

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ICTB
MPCAL



ICTB
Instituto de Ciência e
Tecnologia em Biomodelos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

THAIS VERONEZ DE ANDRADE MARTINS

**AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA PELO TIPO DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL
UTILIZADO POR CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER EM BIOTÉRIO ATRAVÉS DO
SISTEMA DE GAIOLAS INTERLIGADAS (SGI)**

Rio de Janeiro

2017

THAIS VERONEZ DE ANDRADE MARTINS

**AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA PELO TIPO DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL
UTILIZADO POR CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER EM BIOTÉRIO ATRAVÉS DO
SISTEMA DE GAIOLAS INTERLIGADAS (SGI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência em Animais de Laboratório.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Melo de Oliveira

Rio de Janeiro
2017

Martins, Thais Veronez de Andrade.

Avaliação da preferência pelo tipo de enriquecimento ambiental utilizado por camundongos Swiss Webster em biotério através do sistema de gaiolas interligadas (SGI) / Thais Veronez de Andrade Martins. - , 2017.

67 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2017.

Orientador: Gabriel Melo de Oliveira.

Bibliografia: f. 58-65

1. Camundongos. 2. Comportamento Animal. 3. Enriquecimento Ambiental. 4. Sistema de Gaiolas Interligadas. I. Título.


THAIS VERONEZ DE ANDRADE MARTINS

**AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA PELO TIPO DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL
UTILIZADO POR CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER EM BIOTÉRIO ATRAVÉS DO
SISTEMA DE GAIOLAS INTERLIGADAS (SGI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência em Animais de Laboratório.


Aprovada em 18 de dezembro de 2017

Banca Examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. Márcia Cristina Ribeiro Andrade (ICTB/FIOCRUZ)
(Presidente da Banca)


Prof. Dr. Marcel Frajblat (Universidade Federal do Rio de Janeiro)


Prof. Dr. Octávio Augusto França Presgrave (INCQS/FIOCRUZ)


Prof. Dr Gabriel Melo de Oliveira (IOC/FIOCRUZ)
(Orientador)

Rio de Janeiro
2017

Dedicatória

À Anna Beatriz, minha filha, amiga e
companheira de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gabriel Melo de Oliveira, pela dedicação, estímulo, paciência e principalmente por compartilhar comigo o entusiasmo na concretização deste trabalho.

Ao Miguel Ângelo Brück Gonçalves por toda a atenção, conhecimento a mim fornecidos, auxílio técnico e que, com suas críticas e sugestões possibilitaram a elevação da qualidade deste trabalho.

À minha irmã Inah Veronez de Andrade Martins pelo incentivo e apoio em todos os momentos vividos durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação do MPCAL e sua equipe e a todos os colaboradores do Serviço de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (SAL/INCQS) que, no convívio diário, colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À toda minha família pelo companheirismo e compreensão.

À Dra Maria de Nazaré Correia Soeiro, Chefe do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, pelo apoio logístico para os ensaios.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

O camundongo, entre as diferentes espécies, é o mais amplamente estudado na ciência em animais de laboratório e o mais conhecido cientificamente para testes, com os propósitos de ensino e pesquisa biomédica. Dentre as características que o tornam adequado ao uso nas pesquisas científicas pode-se citar o tamanho corporal, a facilidade de manuseio, a prolificidade, o ciclo de vida curto, além da similaridade biológica e genética, que o aproxima do ser humano. Os camundongos machos Swiss Webster (SW-M) apresentam um complexo e variado repertório de comportamentos individuais e sociais. Em relação ao alojamento desses animais em biotério, é primordial o conhecimento do seu comportamento e o uso de enriquecimento ambiental (EA) para elevar a condição de bem-estar e minimizar o estresse durante o período de manutenção e uso dos animais. O objetivo principal desse trabalho é determinar, através da aplicação do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI), a relação entre o comportamento individual e social dos animais e a preferência pelo uso de diferentes tipos de equipamentos/materiais para EA. Através do desenho experimental proposto, busca-se esclarecer a preferência, ou a escolha, dos camundongos SW-M, machos, nas idades infante, jovem e adulto, do tipo de EA, e conseqüentemente, demonstrar a influência no bem-estar na rotina de manutenção desses animais em biotério. Os resultados sugerem que em diferentes idades, os camundongos SW-M, demonstram diferentes tipos de preferência em relação ao tipo de EA oferecido. Os equipamentos/materiais para EA que possibilitam as atividades de abrigo e nidificação são os de maior preferência. A primeira escolha do camundongo é pelo *Igloo*[®], porém demonstra também uma alta utilização do Papel Absorvente. Acredita-se que os dados obtidos possibilitem o refinamento e a eficiência da utilização do EA e a elevação do bem-estar animal.

Palavras-chave: Camundongos, Comportamento Animal, Enriquecimento Ambiental, Sistema de Gaiolas Interligadas.

ABSTRACT

The mouse is the most used animal model during the biomedical assays in laboratory environment. Among the main physiological and behavioral characteristics, we can mention: a) Easy handling; b) Short life cycle; c) prolific nature, moreover, we must highlight the genetic and biological similarity with the human being. The male Swiss Webster (SW-M) mice, outbred stocks, showed, in house facilities, a complex and varied repertoire of individual and social behaviors. We believe that the knowledge of the individual and social behavior of the mice in animal facilities is primordial for the effectiveness of the use of environmental enrichment (EE). Between these reasons, we seek to raise the welfare condition and minimize stress during the period of maintenance and use of the animals. In this work, our main objective was to determine, through the application of the Interconnected Cages System (IGS), the relationship between the SW-M individual and social behavior and EE use and interaction preference between different types of equipment/materials for EE offered. Our methodology is based on the offer of different EE categories: i) Housing; ii) Nesting and iii) Play activity, in each category, through the IGS, we offer two types of material/equipment. In addition, we evaluated the use/interaction at the different ages: 4th week of life (infant); 6th week of life (young) and 8th week of life (adult). The results set, in resume, demonstrate that SW-M mice, in animal facilities (at all ages studied) feature categories of preference for EE relative to the Housing and Nesting categories. In conclusion, the *Igloo*[®] apparatus demonstrate increase percentual of animal use and Absorbent Paper is the material on which the animals showed high index *use/time* interaction. We believe that through the results obtained in this work we can propose new knowledge that may during the routine of animal facilities the raise the mice quality of life and animal welfare.

Keywords: Mice, Animal Behavior, Environmental Enrichment, Interconnected Cages System (IGS).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Breve histórico do uso de enriquecimento ambiental	10
1.2. Princípios éticos, legislação e o uso de enriquecimento ambiental	10
1.3. O comportamento individual e social de Swiss Webster macho em biotério	13
1.4. Utilização do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI) e a determinação da preferência do animal	16
1.5. A importância e o uso do enriquecimento ambiental para camundongos em biotérios	17
1.5.1. Os tipos de enriquecimento ambiental	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
3. JUSTIFICATIVA	22
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo Geral	23
4.2. Objetivos Específicos	23
5. MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1. Animais	24
5.2. Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI)	25
5.3. Esquema de comparação entre os tipos de enriquecimento ambiental	25
5.4. Parâmetros para a determinação da preferência do enriquecimento ambiental pelo Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI)	28
5.4.1. Filmagem	28
5.4.2. Cálculo da preferência pelo enriquecimento ambiental	29
5.4.3. Avaliação do Comportamento	30

5.5. Análises estatísticas	31
6. RESULTADOS	32
6.1. Etapa #1	32
6.2. Etapa #2	44
7. DISCUSSÃO	52
8. CONCLUSÃO	55
9. PERSPECTIVAS	57
10. REFERÊNCIAS	58
11. ANEXO	66
11.1. ANEXO A - Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Breve histórico do uso de enriquecimento ambiental

O termo enriquecimento ambiental (EA), surgido na década de 1920, identificou a importância do ambiente físico e social de animais mantidos em cativeiro, bem como seu impacto no bem-estar (YOUNG, 2003). Segundo Yerkes (1925), se o animal cativo não tiver a oportunidade de exercer seu repertório comportamental natural, ele deve ao menos ter a chance de expressar reações saudáveis diante de invenções e aparatos colocados em seu ambiente.

1.2. Princípios éticos, legislação e o uso de enriquecimento ambiental

As primeiras contribuições para a ciência foram fundamentadas na curiosidade e no empirismo. Ao longo do tempo, a evolução da ciência tornou-se mais detalhada, fazendo-se necessário entender os mecanismos envolvidos em processos fisiológicos e principalmente responder hipóteses através do “Método Científico”. O uso de animais, ou a experimentação animal, tornou-se uma importante “ferramenta” na metodologia científica. Contudo, paralelamente, os animais também foram considerados como seres *sencientes* (capacidade dos seres vivos de sentir sensações e sentimentos de forma consciente). Sendo assim, por exemplo, em 1876, no Reino Unido surgiram as primeiras regulamentações de proteção aos animais como o *Cruelty to Animals Act* (BRAGA, 2009).

Desde então, ocorreu a criação de outras organizações de proteção aos direitos dos animais em inúmeros países. Conseqüentemente, a sociedade científica começou a ter consciência de que era preciso desenvolver condutas éticas e cuidados para com os animais, usá-los para fins bem justificados, com retorno a melhoria da condição de vida para o ser humano ou as diversas espécies animais (BRAGA, 2009).

Em 1959, durante a reunião anual da Associação Americana para Ciência de Animais de Laboratório, foi dado um importante passo em relação ao bem-estar animal, com a

apresentação do trabalho denominado “*The Principles of Humane Experimental Technique*”, descrito pelo zoologista William M. S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch, no qual buscaram trazer mais “humanismo” às técnicas de experimentação. O princípio dos 3 R’s como ficou conhecido, por sua grafia em inglês das palavras *Replacement*, *Reduction* e *Refinement* (Substituir, Reduzir e Refinar). Em resumo, esses princípios propõem a adoção de medidas para o uso de animais em experimentação, tais como, a busca e aplicação de métodos alternativos que, por fim, substitua os testes *in vivo*, a redução do número de animais utilizados nos ensaios e o refinamento de técnicas, minimizando a dor ou sofrimento do animal, visando à melhora do seu bem-estar (BRAGA, 2009; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004; PETROIANU, 1996).

Em 1964, a publicação da obra *Animal Machines*, de Ruth Harrison, causou comoção e indignação ao descrever os maus-tratos a que eram submetidos os animais criados e mantidos em confinamento. O impacto desta publicação gerou grande mobilização dentro do Parlamento Britânico, e resultou na criação do *Brambell Committee* (BRAMBELL, 1965), sob a liderança do médico veterinário Francis William Rogers Brambell, para avaliar o bem-estar dos animais de produção, elaborando sugestões para melhorias zootécnicas na criação e manejo desses animais (MASSARI, 2014; MOREIRA, 2015).

O Parlamento Inglês instituiu, em 1979, o Conselho de Bem-Estar de Animais de Produção (FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL – FAWC), que teve suas diretrizes baseadas nas cinco liberdades mínimas que todo animal deveria ter, uma ferramenta para mensurar o bem-estar animal, que inicialmente foi formulada para os animais de produção, mas que vem sendo ampliada para outros modelos animais, as quais foram reformuladas em 1993 e atualmente são: 1-) Liberdade nutricional ou Liberdade de sede, fome e má-nutrição; 2-) Liberdade sanitária ou Liberdade de dor; 3-) Liberdade de desconforto ou Liberdade ambiental; 4-) Liberdade comportamental ou Liberdade para expressar comportamento natural 5-) Liberdade psicológica ou Liberdade de medo e estresse (DEGUCHI, 2013; FAWC, 1993).

No Brasil, a primeira norma legal a fazer referência ao uso de animais com interesse para a ciência foi o Decreto nº 24.645 de 1934 (BRASIL, 1934), que determinava a tutela pelo estado de todos os animais existentes no país e definia como condutas de maus-tratos os atos de crueldade, violência e trabalhos excessivos, a manutenção do animal em condições anti-higiênicas e o abandono (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016; REZENDE; PELUZIO; SABARENSE, 2008). Em 1941, grande avanço foi dado com o Decreto-Lei nº 3.688, Lei das Contravenções Penais (BRASIL, 1941), que previa pena para a prática da crueldade animal, independentemente da finalidade didática ou científica (CARDOSO, 2009;

GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016). Posteriormente outras legislações foram aprovadas, como a Lei nº 5.197 de 1967, Lei de Proteção à Fauna (BRASIL, 1967a), e o Decreto-Lei nº 221/1967, Código de Pesca, (BRASIL, 1967b), mas nenhuma tratou especificamente do tema “experimentação animal com finalidade didática ou científica” (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016).

No ano de 1979, pela Lei nº 6.638, Lei da Vivisseção, (BRASIL, 1979), foram estabelecidas as Normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais, entretanto esta nunca foi regulamentada (CARDOSO, 2009). Dez anos após, a Constituição Federal de 1988, pelo artigo 225, incumbe à coletividade e ao Poder Público proteger a fauna e a flora, vedando práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção de espécies ou submetam os animais à crueldade (BINSFELD, 2017; BRASIL, 1988). Em 1991, procurando orientar a conduta dos profissionais envolvidos com a utilização de animais em pesquisa, o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), criado em 1983, atualmente a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), instituiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal, postulando 12 Artigos (CARDOSO, 2009; REZENDE; PELUZIO; SABARENSE, 2008).

Atualmente em vigor, a Lei nº 9.605 de 1998, Lei de Crimes Ambientais (BRASIL, 1998), regulamentada pelo Decreto nº 3.179 de 1999 (BRASIL, 1999), em seu Artigo 32 estabelece que é crime praticar atos abusivos, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos ou para quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos (BINSFELD, 2017).

Porém o marco na ciência em animais de laboratório (CAL) foi alcançado, após 12 anos tramitando no Congresso Nacional, pela aprovação da Lei Arouca, nº 11.794 de 08 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008; CONCEA, 2016), regulamentada pelo Decreto nº 6.899 de 2009 (BRASIL, 2009). Através dessa lei foi estruturado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), regulamentada a constituição de Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) e criado o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA); condições indispensáveis para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais de laboratório.

Em 29 de setembro de 2015 a Resolução Normativa (RN) nº 25 que descreve o capítulo “Introdução Geral” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (BRASIL, 2015; CONCEA, 2016) e a RN nº 30, de 02 de fevereiro de 2016, que determina a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Uti-

lização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), na qual apresenta os princípios e as condutas que permitem garantir o cuidado e o manejo eticamente correto de animais produzidos, mantidos ou utilizados em atividades de ensino ou de pesquisa científica no Brasil (BRASIL, 2016a; CONCEA, 2016). Por fim, a RN nº 33, de 18 de novembro de 2016, que propõe o capítulo "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, no qual descreve e orienta sobre estratégias de EA em biotérios, tais como cuidados a serem considerados para o EA e sugestões de EA para roedores e lagomorfos (BRASIL, 2016b).

1.3. O comportamento individual e social de Swiss Webster macho em biotério

O camundongo usado em biotérios é um mamífero da Classe *Mammalia*, da Ordem *Rodentia*, da Família *Muridae*, da Sub-família *Murinae*, e do Gênero *Mus*. O seu nome científico é *Mus musculus* (SANTOS, 2002). Esse animal caracteriza-se por ser uma espécie cosmopolita adaptada a uma grande variedade de condições ambientais (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Possui corpo coberto de pelos, fusiforme e extremamente flexível, o que permite sua passagem em pequenos espaços. Cauda sem pelos que pode atingir comprimento maior do que o corpo, e orelhas eretas arredondadas também desprovidas de pelos (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007; MOREIRA, 2015). Apresentam hábitos noturnos, acomodando-se em qualquer local de tamanho apropriado às suas necessidades. Manifestam a maioria dos seus comportamentos reprodutivos e sociais no escuro e, também comportamentos característicos da espécie muito expressivos como a confecção de ninho e o alojamento em tocas (ALCOCK, 1993; GRAEFF, 1999; KO; DE LUCA, 2009; SUCKOW; DANNEMAN; BRAYTON, 2001).

O Swiss Webster é originário do estoque de camundongos do Dr. Leslie Webster, em 1926, no Instituto Rockfeller. O seu desenvolvimento se deu pela redução para um único par e progênie não isogênica pela *Carworth Farm* tendo como denominação genotípica CFW (SW). Em todos os estudos aqui presentes foram utilizados camundongos *outbred* machos Swiss Webster (SW-M) provenientes do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB-

FIOCRUZ)¹, na qual as matrizes foram adquiridas da *Taconic Biosciences* (genótipo SW-M, machos e SW-F, fêmeas) originária do Instituto Rockfeller através da *Rockland Farms* que criavam esses animais desde 1940 (CAMPOS et al., 2016). Geneticamente, o camundongo SW, pode ser citado como um grande exemplo de heterogenia, onde a adoção do manejo reprodutivo visa manter a variabilidade genética sem alterar o perfil genético da colônia, com alta porcentagem de heterozigose entre seus alelos. Os heterogênicos são animais distintos entre si e são os que melhor mimetizam a variabilidade genética da população humana típica (NOMURA, 2000). Para que sejam mantidos corretamente, não se deve ultrapassar 1% de consanguinidade por geração, utilizando-se sempre o cruzamento de animais sem parentesco entre si (BENAVIDES; GUENÉT, 2003). Dessa forma, a variabilidade genética será diretamente relacionada à variação do comportamento individual e social desses camundongos, os quais não podem ser chamados de linhagem, pelo fato de não serem geneticamente definidos (MASSIRONI; GODARD, 2017).

Durante 4 anos, o grupo de trabalho dos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos (LBC/LITEB – IOC), estudou o comportamento de camundongos SW-M no Biotério de Experimentação Animal. Os resultados possibilitaram afirmar que esses animais demonstram um complexo repertório de comportamento individual e social (KO; DE LUCA, 2009; OLIVEIRA et al., 2015). As principais atividades realizadas por esses animais em biotério foram; a busca por alimento, exploração do ambiente (*rearing*), repouso, auto-higienização (*self-grooming*) e a procura pelo contato físico entre os indivíduos. A frequência destas atividades apresentou variações entre os grupos e entre as idades infantos, jovens e adultos (CHUMBINHO et al., 2012; DEFENSOR et al., 2012; HAMILTON et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2013). Desde o agrupamento ao desmame (3ª semana de vida) até a 8ª semana de vida (sdv), de forma geral, não foi observado claramente uma estrutura hierárquica bem definida, sugerindo uma relação fraternal entre os indivíduos (CAMPOS et al., 2016; KUZEL et al., 2013), com baixo ou ausente padrão de comportamento agressivo (PCA) (OLIVEIRA et al., 2015). Apesar de serem relativamente tranquilos à manipulação, esses animais, podem ser altamente agressivos, principalmente no reagrupamento de machos adultos. A incidência e a intensidade desta agressividade foram variáveis. Observou-se que em 10% dos reagrupamentos de machos em idade adulta, não houve nenhum tipo de PCA, 60% apresentaram intensidade baixa a moderada e que em 30% dos reagrupamentos ocorreram alta agressividade. Em relação à faixa de animais que apresentam

¹ Antigo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL – FIOCRUZ).

alta agressividade (30%), apenas 4 a 6% dos indivíduos reagrupados exerceram sua dominância através de lutas e mordidas, conseqüentemente ferindo a população de subordinados (70%) (BATISTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Através do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI) foi possível detalhar um pouco mais esta estrutura. Foi observado que há presença de dominantes e subordinados, porém, dentre estes subordinados, há indivíduos que são disputantes a dominância e envolvem-se em eventos agressivos e indivíduos, que chamamos de “neutros”, que se subordinam, não disputam a dominância e buscam não se envolver nos eventos agressivos. Outra categoria que chama a atenção que é o “subordinado alvo” que sofre quase 90% das agressões do dominante e demonstra lesões significativas. A tendência é acreditar que este animal ocupa a posição mais inferior da escala social, pelos resultados apresentados pelo referido grupo, por sua presença ser uma ameaça permanente ao dominante (CAMPOS et al., 2016; KUZEL et al., 2013). O grupo acredita que o objetivo do dominante está relacionado ao seu instinto primitivo, obedecendo principalmente à seleção sexual. Observou-se também que o dominante busca uma área exclusiva para sua permanência, isolando o restante do grupo para outra área. Comparando outros animais sociais, sugere-se que esta atitude está relacionada ao acesso a alimentação e também a reprodução, pois estabelecendo seu território sem oponentes facilitaria seu acasalamento, no caso do surgimento de alguma fêmea. Este territorialismo torna-se evidente quando há o estabelecimento definido do indivíduo dominante e ausência (observável) de disputantes agressivos (BUSS, 1982; OLIVEIRA, 2012; WINSTON, 2006). É relevante também discutir que durante o processo de disputa e troca de dominantes, há preferência do indivíduo pela área de passagem, pois possibilita a observação de todos os indivíduos e encontrar mais facilmente o “subordinado alvo”. Além disso, apesar da exclusividade da área para o acesso à alimentação, o estabelecimento da dominância é uma situação estressante para todo o grupo, principalmente para o dominante. Em todos os casos, observou-se que o dominante e o disputante (mais ativo) demonstram perda de peso, assim como em fases de maior agressividade dentro do grupo. Por exemplo, quando não há uma aceitação completa do dominante. Quando há esta aceitação, tanto o dominante quanto os demais componentes do grupo apresentam ganho de peso (KUZEL et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

Ressalta-se que dentro do percentual da população de subordinados, aproximadamente 30% dos indivíduos são possíveis disputantes a dominância e que 40% não se envolvem, não agredem e nem são agredidos; denomina-se essa categoria de neutra. Então, através das observações do grupo, sugere-se uma estrutura hierárquica dinâmica, em relação ao tempo de agrupamento, e composta de: 1) *Dominante*: apenas um animal, com diferentes níveis de agressi-

vidade; 2) *Subordinados disputantes*: número variável de animais agressores / agredidos que buscam a dominância do grupo; 3) *Subordinados neutros*: animais que não se envolvem nos episódios agressivos e 4) *Subordinados alvos*: que sofrem 20 a 30% do total de agressões do dominante (CAMPOS et al., 2016).

1.4. Utilização do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI) e a determinação da preferência do animal

Atualmente, a preocupação com o bem-estar animal demonstra-se de alta relevância, principalmente em relação ao uso de animais na experimentação científica (CLARK; RAGER; CALPIN, 1997). Tornar o ambiente físico e social de animais em biotério mais complexo ou mais próximo do natural é um meio amplamente reconhecido para aumentar o bem-estar. Com relação aos animais de laboratório, é importante que o ambiente de alojamento seja estudado e melhorado, não apenas para aumentar o conforto desses animais, mas também para assegurar que resultados científicos confiáveis e de boa qualidade sejam obtidos (SHERWIN, 2004).

Conforme descrito por Kuzel et al. (2013), os testes de preferência também podem contribuir para uma avaliação do potencial de escolha do animal, conseqüentemente da busca pelo seu bem-estar. No momento em que o animal tem a possibilidade de manifestar sua preferência, a avaliação do estado de bem-estar deixa de ser externa e passa a emergir do próprio animal, ou seja, sua escolha reflete seu estado interno que é, então, assumido como seu estado de bem-estar num determinado momento.

A preferência do animal por uma determinada situação ou objeto é quantificada em termos de tempo ou frequência de escolha (MATTARAIA, 2009). É importante ressaltar que, alguns cuidados na interpretação destes testes devem ser levados em consideração como, por exemplo, o número de opções a que o animal terá acesso, quantificação e intensidade da preferência, ritmo biológico, *status* social, entre outros, como forma de se evitar conclusões equivocadas (VOLPATO, 2007).

Contudo, o uso de gaiolas convencionais para a manutenção de camundongos em biotério impossibilita o animal de expressar os diferentes repertórios do seu comportamento, principalmente o de escolha ou preferência, devido à restrição de espaço (MEDINA, 2011).

Neste trabalho foi utilizado o SGI, equipamento desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, que consiste num aparato que liga duas gaiolas convencionais de policarbonato por conexões hidráulicas de policloreto de vinila (PVC), no tamanho a permitir a passagem de um camundongo adulto. Dessa forma torna-se uma ferramenta útil para avaliação comportamental de camundongos em biotério, pois não interfere no manejo, fisiologia ou bem-estar animal e em associação com parâmetros comportamentais, principalmente do agrupamento e a estruturação de um detalhado etograma, possibilita aos animais demonstrarem sua escolha ou preferência pelos diversos tipos de interação e formação da estrutura social, espaço físico, escolha de parceiros e especificamente, no presente trabalho, os tipos de equipamentos/materiais para o EA oferecidos (KUZEL et al., 2013).

1.5. A importância e o uso do enriquecimento ambiental para camundongos em biotérios

Em 1912, o comerciante e treinador de animais selvagens, Carl Hagenbeck, divulgou na literatura, um dos primeiros relatos de enriquecimento ambiental, quando descreveu a criação de recintos naturais para animais mantidos em restrição de espaço com plantas similares às dos seus ambientes naturais, o que foi denominado como enfoque naturalístico para o manejo com animais silvestres. Desta forma, para que os animais selvagens estivessem bem adaptados à vida em restrição de espaço, deveriam ser inseridos em cenários paisagísticos próximos à sua origem natural (GONÇALVES et al., 2010).

O psicólogo canadense Donald O. Hebb, na década de 40, observou que animais criados em ambientes ricos, ou seja, com variedade de elementos e configurações espaciais, posteriormente, apresentavam claramente habilidade superior de aprendizagem, comparativamente a outros animais criados em ambientes menores e não enriquecidos (MATTARAIA, 2009). Marian Diamond e seus colaboradores, em 1964, retomaram as observações de Donald O. Hebb e demonstraram anatomicamente algumas diferenças cerebrais entre os roedores criados com ou sem enriquecimento (MATTARAIA; OLIVEIRA, 2012).

O EA é uma abordagem para melhorar as condições de alojamento e que tem sido o foco de diversos estudos (MEDINA, 2011), o qual é um dos principais fatores que influencia o bem-estar animal e pode ser conseguido por meio de dispositivos artificiais ou de controle

de ambiente (RIVERA; RODRIGUES, 2009). Na década de 70 a proposta de enriquecimento de ambientes para animais em restrição de espaço, foi empregada nos zoológicos e aos poucos foi sendo levada aos laboratórios, como um meio de aumentar o bem-estar dos animais de experimentação. O principal objetivo do EA é proporcionar aos animais em restrição de espaço um ambiente rico em estimulação sensorial, que pode ser criado de diversas formas, (MATTARAIA, 2009), permitindo a expressão dos comportamentos naturais e típicos da espécie (MATTARAIA; OLIVEIRA, 2012). De acordo com Newberry (1995), o EA deve promover a melhoria da qualidade do ambiente em restrição de espaço, para que o animal tenha opções de escolha de atividade e certo controle sobre seu contexto social e do ambiente espacial. Young (2003) considerou que o enriquecimento deve propiciar aos animais a estimulação sensorial e motora, promovendo bem-estar psicológico por meio de exercícios físicos, atividades cognitivas e desafios, considerando as características da espécie.

Muitos autores concordam que uma das metas do enriquecimento do ambiente é diminuir a incidência de comportamentos anormais (estereotipados) e aumentar o desempenho de comportamentos normais ou comportamentos específicos para a espécie, porém para que isso seja alcançado é preciso que, antes da introdução de qualquer tipo de enriquecimento, alguns aspectos devem ser identificados, dentro dos quais podemos citar o ambiente social (espécie, linhagens, sexo, idade, proximidade a outras espécies e de seres humanos), ambiente físico consistindo de estímulos sensoriais (auditivo, visual, olfativo e tátil), aspectos nutricionais (hábitos alimentares, oferta e tipo de alimento), entre outros. (MATTARAIA, 2009).

Os estudos comportamentais que envolvem o uso de EA são realizados com a elaboração de um etograma e análises dos comportamentos dos animais em três momentos diferentes, antes, durante e depois da oferta do enriquecimento (GONÇALVES et al., 2010), quantificando-se as alterações nas respostas como consequência ao EA introduzido. A avaliação pode ser feita através da observação dos animais em suas gaiolas, aplicando os testes de preferência, testes comportamentais e fisiológicos (MATTARAIA, 2009). Um etograma é como uma “impressão digital” comportamental que compila uma lista de ações e comportamentos detalhadamente descritos e classificados em categorias (instinto, aprendizado, comportamento agressivo, territorial, reprodutivo, alimentar, social e de defesa), com significado funcional (DIXON; FISCH, 1998) e podem ser utilizados para avaliar o impacto e mudanças causados pelo enriquecimento. Uma vez que o comportamento natural é definido, comportamentos anormais podem ser identificados e sua relevância considerada. Um comportamento normal ou anormal pode ser definido como qualquer comportamento aprendido com função de promoção da saú-

de, sobrevivência e reprodução de um animal em um determinado ambiente (KEELING; JENSEN, 2002)

Segundo Mattaraia (2009), a implantação do EA para roedores mantidos em biotérios tem sido recomendada e pode prover uma maior capacidade de aprendizagem, plasticidade cerebral e sucesso reprodutivo, além de melhorar o estado de saúde e desempenho corporal, porém apesar desses benefícios, é necessário avaliar as respostas dos animais frente aos estímulos oferecidos antes de introduzir um programa de EA.

1.5.1. Os tipos de enriquecimento ambiental

A escolha do tipo de EA utilizado depende de uma série de fatores, tais como estrutura do alojamento, idade, sexo, histórico dos animais, rotina do biotério e propósito da intervenção (BOERE, 2001; MEEHAN; MENCH, 2007). Portanto, o uso do enriquecimento deve, antes de tudo, estabelecer uma meta a ser atingida com a implantação desse manejo, a fim de determinar qual tipo de enriquecimento irá aplicar, pois sem direcionamento do EA pode apresentar resultados pouco satisfatórios. A habituação e a extinção são importantes fatores que influenciam na resposta aos enriquecimentos e requerem uma atenção especial. Elas podem ocorrer quando um mesmo estímulo é apresentado diversas vezes ou durante muito tempo, perdendo seu caráter de novidade, conseqüentemente decrescendo gradativamente a taxa de interação, até o animal acostumar-se com a presença do estímulo (GONÇALVES et al., 2010).

Segundo Mattaraia e Oliveira (2012), em relação aos animais de laboratório, as principais técnicas aplicadas para enriquecimento, são as modificações na estrutura das gaiolas ou em seu entorno, possibilidade de interação social, disposição de objetos dentro das gaiolas, criando complexidade ambiental e opção de escolha, aplicação de mudanças na forma de alimentação e estratégias para entretenimento dos animais, como os exercícios físicos. Visando chamar atenção para a diversidade das áreas de enriquecimento, essas técnicas costumam ser divididas, em categorias, porém tais divisões devem ser utilizadas com cuidado, a fim de evitar que as categorias se sobreponham.

O EA pode ser dividido em cinco categorias: i) enriquecimento físico que tem como objetivo reduzir, na medida do possível, as condições deficitárias da restrição de espaço, por

meio de mudanças nos elementos que compõem o ambiente físico, com a introdução de objetos de distração, ou na sua estrutura; ii) cognitivo que tem como objetivo proporcionar situações motivadoras por meio de desafios ou jogos com consequências recompensadoras (GONÇALVES et al., 2010); iii) alimentar que consiste na manipulação da forma com que é oferecido o alimento, bem como alterações da dieta, dos horários e da frequência de alimentação (HONES; MARIN; 2006); iv) sensorial que pode abranger qualquer um dos cinco sentidos. Estímulos visuais, auditivos e olfativos externos, são eficientes na melhora do bem-estar animal (GONÇALVES et al., 2010); e v) enriquecimento social que inclui a socialização dos animais, com contato intra-específico, o qual consiste no alojamento, de espécies gregárias, em grupos ou pares, de maneira harmoniosa, temporária ou permanentemente (BAUMANS, 2005), pois se alojadas individualmente serão privadas de expressar seus comportamentos sociais típicos (STEWART, 2004) ou interespecífico (humano, não-humano) (BAUMANS, 2005).

Apesar de todos os benefícios que o enriquecimento ambiental pode trazer aos animais que vivem em restrição de espaço, é difícil, talvez impossível, simular condições naturais de vida, sem trazer riscos para a saúde destes animais (PORTELLA, 2000). Por isso o uso do EA deve considerar algumas questões como: a-) materiais que sejam livres de toxinas e que permitam processos de descontaminação e esterilização, evitando que se tornem fontes de contaminação para os animais; b-) materiais que sejam certificados ou resistentes às espécies as quais se destinam e c-) materiais que sejam adequados à fase de desenvolvimento em que se encontra o animal (MATTARAIA, 2009).

Vale ressaltar que deve-se evitar a improvisação e o uso de materiais inadequados, pois podem causar ferimentos ou até mesmo levar os animais a óbito. O enriquecimento não deve ser apenas estimulante para os animais, mas também deve ser administrável, ou seja, de fácil implantação, remoção, limpeza e substituição. Viabilizando o trabalho da equipe do biotério, motivando e criando à vontade, em busca da melhoria contínua do EA (MATTARAIA, 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Através da busca por referências relativas ao uso dos camundongos e o EA no sítio de publicações indexadas *PubMed*, constatou-se que a palavra chave *mice* apresenta 1.479.919 artigos publicados. No entanto, quando se relaciona as palavras chaves: *mice and environmental enrichment*, apenas 1.057 publicações estão relacionadas a esse assunto específico (Outubro de 2017). Acredita-se que esses dados sejam importantes para que se possa ilustrar o quanto a área de comportamento e EA em camundongos pode ser explorada pelos pesquisadores da área de ciência em animais de laboratório.

Podemos afirmar que em relação ao EA além de possuir uma pequena fonte de conhecimento sobre a utilização para camundongos, os estudos não detalham a relação entre o seu comportamento individual e social, os hábitos alimentares, alojamento, acasalamento e o eficiente uso dos diversos tipos de EA. Sendo assim, nosso grupo de pesquisa considera que essa abordagem possa ser uma importante fonte de conhecimento para a literatura atual e considera o caráter inédito da hipótese de pesquisa do projeto. O trabalho não infere ou sugere, nem tanto induz ou adapta conhecimentos e equipamentos para o enriquecimento do ambiente no qual são mantidos os camundongos. O eixo principal do projeto foi “perguntar” ao camundongo o que ele prefere. Então essa pergunta se tornou a hipótese de trabalho e a “resposta” dos animais irá se tornar os resultados, que serão posteriormente analisados e discutidos, para somente então podermos concluir, dentro das condições operacionais e de rotina, qual o melhor tipo de EA oferecido ao camundongo Swiss Webster.

Essa “pergunta” foi baseada no uso do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI). O uso desse sistema em associação com os parâmetros comportamentais, principalmente a filmagem do agrupamento e a estruturação de um detalhado etograma, considera-se que este possibilite aos animais demonstrar a sua preferência pelos tipos diferentes de EA oferecidos, ou seja, “respondendo” a hipótese e os objetivos específicos desse projeto (KUZEL et al., 2013).

3. JUSTIFICATIVA

“Qual seria o melhor tipo de EA para camundongos SW-M em biotério?”

A ideia principal para a elaboração e execução dessa dissertação é a busca por novos conhecimentos relacionados ao comportamento, hábitos e atitudes individuais e sociais de camundongos mantidos em biotérios, que possam ser relacionados ao tipo de EA oferecido durante a rotina de manejo do animal. A hipótese do trabalho baseia-se no fato de que o uso de gaiolas convencionais para a manutenção de camundongos em biotério impossibilita o animal expressar diferentes repertórios do seu comportamento através da restrição do espaço. Além disso, não possibilita ao animal o comportamento de escolha ou preferência. Essa preferência, nesse trabalho está relacionada à determinação do melhor tipo de EA a ser oferecido para o animal. Espera-se que nessa abordagem seja possível esclarecer se o EA é uma importante forma de manejo para elevar o bem-estar dos animais usados em laboratório. Esse fato pode ser comprovado em primatas não humanos, tanto em laboratório, como comumente utilizado em gaiolas de animais mantidos em restrição de espaço (zoológicos). Porém qual seria o EA mais adequado para camundongos Swiss Webster machos em biotério? Haveria diferença entre a preferência do camundongo por certo tipo de EA para a idade de infantes e outro para adultos? Acredita-se que o uso do SGI possa esclarecer essas questões. Dessa forma, esse trabalho justifica-se através da elaboração de um sistema (equipamento) que não interfere no manejo, fisiologia ou bem-estar do animal e possibilita ao animal demonstrar sua escolha ou preferência na utilização de diversos tipos de materiais de EA. Concluindo, espera-se que com a utilização do SGI, seja possível ao final sugerir, de forma técnico / científica, novos conhecimentos que poderão influenciar diretamente num melhor manejo de agrupamento e na utilização otimizada dos equipamentos e materiais disponíveis para o EA.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Através da utilização do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI) definir a preferência de diferentes tipos de EA oferecidos a camundongos Swiss Webster machos em biotério.

4.2. Objetivos Específicos

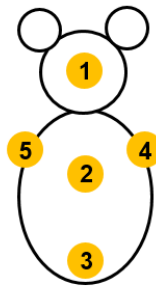
- Determinar pelo uso do SGI a preferência dos animais em relação a diferentes objetos de EA, como equipamentos dos seguintes tipos: a-) abrigo (*Igloo*[®] e túnel de PVC), b-) materiais para nidificação (papel absorvente e touca cirúrgica) e c-) objetos para atividades lúdicas (tubo com guizo e bola com guizo);
- Avaliar a relação entre as diferentes idades: i) infante (4^a semana de vida); ii) jovem (6^a semana de vida) e iii) adulto (8^a semana de vida) na escolha, ou preferência, pelo tipo e objeto de EA oferecido;
- Propor um esquema de uso dos equipamentos e materiais preferidos pelos animais (considerando as suas diferentes idades) durante a rotina de manutenção de camundongos Swiss Webster machos em biotério.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), Swiss Webster, machos, provenientes do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ)² em diferentes idades: a) infantos (3 semanas de vida); b) jovens (5 semanas de vida) e adultos (7 semanas de vida), perfazendo um total de 90 animais para todos os ensaios. Estes foram recebidos e mantidos, em estante ventilada de 2 portas, da marca Alesco, em grupos de 5 animais por gaiola, no Biotério de Experimentação Animal dos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos do Instituto Oswaldo Cruz, sob condições de temperatura ($23\pm 3^{\circ}\text{C}$), umidade ($55\pm 10\%$), fotoperíodo (ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro), e trocas de ar (15 a 20 por hora), controlados. Além disso, foi oferecido água e ração *ad libitum*. Os camundongos foram individualmente identificados através da marcação temporária por uma solução de ácido pícrico/*Bouin*, conforme o Esquema 1. Todos os procedimentos descritos nesse projeto estão em conformidade com os princípios éticos, legislação nacional vigente e, aprovados pela Licença CEUA/IOC: L-004/16 (ANEXO A).

Esquema 1: Identificação individual de camundongos.



² Antigo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL – FIOCRUZ).

5.2. Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI)

O SGI foi desenvolvido através da ligação entre duas gaiolas pequenas de policarbonato (15x30x15 cm) por conexões hidráulicas de policloreto de vinila (PVC) no tamanho a permitir a passagem de um camundongo adulto. Estas gaiolas foram divididas em área A e área B. Em três diferentes SGIs, foi testada cada combinação de tipos de EA, concomitantemente em animais com três diferentes idades. De forma detalhada, por exemplo, na Combinação 1 – C1 (abrigo) foram utilizados três SGIs, um para cada grupo: i-) G1 – infantos; ii-) G2 – jovens e iii-) G3 – adultos. Na área A de cada SGI foi inserido o *Igloo*[®] e na área B colocado o túnel de PVC em todos os Grupos (Figura 1). Nas outras Combinações – C2, C3, C4, C5 e C6, foi utilizado o esquema similar. A partir desse sistema foi possível avaliar, para cada Grupo de animais (idades), a preferência pelo uso do tipo de EA oferecido, pela sua interação com o material/equipamento na área A ou área B do SGI.



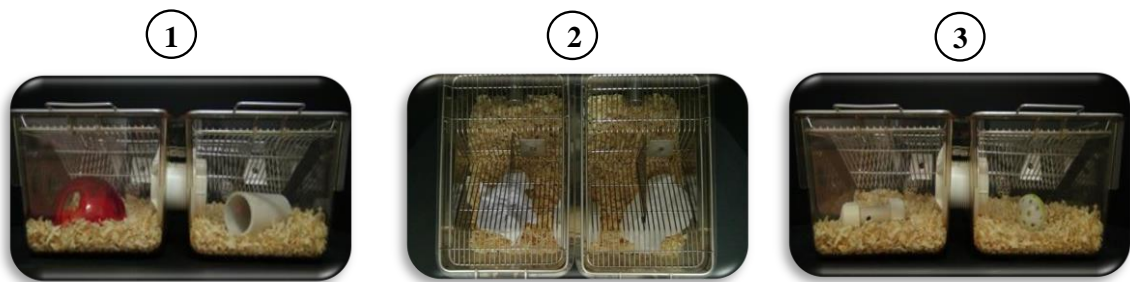
Figura 1: *Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI)*. Ilustração do SGI demonstrando a estruturação de duas áreas de preferência. Em relação a categoria abrigo, na área A, foi inserido o *Igloo*[®] e na Área B, inseriu-se o túnel de PVC. A conexão de PVC possibilitou ao camundongo se deslocar entre as duas áreas e através do desenho experimental proposto, tornou possível a mensuração da preferência do equipamento/material de EA pelos animais.

5.3. Esquema de comparação entre os tipos de enriquecimento ambiental

A preferência dos animais pelos tipos de EA foi inicialmente estruturada através da seleção das seguintes categorias: i-) abrigo: uso do *Igloo*[®] vs túnel de PVC; ii-) nidificação: uso de papel absorvente vs touca cirúrgica e iii-) atividade lúdica: uso do tubo com guizo vs bola

com guizo. Posteriormente, para a avaliação do etograma, também foi utilizado por meio do mesmo esquema um conjunto de Grupos (G1, G2 e G3) no qual não foi inserido nenhum tipo de EA no SGI (Controle Negativo). Então o desenho experimental foi estruturado conforme demonstrado abaixo.

Etapa #1
Combinações



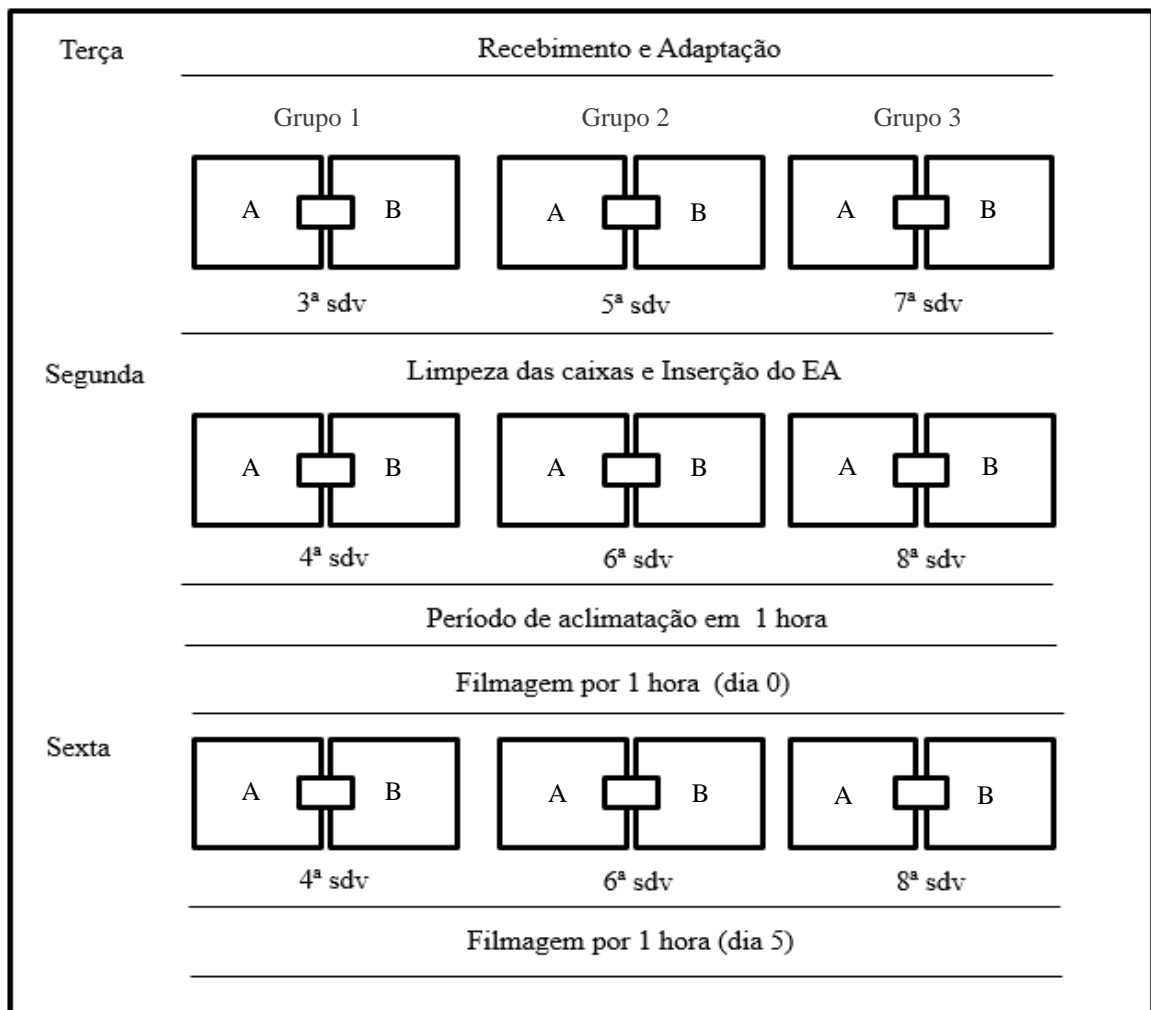
Combinação	Grupos	Área A	Área B
1	G1, G2 e G3	<i>Igloo[®]</i>	Túnel de PVC
2	G1, G2 e G3	Papel Absorvente	Touca Cirúrgica
3	G1, G2 e G3	Tubo com Guizo	Bola com Guizo

Etapa #2
Combinações

Combinação	Grupos	Área A	Área B
4	G1, G2 e G3	<i>Preferido C1</i>	<i>Preferido C2</i>
5	G1, G2 e G3	<i>Preferido C2</i>	<i>Preferido C3</i>
6	G1, G2 e G3	<i>Preferido C3</i>	<i>Preferido C1</i>

Conforme o Esquema 2, foram recebidos animais com 3, 5 e 7 sdv os quais passaram por um processo de adaptação, ao SGI, na ausência de equipamentos / materiais de EA, por uma semana. Na 4^a, 6^a, e 8^a sdv, foram formados três grupos diferentes, dando início à metodologia de avaliação da preferência pelo tipo de EA para uma combinação de cada vez.

Esquema 2: Estrutura do desenho experimental.



5.4. Parâmetros para determinação da preferência do enriquecimento ambiental pelo Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI)

5.4.1. Filmagem

Após o período de adaptação dos animais ao SGI (6 dias), na segunda-feira seguinte, foram introduzidos nas respectivas Áreas do SGI dois tipos de cada categoria de EA, conforme descrito anteriormente nas tabelas de Combinações dos respectivos Grupos. A obtenção dos dados foi realizada por meio da filmagem no interior da estante ventilada, por duas câmeras (Sony HDR - PJ760[®] e Sony HDR - XR550[®]), em plano superior e plano frontal. Essas filmagens foram realizadas no momento da introdução do EA (Dia 0 – Período Inicial) e após 5 dias na sexta-feira (Dia 5 – Período Final). O objetivo desse esquema foi observar a reação do animal no momento da apresentação inicial ao EA e a sua adaptação e uso do mesmo após 5 dias de interação. As filmagens de cada SGI foram realizadas num tempo contínuo, no total de 60 minutos, respeitando sempre o mesmo horário (das 8:00 às 12:00horas).

5.4.2. Cálculo da preferência pelo enriquecimento ambiental

A determinação da preferência pelos tipos de EA oferecidos foi constituída pela análise das filmagens, 1 para cada Combinação, para cada Grupo e para cada animal, ou seja, avaliou-se a interação dos animais Cmdg1, Cmdg2, Cmdg3, Cmdg4 e Cmdg5, individualmente em 60 minutos de filmagem (plano superior). Além disso, esse procedimento foi realizado no período inicial (D0) e no período final (D5) (Figura 2)



Figura 2: Representação da interação dos camundongos ao tipo de EA. Nesse caso utilizou-se como exemplo a categoria abrigo, onde é possível observar, principalmente na Área B um indivíduo utilizando o *Igloo*[®].

Os parâmetros utilizados para o cálculo da preferência dos animais a cada tipo de EA em cada categoria são apresentados na Tabela 1:

Tabela 1: Metodologia para a determinação da preferência pelo EA.

Parâmetros	Metodologia	Objetivo
<i>Uso do EA</i>	Quantificar o número de interação de cada animal ao tipo de EA caracterizado por um período ≥ 5 segundos (Número de Eventos);	Determinar o interesse do animal ao equipamento/material de EA oferecido em valores individuais e percentuais de cada Grupo;
<i>Tempo de Uso do EA</i>	Quantificar o tempo em que cada animal interagiu com o tipo de EA, considerando um período ≥ 5 segundos;	Avaliar a intensidade pelo interesse de uso do animal ao equipamento/material de EA oferecido em segundos para cada indivíduo;
<i>Índice de Preferência</i>	Calcular os valores de uma razão ($IP = \text{Número de eventos relacionado ao uso do EA} / \text{Tempo de uso do EA}$) relacionando o uso e o tempo de uso de cada animal ao tipo de EA.	Determinar a preferência dos camundongos ao tipo de EA oferecido, não somente pela interação ao EA, porém de forma mais completa, ou seja, sua utilização e o tempo de permanência no uso do EA.

5.4.3. Avaliação do comportamento

O etograma foi estruturado para quantificar as principais atividades dos camundongos neste estudo. Essa avaliação foi mensurada por meio das filmagens, determinando-se o percentual (%) de incidência das respectivas atividades: a-) exploração do ambiente (EX); b-) procura por alimento (PA); c-) auto-higienização (AH); d-) repouso (RE) e e-) uso do enriquecimento ambiental (EA) em 60 minutos de filmagem (CHUMBINHO et al., 2012). O objetivo da avaliação das atividades dos camundongos no SGI foi comparar se a presença do EA (em relação ao SGI Controle Negativo) poderia interferir, ou comprometer a execução dos hábitos e o comportamento individual e social dos animais, o que seria indesejado conforme

sugerido na RN nº 33 do CONCEA (BRASIL, 2016b). A figura 3 ilustra as principais atividades quantificadas no etograma.

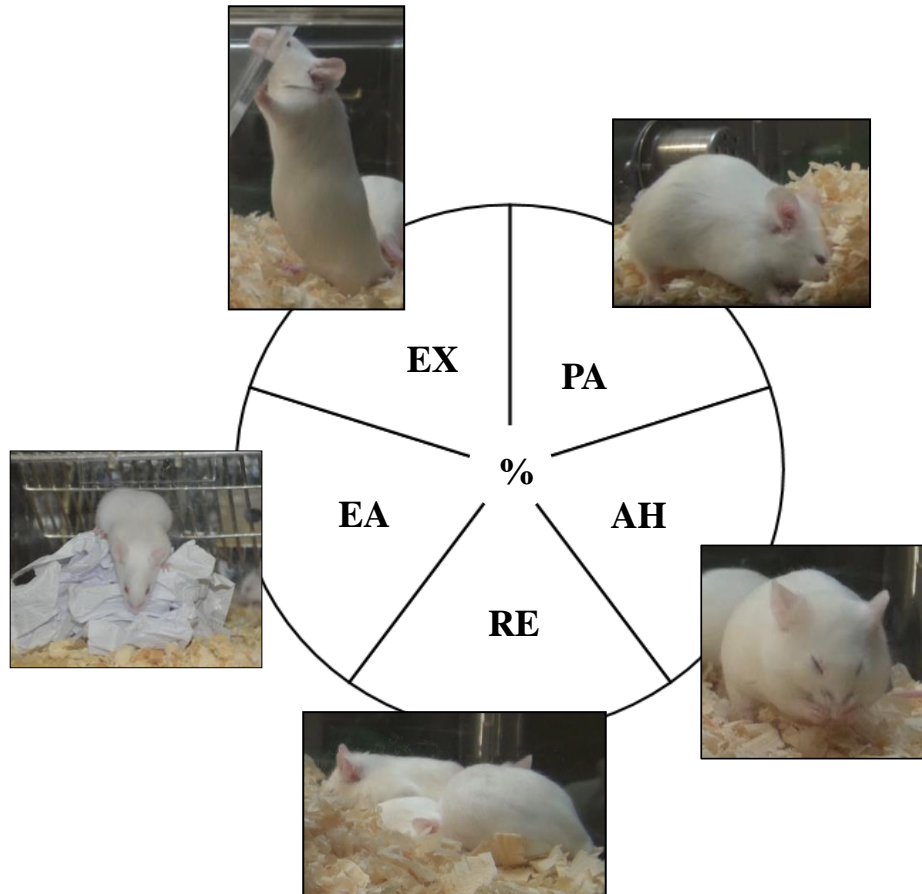


Figura 3: Metodologia de quantificação da incidência de atividades do etograma. Através da análise da filmagem, num período total de 60 minutos, quantificou-se a incidência, num total percentual de atividade, dos respectivos comportamentos que compuseram o etograma. EX: exploração do ambiente; PA: procura por alimento; AH: auto-higienização; RE: repouso e EA: uso do enriquecimento ambiental.

5.5. Análises estatísticas

A coleta dos dados e o processamento dos resultados foram realizados através dos programas Excel e Prisma para realização das operações matemáticas de soma, média, percentual e o desvio padrão ($\pm DP$) de todos os dados obtidos. Definiu-se como fator de significância ($P \leq 0,05$) sob o teste estatístico *T student*. Esses resultados foram confirmados através da aplicação do teste estatístico não paramétrico *Mann Whitney* com o mesmo valor de significância.

6. RESULTADOS

Os resultados indicaram qual a preferência pelo tipo de EA em camundongos machos Swiss Webster, na idade de infante, jovem e adulto. Para estruturar o desenho experimental, foram definidas três categorias (abrigo, nidificação e atividade lúdica) e com dois equipamentos/materiais diferentes de EA para cada categoria. Para responder à pergunta principal do projeto, foi utilizado o SGI, determinando (prioritariamente) em cada Combinação o uso (interação) e o tempo de uso de cada animal, em diferentes idades.

6.1. Etapa #1

Na Etapa#1, a Combinação 1 – C1 foi destinada a avaliação dos tipos de EA relacionadas a categoria de abrigo. No SGI, a área A, foi inserido o *Igloo*[®] e na B o túnel de PVC e as diferentes idades formaram os Grupos: G1 (4^a sdv), G2 (6^a sdv) e G3 (8^a sdv). A figura 4 mostra o uso do tipo de EA através do número de eventos de interação de cada animal e o tempo que o respectivo animal utilizou o EA.

Os camundongos infantes (Fig. 4A) quando apresentados ao *Igloo*[®] realizaram em média 5.4 ± 5.9 interações (Nº de eventos - NE) com o equipamento / material durante um período de 60 minutos de observação. Os animais infantes de forma geral demonstram um perfil de comportamento muito semelhante entre o grupo. Porém, destacamos que um indivíduo apresentou 15 interações, o triplo da média do grupo. Após 5 dias de interação com o *Igloo*[®] a média de interação eleva-se para 17.0 ± 3.8 NE, e é significativamente maior, tanto em relação ao período inicial com o *Igloo*[®] quanto em relação à interação com o túnel de PVC nos períodos inicial: 3.0 ± 5.7 e final: 9.8 ± 1.9 NE.

Em relação ao tempo de uso (Fig. 4D) esse perfil é similar, sendo que os camundongos na 4^a sdv, em geral, usam o abrigo por reduzido tempo. O *Igloo*[®] após 5 dias de interação é o objeto em que os animais, em média, utilizam por mais tempo (170.0 ± 38.1 seg.) quando comparado ao período inicial (34.2 ± 43.0 seg.) e ao túnel de PVC (inicial: 15.0 ± 28.3 – final: 49.0 ± 9.6 seg.).

Na 6ª sdv (Fig. 4B) os animais demonstram um aumento no interesse pelo uso do EA, porém com característica heterogênea entre os indivíduos. Em relação ao uso, não observamos uma significativa diferença entre o período inicial (27.8 ± 9.6 NE) e final (19.8 ± 5.9 NE) pelo *Igloo*®. No entanto, o período final do túnel de PVC foi menos utilizado em comparação ao *Igloo*® e ao período inicial (31.6 ± 16.7 NE) do próprio equipamento (9.4 ± 3.4 NE). O tempo de uso (Fig. 4E) demonstrou um perfil mais homogêneo no tempo de utilização. No período inicial o *Igloo*® (284.6 ± 87.2 seg.) e o túnel de PVC (234.0 ± 63.6 seg.) apresentaram valores semelhantes. No período final, um indivíduo passou um tempo maior no interior do *Igloo*® (821 segundos), porém o valor médio desse ponto (418.0 ± 235.4 seg.) foi similar aos outros períodos estudados. O túnel de PVC no período final (40.6 ± 19.8 seg.) demonstrou um valor médio significativamente menor quando comparado com ou outros pontos. Na idade adulta, em relação ao uso (Fig. 4C) *Igloo*® no período inicial há um maior interesse, porém com grande variabilidade entre os animais (12.8 ± 13.4 NE), sendo que um indivíduo usou o objeto por 29 interações. Nos demais pontos não houve variação significativa entre os valores médios de uso (*Igloo*® – final: 7.4 ± 4.3 ; túnel de PVC – inicial: 2.8 ± 2.7 e final: 7.8 ± 2.8 NE).

Curiosamente em relação ao tempo de uso (Fig. 4F), alguns indivíduos utilizam o *Igloo*® por tempo prolongado e outros com menos tempo. Os valores médios (inicial: 169.0 ± 213.5 – final: 411.0 ± 235.6 seg.). Alguns indivíduos chegam a passar 513 e 701 segundos, respectivamente, no interior do objeto. Assim como no período final do túnel de PVC o valor médio do grupo foi de 278.2 ± 331.4 segundos, no entanto um indivíduo ficou no interior do túnel de PVC por 863 segundos. O valor médio no período inicial do túnel de PVC foi de 18.8 ± 21.2 segundos.

Nessa Combinação, foi determinado que o *Igloo*® foi o objeto de maior preferência pelos camundongos (Fig. 5). Na 4ª sdv o percentual total de uso foi de 64% para o *Igloo*® (Fig. 5A) e calculando a relação uso / tempo (Fig. 5D), o índice de preferência foi de $IP = 10$ no período final relativo ao *Igloo*®, sendo este um valor superior aos outros IPs (*Igloo*® – inicial: $IP = 6$; túnel de PVC – inicial: $IP = 5$ e final $IP = 5$). Nas idades de jovem e adulto o percentual de uso total do *Igloo*® foi de 54 (Fig. 5B) e 66% (Fig. 5C), respectivamente. O IP apresentou elevação na 6ª sdv (*Igloo*® – inicial: $IP = 10$ e final: $IP = 21$; túnel de PVC – inicial: $IP = 7$ e final $IP = 4$) (Fig. 5E). Na 8ª sdv ficou evidente a preferência dos camundongos, na respectiva idade, pelo *Igloo*® (*Igloo*® – inicial: $IP = 13$ e final: $IP = 56$; túnel de PVC – inicial: $IP = 13$ e final $IP = 36$) (Fig. 5F).

Na Combinação 2, foi avaliada a preferência entre os tipos de EA destinados a nidificação. No SGI, a área A, foi inserido o papel absorvente e na B a touca cirúrgica e as diferen-

tes idades formaram os Grupos: G1 (4^a sdv), G2 (6^a sdv) e G3 (8^a sdv). O papel absorvente demonstrou ser o material com maior uso pelos camundongos (Fig. 6). Os animais infantos, novamente, utilizam pouco o EA (Fig. 6A), porém demonstram um uso significativamente maior quando comparado a touca cirúrgica, tanto no período inicial quanto no final (papel absorvente – inicial: 9.2 ± 8.5 e final: 8.0 ± 1.2 ; touca cirúrgica - inicial: 0 e final: 1.8 ± 1.3 NE). Em relação ao tempo de uso (Fig. 6D), o perfil é similar (papel absorvente – inicial: 166.8 ± 155.5 e final: 141.6 ± 62.0 ; touca cirúrgica - inicial: 0 e final: 9.2 ± 8.5 seg.). Destaca-se que há variações individuais, onde, por exemplo, um indivíduo não utilizou nenhum material, enquanto outro indivíduo utilizou 18 vezes o papel absorvente, passando um tempo de 319 segundos. Na 6^a sdv, os camundongos, apresentaram um aumento no interesse pelo EA, principalmente quando comparado com os animais infantos. Em relação ao uso do papel absorvente (Fig. 6B), houve diferença entre os indivíduos. Tanto no período inicial quanto no final a utilização do papel absorvente foi significativamente maior quando comparada aos períodos estudados para touca cirúrgica (papel absorvente – inicial: 22.2 ± 11.4 e final: 8.2 ± 5.2 ; touca cirúrgica - inicial: 0.2 ± 0.4 e final: 0.8 ± 1.7 NE). O tempo de uso corresponde ao número de interações com o material (Fig. 6E) sendo significativamente elevado quando comparado aos demais quesitos (papel absorvente – inicial: 22.2 ± 11.4 e final: 8.2 ± 5.2 ; touca cirúrgica - inicial: 0.2 ± 0.4 e final: 0.8 ± 1.7 seg.).

Os camundongos adultos (Fig. 6C) demonstram grande interesse ao papel absorvente (com variações individuais entre 0 a 31 ao NE) no período inicial, porém ao final de 5 dias de interação com o material os valores médios e individuais foram muito reduzidos, semelhantes aos períodos inicial e final da touca cirúrgica (papel absorvente – inicial: 15.4 ± 14.4 e final: 0; touca cirúrgica - inicial: 0.6 ± 1.3 e final: 4.2 ± 2.9 NE). Esses resultados repetem-se também, inclusive pela grande variação individual, para o tempo de utilização do papel absorvente (Fig. 6F) pelos camundongos (papel absorvente – inicial: 437.0 ± 406.4 e final: 0; touca cirúrgica - inicial: 8.4 ± 18.7 e final: 25.2 ± 11.7 seg.).

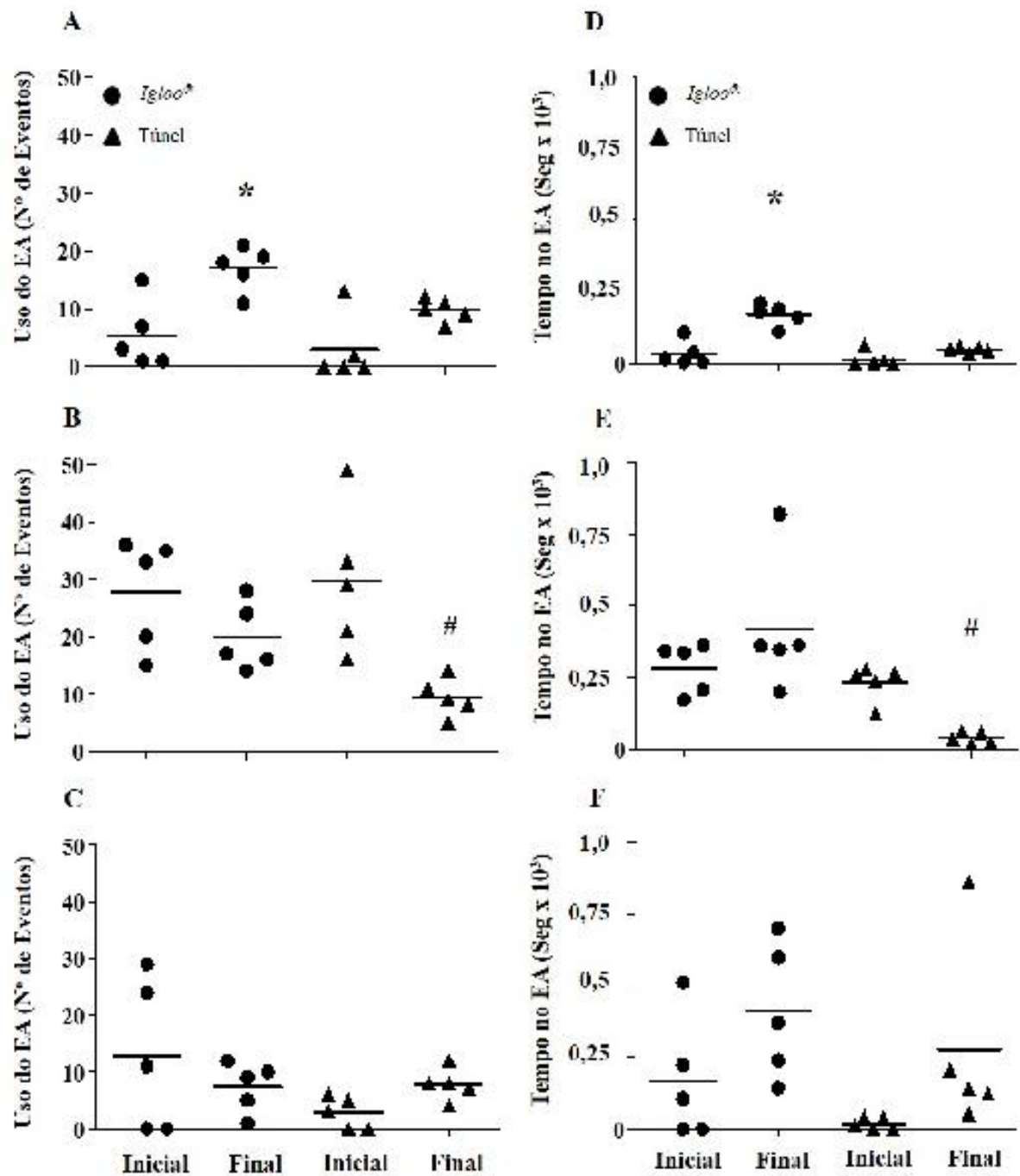


Figura 4: Avaliação individual da interação com o EA na categoria de abrigo. Na Combinação 1 – C1 (● *Igloo*[®] e ▲ túnel de PVC), pela análise das filmagens, o uso de cada tipo de EA (A, B, C), foi mensurado através do número de eventos de interação entre cada animal e o material num tempo de 60 minutos. O tempo dessa interação (em segundos) também foi avaliado nos respectivos tipos de enriquecimento ambiental (D, E, F). Essas avaliações foram realizadas através da observação individual dos camundongos em suas diferentes idades: Grupo 1, na 1^a sdv (A e D); Grupo 2, na 6^a sdv (B e E) e Grupo 3, 8^a sdv (C e F). Nessas figuras são demonstrados, os resultados da interação no dia 0 (inicial) e no dia 5 (final), onde cada símbolo correlaciona-se a um túnel individual e o traço o valor médio do grupo. * demonstra a significância estatística ($p < 0,05$) pela maior preferência pelo *Igloo*[®] do grupo de animais na 1^a sdv no final do tempo de interação em relação aos demais parâmetros estudados. # demonstra a significância estatística ($p < 0,05$) pela menor preferência pelo túnel de PVC do grupo de animais na 6^a sdv no final do tempo de interação em relação aos demais parâmetros estudados.

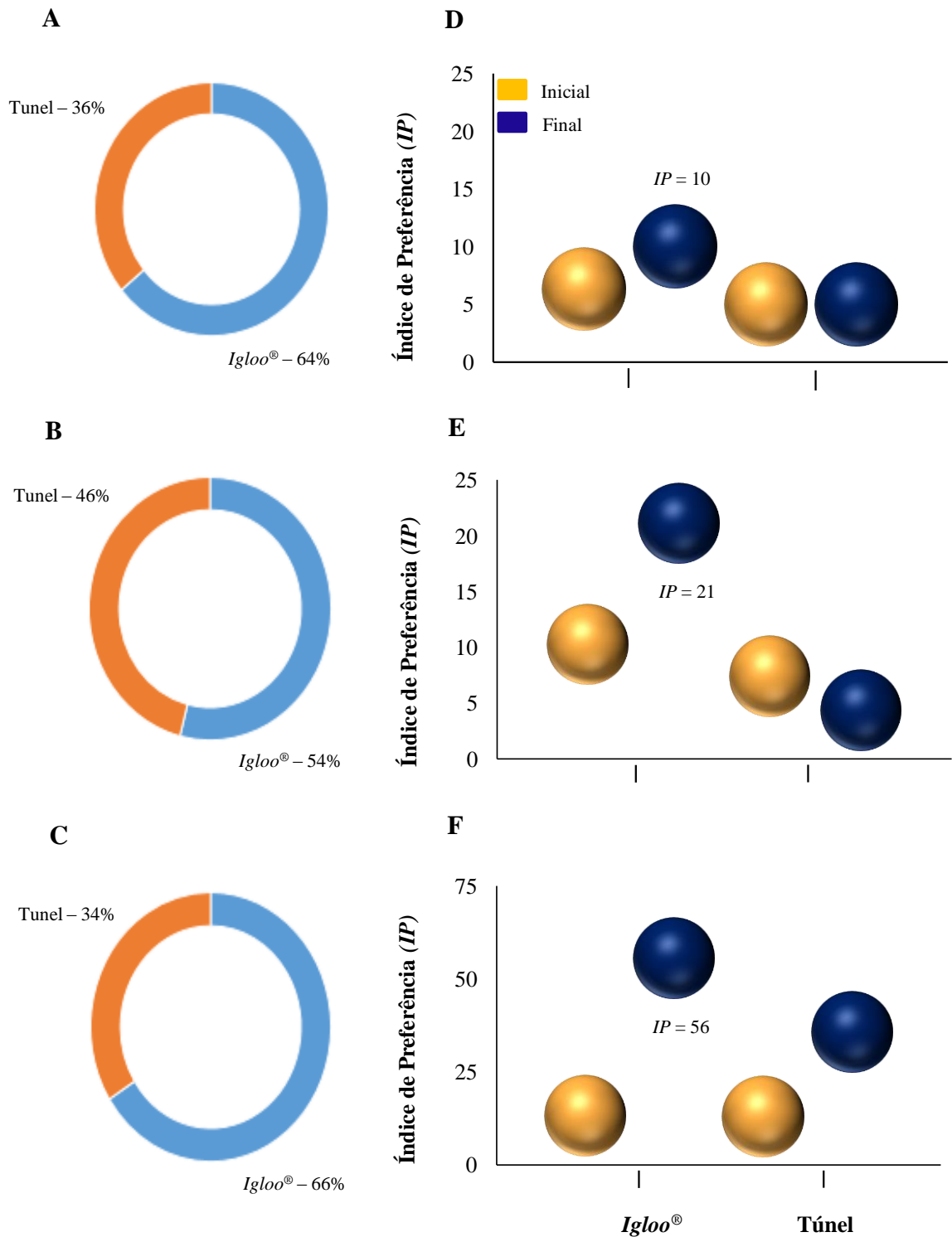


Figura 5: Determinação da preferência pelo EA na categoria abrigo. A avaliação dos resultados ilustra de duas formas a preferência dos camundongos Swiss Webster, nas idades de 4ª sdv (A e D), 6ª sdv (B e E) e 8ª sdv (C e F), pelo tipo de EA, na categoria abrigo. O valor médio foi calculado em percentual (%) para a incidência de uso (A, B, C) dos animais em relação ao *Igloo*® (faixa azul) e o túnel de PVC (faixa laranja). O índice de preferência foi calculado através da relação entre uso/tempo obtendo o índice denominado *IP* (D, E, F), dessa forma foi determinada a preferência de interação dos camundongos ao tipo de EA (*Igloo*® e túnel de PVC) entre o momento inicial (círculo amarelo) e final (círculo azul escuro). O valor maior de *IP* está descrito na figura, demonstrando a maior preferência do grupo de animais pelo tipo de EA no desenho experimental.

O tipo de enriquecimento ambiental de preferência para a categoria de nidificação foi o papel absorvente (Fig. 7). O percentual total de uso do papel absorvente foi de 93% para a 4ª sdv (Fig. 7A), 97% para a 6ª sdv (Fig. 7B) e 76% para a 8ª sdv (Fig. 7C). Corroborando os resultados pela relação uso/tempo, demonstrou que para os camundongos infantos (Fig. 7D), a preferência pelo papel absorvente através dos valores do índice de preferência (papel absorvente – inicial: $IP = 18$ e final: $IP = 17$; touca cirúrgica – inicial: $IP = 4$ e final $IP = 5$), tendo resultados semelhantes aos animais jovens (papel absorvente – inicial: $IP = 18$ e final: $IP = 19$; touca cirúrgica – inicial: $IP = 5$ e final $IP = 4$) (Fig. 7E). Também na categoria de nidificação, os camundongos na 8ª sdv (Fig. 7F), demonstram maior interesse pela utilização do enriquecimento ambiental, inclusive quando comparado com as outras idades, e o papel absorvente é o material de escolha (papel absorvente – inicial: $IP = 28$ e final: $IP = 10$; touca cirúrgica – inicial: $IP = 10$ e final $IP = 11$).

A última categoria deteve-se a avaliar a possibilidade de uso de objetos que pudessem estimular a atividade lúdica (brincar) nos camundongos. Na Combinação 3 – C3 foi inserido o tubo com guizo na área A e a bola com guizo na área B do SGI, repetindo os Grupos 1 (4ª sdv), G2 (6ª sdv) e G3 (8ª sdv). Os resultados dessa Combinação demonstraram que os camundongos não apresentam marcante interesse em realizar atividades lúdicas com os objetos oferecidos (Fig. 8). Na 4ª sdv (Fig. 8A), o uso do tubo com guizo e da bola com guizo no período inicial foi praticamente nulo (tubo com guizo – inicial: 0 e final: 1; bola com guizo – inicial: 0.2 ± 0.4 NE). Somente após 5 dias de interação com a bola com guizo foi que os animais infantos demonstraram interesse no objeto utilizando 4.0 ± 1.7 NE em 60 minutos de observação. Os camundongos jovens (Fig. 8B), como observado nas outras Combinações apresentaram maior curiosidade em relação ao EA. Houve maior utilização do tubo com guizo no período inicial (8.0 ± 6.2 NE), quando comparado com o período final (1.0 ± 1.0 NE). Contudo, com valores similares ao uso da bola com guizo tanto no período inicial (7.6 ± 4.6 NE) quanto no final (3.0 ± 1.4 NE).

Já os animais na 8ª sdv (Fig. 8C), demonstraram um perfil complexo. Inicialmente demonstraram um uso significativamente maior (11.0 ± 7.0 NE) ao tubo com guizo quando comparado com o período final (2.8 ± 3.4 NE) e após 5 dias de interação apresentaram maior interação com a bola com guizo (11.2 ± 7.3 NE) quando comparado aos valores iniciais do respectivo objeto (4.2 ± 2.9 NE) e o período final do tubo com guizo.

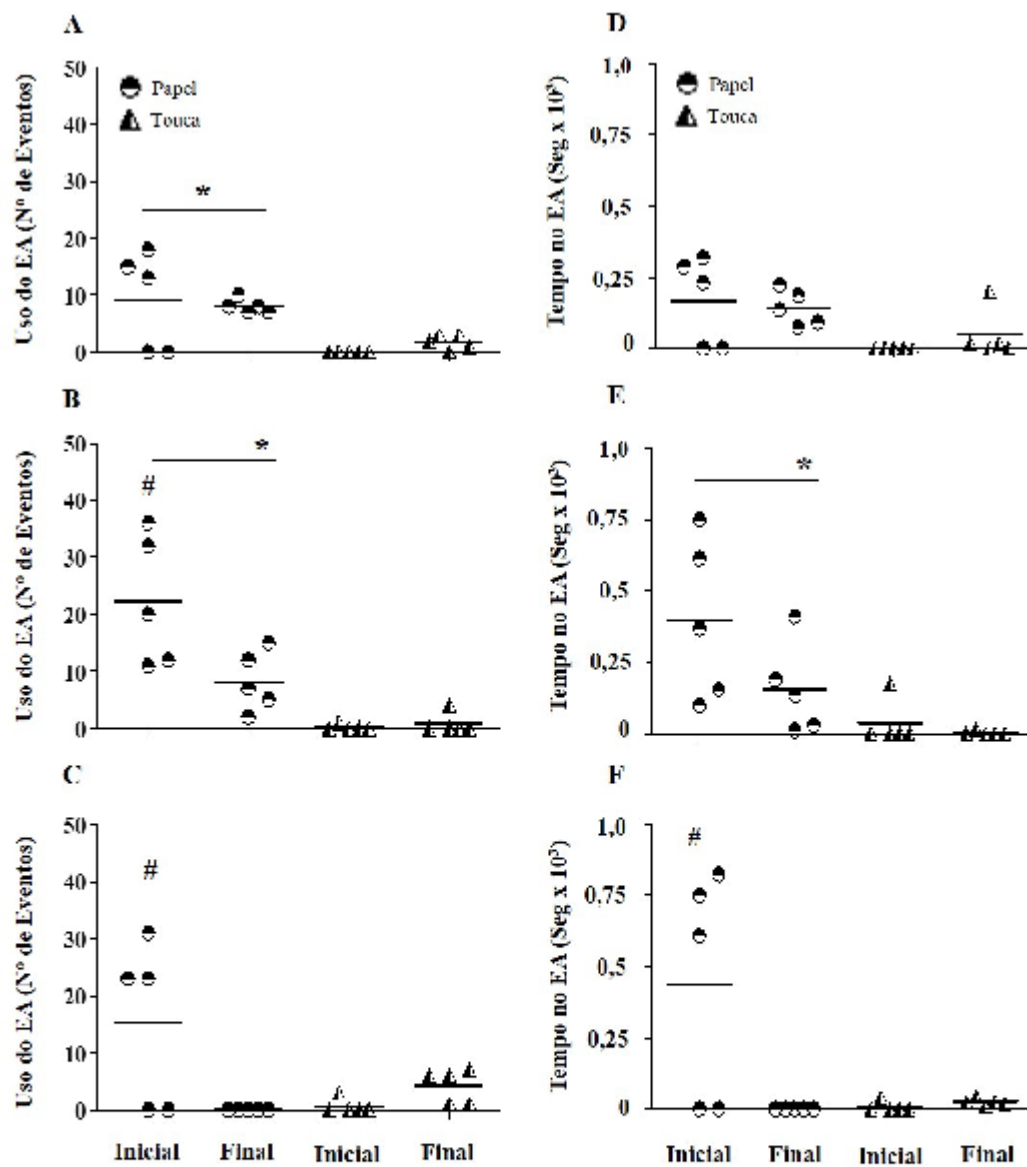


Figura 6: Avaliação individual da interação com o EA na categoria de nidificação. Na combinação 2 – C2 (● papel absorvente vs ▲ touca cirúrgica), pela análise das filmagens, o uso de cada tipo de EA (A, B, C) foi mensurado através do número de eventos de interação entre cada animal e o material num tempo de 60 minutos. O tempo dessa interação (em segundos) também foi avaliada nos respectivos tipos de EA (D, E, F). Essas avaliações foram realizadas através da observação individual dos camundongos em suas diferentes idades: Grupo 1, na 4^a sdtv (A e D); Grupo 2, na 6^a sdtv (B e E) e Grupo 3, 8^a sdtv (C e F). Nessas figuras são demonstrados, os resultados da interação no dia 0 (inicial) e no dia 5 (final), onde cada símbolo correlaciona-se a um único indivíduo e o traço o valor médio do grupo. # demonstra a significância estatística ($p < 0,05$) pela maior preferência pelo papel absorvente dos grupos de animais na 4^a, 6^a e 8^a sdtv, no início e no final do tempo de interação em relação aos outros parâmetros. * demonstra a significância estatística ($p < 0,05$) pela maior preferência ao papel absorvente pelos grupos de animais na 6^a e 8^a sdtv, somente ao período inicial em relação aos demais parâmetros estudados.

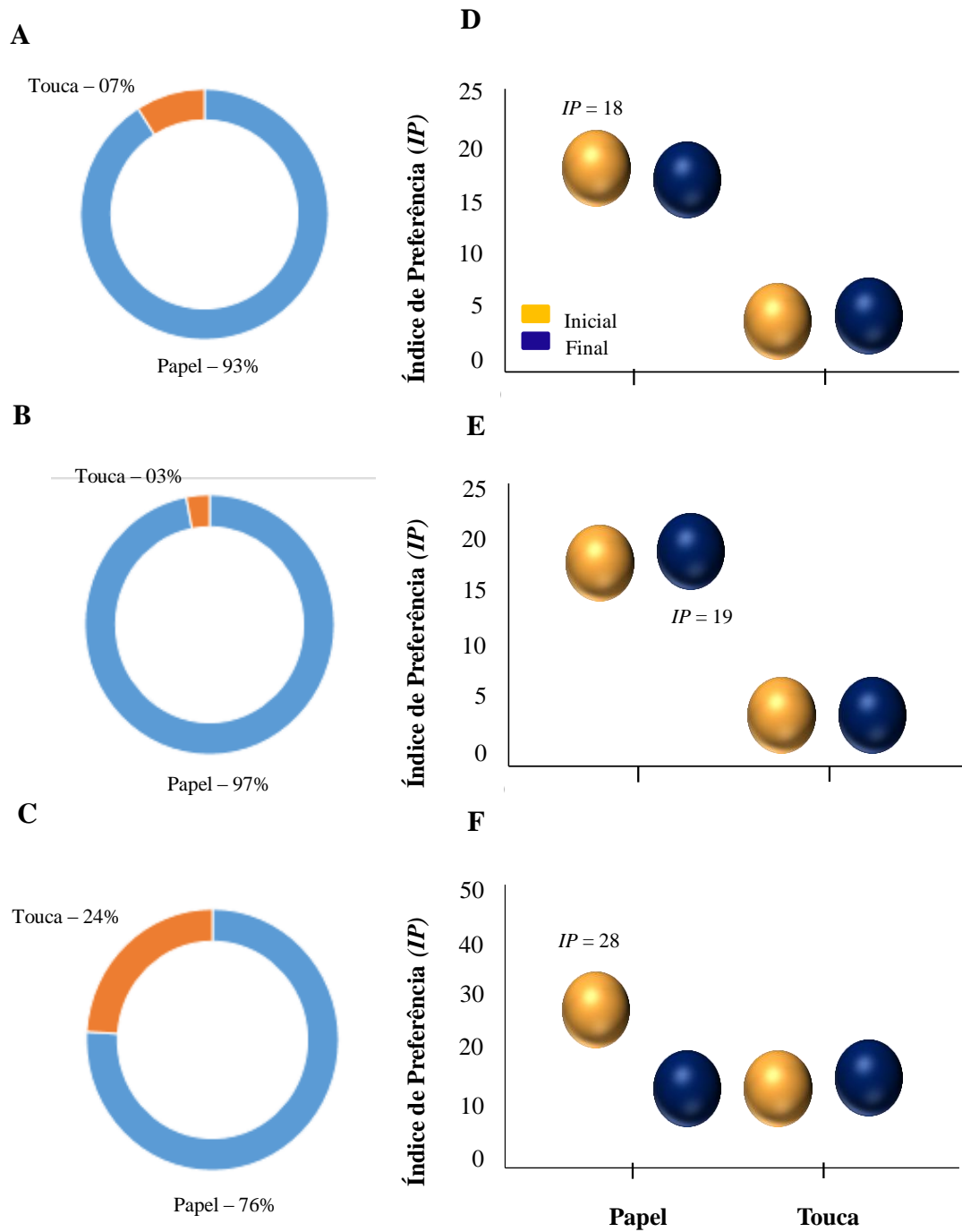


Figura 7: Determinação da preferência pelo EA na categoria nidificação. Através da avaliação dos resultados, buscou-se ilustrar de duas formas a preferência dos camundongos Swiss Webster, nas idades de 4ª sdv (A e D), 6ª sdv (B e E) e 8ª sdv (C e F), pelo tipo de EA, na categoria nidificação. O valor médio foi calculado em percentual (%) para a incidência de uso (A, B, C) dos animais em relação ao papel absorvente (faixa azul) e a touca cirúrgica (faixa laranja). O índice de preferência foi calculado através da relação entre uso/tempo, obtendo o índice denominado *IP* (D, E, F), dessa forma, a preferência de interação dos camundongos ao tipo de enriquecimento ambiental (papel absorvente e touca cirúrgica) foi determinada entre o momento inicial (círculo amarelo) e final (círculo azul escuro). O valor maior de *IP* está descrito na figura, demonstrando a maior preferência do grupo de animais pelo tipo de enriquecimento ambiental no desenho experimental proposto.

Contudo, os valores foram semelhantes em relação à utilização do tubo com guizo no período inicial. Nas variações individuais, no tubo com guizo, houve animais com 3 e outros indivíduos com 20 interações em 60 minutos de observação. Da mesma forma, houve interação diferenciada com a bola com guizo, tendo indivíduos com 2 e outros indivíduos com 22 interações. Quando o tempo em que os animais interagem com os objetos foi avaliado, os camundongos infantos (Fig. 8D) somente no período final demonstram reduzidos valores de utilização da bola com guizo (tubo com guizo – inicial: 0 e final: 3.2 ± 1.3 ; bola com guizo – inicial: 0.4 ± 0.9 e final: 26.4 ± 19.6 seg.).

Na 6ª sdv (Fig. 8E), tanto para o tubo com guizo (55.8 ± 41.0 seg.) como para a bola com guizo (52.0 ± 51.3 seg.). O período inicial foi o ponto de maior interesse pelos respectivos tipos de EA. Os animais adultos (Fig. 8F), em relação ao tempo de uso, apresentam somente um reduzido tempo de interação com o tubo com guizo quando comparado com os demais quesitos (tubo com guizo – inicial: 93.0 ± 61.9 e final: 5.2 ± 6.7 ; bola com guizo – inicial: 20.4 ± 12.5 e final: 19.0 ± 11.8 seg.).

Na categoria de atividade lúdica, a bola com guizo foi o tipo de enriquecimento ambiental de preferência dos camundongos (Fig. 9). Porém, essa preferência demonstrou, de forma geral, um nível reduzido de interesse ou de capacidade do objeto em estimular a interação dos animais. O percentual total de uso na 4ª sdv foi de 81% (Fig. 9A), na 6ª sdv foi de 54% (Fig. 9B) e de 53% para a 8ª sdv (Fig. 9C).

O índice de preferência para os animais na 4ª sdv (Fig. 9D) foi calculado em $IP = 12$ para bola com guizo no período final e $IP = 4$ no período inicial. Em relação ao tubo com guizo, no período inicial calculamos $IP = 4$ e no período final $IP = 7$. Os resultados de IP para os camundongos jovens (Fig. 9E) descreveram para bola com guizo (inicial: $IP = 12$ e final: $IP = 7$) e quanto ao tubo com guizo (inicial: $IP = 10$ e final: $IP = 4$). Por fim, para os animais adultos (Fig. 9F) os resultados demonstram que a bola com guizo, no período inicial $IP = 09$ e no final $IP = 5$. O tubo com guizo no período inicial apresenta o $IP = 7$ e no Final $IP = 5$.

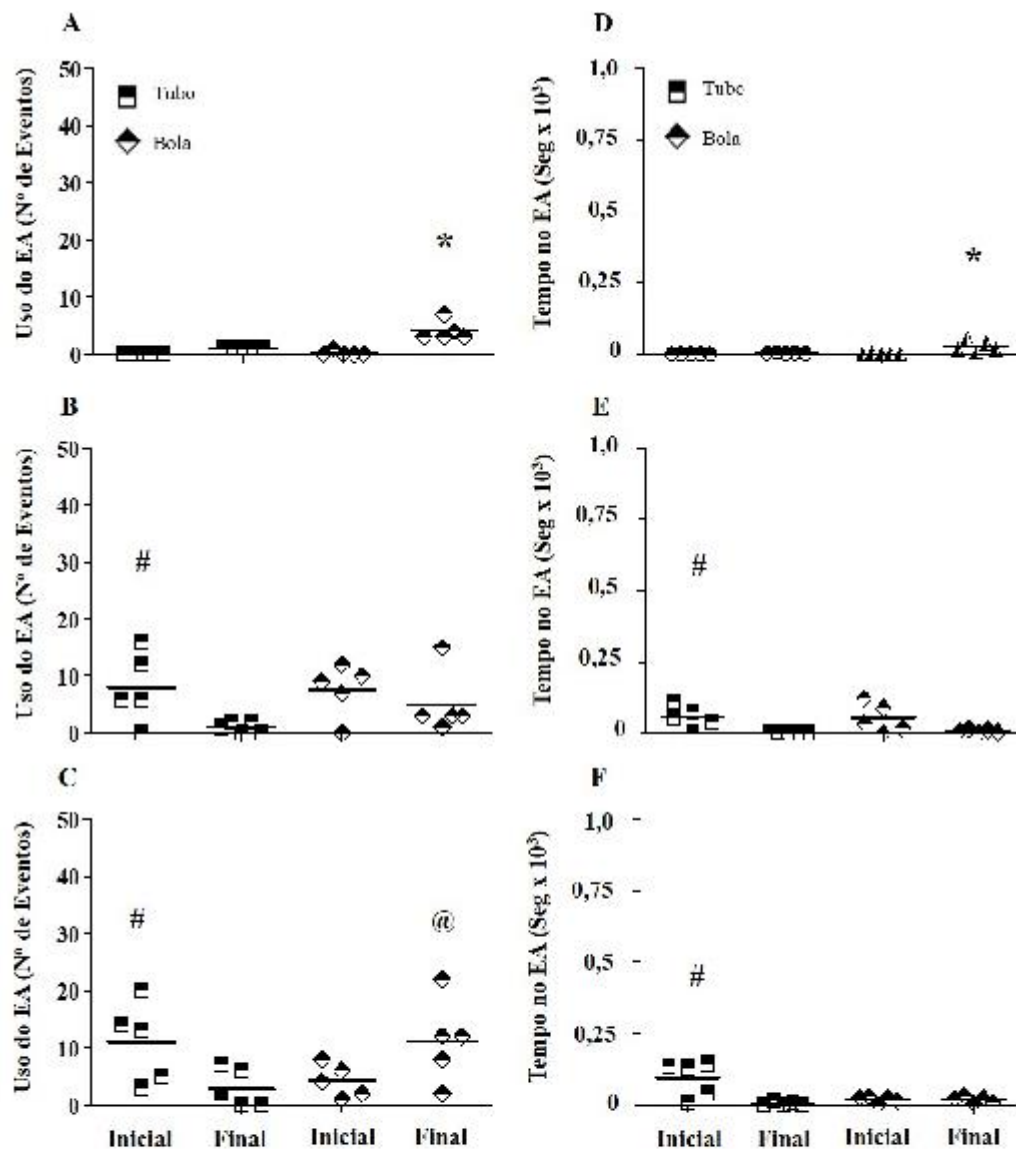


Figura 8: Avaliação individual da interação com o EA na categoria de atividade lúdica. Na Combinação 3 - C3 (■ tubo com guizo vs ◆ bola com guizo), pela análise das filmagens, o uso de cada tipo de EA (A, B, C) foi mensurado através do número de eventos de interação entre cada animal e o material num tempo de 60 minutos. O tempo dessa interação (em segundos) também foi avaliado nos respectivos tipos EA (D, E, F). Essas avaliações foram realizadas através de observação individual dos camundongos em suas diferentes idades: Grupo 1, na 4^a sdv (A e D); Grupo 2, na 6^a sdv (B e E) e Grupo 3, 8^a sdv (C e F). Nessas figuras, foram demonstrados os resultados da interação no dia 0 (inicial) e no dia 5 (final), onde cada símbolo correlaciona-se a um único indivíduo e o traço o valor médio do grupo. * demonstra a significância estatística ($p \leq 0,05$) pela maior preferência pela bola com guizo do grupo de animais na 4^a sdv no final do tempo de interação em relação aos outros parâmetros. # demonstra a significância estatística ($p \leq 0,05$) pela maior preferência pelo tubo com guizo dos grupos de animais na 6^a e 8^a sdv somente ao período inicial em relação aos demais parâmetros. @ demonstra a significância estatística ($p \leq 0,05$) pela maior preferência pela bola com guizo do grupo de animais na 8^a sdv somente ao período final em relação aos demais parâmetros.

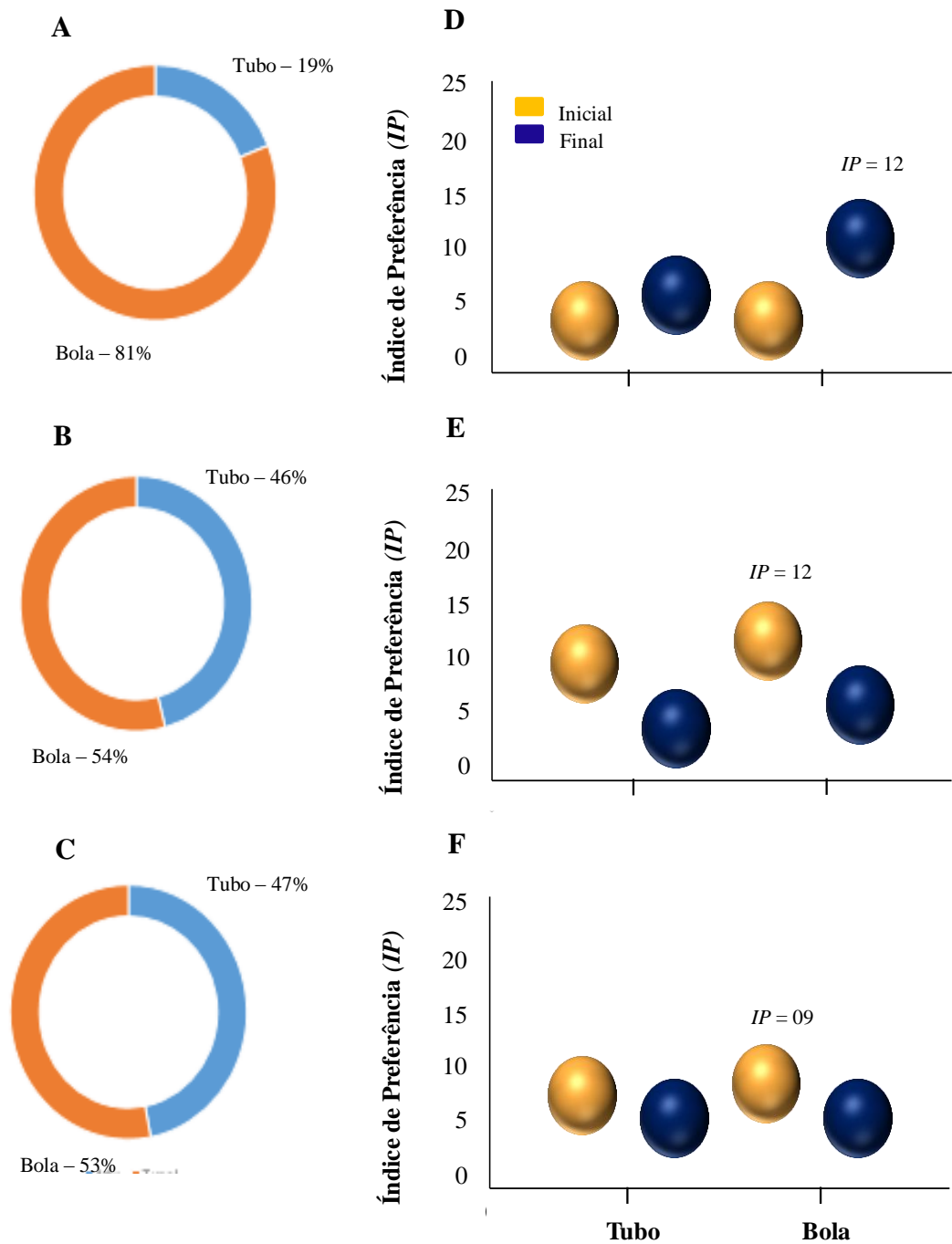


Figura 9: Determinação da preferência pelo EA na categoria atividade lúdica. Através da avaliação dos resultados, buscou-se ilustrar de duas formas a preferência dos camundongos Swiss Webster, nas idades de 4ª sdv (A e D), 6ª sdv (B e E) e 8ª sdv (C e F), pelo tipo EA, na categoria atividade lúdica. O valor médio foi calculado em percentual (%) para a incidência de uso (A, B, C) dos animais em relação ao tubo com guizo (faixa azul) e a bola com guizo (faixa laranja). O índice de preferência foi calculado através da relação entre uso/tempo, obtendo o índice denominado *IP* (D, E, F), dessa forma foi determinada a preferência de interação dos camundongos ao tipo de EA (tubo com guizo e bola com guizo) entre o momento inicial (círculo amarelo) e final (círculo azul escuro). O valor maior de *IP* está descrito na figura demonstrando a maior preferência do grupo de animais pelo tipo de EA no desenho experimental proposto.

Em resumo, na seleção proposta pela Etapa#1, os resultados encontram-se sintetizados na Tabela 2. Foi estimada a graduação de preferência pelo tipo de EA por meio dos valores do índice de preferência qualificado em número de cruces (+). Essa graduação foi relacionada ao tipo de EA preferido de cada categoria (abrigo, nidificação e atividade lúdica) nas diferentes idades estudadas. Através dos resultados da Etapa#1, constatou-se que os camundongos machos Swiss Webster em biotério apresentam diferentes graduações de preferência a depender da sua idade. Os animais na 4ª sdv demonstram baixa interação com os diferentes tipos de EA preferidos (*Igloo*®, papel absorvente e bola com guizo). O papel absorvente e a bola com guizo apresentaram moderada preferência (++) , enquanto que a utilização do *Igloo*® representou reduzida preferência (+). O interesse pela utilização do EA eleva-se na 6ª sdv. Nessa idade, o papel absorvente e a bola com guizo estimulam uma moderada preferência (++) , já o *Igloo*® demonstra um maior interesse com alta preferência pela sua utilização (+++). A graduação caracterizada por muito alta preferência (++++) somente é observada na 8ª sdv e pela utilização do *Igloo*® por esses animais. O papel absorvente também apresenta alta preferência (+++). Enquanto que a bola com guizo para indivíduos adultos representa uma reduzida preferência (+).

Tabela 2: Comparação do grau de preferência entre as diferentes idades pelo tipo de enriquecimento ambiental através do índice de preferência.

Tipo / Idade	Graduação da Preferência		
	4ª sdv	6ª sdv	8ª sdv
<i>Igloo</i> ®	+	+++	++++
Papel	++	++	+++
Bola	++	++	+

Legenda: $IP \leq 10$ (+) – Reduzida preferência; $IP \geq 10$ a 20 (++) – Moderada preferência; $IP \geq 20$ a 30 (+++) – Alta preferência; $IP \geq 30$ (++++) – Muito alta preferência.

6.2. Etapa #2

A partir da seleção do EA preferido, deu-se início à Etapa#2. Nessa etapa foi feita uma análise comparativa entre os objetos/materiais preferidos na Etapa#1, para a determinação final do tipo preferido de EA pelo camundongo Swiss Webster em biotério.

Após toda a análise das filmagens, análise qualitativa e quantitativa proposta na metodologia, é possível afirmar que:

- a-) bola com guizo, apesar de ser o objeto de EA preferido de sua categoria, demonstrou baixo interesse de uso pelos animais;
- b-) na comparação com os outros objetos/materiais, seu uso foi ainda mais reduzido, quase nulo, principalmente quando comparado com o papel absorvente.

Dessa forma, optou-se por descrever os resultados somente da comparação entre o objeto preferido da Combinação 1 – C1 (*Igloo*[®]) e do material de nidificação preferido da Combinação 2 – C2 (papel absorvente). Os resultados serão concentrados na discussão e conclusão do EA preferido pelos camundongos Swiss Webster somente na Combinação 4, ou seja, a comparação entre o uso do *Igloo*[®] e do papel absorvente.

A figura 10 descreve que na 4^a sdv (Fig. 10A) o *Igloo*[®] proporcionou um baixo uso dos animais no período Inicial com uma média de uso de 0.6 ± 0.9 NE. Porém após o período de 5 dias (final) os animais demonstram uma média de uso significativamente maior (27.6 ± 9.5 NE), inclusive quando comparado aos períodos inicial (7.8 ± 7.3 NE) e final (10.0 ± 1.2 NE) do material papel absorvente. Esse perfil foi reproduzido nas outras idades: 6^a sdv (Fig. 10B) e 8^a sdv (Fig. 10C). Apesar dos animais jovens e adultos apresentarem aumento do interesse no *Igloo*[®] (quando comparado com a 4^a sdv) no período inicial (9.6 ± 9.4 e 12.2 ± 8.8 NE, respectivamente) ao final os animais jovens utilizam em média 31.4 ± 4.5 NE e os adultos apresentam 46.8 ± 4.9 NE. Esses valores do período final foram significativamente maiores ao período inicial do próprio *Igloo*[®] e do uso em ambos os períodos do papel absorvente por ambas as idades.

Em relação ao tempo de uso, na 4^a sdv (Fig. 10D) o tempo de uso do *Igloo*[®] inicialmente foi muito reduzido (12.6 ± 17.9 seg.), com um aumento ao final de 5 dias (329.4 ± 76.8 seg.). No entanto, em relação ao papel absorvente, inicialmente, os animais infantis utilizam o respectivo EA por maior tempo (255.4 ± 2378 seg.) apesar de forma heterogênea e significa-

tivamente superior ao final da interação (103.4 ± 32.7 seg.). Na 6ª sdv (Fig. 10E) o tempo de uso do EA foi similar em ambos os tipos de EA, tanto inicial quanto final com aproximadamente 246.8 ± 118.3 segundos, porém o tempo de uso dos animais pelo papel absorvente diminui significativamente ao término dos 5 dias de interação (79.2 ± 62.9 seg.). Os camundongos adultos (Fig. 10F) passam um tempo médio máximo de 318.2 ± 78.2 segundos em relação ao *Igloo*®. Contudo, quando recebem o papel absorvente utilizam esse material por 546.4 ± 195.4 segundos, sendo um valor médio superior ao *Igloo*® e ao período final desse material (159.0 ± 37.7 seg.).

Os resultados anteriores demonstram as variações individuais e a média de uso e tempo de uso dos tipos de EA comparados, *Igloo*® e papel absorvente. Na definição do tipo de EA de preferência pelos camundongos Swiss Webster, foi feito o percentual de uso do conjunto de animais para cada objeto/material e também a relação entre o uso e o tempo de uso dos animais.

Na figura 11, observa-se que em todas as idades há preponderância do uso do *Igloo*® em todas as idades. Na 4ª sdv (Fig. 11A), 61% dos animais preferem utilizar o *Igloo*® quando comparado com o papel absorvente. Esses valores são similares para a 6ª sdv (Fig. 11B), com 65% ,e 8ª sdv (Fig. 11C), com 61%. Apesar do percentual de uso do *Igloo*® ser maior nos camundongos Swiss Webster a relação uso/tempo que determina o índice de preferência (*IP*), o papel absorvente, quando apresentados aos animais (em todas as idades) apresentou um *IP* maior no período inicial. Os camundongos infantos (Fig. 11D) apresentam um *IP*=33, os jovens *IP*=26 e os adultos *IP*=31. Dessa forma, ambos os resultados podem ser interpretados de forma que o *Igloo*® promove maior interesse e atividade, no entanto, o tempo de uso do papel absorvente foi maior quando comparado ao *Igloo*®.

Após a determinação da preferência do EA, foi feito um estudo de qual seria a influência desses equipamentos/materiais no ambiente e na dinâmica de interação individual e social do comportamento de camundongos Swiss Webster (Fig. 12). Na 4ª sdv, na ausência do EA a atividade de maior incidência entre os animais foi o Re (54%), seguido de EX (23%), PA (19%) e AH (5%) (Fig. 12A). Quando foi inserido os EAs (*Igloo*® e Papel Absorvente) no SGI, o etograma demonstrou que ¼ da incidência de comportamentos relacionados a não utilização dos EAs foi relacionada ao repouso (26%). Contudo, 45% da frequência das atividades foram relacionadas ao uso de EA, diminuindo a EX (17%), PA (10%) e AH (4%) (Fig. 12B). Os camundongos jovens, na ausência de EA apresentam maior incidência de atividades relacionadas à PA (44%) e EX (42%) e pouco descansam (Re – 10%) (Fig. 12C). Porém na

presença do *Igloo*[®] e do papel absorvente no SGI, promovem um grande interesse dos animais aos EAs (63%) e diminui a frequência de atividades como PA (11%) e EX (25%) (Fig. 12D).

De forma similar, esses resultados, podem ser observados nos indivíduos adultos. Na ausência de EA, a EX (45%) é o comportamento com maior incidência, seguido da PA (34%) (Fig. 12E). Os camundongos na 8^a sdv apresentam um alto interesse pelo EA, corroborando os dados descritos nessa dissertação. A utilização do *Igloo*[®] e do papel absorvente foi relacionada acerca de 69% das atividades dos animais na respectiva idade e novamente reduzindo a EX (17%) e PA (11%) (Fig. 12F).

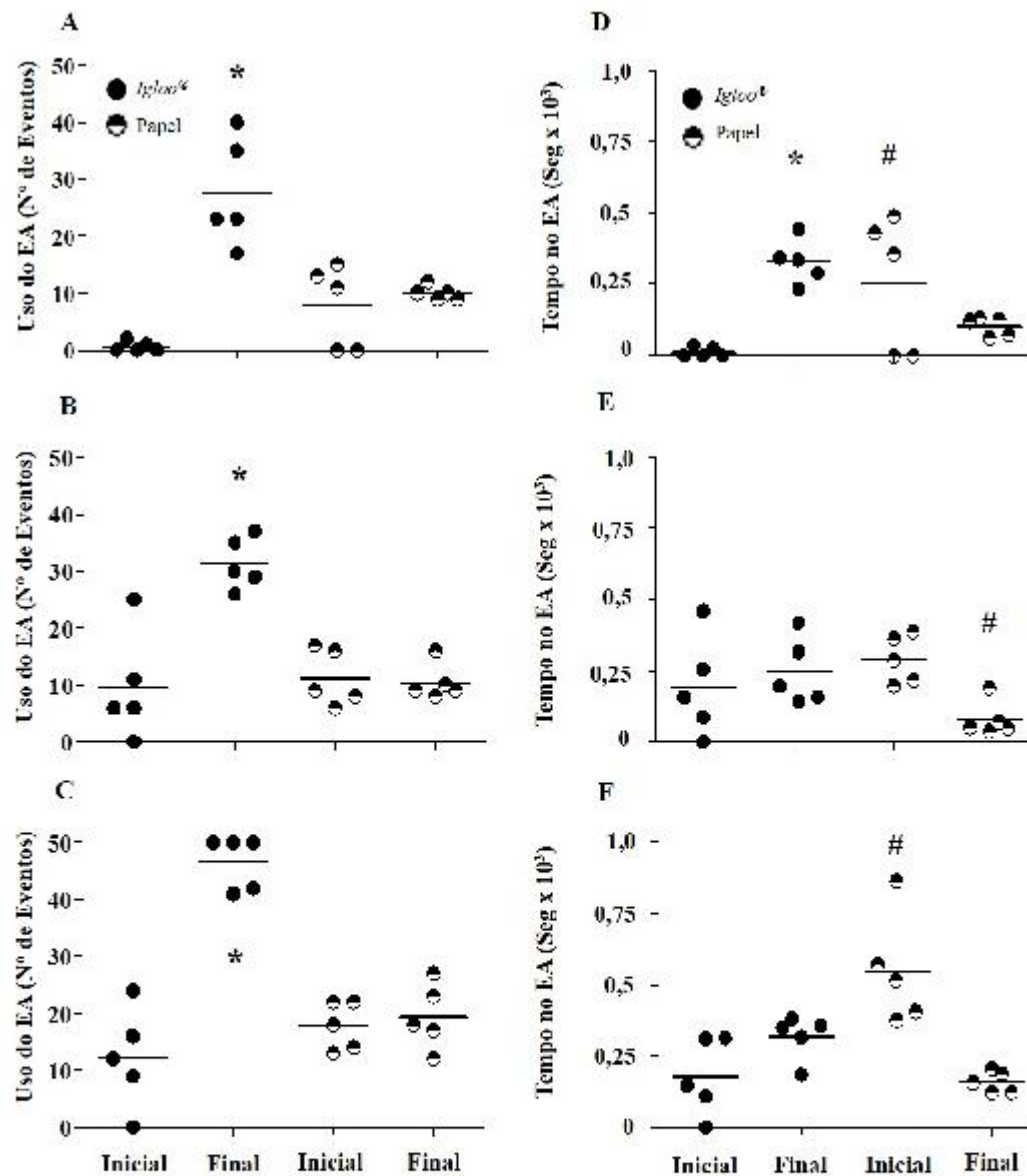


Figura 10: Determinação do objeto/materia' preferido pelos animais para uso como EA: Através da seleção de categorias foi realizada a comparação individual entre o objeto preferido da categoria Abrigo (● *Igloo*[®]) e da categoria Nidificação (○ Papel Absorvente). O uso de cada tipo do EA (A, B, C) foi mensurado através do número de eventos de interação entre cada animal e o material num tempo de 60 minutos. O tempo dessa interação (em segundos) também foi avaliado entre os respectivos tipos de EA (D, E, F). Essas avaliações foram realizadas através da observação individual dos camundongos em suas diferentes idades da Combinação 1 – C1: Grupo 1, na 4ª sdtv (A e D), Grupo 2, na 6ª sdtv (B e E) e Grupo 3, 8ª sdtv (C e F). Nessas figuras, são demonstrados os resultados da interação no dia 0 (inicial) e no dia 5 (final), onde cada símbolo correlaciona-se a um único indivíduo e o traço o valor médio do grupo. * demonstra a significância estatística ($p \leq 0,05$) pela maior preferência pelo *Igloo*[®] entre os grupos de animais na 4ª, 6ª e 8ª sdtv, no final do tempo de interação em relação aos outros parâmetros. # demonstra a significância estatística ($p \leq 0,05$) pela maior preferência ao papel absorvente pelos grupos de animais na 4ª, 6ª e 8ª sdtv, nos períodos inicial e final em relação aos demais parâmetros.

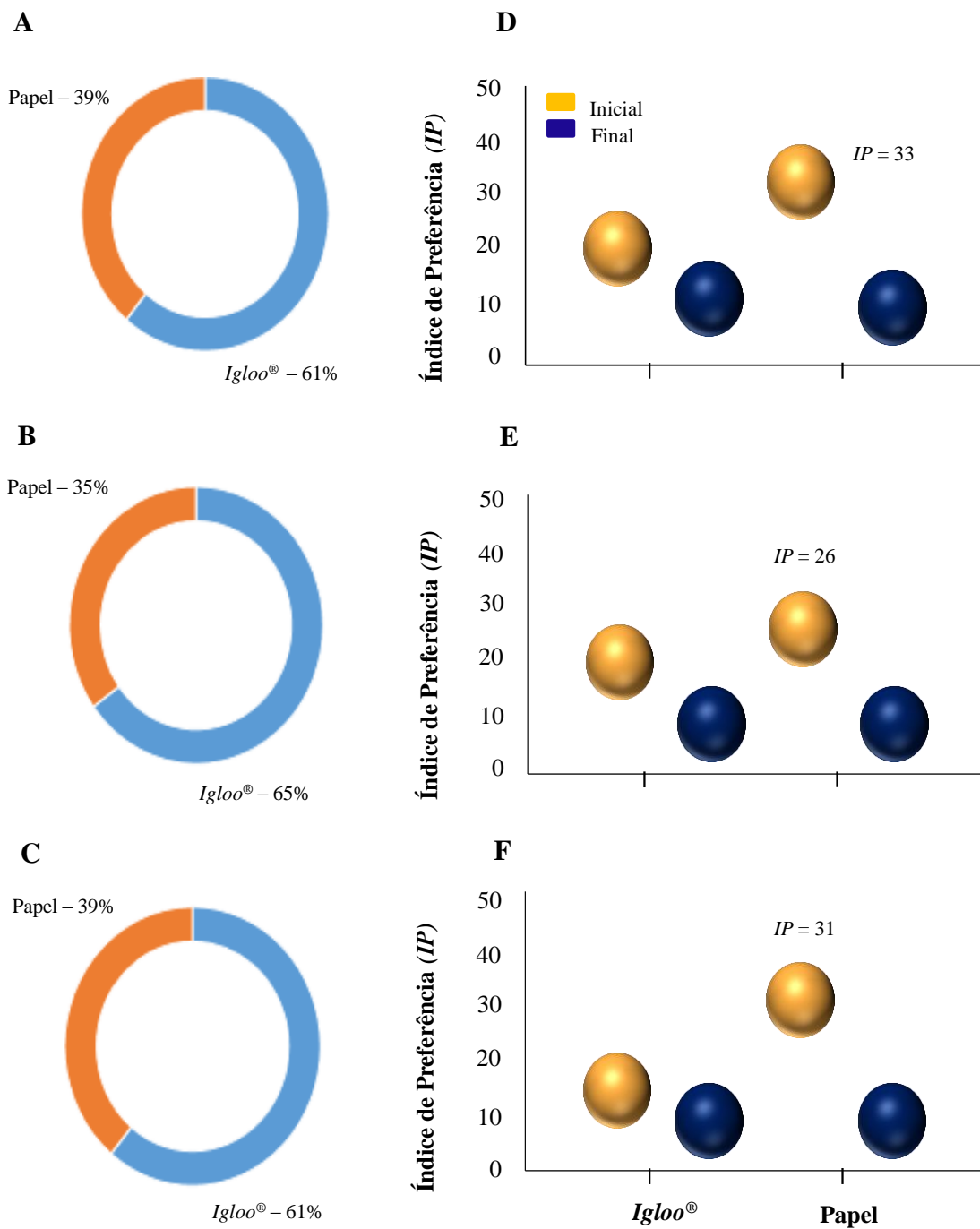


Figura 11: Determinação da preferência pelo tipo de EA utilizado por camundongos Swiss Webster. Através da avaliação dos resultados, buscou-se ilustrar de duas formas a preferência dos animais, nas idades de 4ª sdv (A e D), 6ª sdv (B e E) e 8ª sdv (C e F), pelo objeto/matéria de EA preferido pelos indivíduos. O valor médio foi calculado em percentual (%) para a incidência de uso (A, B, C) dos animais em relação ao *Igloo*® (faixa azul) e o papel absorvente (faixa laranja). O índice de preferência foi calculado através da relação entre uso/tempo, obtendo o índice denominado *IP* (D, E, F), dessa forma foi determinada a preferência de interação dos camundongos ao tipo de EA (*Igloo*® vs papel absorvente) entre o momento inicial (círculo amarelo) e final (círculo azul escuro). O valor maior de *IP* está descrito na figura, demonstrando a maior preferência do grupo de animais pelo objeto/material de EA no desenho experimental proposto (Combinação 4 – C4).

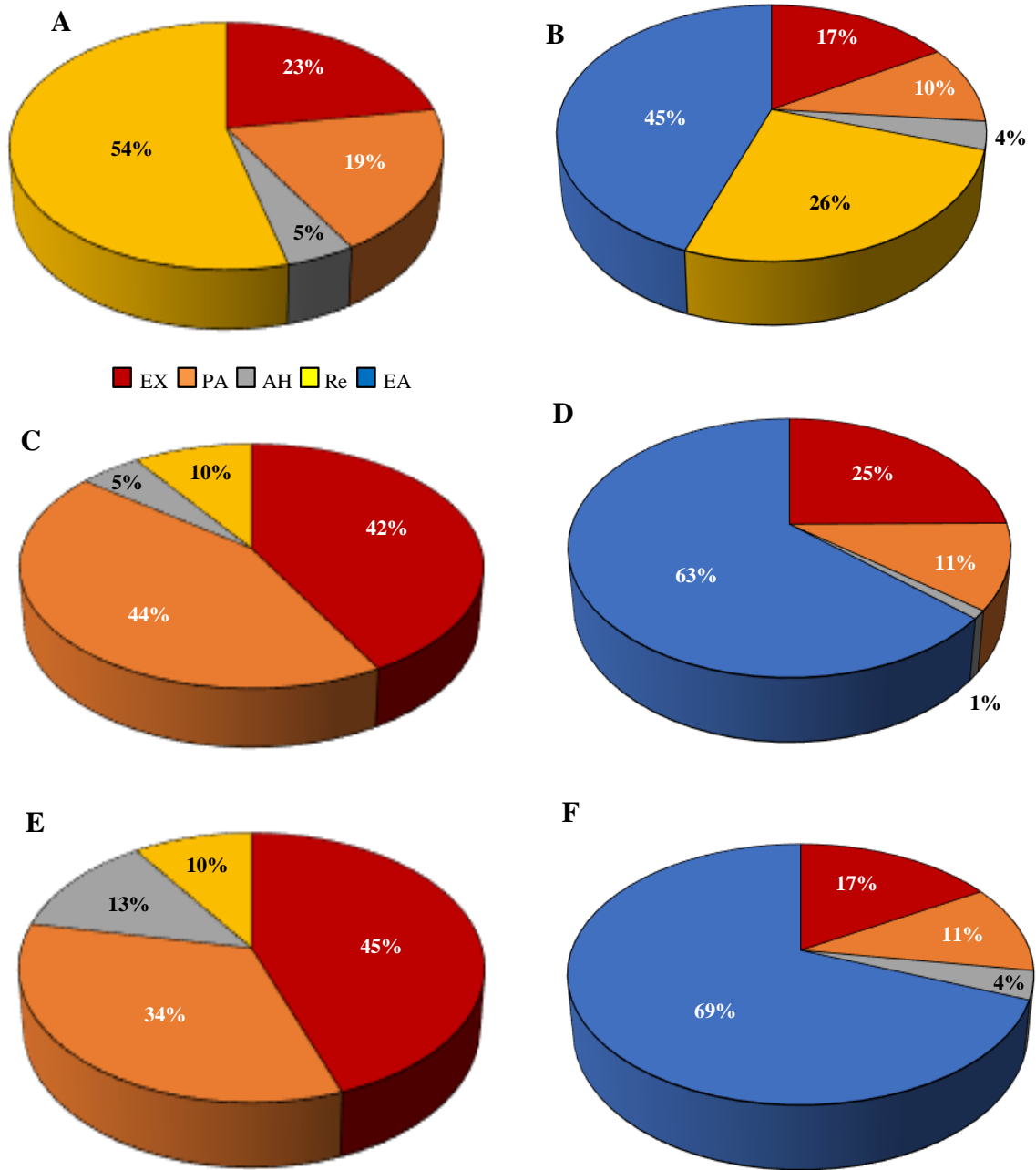


Figura 12: Etograma dos camundongos Swiss Webster através da utilização do SGI contendo os dois tipos de EA preferidos (*Igloo*[®] e Papel Absorvente). Através das filmagens, foi determinada a incidência dos principais comportamentos individuais, calculada pelos valores totais e expressada em percentual. A Combinação 4 – C4, contendo o *Igloo*[®] e o papel absorvente foi avaliada na 4^a sdv (A e B), 6^a sdv (C e D) e 8^a sdv (E e F). O Etograma foi definido pelas seguintes atividades comportamentais: exploração do ambiente (EX – vermelho); procura por alimento (PA – laranja); auto-higienização (AH – cinza); repouso (Re – amarelo) e uso do enriquecimento ambiental (EA – azul escuro). A incidência foi calculada em 60 minutos nas respectivas atividades entre o período inicial e final e determinada pelo valor percentual (%) sendo relacionadas a comparação entre a ausência de EA no SGI (A, C, E) e a presença do *Igloo*[®] e papel absorvente (B, D, F) no SGI ,nas respectivas idades.

A utilização do SGI e a estruturação do modelo experimental possibilitaram elucidar a pergunta do projeto. Os resultados demonstram que o *Igloo*[®] e o papel absorvente foram os objetos/materiais mais preferidos pelos camundongos Swiss Webster em biotério. No decorrer do estudo e na captação das imagens e análise de dados, atitudes peculiares dos camundongos foram observadas (Fig. 13). Por exemplo, na primeira foto (Fig. 13A) é possível correlacionar que na ausência do EA os camundongos apresentaram maior incidência de comportamentos como exploração do ambiente (*rearing*) e procura de alimento (PA). Na figura 13B, principalmente em camundongos infantos (4^a sdv), apesar da oferta de 2 tipos diferentes de EA, inicialmente, os indivíduos preferiram repousar em conjunto e não utilizaram o EA. O uso do papel absorvente demonstrou aspectos interessantes, o primeiro baseia-se de que no início, o camundongo gostou de interagir com o material (foto no detalhe), porém após o período de 5 dias de interação, os indivíduos transformam o material semelhante a cama. Além disso, são capazes de transportar as folhas de papel da área A para a área B e interagir com os dois tipos de EAs numa mesma área. Sendo que essa interação, conforme descrita pelo *Igloo*[®], seu uso é primordialmente de abrigo, porém principalmente na 6^a sdv, os indivíduos utilizaram muito esse tipo de EA para subirem e realizarem a exploração do ambiente (Fig. 13C). Na idade adulta, uma das desvantagens do *Igloo*[®] foi que quatro animais ocuparam o abrigo e excluíram um indivíduo (Fig. 13D).

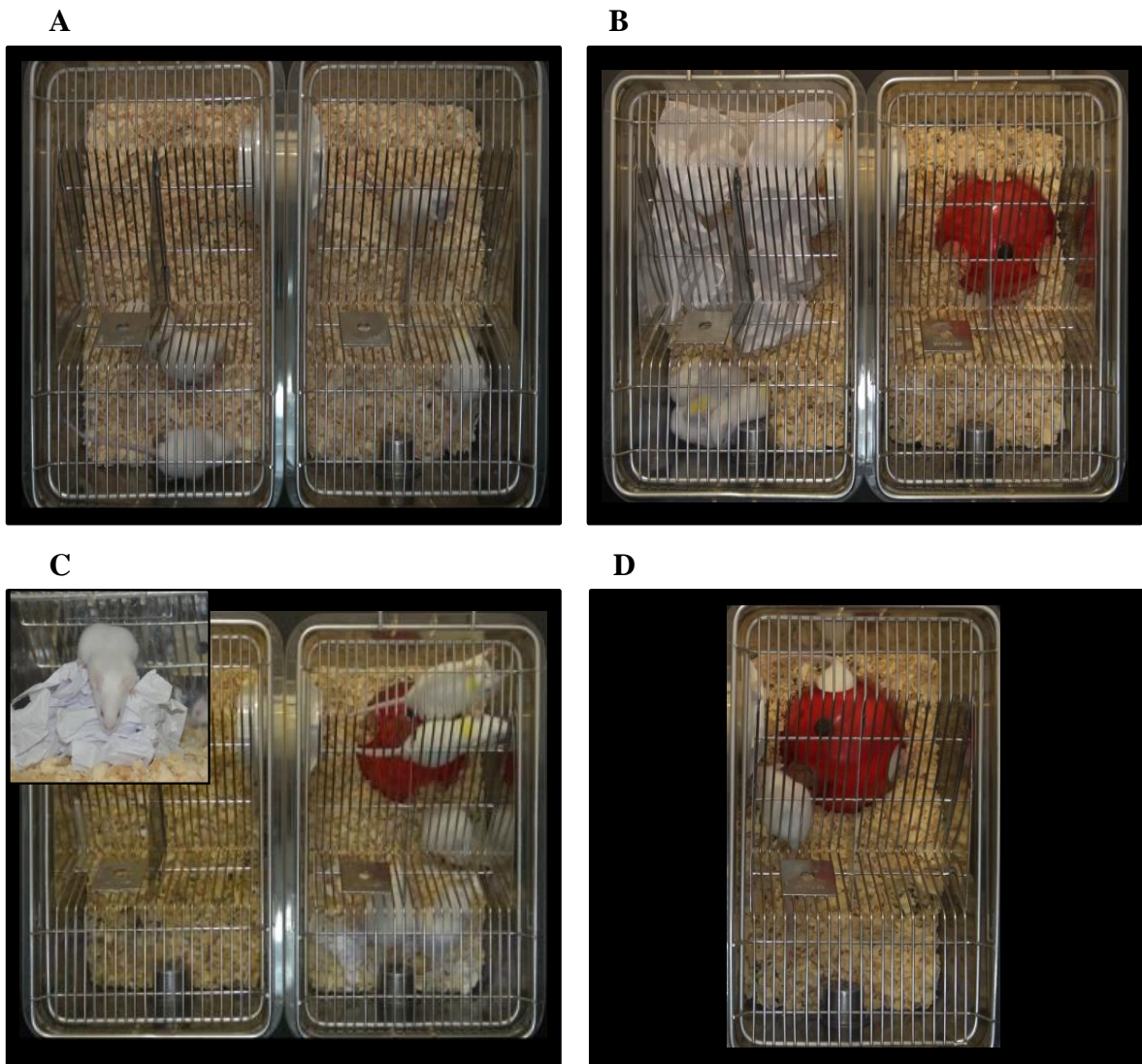


Figura 13: Ilustração de situações peculiares observadas durante o uso dos diversos tipos de EA: Durante as filmagens, foi possível observar comportamentos peculiares e marcantes dos animais durante sua interação com o EA através do SGI. O comportamento do camundongo Swiss Webster foi avaliado na presença e na ausência de EA (A). Após a colocação do EA no microambiente do animal, animais infantos demoraram para iniciar sua interação com o objeto/material e preferiram dormir em conjunto diretamente na cama da gaiola (B). Animais jovens, interagiram de forma dinâmica e rápida com os materiais. Subiram nas folhas de papel ou no *Igloo*[®], ou também transportaram as folhas entre as áreas (C). Na idade adulta, em relação ao peso corporal e tamanho do abrigo foi demonstrado que o número ideal de camundongos para o tipo de *Igloo*[®] utilizado é de 4 animais, pois um indivíduo foi excluído do EA (D).

7. DISCUSSÃO

A primeira contribuição teórica significativa para minimizar os aspectos éticos negativos da experimentação animal foi feita pelo zoologista William M. S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch, em 1959, (REZENDE; PELUZIO; SABARENSE, 2008), com a apresentação do trabalho denominado “*The Principles of Humane Experimental Technique*”, no qual os autores propuseram o conceito dos 3 R’s, como ficou conhecido, por sua grafia em inglês das palavras *Replacement*, *Reduction* e *Refinement* (Substituir, Reduzir e Refinar) (BRAGA, 2017; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004; PETROIANU, 1996). O refinamento das técnicas de manipulação e experimentação é um dos princípios éticos utilizados na Ciência em Animais de Laboratório, o qual tem como objetivo, minimizar a dor ou sofrimento do animal desde seu nascimento até sua morte, visando a promoção do seu bem-estar (BRAGA, 2017).

Neste estudo, foi abordado o uso do EA por camundongos machos, Swiss Webster, mantidos em biotério, em diferentes idades e categorias de modificação do ambiente do animal: a-) objetos que promovam abrigo aos animais; b-) materiais que possibilitem a atividade de nidificação e c-) objetos que estimulem a atividade lúdica dos animais. Com o uso do SGI foi possível realizar a combinação entre os diversos tipos de EA, e possibilitar ao camundongo demonstrar sua preferência pelo tipo de EA oferecido em suas diferentes idades (KUZEL et al., 2013).

De um modo geral, independentemente da idade dos animais, foi possível observar que a preferência dos camundongos em biotério, foi relacionada, principalmente, às categorias de abrigo e nidificação. Os objetos de atividade lúdica utilizados nesse estudo despertaram interesse, porém com nível de interação reduzido, quando comparados com as outras categorias, até mesmo nas idades infante e jovem (MARTINS et al., 2017). É provável que o comportamento individual do camundongo esteja relacionado a esses resultados, uma vez que o animal tende direcionar suas atividades, na busca por proteção contra possíveis predadores, companheiros ou outros estímulos, como a luz forte, fazendo uso dos abrigos, e na confecção de ninho para termorregulação, conforto e repouso (BRASIL, 2016b; MATTARAIA; OLIVEIRA, 2012; MOREIRA, 2015; RIVERA, 2017). A atividade de brincar, além de despender alto gasto de energia, pode tornar o animal mais susceptível ao ataque de predadores. Os camundongos possuem metabolismo acelerado, o qual pode estar intimamente relacionado ao gasto de energia. Dentre as atividades comportamentais mais frequentes observadas nestes

animais, sem o uso do EA, foi à procura de alimento caracterizada pelo remexer da cama com as patas dianteiras (*digging*) e a exploração do ambiente (*rearing*) quando há o levantamento vertical, com ou sem apoio das patas dianteiras, na parede da gaiola (CHUMBINHO et al., 2012; HAMILTON et al., 2014; RODRIGUES et al., 2013).

Em relação à idade dos animais, vale salientar que há também uma diferença evidente, independente dos tipos de EA oferecidos entre as categorias. Os camundongos infantos demonstraram reduzido interesse em todos EA oferecidos, porém apresentaram um comportamento mais uniforme entre os indivíduos do respectivo grupo. O papel absorvente, da categoria nidificação, desde a sua apresentação até após os 5 dias de interação, demonstrou ser o item de preferência dos animais dessa idade. É possível que esse resultado esteja associado ao comportamento individual e social característico dessa idade, quando há menor atividade física e maior tempo de repouso, sendo então mais adequado o uso do papel absorvente para confeccionar o ninho.

Os animais jovens, curiosamente, apresentam interesse diferenciado quando comparados entre si, uma vez que alguns se interessam mais pelo EA do que outros. A categoria abrigo é a preferida para essa idade, principalmente o uso do *Igloo*[®]. O papel absorvente, também promoveu um marcante e heterogêneo interesse de seu uso. Esses dados podem ser explicados provavelmente pelo fato dos animais nessa idade estarem em elevação hormonal, (neste caso, os hormônios sexuais) promovendo, assim, uma maior atividade comportamental e uma significativa curiosidade dos indivíduos ao ambiente e a qualquer objeto ou material inserido em seu ambiente (CAMPOS et al., 2016). Porém, constatou-se queda no interesse/uso do papel absorvente após 5 dias de interação, uma vez que o EA foi misturado à cama dos animais, devido a utilização excessiva. Desta forma, sugere-se que, nessa idade, deve haver uma troca do material a cada 48 horas para que haja interação contínua.

Nos animais adultos a questão do papel absorvente também foi observada, onde houve alta preferência pelos indivíduos, porém novamente de maneira desuniforme, uma vez que alguns animais interagem com o EA e outros não. Nessa idade ficou ainda mais evidente que após 5 dias de interação, o papel absorvente e a cama tornaram-se um mesmo material, perdendo sua característica de EA.

O *Igloo*[®], sem dúvida, é o tipo de EA de maior preferência entre os camundongos adultos, uma vez que este propicia abrigo aos indivíduos e alguns passam mais tempo interagindo com esse objeto do que com qualquer outro tipo de EA testado. Entretanto, é interessante destacar que alguns animais dominam o *Igloo*[®], demonstrando claramente que esse EA estimulou o comportamento individual e social de territorialismo (BATISTA et al., 2012).

Essa dominação pelo objeto pode ser notada pela presença de ataques proferidos pelo camundongo dominante contra os outros animais que buscam fazer uso do *Igloo*[®]. Porém quando há tolerância do dominante ao uso do EA por outros indivíduos, o tamanho do *Igloo*[®] torna-se um fator limitante, restringindo seu uso para, no máximo 4, camundongos na idade adulta ao mesmo tempo.

Em relação ao etograma, na ausência do EA no SGI, os camundongos Swiss Webster, demonstraram na 4ª sdv alta incidência na atividade de repouso, seguido de EX e PA. No entanto, quando foram inseridos os EAs de escolha, *Igloo*[®] e o papel absorvente em cada área do SGI, houve uma mudança no seu comportamento individual e social. O uso do EA foi de grande proporção, sendo que, esse uso, também foi direcionado a atividade de repouso, pois ambos EAs propiciam esse hábito natural da idade. Além disso, curiosamente, parte dos animais manteve a atividade de repouso, porém sem o uso do EA.

Os indivíduos jovens e adultos demonstraram um perfil semelhante no etograma na ausência de EA. A EX e a PA foram as atividades de maior incidência entre o grupo de animais no SGI. A presença do EA (*Igloo*[®] e o papel absorvente) promoveu alto interesse e seu uso tornou-se maior que as atividades de EX e PA. Dessa forma, enfatiza-se a importância do uso de EA em gaiolas de camundongos em ambiente laboratorial. Ressalta-se que, apesar do grande interesse e da alta frequência de uso dos EAs nas respectivas idades, a diminuição da EX e de PA, foi proporcional entre elas e não desapareceu, apenas foi reduzida. A atividade de RE foi observada em baixa frequência na ausência do EA. Quando houve a inserção do EA, os gráficos demonstram ausência dessa atividade. Esse resultado deve ser avaliado da seguinte forma: a) os animais dessa idade, durante o período de filmagem (60 minutos), apresentaram baixa incidência da respectiva atividade e b) os indivíduos que foram observados em repouso, o fizeram utilizando o EA, então foi contabilizado como incidência de uso de EA (CHUMBINHO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013).

8 CONCLUSÃO

Através do conjunto de resultados descritos nesse trabalho foi possível responder a questão motivadora do projeto: “Qual seria o melhor tipo de EA para camundongos SW-M em biotério?”

O uso do SGI, permitiu o animal escolher, em diferentes idades, entre os equipamentos/materiais de sua preferência, como EA em suas atividades individual e dinâmica social. Os tipos de EA relacionados a categoria abrigo e nidificação foram os de preferência. Sendo que dentro dessas categorias, o *Igloo*[®] e o papel absorvente foram os preferidos, respectivamente. É válido ressaltar que camundongos infantos demonstraram, neste estudo, menor interesse ao uso de EA quando comparado com as idades de jovens e adultos. Além disso, diversos objetos de atividade lúdica promoveram reduzido interesse nas diferentes idades estudadas.

Os resultados deste trabalho permitiram a elaboração de uma tabela (Tabela 3), na qual são indicadas vantagens e desvantagens de cada equipamento/material de maior preferência, pelos animais, em relação a cada idade. Acredita-se que esses dados possam contribuir para a orientação e a execução de um processo ou implantação de um programa contínuo e eficiente de uso do EA em biotérios.

Tabela 3: Tipos de EA preferidos e resumo de suas vantagens e desvantagens em relação as faixas etárias.

<i>Vantagens</i>	<i>Igloo</i> [®]	<i>Desvantagens</i>
Proporciona conforto para repouso	4 ^a sdv	Maior tempo de adaptação ao EA
Estimula a atividade dos animais	6 ^a sdv	Baixo uso como Abrigo
Utilizam como abrigo para repouso	8 ^a sdv	Utilização de 3 a 4 animais
Reutilização e higienização	Gerais	Dominância e agressividade

<i>Vantagens</i>	Papel Absorvente	<i>Desvantagens</i>
Oferece material para repouso	4 ^a sdv	Baixo uso e manipulação do EA
Estimula a atividade dos animais	6 ^a sdv	Perde o uso rapidamente
Alta utilização dos animais	8 ^a sdv	Período curto de substituição
Custo relativamente baixo	Gerais	Esterilização do material

9. PERSPECTIVAS

Uma das perspectivas e aplicabilidade dos conhecimentos obtidos pelos resultados desse trabalho foi o auxílio na estruturação e implantação do Programa de Enriquecimento Ambiental (PEA), do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz (CEA/IOC). De forma similar, contatos preliminares entre coordenadores, pesquisadores e demais usuários, do Serviço de Animais de Laboratório (SAL), no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), estão sendo buscados para que haja a estruturação e implantação do PEA.

A princípio, salienta-se que apesar da prática de uso do EA ser regulamentada e de uso recorrente em diversas instituições no Brasil, o ineditismo desse programa constitui-se de: a) anteriormente a escolha e inclusão do EA para as diversas espécies animais utilizadas no CEA/IOC, um intenso trabalho etológico foi realizado e, pela primeira vez, ao menos descrito na literatura relativa à ciência em animais de laboratório, foi “perguntado” ao animal qual o tipo de EA de sua preferência e/ou escolha; b) a aplicação do SGI possibilitou a determinação estatística e científica dos tipos de EAs preferidos e sua influência, durante sua inclusão, no comportamento individual e social dos animais em diferentes idades; c) foi viável determinar através de testes comportamentais, como por exemplo, o Teste de Suspensão da Cauda (TSC), a influência na atividade física/emocional do uso prolongado dos diversos tipos de EAs. Pode-se afirmar que a ausência de EA promove no grupo de animais (nesse caso, camundongos) uma hipoatividade, similar ao estado *depression-like*, quando comparado a agrupamentos com EA. Esse fato é extremamente importante quando relacionado à qualidade de vida dos animais e a reprodutibilidade dos resultados dos ensaios, pois a hipoatividade ou estado *depression-like* promove influência direta na fisiologia, endocrinologia, imunologia e neurologia dos animais.

10. REFERÊNCIAS

ALCOCK, J. **Animal behavior, an evolutionary approach**. 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1993.

BATISTA, W. S.; SILVA, L. C. C. P.; DEMARQUE, K. C.; OLIVEIRA, F. S.; ACQUARONE, M.; BÔAS, F. V.; OLIVEIRA, G. M. Estudo do comportamento agressivo de camundongos em biotério: aplicação do modelo espontâneo de agressividade (MEA). **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 1, n. 4, p. 322-335, 2012.

BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v.46, n. 2, p. 162-70. 2005.

BENAVIDES, F.J.; GUENÉT, J.L. Genética de Camundongos. In: Benavides, F.J; Guenét, J.L. (Orgs.) **Manual de Genética de Roedores de Laboratório**: Princípios básicos y aplicaciones. Madri: Universidad de Alcalá, SECAL 2003.

BINSFELD, P. C. Caminho para a Legalidade. In: LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M; KO, G.M. (Orgs.) **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2017. p. 11-24.

BOERE, V. Enriquecimento ambiental para primatas neotropicais em restrição de espaço. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3 p. 543-551. 2001.

BRAGA, L. M. G. M. Três Rs. In: LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M; KO, G.M. (Orgs.) **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2017. p. 25-33.

BRAGA, L. M. G. M. Três Rs. In: LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M; KO, G.M. (Orgs.) **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Ateneu, 2009. p. 29-36.

BRAMBELL, F. W. R. **Report of the technical committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1965.

BRASIL. Decreto nº 24.645/1934 de 10 de julho. Estabelece medidas de proteção aos animais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/d24645.htm>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto-Lei nº 3.688/1941 de 03 de outubro. Lei das contravenções penais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del3688.htm>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei nº 5.197/1967a de 03 de janeiro. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L5197.htm >. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto-Lei nº 221/1967b de 28 de fevereiro. Dispõe sobre a proteção e estímulos à pesca e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del0221.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei nº 6.638/1979 de 08 de maio. Estabelece normas para a prática científica da vivissecção de animais e determina outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1970-1979/L6638.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Constituição 1988 de 05 de outubro. Constituição da República Federativa do Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicaocompilado.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei nº 9.605/1998 de 12 de fevereiro. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9605.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto nº 3.179/1999 de 21 de setembro. Dispõe sobre a especificação das sanções aplicáveis às condutas e atividades lesivas ao meio ambiente e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d3179.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei nº 11.794/2008 de 08 de outubro. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto nº 6.899/2009 de 15 de julho. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais-CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa nº 25, de 29 de setembro de 2015. Baixa o Capítulo "Introdução Geral" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 6 out. 2015. Disponível em: < http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa nº 30, de 02 de fevereiro de 2016a. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 3 fev. 2016. Disponível em: < http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238684.pdf>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016b. Baixa o Capítulo "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 21 nov. 2016. Disponível em: < <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=5&data=21/11/2016>>. Acesso em 21 ago. 2017.

BUSS, D. M. **Evolution of desire**. 1982. New York Basic Books p. 23-89.

CAMPOS, J.D.S.; HOPPE, L. Y.; FRAGOSO, V. M. S.; OLIVEIRA, G. M. O comportamento do camundongo Swiss Webster em biotério de experimentação: Observações e reflexões. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 4. n. 1, p. 30-41, 2016.

CARDOSO, C. Legislação brasileira para uso de animais em pesquisa. In LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M; KO, G.M. (Orgs.) **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Ateneu, 2009. p. 11-27.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 03, p. 289-299, 2004.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2007

CHUMBINHO, L.C.; SILVA, L. C. C. P.; PIZZINI, C. C.; BATISTA, W. S.; OLIVEIRA, F. S.; OLIVEIRA, G. M. . Etograma de camundongos em biotério: Quais são as principais atividades deste animal dentro da gaiola? **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 25-31, 2012.

CLARK, J. D.; RAGER, D. R.; CALPIN, J. P. Animal well-being I. General considerations. **Laboratory Animal Science**. v. 47, n. 6, p. 564-570, 1997.

CONCEA. **Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**, Brasília, DF, 26 set. 2016. Disponível em: < http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf>. Acesso em 21 ago. 2017.

DEFENSOR, E. B.; CORLEY, M. J.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Facial expressions of mice in aggressive and fearful contexts. **Physiology & Behavior**, v. 107, p. 680–685, 2012.

DEGUCHI, B. G. F. Bem-estar de animais de laboratório: questões relevantes ao refinamento. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, Paraná, Curitiba. 2013. Disponível em: < <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/31665/R%20-%20D%20-%20BERNARDO%20GRACA%20FATORI%20DEGUCHI.pdf?sequence=1> >. Acesso em 7 jul. 2017.

DIXON, A. K.; FISCH, H. U. Animal models and ethological strategies for early drug-testing in humans. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 23, n. 2, p. 345-358, 1998.

FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL (FAWC). **Farm Animal Welfare Council: Report on priorities for animal welfare research and development**. London: FAWC, 1993.

GRAEFF, F. G. Medicamentos ansiolíticos. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, p. 123-160, 1999.

GONÇALVES, M. A. B.; SILVA, S. L.; TAVARES, M. C. H.; GROSMANN, N. V.; CIPRESTE, C. F.; CASTRO, P. H. G. Comportamento e bem-estar animal: o enriquecimento ambiental. In ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R.; MARINHO, A. M.; FILHO, J. F. (Orgs.). **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010. p. 137–160.

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. C.; MENEZES, L. M. B. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista Bioética**, v. 24, n. 2, p. 217-224, 2016.

HAMILTON, D. A.; BARTO, D.; RODRIGUEZ, C. I.; MAGCALAS, C. M.; FINK, B. C.; RICE, J. P.; BIRD, C. W.; DAVIES, S.; SAVAGE, D. D. Effects of moderate prenatal ethanol exposure and age on social behavior, spatial response perseveration errors and motor behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 269, p. 44–54, 2014.

HONESS, P. E.; MARIN, C. M. Enrichment and aggression in primates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 3, p. 413-436, 2006

KEELING, L.; JENSEN, P. Behavioral disturbances, stress and welfare. In: JENSEN, P. (Ed.). **The ethnology of domestic animals: An Introductory Text**. Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI Publishing 2002. p. 79-98.

KO, G. M.; DE LUCA, R. R. Camundongo. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. (Orgs.) **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Ateneu, 2009. p. 137-165.

KUZEL, M. A.; OLIVEIRA, F. S.; DEMARQUE, K. C.; RANGEL, J. A.; RODRIGUES, F. V. B.; BATISTA, W. S.; GAMEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. M. Estudo da hierarquia de camundongos Swiss Webster através do uso de Sistemas com Gaiolas Interligadas (SGI). **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 49-60, 2013.

MARTINS, T. V. A.; GONÇALVES, M. A. B.; CAMPOS, J. D. S.; OLIVEIRA, G. M. Avaliação da preferência pelo tipo de enriquecimento ambiental utilizado por camundongos Swiss Webster em biotério através do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI). **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 17-34, 2017.

MASSARI, C. H. A. L. **O bem-estar na experimentação animal com ênfase na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Sorocaba, Sorocaba, São Paulo. 2014. Disponível em: < http://farmacia.uniso.br/producao-discente/dissertacoes/2014/Catia_Helena_de_Almeida_Lima_Massari.pdf >. Acesso em 7 jul. 2017.

MASSIRONI, S. M. G.; GODARD, A. L. B. Genética de Animais de Laboratório. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. (Orgs.) **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2017. p. 325-341.

MATTARAIA, V. G. M. Enriquecimento ambiental. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. (Orgs.) **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Ateneu, 2009. p. 537-547.

MATTARAIA, V. G. M.; OLIVEIRA, G. M. Enriquecimento ambiental. In: MATTARAIA, V. M.; OLIVEIRA, G. M. (Orgs.). **Comportamento de Camundongos em Biotério**. São Paulo: Poloprint, 2012. p. 223-240.

MEDINA, M. P. **Efeitos do enriquecimento ambiental no comportamento e bem-estar de animais de laboratório convencionais**. 2011. Trabalho de Graduação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2011. Disponível em: < <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/60802/000860495.pdf?sequence=1>>. Acesso em 1 jul. 2016

MEEHAN, C. L.; MENCH, J. A. The challenge of challenge: can problem solving opportunities enhance animal welfare? **Applied Animal Behaviour Science**, v.102, p. 246-261, 2007.

MOREIRA, V. B. **Eficiência reprodutiva e comportamento parental de camundongos isogênicos e heterogênicos produzidos em ambiente modificado**. 2015. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 2015. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/126631/000841528.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 7 jul. 2017.

NEWBERRY, R. C. Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 44, p. 229-243, 1995.

NOMURA, T. **Concept for establishment of rat outbred global standard strains. Microbial status and genetic evaluation of mice and rats: proceedings of the 1999**. US / Japan Conference. Institute for Laboratory Animal Research (ILAR), 2000.

OLIVEIRA, F. S.; DEMARQUE, K. C.; RANGEL, J. A.; BATISTA, W. S.; GAMEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. M. Dosagem da concentração plasmática de corticosterona em camundongos altamente agressivos da linhagem Swiss Webster. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 85-94, 2015.

OLIVEIRA, G. M. Hierarquização em Agrupamentos. In: MATTARAIA, V.M.; OLIVEIRA, G.M. (Orgs.). **Comportamento de Camundongos em Biotério**. São Paulo: Poloprint, 2012. p. 179-194.

PETROIANU, A. Aspectos éticos na pesquisa em animais. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 157-164, 1996.

PORTELLA, A. S. **O enriquecimento ambiental na criação de animais em jardins zoológicos**. 2000. Monografia (Licenciado em Ciências Biológicas). Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília. 2000. Disponível em: < <http://repositorio.uniceub.br/bitstream/123456789/2385/2/9508876.pdf> >. Acesso em 16 ago. 2017.

REZENDE, A. H.; PELUZIO, M. C. G.; SABARENSE, C. M. Experimentação animal: ética e legislação brasileira. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 237-242, 2008.

RIVERA, E. A. B. Bem-Estar de Animais de Laboratório. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. (Orgs.). **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2017. p. 35-45.

RIVERA, E. A. B.; RODRIGUES, U. P. Ética na Utilização de Modelos Animais. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. (Orgs.). **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Ateneu, 2009. p. 37-41.

RODRIGUES, F. V. B.; KLOUZEL, M. A.; DEMARQUE, K. C.; RANGEL, J. A.; SILVA, L. C. C. P.; BATISTA, W. S.; GAMEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. M. Etograma de camundongos em biotério II: Quais são as principais diferenças no comportamento de Swiss Webster e BALB/c?. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v.2 n. 1, p. 20-30, 2013.

SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Orgs.). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 115-118.

SHERWIN, C. M. The influence of standard laboratory cages on rodents and the validity of research data. **Animal welfare**, v. 13, n. 1, p. 9-15, 2004.

STEWART K. Development of an environmental enrichment program utilizing simple strategies. **Animal Welfare Information Center Bulletin**, v. 12, n. 1-2, p. 1-40, 2004

SUCKOW, M. A.; DANNEMAN, P.; BRAYTON, C. **The Laboratory Mouse**. Boca Raton: CRC, 2001. p. 168

VOLPATO, G. L. Considerações metodológicas sobre os testes de preferência na avaliação do bem-estar em peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 53-61, 2007.

WINSTON, R. **Instituto humano**. Grã Bretanha: Globo, 2006. p. 1-52.

YERKES, R. M. **Almost human**. London: Jonathan Cope, 1925. 229 p.

YOUNG, R. J. **Environmental enrichment for captive animals**. Hong Kong. Wiley-Blackwell Animal Welfare Book Series/UFAW. 2003. 228 p.

11. ANEXO

11.1. ANEXO A - Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA

L-004/2016

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-055/2015), intitulado "Utilização do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI) para o estudo de preferência comportamental em camundongos da linhagem Swiss Webster", sob a responsabilidade de **GABRIEL MELO DE OLIVEIRA** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 30/11/2018 e inclui o uso total de:

Camundongo, cepa:

Mus musculus / Swiss Webster – 160 animais machos – 3 semanas de vida

Mus musculus / Swiss Webster – 100 animais machos – 5 semanas de vida

Mus musculus / Swiss Webster – 100 animais machos – 7 semanas de vida

Mus musculus / Swiss Webster – 24 animais machos – 8 semanas de vida

Mus musculus / Swiss Webster – 12 animais fêmeas – 10 semanas de vida

Rio de Janeiro, 17 de fevereiro de 2016.

Flávio Alves Lara

Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz