



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Enriquecimento Ambiental e a modulação da emocionalidade, cuidado materno e metilação de genes em camundongos fêmeas LG/J.

Área de Concentração: Genética e Evolução

Aluna: Natalia Marques Rosa

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

Co-Orientadora: Prof. Dra. Andréa Cristina Peripato

São Carlos

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Natalia Marques Rosa, realizada em 30/08/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Reinaldo Otavio Alvarenga Alves de Brito (UFSCar)

Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato (UFSCar)

Prof. Dr. Geison Souza Izídio (UFSC)

Prof. Dr. Bruno Sauce Silva (VU)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

*À minha família, pela dedicação de suas
vidas em favor daqueles que amam. E
em especial à memória de minha vó
Marilda que tanto estimava pela
conclusão deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida.

Agradeço especialmente à minha avó Maria (*in memoriam*), por me deixar lembranças que definem quem sou. À minha avó Marilda (*in memoriam*) pelas orações e estimas para a conclusão deste trabalho. Sei que lá no céu estarão brindando com toddynho e leite ninho.

Agradeço ao meu irmão que, diariamente, me mostra o poder da perseverança e a força que temos dentro de nós, só basta acessá-la. E pela inocência das brincadeiras que muitas vezes me tiraram da escuridão de alguns pensamentos.

Aos meus pais, Graziela e Alessandro, que tanto me apoiam e me incentivam a conquistar meus sonhos! E ao meu companheiro de vida, Diogo, que de forma especial e carinhosa me ajudou a chegar até aqui! E tia Alexandra, obrigada por me ouvir!

Ao Prof. Dr. Reinaldo Alvarenga Alves de Brito, meu orientador, e à Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato, minha co-orientadora, pela oportunidade de realizar este estudo no Laboratório de Genética de Populações e Evolução e no Laboratório de Genética de Comportamento pela atenção, paciência e dedicação durante todo este percurso para a conclusão da dissertação.

Aos meus amigos Edgar, Lindomar e Nathalia, pelas palavras de apoio e por transformarem o tempo que passávamos em teste em momentos de amizade. Agradeço as minhas amigas Edyane, Mariana e Samira, por compartilharem seus conhecimentos e pelas palavras de apoio em momentos difíceis. E agradeço especialmente à minha amiga Beatriz, sua presença e apoio foi de fundamental importância para concluirmos este trabalho; obrigada por iluminar nossa salinha. E, em especial, a dois grandes amigos e servidores da UFSCar Antônio Donizetti Aparecido da Silva (Tonim) e Luiz Henrique da Silva (Piau), pela construção do Sistema de Gaiolas Interligadas e pelas risadas enquanto eu autoclavava os materiais.

Gostaria também de agradecer ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar - *campus* São Carlos) e ao Programa de Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv).

E por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento da bolsa de mestrado.

Obrigada.

“A vida é mais do que só ficar esperando.”

Jesse Koz & Shurastey

RESUMO

O Enriquecimento Ambiental (EA) pode ser considerado como um conjunto de alterações ambientais que pode estimular comportamentos específicos para uma espécie e favorecer o bem-estar em animais cativos. O presente trabalho pretendeu investigar a influência do EA (rolo de papelão) sobre modulações comportamentais e epigenéticas em fêmeas murinas da linhagem LG/J de diferentes fases de vida. Para isso, foram estabelecidos quatro grupos: grupo 1, controle positivo – EA contínuo; grupo 2, controle negativo – EA ausente; grupo 3 – EA na fase púbere (3 e 4 semanas de idade); e grupo 4 – EA na fase materna. A emocionalidade de todas as fêmeas foi avaliada pelos testes de Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado. Também foi avaliado o desempenho da mãe na postura materna (tamanho de ninhada, construção de ninho, peso dos filhotes, placentofagia e agressividade contra intrusos) e no Teste de Recuperação dos Filhotes (*self grooming* da mãe e interação mãe-filhotes pelo *licking*, *nursing* e tempo de resgate da ninhada). As fêmeas parecem, de maneira geral, apresentar naturalmente o comportamento tipo ansioso e depressivo que intensificaram-se em fases de vida mais tardias. No entanto, a utilização do enriquecimento ambiental parece mitigar essas respostas comportamentais. Fêmeas enriquecidas na fase púbere e materna demonstraram-se menos ansiosas e depressivas do que fêmeas não enriquecidas. Porém, a habituação das fêmeas ao enriquecimento constante anularam os efeitos positivos desejados. Da mesma forma, expor as fêmeas ao enriquecimento apenas na fase púbere parece ter refletido em comportamentos tipo ansiosos e depressivos na fase mais tardia (pós-desmame). O enriquecimento na fase materna promoveu melhorias na postura das fêmeas, em que as ninhadas sofreram menos perdas de filhotes, os ninhos construídos foram mais altos e aquecidos, e os filhotes tiveram mais proteção pelas mães na análise de agressividade contra intrusos e no teste de resgate. Após as análises fenotípicas foi possível sequenciar uma amostra de hipotálamo utilizando o sequenciador de bolso, *Oxford Nanopore MinION* que permitiu aprender metodologias de uma tecnologia de sequenciamento de quarta geração. Nossos resultados permitiram o enriquecimento das discussões na área de pesquisa e embasam novos trabalhos de nosso grupo, na busca de marcadores epigenéticos associados ao bem-estar animal.

Palavras-chave: Bem-estar animal; Ansiedade; Depressão; Comportamento materno; Epigenética.

ABSTRACT

Environmental Enrichment (EE) can be considered as a set of environmental changes that can adjust the model of a species and favor well-being in captive animals. The present study intends to investigate the influence of EE (cardboard roll) on behavioral and epigenetic modulations in murine females of the LG/J strain in different life stages. For this, four groups were determined: group 1, positive control – continuous EE; group 2, negative control – EE absent; group 3 – EE in the pubertal phase (3 and 4 weeks of age); and group 4 – EE in the maternal phase. The emotionality of all females was evaluated by the Open Field, Elevated Plus Maze and Forced Swim tests. The mother's performance was also evaluated in terms of maternal posture (litter size, nest construction, puppies weight, placentophagy and aggressiveness against intruders) and in the Puppies Recovery Test (self grooming and mother-puppies interaction by licking, nursing and litter rescue time). Females seem, in general, to naturally present anxious and depressive behavior that intensified in later life stages. However, the use of environmental enrichment seems to mitigate these behavioral responses. Likewise, exposing females to enrichment only in the pubertal phase seems to have reflected in anxious and depressive-like behaviors in the later phase (post-weaning). The enrichment in the maternal phase promoted improvements in the posture of the females, in which the litters suffered less loss of puppies, the nests built were taller and warmer, and the puppies had more protection by the mothers in the analysis of aggression against intruders and in the rescue test. After the phenotypic analyses, it was possible to sequence a hypothalamus sample using the pocket sequencer, Oxford Nanopore MinION, which allowed learning methodologies of a fourth generation sequencing technology. Our results allowed the enrichment of discussions in the research area and support new work by our group, in the search for epigenetic markers associated with animal welfare.

Keywords: Animal welfare; Anxiety; Depression; Maternal behavior; Epigenetics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Enriquecimento Ambiental (EA)	24
3.2.1. Exposição ao Enriquecimento Ambiental	25
3.3 Testes de emocionalidade e de Cuidado Materno	25
3.3.1. Emocionalidade	25
3.3.1.1 Campo Aberto (CA)	26
3.3.1.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	27
3.3.1.3 Nado Forçado (NF)	27
3.3.2 Cuidado Materno	28
3.3.2.1. Comportamento Materno	28
3.3.2.2 Teste de Recuperação dos Filhotes (RF)	28
3.3.2.3. Variáveis quantitativas relacionadas ao Enriquecimento ambiental	29
3.4 Análises Estatísticas	29
3.5 Procedimentos Moleculares	30
3.5.1 Extração de DNA	30
3.5.2 Metilação	31
3.5.2.1 Sequenciamento	31
3.5.2.2 Análise de pós-processamento dos dados de sequenciamento	32
3.5.2.2.1 Poretools	33
3.5.2.2.2 Nanoplot	33
3.5.2.2.3 NanoMethPhase	33
3.5.2.2.4 Tombo	35
3.5.2.2.5 DeepSignal2	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1 Enriquecimento Ambiental (EA)	38
4.1.1 Teste de Preferência de Enriquecimento Ambiental (TPEA)	38
4.2 Testes de emocionalidade e cuidado materno	39
4.2.1 Emocionalidade	39
4.2.1.1 Campo Aberto (CA) e Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	41
4.2.1.2 Nado Forçado (NF)	52

4.2.2 Cuidado materno	59
4.2.2.1 Comportamento materno	59
4.2.2.2 Teste de Recuperação dos Filhotes (RF)	69
4.2.2.3 Variáveis quantitativas relacionadas ao Enriquecimento Ambiental	76
4.3 Procedimentos Moleculares	81
4.3.1 Extração de DNA	81
4.3.2 Metilação	83
5 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
APÊNDICE A	112
ANEXO A	9
ANEXO B	10

1 INTRODUÇÃO

Desenvolvimento científico

O avanço, o desenvolvimento e as aplicações do método científico tiveram a experimentação animal como ferramenta fundamental. Fato histórico é que a pesquisa em animais não-humanos vem sendo utilizada desde a antiguidade e sua importância se mostrou e se mostra de grande valia (MENEZES, 2002). Ao mesmo tempo que a experimentação animal apresenta diversas vantagens, como a extrapolação dos conhecimentos para os seres humanos devido às suas possíveis proximidades evolutivas (estabelecidas por Charles Darwin já em 1859 (GOLDIM, RAYMUNDO, 1997)), ela também está presente em diversos debates envolvendo questões éticas e morais, religiosas, políticas, legais, de conservação ambiental, científicas e econômicas. Concomitantemente ao início dos debates sobre bem-estar animal e o estabelecimento dos animais como seres sencientes, i.e., capazes de sentir sensações e sentimentos de forma consciente (BRAGA, 2009), foram estabelecidas as primeiras regulamentações de proteção aos animais, como o The Cruelty to Animals Act no Reino Unido, em 1876. Em convergência, diversas diretrizes sobre a experimentação animal também surgiram, para assegurar a proibição de experimentos que causassem dor aos animais (UK PUBLIC GENERAL ACTS, 1876). Em 1959, Russel e Burch, com Replace, Reduce e Refine, sintetizaram o princípio humanitário de experimentação animal e sugeriram, sucintamente, a substituição dos animais por modelos de experimentação não sensíveis, a redução do número de animais por experimento e o refinamento de técnicas e procedimentos. No Brasil, a Lei Arouca, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) responsáveis por, resumidamente, formular e zelar pelo cumprimento de normas relacionadas à experimentação animal (BRASIL, 2008). Sendo assim, as discussões entre a utilização de animais em pesquisas e a importância dos conhecimentos gerados foram e são importantes para a manutenção de princípios éticos e legislações que asseguram o direito dos animais fundado em respeito, responsabilidade e conhecimento.

Animais modelo e sua importância para o desenvolvimento científico

Diversas questões éticas impossibilitam a experimentação em seres humanos, principalmente em investigações de estudos básicos e aplicados que buscam

desenvolver os conhecimentos sobre a fisiologia do organismo, ou, por exemplo, desenvolvimento de novos tratamentos e metodologias médicas (DAMATTA, 2010). Além disso, o Código de Nüremberg determina que a experimentação em humanos deve ser baseada em resultados da experimentação animal (ONU, 1949). Portanto, o uso de animais para o desenvolvimento científico é de importância significativa. Os estudos com animais modelo são fundamentais para o desenvolvimento de linhas de pesquisas biológicas e médicas, já que enquanto modelo, esses seres permitem mimetizar ou reproduzir características humanas (BELMIRA, 2002). Embora existam diferenças entre esses modelos animais e seres humanos, as semelhanças fisiológicas, celulares e moleculares geram informações valiosas dificilmente encontradas, por exemplo, em modelos computacionais e culturas de células (RAYMUNDO, GOLDIM, 2009).

Com a expansão do conhecimento sobre a biologia dos modelos animais, algumas espécies começaram a ser mais utilizadas do que outras, isto devido a suas próprias características, como: pequeno tamanho, ciclo reprodutivo relativamente curto, tamanhos de ninhada maiores, nutrição variada e adaptação ao cativeiro. Além dessas características, roedores, em especial camundongos (*Mus musculus*), também são dóceis, de fácil manejo, sociáveis e se adaptam a ambientes variados (BELMIRA, 2002). Roedores também apresentam bom desempenho em tarefas cognitivas, sendo importantes por exemplo, para o estudo e compreensão dos sistemas neurais que medeiam a emoção (CRYAN, HOLMES, 2005). Além disso, 90% do genoma murino e humano pode ser encontrado em regiões de sintonia conservada, refletindo a organização estrutural no ancestral comum e possibilitando o alinhamento de parte das sequências de ambas as espécies (PAU et al., 2004; GUÉNET, 2005).

Experimentação animal e bem-estar

A experimentação animal avançou e se refinou e, dado o crescente uso de animais de laboratório, como camundongos, e com base nesses novos conceitos fundamentado no tratamento ético e humanitário dos animais de laboratório, se faz presente um questionamento importante na ciência de animais de laboratório: o bem-estar animal. Em 1986, Broom definiu o bem-estar de um indivíduo como o seu “estado em relação às suas tentativas de adaptar-se ao ambiente” em que está inserido. Já em 1992, Hurnik definiu bem-estar como sendo “o estado de harmonia entre o animal e seu ambiente, caracterizado por condições físicas e fisiológicas ótimas e alta qualidade de vida dos animais”. Um conceito diretamente associado e que correlaciona as definições,

é a homeostase, ou seja, harmonia entre o ambiente interno do animal (do organismo propriamente dito) e externo (condições ambientais) (MCMILLAN, 1999). A homeostase exige que o animal se adapte e tenha controle em situações adversas, quando não, pode haver desconforto ou estresse (NEVES, MANCINI, MENEZES, 2013). Uma ferramenta reconhecida para avaliar o bem-estar é analisar as Cinco Liberdades, ideias estabelecidas em 1967, pelo Conselho de Bem-estar de Animais de Produção (*Farm Animal Welfare Council – FAWAC*), na Inglaterra, que mais tarde, em 2006 tiveram suas nomenclaturas alteradas por Molento, as quais se referem à: Liberdade Nutricional, Liberdade Sanitária, Liberdade Ambiental, Liberdade Comportamental e Liberdade Psicológica. As Cinco Liberdades auxiliam na quantificação do bem-estar animal e, no caso do presente estudo, a Liberdade Comportamental está em foco, ou seja, que o animal possa expressar comportamentos naturais dentro do possível, mesmo sob as condições de análise. O animal cativo deve, ao menos, poder expressar reações saudáveis em resposta a intervenções e aparatos inseridos em seu ambiente (YERKES, 1925).

Enriquecimento Ambiental (EA)

Sabe-se que animais mantidos fora de seu habitat natural geralmente não executam ou podem apresentar padrão limitado de tarefas específicas de sua espécie (MOREZZI et al., 2020). Para evitar/atenuar esses impactos negativos, a utilização de Enriquecimento Ambiental (EA) minimiza o estresse e tem sido uma abordagem para tornar as condições de alojamento mais complexas para atender preceitos etológicos próprios da espécie, sendo um dos principais fatores que influenciam no bem-estar animal (MEDINA, 2011). É possível definir EA como um conjunto de alterações no ambiente de animais cativos que estimulam a expressão de comportamentos específicos da espécie e favorecem o bem-estar (NEWBERRY, 1995; BAILOO, 2018). É importante que o ambiente seja desenvolvido visando o conforto dos animais, para evitar possíveis vieses metodológicos, pois quanto menor o estresse do animal, menor a variabilidade dos resultados, garantindo maior confiabilidade nos estudos, assegurando que sejam obtidos resultados científicos confiáveis e de boa qualidade (SHERWIN, 2004; OLIVARES, SANTOS, 2012).

Segundo Mattaraia (2009), o uso de EA para roedores mantidos em biotérios é amplamente recomendado por promover maior capacidade de aprendizagem, plasticidade cerebral e sucesso reprodutivo, além de melhorar o estado de saúde e

desempenho corporal. Contudo, é necessário analisar as respostas dos animais frente aos estímulos oferecidos antes de introduzir um programa de enriquecimento. O principal objetivo do EA é diminuir a incidência de comportamentos estereotipados e aumentar comportamentos normais. E por isso, a escolha do tipo de EA depende de alguns fatores, como estrutura do alojamento, idade, sexo, histórico dos animais, rotina do biotério e propósito da intervenção, pois sem direcionamento, a ferramenta EA pode apresentar resultados pouco satisfatórios (OLIVEIRA, BRÜCK, MARTINS, 2018). Outro fator que influencia na resposta aos enriquecimentos é a habituação, que pode ocorrer quando um mesmo estímulo é apresentado diversas vezes ou por tempo prolongado, perdendo seu caráter de novidade, diminuindo a taxa de interação, até que o EA se torne parte do alojamento padrão (KUCZAJ, 2002).

Enriquecimento Ambiental e suas classificações

Existem algumas classificações dos tipos de enriquecimentos. Segundo Neves, Mancini e Menezes (2013), os enriquecimentos podem ser caracterizados como: enriquecimento cognitivo, alimentar, sensorial, social e físico. Brevemente, o enriquecimento cognitivo objetiva proporcionar situações motivadoras por meio de desafios e jogos com consequências recompensadoras (GONÇALVES et al. 2010); o EA alimentar pode ser inserido como modificações na forma como o alimento é oferecido, bem como alterações da dieta, horários e frequência de alimentação (HONES, MARIN, 2006); o sensorial inclui estímulos visuais, auditivos e olfativos que sejam eficientes na melhoria do bem-estar (GONÇALVES et al. 2010); o EA social inclui a socialização dos animais, de maneira harmoniosa, com ou sem contato com intra ou inter-específicos (BAUMANS, 2005); e o EA físico, alvo do estudo deste trabalho, tem como objetivo reduzir 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 (GONÇALVES et al. 2010). Alguns exemplos de objetos de enriquecimentos para camundongos são: tubos de PVC, algodão, papel-toalha, máscara descartável amarrada para funcionar como rede de descanso, papel picado, e objetos comercializados, como cabanas e iglus (NEVES, MANCINI e MENEZES, 2013). Outro fator a ser mencionado e analisado antes de expor os animais a objetos de enriquecimento é o possível risco para a saúde dos animais (PORTELLA, 2000). Por isso os materiais devem ser livres de toxinas e permitir processos de descontaminação e esterilização, ser certificados ou resistentes às espécies as quais se

destinam e que sejam adequados à fase de desenvolvimento do animal (MATTARAIA, 2009). Além dos benefícios discutidos anteriormente, o EA também se mostra diretamente relacionado com o comportamento e emocionalidade dos animais (ROSENZWEIG, 1966), como na regulação de respostas ansiosas (BENAROYA-MILSHTEIN, 2004; GÖRTZ, 2008) e depressivas (HATTORI, 2007; JHA, DONG, SAKATA, 2011).

Emocionalidade e testes comportamentais

A emocionalidade é uma característica complexa e sua definição ainda envolve discussões. A palavra emoção, do latim *emovere* evoca ideias de movimento/mudança e pode ser ampliada para o sentido de agitação ou perturbação do estado psicológico (RAMOS, MORMÈDE, 1997). A definição em dicionário da língua portuguesa é: “perturbação do espírito, provocada por situações diversas e se manifesta como alegria, tristeza, raiva, etc” (FERREIRA, ANJOS, 2000). Em 1934, Hall descreveu emocionalidade como um termo descritivo para “eliminação emocional” conceituando as alterações comportamentais e periféricas que acompanham alta atividade nervosa simpática em resposta a diversos estímulos, incluindo as novidades ambientais. A interpretação comumente adotada pela psicologia e neurociência envolve os estados particulares de determinado organismo frente às condições bem definidas (situação emocional) que se adiciona às experiências subjetivas e manifestações somáticas e viscerais (MESQUITA, DUARTE; 1996). Conforme o estudo da psicologia comparada foi avançando, modelos comportamentais foram criados para medir a emotividade dos animais, principalmente roedores, e diferentes interpretações surgiram. Contudo, a maioria compartilha de experiências envolvidas no campo dos sentimentos associadas às mudanças comportamentais/fisiológicas geradas por situações incomuns (RAMOS, MORMÈDE, 1997). O conjunto de emoções que animais não-primatas experimentam é menos complexo, incluindo estados de medo, alegria e raiva (GHERARDI, 1988). Em seus estudos, Darwin (1972) conclui que certas expressões de emoções são inatas e que derivaram de ações que serviram originalmente a uma função adaptativa do indivíduo. Ou seja, uma função adaptativa que influenciou/influencia diretamente nas chances de sobrevivência e sucesso reprodutivo.

Um dos tipos clássicos de emoção é a ansiedade, que por definição: é a antecipação emocional de uma situação aversiva, difícil de prever e controlar, e que é provável de ocorrer (MESQUITA, DUARTE; 1996), ou, pela definição farmacológica:

um estado emocional expresso comportamentalmente sob condições ambientais aversivas que pode ser amenizado ou potencializado pelo uso de drogas ansiolíticas ou ansiogênicas (RAMOS, MORMÈDE, 1997). Segundo a Edition et al. (2013), a ansiedade é marcada principalmente por um “medo acentuado persistente e excessivo ou irracional”. Esses critérios também são importantíssimos na diferenciação de transtornos depressivos. De fato, ao contrário de episódios depressivos, uma resposta ansiosa transitória a um estímulo/perigo real é uma resposta apropriada e adaptativa. Ansiedade e medo são comportamentos relacionados, porém, segundo Blanchard e Blanchard (1988), a ansiedade está associada à avaliação de risco em situações de ameaça potencial e incerta, enquanto o medo está associado à estratégias defensivas que ocorrem frente a presença de uma ameaça. Em camundongos, a modulação de comportamentos tipo ansiosos pode ser observada, por exemplo, pela evitação da exposição a locais aversivos e de áreas bem iluminadas, baixa interação social com coespecíficos não familiares e *grooming* excessivo (CRYAN, HOLMES, 2005).

A depressão é outro tipo de emoção identificada em animais e pode ser definida como estado melancólico (MESQUITA, DUARTE; 1996). Abordagens médicas contemporâneas reconhecem depressão como uma patologia do sistema nervoso central (INSEL, CHARNEY, 2003). A depressão é tanto biologicamente quanto geneticamente um distúrbio heterogêneo com sintomas manifestados em níveis psicológicos, comportamentais e fisiológicos. Comportamentos tipo depressivos em camundongos podem ser apresentados, por exemplo, como perda anormal de peso corporal após exposição a estressor, arquitetura de sono anormal e alterações em várias medidas de atividade locomotora e funções motoras (CRYAN, HOLMES, 2005).

Testes comportamentais foram desenvolvidos para a determinação da emocionalidade dos indivíduos e, adicionalmente, validar modelos de camundongos para o estudo de ansiedade e depressão. Em 2007, Jacqueline Crawley advertiu sobre a não antropomorfização de comportamentos relacionados à emoção em camundongos, portanto é possível estudar, por meio de inferência, comportamentos, circuitos neurais e fatores genéticos utilizando outras espécies, como animais modelos, para entender o comportamento humano e as doenças. Segundo McKinney e Bunney (1969) é necessário que o comportamento do modelo animal seja 'razoavelmente análogo' ao transtorno humano; e as avaliações devem provocar uma mudança comportamental monitorável; produzir mudanças comportamentais revertidas pelas mesmas modalidades de tratamento que são eficazes em humanos; e ser reprodutível entre os

investigadores. Os diferentes testes comportamentais expõem os animais a um ou mais estímulos aversivos, por períodos variáveis, com observação concomitante dos seus comportamentos (ARCHER, 1973). Estudos nessa área tem utilizado os testes considerados como “clássicos”: Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Nado Forçado, Teste da suspensão da cauda, Caixa claro/escuro e Interação social (HALLER; ALIKI, 2012).

Os testes de conflito de abordagem-evitação com base exploratória para a observação de comportamentos tipo ansiosos, avaliam o conflito entre explorar e a aversão por espaços expostos e bem iluminados. Os testes de Campo Aberto (CA) e Labirinto em Cruz Elevado (LCE) são amplamente utilizados para avaliação de comportamentos tipo ansiosos (HALL, 1934; LISTER, 1987; RODGERS et al., 1997). O teste com caixa claro/escuro baseia-se na aversão natural camundongos, animais de hábitos noturnos, por ambientes claros ou excessivamente iluminados (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; COSTALL et al., 1989). O teste de suspensão da cauda (STERU et al., 1985; CHERMAT et al., 1986) se baseia no fato de que animais submetidos a curtos períodos de estresse inescapável pela suspensão de sua cauda tendem a desenvolver uma postura imóvel, característica de comportamentos depressivos, assim como no teste de Nado Forçado (NF) que se baseia na observação de imobilidade em roedores quando colocados em um cilindro fechado (inescapável) com água morna (PORSOLT et al., 1977). E por fim, o teste de interação social é um modelo amplamente utilizado que permite avaliar comportamentos de dois ou mais camundongos expostos a uma mesma arena. Os animais apresentam comportamentos de farejar e seguir uns aos outros, subir um no outro ou ficar embaixo, farejamento focinho-focinho e farejamento anogenital (LAVIOLA, TERRANOVA, 1994; MCFARLANE; KUSEK; YANG; PHOENIX; BOLIVAR; CRAWLEY, 2008). Neste trabalho serão utilizados testes comportamentais para avaliar traços ansiosos e depressivos dos animais, entre eles o Campo Aberto (CA) e Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para avaliar traços ansiosos, além do Nado Forçado (NF) para avaliar traços depressivos de fêmeas LG/J. Vale ressaltar que, as fêmeas LG/J (linhagem estudada neste trabalho) parecem apresentar padrão comportamental naturalmente tipo ansioso e depressivo dependendo da fase de vida em que se encontram (ROSA, MASUKI, MACHADO JR, ALVES, PERIPATO, 2021; SANTANA, PERIPATO, ROSA, 2016). Porém, é preciso atentar-se que os roedores, geralmente, apresentam característica naturalmente neofóbica e diversos fatores podem

acentuar ou atenuar seus traços emocionais podendo ser de origem ambiental ou de influência biológica (PRUT; BELZUNG, 2003).

Emocionalidade e influencias ambientais e biológicas

Os fatores ambientais podem estar relacionados tanto ao âmbito físico do recinto, quanto social. Acerca desses fatores ambientais, alguns estudos demonstraram, por exemplo, que o agrupamento nas gaiolas e o isolamento social são questões críticas nas alterações de níveis de ansiedade (MAISONNETTE et al., 1993; DA SILVA, N.L. et al., 1996; KAWAK et. al., 2009). Da mesma forma, o nível de iluminação em que o alojamento e os testes comportamentais são expostos também influencia na resposta comportamental dos camundongos e ratos (CARDENAS, LAMPREA, MORATO, 2001; BERTOGLIO, CAROBREZ, 2002; IZÍDIO, et al. 2005). Vale destacar aqui que, embora os camundongos sejam espécies exploratórias, naturalmente forrageadores e desempenham tarefas baseadas na exploração do ambiente, a pressão seletiva na defesa contra a predação culminou em uma aversão inata a espaços expostos e bem iluminados. (CRYAN, HOLMES, 2005). A variação na manipulação dos animais pelo experimentador e/ou tratador pode gerar em alterações comportamentais dos animais de laboratório (Andrews e File, 1993), além da presença de enriquecimento ambiental que influencia diretamente no comportamento e emocionalidade dos animais, como já mencionado anteriormente.

O ambiente social dos animais também pode ser relevante para alterações encontradas na emocionalidade. Os animais de laboratório apresentam interações sociais co-específicas do tipo mãe-filhote, macho-macho e fêmea-fêmea, e interações fêmea-macho que envolvem diferentes estratégias comportamentais associadas à agressão, dominação, motivação para explorar o ambiente e parceiro, e, conseqüentemente, podem suscitar medo e ansiedade (CAROLA, et al., 2008).

Os comportamentos relacionados à ansiedade e emocionalidade também são influenciados por fatores biológicos. Diferentes linhagens de camundongos podem apresentar diferentes perfis emocionais (GRIEBEL et al., 2000), assim como a alteração na microbiota de animais isogênicos podem alterar seu desempenho em testes de comportamento (BOEDER, 2019). Além disso, os animais possuem variações hormonais no decorrer do dia, o que pode gerar diferenças comportamentais em sua exposição a diferentes testes (NELSON, SCHEVING et al., 1975; BERTOGLIO, CAROBREZ, 2002), por isso, a fase do dia no qual os animais estão sendo avaliados

deve-se manter constante, a fim de amenizar a influência desta variável. A idade/fases de vida, como puberdade, fase adulta, reprodutiva e idades mais avançadas de envelhecimento também interferem na resposta emocional frente aos diferentes estímulos (IMHOF et al., 1993). A juventude é marcada por uma fase crucial de desenvolvimento comportamental (MACRI et al., 2002) em que a emocionalidade e os sistemas neurais mediando a emoção permanecem altamente plásticos (HOLMES et al., 2005). No entanto, há uma fase crítica do desenvolvimento comportamental: a puberdade. Nela, a função adaptativa da dispersão, a busca por novos nichos (MACRI et al., 2002), a exploração de ambientes (GALEF, 1981) adicionados à um declínio no sistema cerebral mediador de respostas ao estresse (DILLON et al., 1991) parecem estar frequentemente associados à diminuição de comportamentos tipo ansiosos. E quanto ao envelhecimento, por si só já é acompanhado de mudanças cognitivas e emocionais marcantes, podendo apresentar aumento nos comportamentos tipo ansiosos e depressivos (MEYZA et al., 2011).

O sexo também apresenta diversas características quantitativas que influenciam a emocionalidade (IMHOF et al., 1993; NGUN et al., 2010), além de que, fêmeas estão sujeitas a alterações hormonais cíclicas, quando adultas (ciclo estral) (BIRKE, ARCHER, 1975), e principalmente, na fase materna (ZULUAGA et al., 2005). A complexidade na fase materna engloba tanto fatores ambientais quanto biológicos que modulam alterações comportamentais (GRIER, 1984). Desde a fecundação até o desmame, fêmeas estão expostas a um ambiente social (macho-fêmea, mãe-filhotes) instável, que podem direcionar alterações comportamentais, modificando seu próprio ambiente, como o comportamento de construir ninhos. Este comportamento é uma importante conduta desempenhada por roedores adultos que permite a termorregulação, repouso e proteção contra adversidades externas (intrusos/predadores) (WEBER; OLSSON, 2008). Em um ambiente materno, além das funções elencadas, a presença do ninho também terá a função de manutenção da temperatura dos filhotes (LYNCH, 1994), redução da evaporação de água de seus corpos (FRIEDMAN, BRUNO, 1976), e principalmente o agrupamento irá aumentar a interação mãe-filhote, facilitando o cuidado materno (FLEMING et al. 1999).

Cuidado materno

O cuidado materno, observado na maioria dos mamíferos, é um conjunto de comportamentos realizados pela fêmea que induz o aumento da probabilidade de

sobrevivência da prole, sejam estes diretamente relacionados com os filhotes (*nursing* e *licking/grooming*, por exemplo) ou indiretamente (como construção de ninho e agressão contra intrusos) e, dessa forma, são fundamentais desde a fase gestacional ao desmame (NUMAN, 1990; PERIPATO; CHEVERUD, 2002; KURODA et al., 2011; GOÉS; SAUCE; PERIPATO, 2012). Sabe-se que o cuidado materno depende da ativação de fatores neuroendócrinos (circuitos neurais e variações hormonais) como resposta a concepção e posteriormente a estímulos advindos da prole (DENENBERG et al., 1969; POINDRON, 2005; SAUCE, 2010; BRIDGES, 2015). Os mecanismos neuroquímicos envolvidos com o cuidado materno envolvem interações entre áreas cerebrais críticas, tais como hipocampo, área pré-óptica medial e outras regiões do hipotálamo (OLABAZAL, FERREIRA, 1997; NUMAN et al., 1998; LEE, BROWN, 2002). O cuidado materno também está envolvido com uma complexa arquitetura genética, com poucos genes de pequeno efeito individual, mas uma grande gama de interações entre diferentes regiões do genoma (PERIPATO et al., 2004). Esse padrão se repete ao investigar a arquitetura genética de comportamentos maternos específicos como tamanho da ninhada (PERIPATO et al., 2004), ejeção de leite (GÓES; SAUCE; PERIPATO, 2012), construção de ninhos (SAUCE; DE BRITO; PERIPATO, 2012), e a emocionalidade (MONTE, 2012).

Fêmeas em fase materna proporcionam um ambiente que reflete sua emocionalidade. Esse mesmo ambiente influencia o desenvolvimento emocional de seus filhotes (HANSEN; FERREIRA, 1986; FRANCIS et al., 1999; MOFFIT et al., 2006; FOYER, WILSSON, JENSEN, 2016). Em roedores, as variações no cuidado materno relacionadas à ansiedade podem afetar a progênie (CALDJI et al., 2000; URIARTE et al., 2007) e, a separação mãe-filhote ou mesmo o desmame precoce podem gerar um aumento na ansiedade e agressividade da prole (NAKAMURA et al., 2003; KIKUSUI et al., 2006). Fêmeas que não acariciam seus filhotes ao nascer desencadeiam um comportamento ansioso na fase adulta dos filhotes (CALDJI et al., 1998), que poderá ser transferido de uma geração para a outra (FRANCIS et al., 2003). Essa postura materna pode desencadear alterações na expressão de genes relacionados ao estresse e ansiedade, em seus filhotes (VAN HASSELT, et al., 2012).

Acredita-se que a própria experiência materna também seja enriquecedora devido a uma interação de demandas endócrinas e da prole (KINSLEY, LAMBERT, 2008), mesmo assim, o enriquecimento ambiental nesta fase parece contribuir com resultados apreciáveis. Revisão recente aponta que enriquecer o ambiente na fase

gestacional reflete nas mães em tendência de aumento dos comportamentos de cuidados maternos, de modo que as mães enriquecidas se envolvem em cuidados de alta qualidade quando estão no ninho (STRZELEWICZ et al., 2019) e conseqüentemente, diminuem respostas tipo depressivas e ansiosas (SPARLING, et al., 2020). Mesmo assim, ainda há poucos estudos que avaliam o efeito do enriquecimento ambiental nos comportamentos maternos.

Plasticidade fenotípica e epigenética

Como o fator ambiental pode interferir no comportamento, e o EA tem como fundamento a busca pelo bem-estar animal, o estudo de alterações ambientais *via* EA podem desvendar mecanismos que modulem essa plasticidade, entre eles os epigenéticos. Vale ressaltar que epigenética pode ser definida como o estudo de alterações hereditárias na expressão dos genes que não pode ser explicada por mudanças na sequência de DNA (RUSSO; MARTIENSSEN; RIGGS, 1996). Os fenótipos, como a emocionalidade (PURBA et al., 1996; TANAKA et al. 2000) e o cuidado materno (BROWN et al., 1996; LEFEVBRE et al. 1998; LI et al., 1999; SCOTT et al., 2015), podem ser expressos e regulados por informações genéticas que, por sua vez, dependem frequentemente de sinais ambientais (internos ou externos) para serem expressas (WATSON et al., 2006). Estudos demonstraram algumas vias pelas quais o ambiente externo regula a expressão das informações genéticas, por exemplo, o ritmo circadiano de camundongos pode sofrer alterações dependentes de luminosidade (AZZI et al., 2014), eventos iniciais na vida de ratos podem alterar a expressão gênica de genes específicos (ROTH et al., 2009) e o enriquecimento ambiental parece alterar expressão de genes associados ao comportamento exploratório (ZOCHER et al., 2020). Em todos esses estudos, as mudanças estão relacionadas à regulação gênica sem modificações na sequência de nucleotídeos.

Existem meios pelos quais os sinais são detectados pela célula e “comunicados” para os genes como, por exemplo, os ativadores e repressores das vias de transdução de sinal que se ligam próximos a um gene e o controlam (“ligam” e “desligam” o gene). Também há outra maneira de regular a expressão gênica: o silenciamento gênico. Neste caso, um gene é silenciado devido à sua localização, mesmo sem sinais ambientais específicos. A forma de silenciamento mais comum está associada a heterocromatina: uma forma densa da cromatina que impede que as informações gênicas dessa região sejam acessadas pela maquinaria de transcrição. Outro método bastante comum em

células de mamíferos é o silenciamento da transcrição *via* metilação do DNA (WATSON et al., 2006).

Metilação do DNA

No genoma de mamíferos, a metilação do DNA ocorre por um mecanismo endógeno de transferência de um grupo metil para a posição C5 da citosina, formando 5-metilcitosinas (5mC). A regulação gênica por esse método pode impedir a ligação de proteínas ou inibir a maquinaria transcricional bloqueando a expressão gênica (WATSON et al., 2006; MOORE; LE; FAN, 2013). A metilação do DNA é catalisada por uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) responsáveis por transferir um grupo metil da S-adenilmetionina para o quinto carbono de uma citosina, formando as 5mCs (MOORE; LE; FAN, 2013). Em mamíferos, esse processo ocorre com mais frequência em dinucleotídeos CG, conhecidos como ilhas CpGs, comumente encontradas em sequências regulatórias (LEA et al., 2016). As ilhas CpGs compreendem trechos do DNA com comprimento aproximado de 1000 pares de bases com densidades de dinucleotídeos CGs mais alta do que o resto do genoma (BIRD, 1980). Nessas regiões, a maioria dos promotores de genes estão localizados (COSTELLO, 2001) e, interessante, são regiões altamente conservadas entre camundongos e humanos, indicando que possuem uma importância funcional (ILLINGWORTH et al., 2010). A metilação das ilhas CpGs pode inibir a ligação do fator de transcrição, recrutar proteínas repressivas de ligação ao metil e silenciar de forma estável a expressão gênica (MOORE; LE; FAN, 2013).

Algumas vezes, os padrões de expressão gênica precisam ser herdados e a herança desses padrões na ausência de mutação é chamada de regulação epigenética. Esse mecanismo regulatório está fundamentalmente associado, por exemplo, ao fenômeno de “memorização”, conhecido como *imprinting*, pelo qual apenas um dos alelos (de origem paterna ou materna) de certos genes são expressos (WATSON et al., 2006). Como listados anteriormente, como regulação de expressão/ silenciamento gênico, os mecanismos epigenéticos envolvem modificações pós-traducionais nas histonas, micro RNAs (miRNAs) não-codificantes (BACCARELLI, BOLLATI, 2009; TORO, AYLWIN, LOMNICZI, 2018) e alterações químicas no DNA como a metilação do DNA (LA SALLE; TRASLER, 2006).

Os padrões de metilação do organismo podem ser alterados pelas condições ambientais, seja durante o desenvolvimento ou posteriormente, quando as metilações

auxiliam a coordenar a resposta celular a novos estímulos ambientais. Portanto, a metilação do DNA desempenha um papel significativo na mediação da resposta regulatória do gene às mudanças ambientais (GUO et al., 2012). Um dos clássicos estudos acerca deste assunto investigou a adoção cruzada de fêmeas que tiveram mães com baixo e alto nível de *licking/grooming* e *arched-back nursing* (LG/ABN, *i.e.*, lambar/limpar e amamentar com dorso arqueado). Foi observado que aquelas fêmeas filhas biológicas de mães com baixos níveis de LG/ABN adotadas por mães com altos níveis de LG/ABN também apresentavam altos níveis desse comportamento inclusive quando comparadas às fêmeas nascidas de mães com altos níveis, mas adotadas por mães com baixo LG/ABN. Além disso, as fêmeas com mães de alto nível de LG/ABN apresentaram menos respostas de medo frente à novidade. Isso sugere que o manejo pós-natal pode alterar o fenótipo da prole, elucidando a hipótese de transmissão comportamental para as próximas gerações. Essa sugestão foi então verificada avaliando os efeitos epigenéticos nas respostas ao estresse. A região hipocampal possui estruturas denominadas receptores de glucocorticóides (GR), os quais, quando ativados, auxiliam na mediação de respostas a estresses. Estudos apontam que, aparentemente, a prole adulta de mães de alto LG/ABN apresentam aumento da expressão hipocampal do mRNA do receptor de glucocorticóides (GR) e por consequência respondem de forma mais saudável ao estresse. Neste caso, foi observado que o aumento na expressão de GR foi devido à desmetilação desse gene, mas no caso de fêmeas criadas por mães de baixo LG/ABN, essas informações permaneceram metiladas, silenciadas, ou seja, não expressas e resultaram em respostas não saudáveis desses animais frente ao estresse (LIU, et al., 1997; FRANCIS et al., 1999; WEAVER, et al., 2004; VAN HASSELT, et al., 2012).

Metodologias para análise epigenética

Com a finalidade de elucidar assuntos referentes às regulações epigenéticas, algumas metodologias avaliam, especificamente, a metilação em amostras de DNA, seja com o estudo do genoma completo ou de genes candidatos, buscando pelo padrão de metilação. O perfil de metilação completo pode ser analisado por metodologias como HPLC-UV (*High Performance Chromatography – Ultraviolet*), LC-MS/MS (*Liquid Chromatography coupled with tandem mass spectrometry*), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), PCR de LINE-1 seguida de pirosequenciamento, AFLP (*Amplification Fragment Length Polimorphism*) e/ou RFLP (*Restriction Fragment Length*

Polymorphism) e LUMA (*Luminometric Methylation Assay*). No entanto, outras metodologias permitem buscar por regiões diferencialmente metiladas no genoma, como MSCC (*Methyl-Sensitive Cut Counting*), técnicas com *Microarray* ou *Bead Array* e Sequenciamento por Bissulfito (KURDYUKOV; BULLOCK, 2016). Nesse último caso, existem métodos que buscam por diferentes regiões metiladas, como *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS) e *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* (RRBS).

A metilação também pode ser avaliada em regiões específicas, pela busca de genes candidatos por ensaios baseados na digestão do DNA, ou por diferentes análises do DNA convertido por bissulfito, como *Bead Array*, PCR e sequenciamento, pirosequenciamento, PCR com HRM (*High Resolution Melting*), COLD-PCR, e o método MSP (*Methylation-specific PCR*) (KURDYUKOV; BULLOCK, 2016) que verifica a presença do grupo metil com a utilização de *primers* específicos metilados e não metilados (DERKS et al., 2004).

Epigenética e Nanopore

O encontro da tecnologia de nanoporos com a epigenética se dá devido à possibilidade de analisar marcas epigenéticas, como 5mC ou 6-metiladeninas, sem tratamento especial prévio das amostras. Enquanto grande parte das tecnologias de sequenciamento não conseguem distinguir entre bases metiladas e não metiladas no DNA nativo, a quarta geração de sequenciamento o faz utilizando o sequenciador *Oxford Nanopore MinION* (SHCATZ, M.C. 2017). O sequenciador de “bolso”, *MinION*, é um dispositivo baseado em nanoporos de alto rendimento capazes de sequenciar fragmentos de DNA longos não amplificados (IP et al., 2015). O procedimento é baseado em mudanças dependentes da sequência na corrente iônica ao longo do tempo: conforme há a passagem de DNA pelos nanoporos da membrana lipídica, sinais de corrente elétrica são transmitidos e registrados computacionalmente, sinais esses que são sensíveis a modificações de base, como a 5-metilcitosina. Dessa forma, os padrões de sinais são interpretados como sequências curtas de DNA cujas bases metiladas podem gerar assinaturas reproduzíveis e interpretáveis (IP et al., 2015; RAND et al., 2017; SIMPSON et al., 2017), permitindo estudo de metilação em diversos tecidos e a um custo relativamente acessível. Embora esta seja uma tecnologia extremamente nova, o sequenciamento por nanoporos já fora aplicado em diversas

pesquisas clínicas, estudos envolvendo detecções de micro-organismos, montagem de genomas, epigenética e genômica ambiental (LIN; HUI; MAO, 2021).

O emprego de tecnologias que permitam investigar mecanismo moleculares envolvidos na expressão de genes, e principalmente nos que possam estar suscetíveis a modulação ambiental permitiu a realização do presente trabalho. Assim, comportamentos relacionadas ao cuidado materno, ansiedade e depressão de fêmeas de camundongos LG/J foram investigadas quanto à exposição a enriquecimento ambiental. Após avaliação comportamental, foi analisada a metilação global do hipotálamo dessas fêmeas. O presente estudo foi pioneiro em nosso grupo de pesquisa.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a influência do Enriquecimento Ambiental (EA) em diferentes fases de vida sobre a emocionalidade, cuidado materno e metilação global de *Mus musculus* fêmeas da linhagem LG/J.

Para tanto foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Realizar de projeto piloto sobre o Teste de Preferência de EA analisado em fêmeas LG/J nas fases: púbere, idade reprodutiva e após experiência sexual;
- Expor ao enriquecimento ambiental escolhido pelas fêmeas nas fases púbere, reprodutiva e materna, e exposição em fêmeas controle positivas, mantendo o EA por todo esse período;
- Investigar a emocionalidade das fêmeas LG/J pelos testes de Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Nado Forçado (NF) nas fases púbere, reprodutiva, materna e pós-desmame de todos os grupo a serem estudados;
- Investigar e contrastar o cuidado materno entre as fêmeas expostas ou não ao EA, avaliando o comportamento materno e o teste de recuperação dos filhotes;
- Buscar associações entre o EA com a emocionalidade (teste CA, LCE e NF) e o cuidado materno;
- Padronizar a extração de DNA de amostras de hipotálamos;
- Buscar a metilação global em hipotálamos pelo sequenciamento de DNA hipotalâmico via *ONT MinION*;
- Procurar por melhores ferramentas para análise de pós-processamento do sequenciamento de DNA por meio de testes com os dados gerados;
- Buscar por genes metilados no hipotálamo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados, nesse estudo, camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem LG/J importada do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, EUA) em 2015. Após o nascimento da primeira geração, os animais foram mantidos e vem sendo criados na sala de experimentação do Laboratório de Genética do Comportamento do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar *campus* São Carlos.

Os animais foram acompanhados desde o nascimento. Logo após o parto, o tamanho da ninhada foi verificado diariamente. Ao fim da primeira semana, os animais foram pesados e identificados individualmente com marcações nos dedos. Fez-se o monitoramento de pesagem semanalmente até que os filhotes completassem sete semanas de vida. Durante esse período, os animais com três semanas de vida foram desmamados (separados da mãe) e alocados em gaiolas sexo-específicas com até cinco animais. Após sete semanas eles foram encaminhados em casais para reprodução.

Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração para roedores Nuvilab CR-1 Autoclavável (QUIMTIA SA, Colombo - PR) e água filtrada, ambos autoclavados e mantidos sob maravalha de *pinus* autoclavada (JR Maravalha, Paulínia – SP). A sala foi mantida a ~22°C em ciclo claro-escuro de 12 horas (L:D 12:12h; luzes acesas às 6 horas da manhã). Após a análise fenotípica, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para coleta do hipotálamo para análises moleculares.

Os procedimentos no manuseio e na experimentação com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSCar (CEUA nº 5335140519) (em detalhes no Anexo A).

3.2 Enriquecimento Ambiental (EA)

Um projeto piloto fora realizado com o objetivo de avaliar a preferência das fêmeas *Mus musculus* da linhagem LG/J frente a tipos diferentes de enriquecimentos. As atividades desse projeto piloto também foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSCar (CEUA nº 7096180319) (em detalhes no Anexo B) e estão relatadas em detalhes no Apêndice A. Os dados de preferência obtidos resultaram em um único objeto preferido pelas fêmeas: o rolo de papelão.

3.2.1. Exposição ao Enriquecimento Ambiental

Para o desenvolvimento do projeto foram avaliadas 80 (oitenta) fêmeas da linhagem LG/J. Elas foram separadas em 4 grupos com 20 fêmeas cada: G1 (Grupo Controle Positivo – presença de enriquecimento), G2 (Grupo Controle Negativo – ausência de enriquecimento), G3 (Grupo Púbere; fêmeas de 3 a 4 semanas) e G4 (Grupo Materno; fase materna). A influência do enriquecimento ambiental foi avaliada em fases diferentes para cada grupo: no G1, as fêmeas foram expostas ao EA desde a fase púbere à materna; no G2, as fêmeas não foram expostas ao EA em fase alguma; no G3, as fêmeas foram expostas apenas na fase púbere e no G4, apenas na fase materna. As fêmeas dos grupos G3 e G4 foram expostas continuamente com o EA por 2 semanas, sendo que na primeira semana as fêmeas interagiram com o EA e na segunda foram avaliadas em testes de comportamento, que serão descritos posteriormente. Vale ressaltar que a manutenção dos animais exigiu a limpeza semanal das gaiolas. Nesse momento, o rolo de papelão foi substituído por um novo, após a higiene das caixas. Os cruzamentos de todos os grupos foram realizados assim que as fêmeas atingiram nove (9) semanas de vida.

Durante o desenvolvimento do projeto, havia a intenção de estudarmos mais um grupo de 20 fêmeas, pelo qual, avaliaríamos a influência da exposição do enriquecimento apenas na fase reprodutiva (Grupo Reprodutivo; fêmeas de 7 a 8 semanas). No entanto, durante a realização do trabalho, teve início a pandemia da COVID-19, causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) e devido às restrições sanitárias implementadas e medidas de prevenção não foi possível realizá-lo.

3.3 Testes de emocionalidade e de Cuidado Materno

3.3.1. Emocionalidade

As análises previstas neste trabalho incluíram os testes de determinação da emocionalidade dos indivíduos selecionados. Em todos os grupos, todas as fêmeas foram acompanhadas desde o nascimento, e avaliadas pelos testes de análise comportamental (Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Nado Forçado (NF)) em quatro diferentes fases de vida: na fase Púbere (com 3 e 4 semanas de vida), na fase Reprodutiva (com 7 e 8 semanas de vida), na fase Materna (com 11 e 12 semanas de vida) e na fase Pós-Desmame (~15 semanas de vida). Os testes foram realizados na segunda semana de cada fase nos dias 2 (D2 – CA), 4 (D4 – LCE) e 6 (D6

– NF) (ver Figura 1). O tempo de realização da sequência dos testes nas diferentes fases de vida tiveram intervalo mínimo de 21 dias para evitar habituação das fêmeas aos aparatos (PARRA et al., 1999).

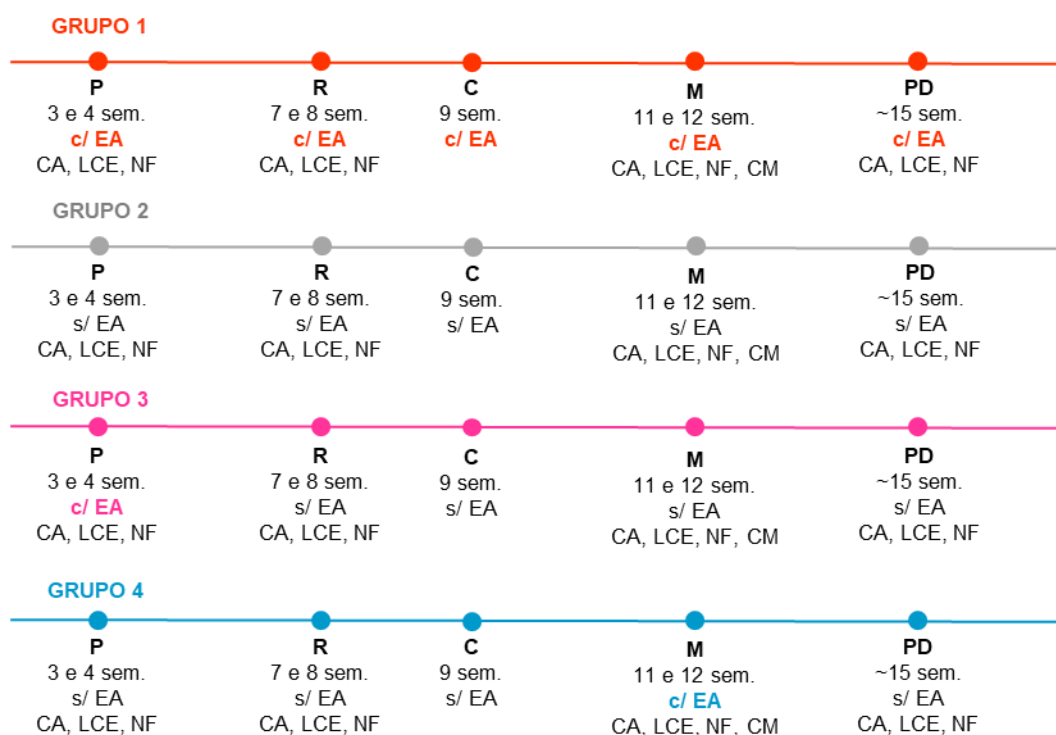


Figura 1. Desenho Experimental sobre a conduta de Enriquecimento Ambiental, testes de emocionalidade e avaliação do Cuidado materno, em cada fase avaliado nos Grupos 1, 2, 3 e 4. Legenda: as siglas são referentes à: P – fase Púbere; R – fase Reprodutiva; C – Cruzamento; M – fase Materna; PD – fase Pós-Desmame; sem. – semanas de vida; EA – Enriquecimento Ambiental; CA – Campo Aberto; LCE – Labirinto em Cruz Elevado; NF – Nado Forçado e CM – Cuidado Materno.

3.3.1.1 Campo Aberto (CA)

O teste CA apresenta uma área aberta e com boa luminosidade que permite avaliar diferentes reações comportamentais como reflexo da emocionalidade do animal, por exemplo, ansiedade e locomoção (HALL, 1934). Espera-se que as fêmeas menos ansiosas explorem mais o ambiente e, dessa forma, estejam presentes em áreas mais expostas/aversivas (CHOLERIS et al., 2001). O aparato estava disponível na sala de camundongos do biotério do Laboratório de Genética de Comportamento, UFSCar *campus* São Carlos, e ele apresenta uma base com dimensões de 40cmx40cm e marcações de uma grade com 16 quadrados de 10cmx10cm. A base é cercada por paredes de acrílico de altura suficiente para que o animal não consiga escalá-la.

Para início do teste, o aparato foi higienizado com *HerbalVet* e álcool 70%. As fêmeas foram manipuladas em fluxo laminar, pesadas e conduzidas até o aparelho, onde foram colocadas no centro do teste e filmadas. O CA tem duração de 5 minutos e ao final, foram contados os bolos fecais. Após a realização do teste, o animal foi devolvido para sua gaiola. Para a análise do teste, foram avaliadas as frequências relativas no centro, duração relativa no centro e distância em quadrados.

3.3.1.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é um teste amplamente aplicado em pesquisas de comportamento animal para investigar ansiedade, mensurada pela esquia do animal a áreas aversivas, isto é, espera-se que aqueles animais que explorarem mais os braços abertos sejam menos ansiosos (RODGERS et al., 1997). O aparato estava disponível na sala de camundongos do biotério do Laboratório de Genética do Comportamento, UFSCar *campus* São Carlos, e possui as seguintes características: formato de cruz montado a 40cm do chão, com dois braços abertos (área aversiva - 30cm de comprimento, 6cm de largura e 0,25cm de altura) e dois braços fechados (30cm de comprimento, 6cm de largura e 15cm de altura). Ao iniciar, o aparelho foi higienizado com *HerbalVet* e álcool 70%; as fêmeas foram manipuladas no fluxo laminar e conduzidas até o aparelho, em que foram colocadas no centro e filmadas. Este teste tem duração de 5 minutos e ao final, o animal foi devolvido para sua gaiola. Para o LCE, foram avaliadas as frequências relativas nos braços abertos e duração relativa nos braços abertos.

3.3.1.3 Nado Forçado (NF)

O NF é baseado na exposição do animal a um ambiente que causa estresse descontrolado e permite investigar sobre a emocionalidade de cada indivíduo (PETIT-DEMOULIERE et al., 2005). Segundo Porsolt et al. (1977), os animais que apresentam imobilidade (param de nadar) puderam ser considerados com indícios de depressão.

O aparato é formado por um recipiente cilíndrico de vidro com 40cm de profundidade e 20cm de diâmetro, que foi preenchido com 19,5 cm de água à temperatura esterilizada pela exposição à luz UV. No momento do teste a água foi aquecida a 24-25° C, quando necessária, e o animal foi manipulado no fluxo laminar e em seguida, depositado cuidadosamente no interior do recipiente, permanecendo por 6 minutos e sendo filmado. Ao final, o animal foi retirado e secado com papel absorvente

antes de ser devolvido para sua gaiola. Para o teste de NF, foram avaliadas as durações relativas de mobilidade, imobilidade e remo; e frequências relativas de mobilidade, imobilidade e remo.

3.3.2 Cuidado Materno

O cuidado materno foi monitorado por meio de observações do comportamento materno desde a detecção da prenhez até a primeira semana pós-parto. Também foi avaliado pelo teste de resgate dos filhotes (Figura 1). Os dados do cuidado materno foram avaliados contrastando com a presença ou ausência de EA. Os itens avaliados no cuidado materno foram: viabilidade dos filhotes, tamanho de ninhada ao nascimento, tamanho de ninhada viável, placentofagia, agressividade, presença de leite e fechamento e temperatura do ninho. As fêmeas também foram caracterizadas como boas mães (se pelo menos um dos filhotes nascidos sobreviveu) ou não.

3.3.2.1. Comportamento Materno

Do dia do parto até o sétimo dia após o nascimento foi investigado a construção do ninho: a altura, temperatura e tipo (aberto ou fechado). No nascimento dos filhotes foi verificada a placentofagia, por meio da procura de resquícios de placenta e sangue na maravalha. Então, os filhotes foram pesados por 7 (sete) dias consecutivos (D1 ao D7) e observou-se a presença de leite no estômago, por meio da análise visual da barriga.

Durante o manuseio dos filhotes, pesagem e avaliação dos ninhos, foi verificado se a fêmea apresentava uma postura de enfrentamento, conhecida como comportamento agressivo contra o manuseador, indicando a proteção de seus filhotes. Nos dias 3 (D3) e 7 (D7) após o parto foi realizado o Teste de Recuperação dos Filhotes (ver próximo tópico). Após o desmame e finalização de testes comportamentais a fêmea foi eutanasiada por deslocamento cervical, por uma pessoa treinada, e não as expusemos a anestesia, pois poderia prejudicar os procedimentos laboratoriais com seus tecidos.

3.3.2.2 Teste de Recuperação dos Filhotes (RF)

O RF é um teste que possibilita avaliar o cuidado materno relacionado à proteção dos filhotes contra adversidades externas. Ele tem sido utilizado pelo nosso grupo de pesquisa para verificar, pela avaliação de algumas características, a interação direta da mãe com os filhotes (FORTI, 2012). O teste foi realizado em fluxo laminar e

na própria gaiola da fêmea. No caso deste trabalho, nos dias 3 (D3) e 7 (D7) pós-nascimento, os filhotes foram pesados e colocados aleatoriamente sobre a maravalha (fora do ninho) e posteriormente a fêmea foi colocada na gaiola (Figura 2). No momento da exposição da fêmea, é iniciada a gravação de 6 (seis) minutos para análise (tempo determinado em trabalhos anteriores do grupo).

Durante o teste, vários comportamentos foram elencados previamente e foram objetivos de avaliação, sendo eles: coçar (fêmea se coçar com as patas traseiras), *self-grooming* (autolimpeza), locomoção, *grooming/licking* (limpeza do corpo e região anogenital dos filhotes), *nursing* (fêmea posicionada sobre os filhotes com postura curvada), resgate (fêmea pegar o filhote com a boca e carrega-lo), resgate bem sucedido (fêmea pegar o filhote com a boca e carrega-lo até o ninho) e latência (tempo que a fêmea demora para pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho). Foram avaliados o tempo e a frequência dos comportamentos: coçar, *self-grooming*, *grooming/licking*, *nursing* e resgate. Foi verificada a frequência de resgate bem-sucedido e o tempo de latência.

3.3.2.3. Variáveis quantitativas relacionadas ao Enriquecimento ambiental

Algumas variáveis, coletadas ao longo do período pós-parto ao desmame, foram utilizadas para contrastar as fêmeas dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4). O ganho em peso das mães, do dia do parto até o desmame foi avaliado pelo ganho em peso até o desmame (diferença de peso entre a primeira e terceira semana). Foram pesados os depósitos de gordura reprodutivos, renais e mesentéricos, pós-eutanásia das mães. O peso dos filhotes até o desmame, além de seu ganho em peso do nascimento ao desmame foram avaliados, de acordo com as mães, referentes aos grupos estudados.

3.4 Análises Estatísticas

Os vídeos obtidos durante a gravação dos testes comportamentais e do teste de recuperação dos filhotes foram analisados no Programa de Registro Comportamental *X-Plo-Rat*, 2005 (http://www.oocities.org/xplorat/pages/ingles/mainframe_en.htm). As planilhas com os dados registrados durante a análise foram tabuladas em planilhas de Excel (2013) e foi realizada análise estatística descritiva.

Para verificar se a diferença entre os grupos foi significativa, as análises estatísticas foram realizadas da seguinte forma: no caso de comparação entre duas

variáveis de dados quantitativos pareados e não pareados paramétricos foi utilizado o Teste *t* de *Student*. Para os dados não paramétricos, foram utilizados os testes *Wilcoxon* no caso de dados pareados e *Mann-Whitney* nos casos de dados não pareados. Nos casos de comparação entre três ou mais variáveis foram utilizados os testes *One-way Analysis of Variance* para dados paramétricos e *Kruskal-Wallis* para dados não-paramétricos. E para os dados qualitativos de cuidado materno foi verificada a frequência de ocorrência dos eventos (sim/não) e a diferença significativa foi verificada com o Teste Exato de Fisher. Para essas análises foi utilizado o programa *GraphPad prism 7* (*GraphPad Software* <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

3.5 Procedimentos Moleculares

3.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA de amostras de hipotálamo das fêmeas de camundongo fenotipadas foi realizada segundo o protocolo do *kit Wizard SV 96 Genomic DNA Purification System* (PROMEGA, EUA) combinado ao uso do *Vac-Man 96 Vacuum Manifold*, que produz, de forma rápida, DNA genômico purificado e de qualidade. As amostras estavam armazenadas em -80°C e em solução estabilizante de ácidos nucleicos *RNA later*. Para a realização das próximas etapas, foi esperado rendimento médio de 6 μg a partir de 20mg de amostra de tecido cerebral.

O protocolo do fabricante necessitou de algumas adaptações, que estavam envolvidas no processo de maceração e lise celular. Nesse caso, essa etapa foi realizada em microtubos de 1,5mL individuais. A solução de digestão também foi modificada quanto ao volume de proteinase K, assim como descrito na Tabela 1:

Tabela 1. Solução de digestão Master Mix para o processo de extração de DNA.

<i>Solução de Digestão Master Mix</i>	<i>Volume por amostra</i>
<i>Nuclei Lysis Solution</i>	200uL
<i>0,5 M EDTA (pH 8,0)</i>	50uL
<i>Proteinase K, 20mg/mL</i>	10uL
<i>RNAse A solution, 4mg/mL</i>	5uL
<i>Volume total</i>	265uL

Para a extração de DNA, resumidamente, as amostras de hipotálamo foram maceradas e incubadas em banho-maria à 55°C *overnight* (16-18 horas) para a lise celular. O lisado passou por processo de lavagem e por fim, foi eluído o DNA genômico. Com o sistema de purificação *Wizard SV*, o DNA genômico é purificado usando filtração a vácuo de 96 poços, que dispensa centrifugação ou precipitação. Posteriormente, a quantificação do DNA extraído foi realizada em um fluorômetro Qubit.

3.5.2 Metilação

As análises de metilação global do genoma dos animais foram realizadas a partir do sequenciamento de genoma completo com o uso do sequenciador *MinION* por meio da tecnologia de nanoporos desenvolvida pela *Oxford Nanopore Technology*. Essa tecnologia consegue distinguir diretamente entre bases metiladas e não-metiladas no DNA nativo sem que sejam necessários tratamentos prévios da amostra.

O *MinION* é um dispositivo portátil no qual se encaixa uma *flow cell* descartável preenchida por uma membrana lipídica e nanoporos, que são proteínas transmembrana, que permitem a passagem do DNA em fita simples. Conforme o DNA passa pelo poro, o sensor detecta mudanças na corrente iônica causadas por diferenças nas sequências de nucleotídeos que são segmentadas como eventos discretos que tem uma duração, amplitude média e variância associadas (JAIN et al., 2016). As bases metiladas geram sinais de corrente eletrolítica distintas das bases não metiladas, produzindo assinaturas reproduzíveis e interpretáveis que permitem avaliar o metiloma da amostra (SCHATZ, 2017). A sequência de eventos é interpretada computacionalmente usando modelos gráficos.

3.5.2.1 Sequenciamento

Foi utilizado o protocolo de sequenciamento *Native barcoding genomic DNA* (com *EXP-NBD104*, *EXPNBD114*, e *SQK-LSK109*). Essa metodologia permite otimizar o sequenciamento para analisar mais amostras (até 24) em uma mesma “corrida” ao realizar algumas etapas: inicia-se pela verificação de todos os requisitos necessários para o experimento, incluindo a quantificação da concentração de DNA nativo disponível e checagem da *flow cell*; posteriormente é feito o preparo da biblioteca, no qual ocorre o reparo das extremidades do DNA, ligação de *barcodes* que permitem o sequenciamento de diferentes amostras em uma mesma *flow cell* e adaptadores para o

sequenciamento. Em seguida, fez-se preparo da *flow cell* e carregamento da biblioteca de DNA na qual é iniciada a corrida usando o *software MinKNOW* selecionando o fluxo de trabalho com uso de *barcodes* (verificar Tabela 2) e a leitura das bases, inclusive as metiladas, que são processadas em tempo real.

Tabela 2. Informações referentes aos native barcodes utilizados para cada amostra.

Amostra	Barcode	Sequência
Camundongo	NB01	CACAAAGACACCGACAACCTTTCTT
Mosca	NB02	ACAGACGACTACAAACGGAATCGA
LAMBDA	NB03	CCTGGTAACTGGGACACAAGACTC

Algumas adequações ao protocolo foram padronizadas para que fosse possível correr o sequenciamento no laboratório. Elas incluíram:

- Preparo de *beads* “Serapure” pelo protocolo “Preparation of 1.5 mg/mL Sera-mag carbolylate modified magnetic particles” (MIRANDA, 2017) para substituir a *AMPure XP* de forma a ser eficientemente equivalente; também adaptamos a proporção de 20uL de *beads* com 40uL de Peg 8000 (proporção de 1 *beads* : 2 Peg 8000) para uso e aquecimento prévio das *beads* à 37°C por 10 minutos;

- Padronização a eluição das *beads* em 25uL de *nuclease-free water* por 30 minutos à 65°C em banho-seco para aprimorar a recuperação de DNA após a lavagem;

- Utilização *NEBNext Quick Ligase Buffer (2X)* em volume de 80uL para a ligação dos adaptadores;

- E por fim, padronizamos o tempo das reações de ligação para *overnight* a 4°C na geladeira, o que aumenta a eficiência da reação.

3.5.2.2 Análise de pós-processamento dos dados de sequenciamento

As análises de pós-processamento foram realizadas utilizando o Servidor Dell Power Edge T620 com processadores Intel® Xeon® E5-2600 e sistema operacional Linux Ubuntu 18.06, ao qual o *MinION* está conectado. O sistema operacional, bem como os *softwares* necessários para seu processamento foram montados em um disco sólido de 1TB.

Após a coleta dos dados brutos via *software MinKNOW*, os arquivos, em formato FAST5 precisam ser pós-processados para avaliar o sequenciamento realizado. As etapas de pós-processamento englobam três etapas gerais: *basecall*, *methylation call* e busca por Regiões Diferencialmente Metiladas (DMRs de *Differentially Methylated*

Regions). O processamento desses dados está se transformando rapidamente, com diversos *softwares* sendo desenvolvidos, dos quais escolhemos alguns fluxos de trabalhos para as análises de pós-processamento dos dados que incluem: *NanoMethPhase* (<https://github.com/vahidAK/NanoMethPhase>), *Tombo* (<https://nanoporetech.github.io/tombo/>) e *Deepsignal2* (<https://github.com/PengNi/deepsignal2>).

3.5.2.2.1 *Poretools*

Poretools compreende um conjunto de ferramentas para explorar os conjuntos de dados gerados pelo sequenciamento pelo *MinION*. Tem como finalidade a avaliação da qualidade de análises *downstream* operando diretamente no formato de arquivo bruto FAST5 produzido pelo sequenciador (LOMAN; QUINLAN, 2014).

O comando utilizado para gerar os dados foi: `poretools stats fast5_data/`, que coleta estatísticas de tamanho das *reads* do conjunto de arquivos FAST5.

3.5.2.2.2 *Nanoplot*

Nanoplot é uma ferramenta utilizada para visualizar e gerar gráficos referentes aos dados de *basecall* gerados pelo chamador de bases *Guppy*. Durante o processo de chamada de bases, o programa gera um arquivo que contém um resumo com informações utilizadas pelo *Nanoplot* para gerar as figuras (`sequencing_summary.txt`). Atualmente, esta ferramenta está disponibilizada como pacote do *python* e como serviço da *web* (<http://nanoplot.bioinf.be/>) (COSTER et al., 2018).

3.5.2.2.3 *NanoMethPhase*

O *NanoMethPhase* (<https://github.com/vahidAK/NanoMethPhase>) é um *software* para fasear 5-metilcitosinas de sequenciamentos de *Nanopore*, capaz de detectar com precisão a metilação específica de alelos em todo o genoma usando os dados de sequenciamento de baixa cobertura de redundância de cerca de dez vezes (AKBARI, et al. 2021). Esse fluxo de trabalho é dividido em 4 etapas: *basecall*, *methylation calling*, *detecting haplotype methylome* e *differential methylation analysis*.

A primeira etapa, *basecall*, compreende a tradução dos sinais elétricos brutos do sequenciador em bases (ATCG) e em nosso caso, utilizamos o *Guppy basecaller* (<https://community.nanoporetech.com>), um leitor de bases baseado em uma rede neural

que além de traduzir os sinais (convertendo arquivos “FAST5” em “FASTQ”), também filtra *reads* de baixa qualidade, retira os adaptadores do *Oxford Nanopore* e pode estimar a probabilidade de metilação por base.

A segunda etapa, *methylation calling*, consiste na chamada de metilação e utiliza outros *softwares*: *Nanopolish* (<https://github.com/jts/nanopolish>), responsável pela chamada de metilação nos dinucleotídeos CpG. *Clair3* (<https://github.com/HKU-BAL/Clair3>), responsável pela chamada de variantes. E o *WhatsHap* (<https://github.com/whatsHap/whatsHap>), responsável por fasear variantes de nucleotídeos únicos.

A terceira etapa, *detecting haplotype methylome*, consiste em detectar os haplótipos do metiloma e gera tabelas com informações importantes relacionadas à chamada de metilação como: nome do cromossomo, início e fim da posição do CpG, fita, número de CpGs chamadas como metiladas e frequência de metilação.

A quarta e última etapa, *differential methylation analysis*, consiste na performance de análise diferencial de metilação para detectar regiões monoalélicamente metiladas com a utilização de métodos estatísticos para inferir regiões diferencialmente metiladas.

Os comandos utilizados para gerar os dados foram: `nanopolish index [OPTIONS] -d nanopore_raw_file_directory reads.fastq` e `nanopolish call-methylation [OPTIONS] <fas5|dir>` para, respectivamente, indexar os arquivos FASTQ e chamar a metilação a partir das informações de sinais medidas pelo sequenciador ao detectar 5mC. Alinhamento das *reads* com o genoma de referência pelo comando `minimap2 -a -x map-ont reference.fasta output.fastq | samtools sort -T tmp -o output.orted.bam` `samtools index output.sorted.bam`. A chamada de variação foi feita pelo comando `./run_clair3.sh --bam_fn=${BAM} --ref_fn=${REF} --threads=${THREADS} --platform="ont" --model_path=${MODEL_PREFIX} --output=${OUTPUT_DIR}` e, como avaliamos dados com baixas coberturas (<30X), utilizamos o `snvoter prediction -i <SNVs_Clair.vcf> -b <sorted_indexed.bam> -r <reference_genome.fa> -t number_of_threads -o output_prefix` para melhorar a busca por Variantes de Nucleotídeo Único (SNVs de *Single Nucleotide Variants*). E o faseamento foi realizado pelo comando `whatsHap phase --`

```
ignore-read-groups      --reference      reference.fa      -o
HighQualitySNVs_whatshap_phased.vcf      HighQualitySNVs.vcf
sorted_indexed.bam. A partir dessa etapa foram executados os comandos do
nanomethphase methyl_call_processor -mc MethylationCall.tsv
-t 20 | sort -k1,1 -k2,2n -k3,3n | bgzip >
MethylationCall.bed.gz      &&      tabix      -p      bed
MethylationCall.bed.gz, para preparar o arquivo das as duas etapas finais:
nanomethphase phase -mc MethylationCall.bed.gz -o
Test_methylome -of bam,methylcall,bam2bis -b sorted.bam -r
hg38.fa -v Phased.vcf -t 64, para obter o metiloma do haplótipo e o
nanomethphase dma -c 1,2,4,5,7 -ca <path to methylation
frequency for haplotype1> -co <path to methylation
frequency for haplotype2> -o <output directory> -op <output
Prefix> para executar a análise diferencial de metilação.
```

3.5.2.2.4 Tombo

Tombo (<https://nanoporetech.github.io/tombo/>) é um conjunto de ferramentas capazes de identificar, principalmente, nucleotídeos modificados a partir de dados brutos de sequenciamento de *Nanopore*. Também apresenta ferramentas para analisar e visualizar os sinais brutos. Esse fluxo de trabalho consiste em três principais etapas após a chamada de bases via *Guppy*: *preprocess*, que anota as *reads* com *basecall* em formato FASTQ; *re-squiggle*, que alinha os dados brutos ao genoma de referência e *detect modifications* que detecta dinuceotídeos CpGs metilados.

Para rodar esse processamento, foi utilizado o *workflow* do Snakemake pelo comando `snakemake -s Tombo tombo_results/example_tombo-freq-perCG.tsv`. Esse processo gerou os arquivos com dados de cobertura e frequência de metilação.

3.5.2.2.5 DeepSignal2

DeepSignal2 (<https://github.com/PengNi/deepsignal2>) é um método de *deep learning* para detectar estados de metilação de DNA a partir de leituras de sequenciamento de *Nanopore* (NI et al. 2019). Esse método compreende em três etapas: *Guppy basecaller* (mesmo procedimento para ambos os métodos anteriores), *tombo re-squiggle*, *extract features* e *call mods*. Essas etapas cosistem, respectivamente,

em: fazer a chamada de base via *Guppy*, processar os arquivos FASTQ gerados via módulo *re-squiggle* do Tombo, extrair as características dos sítios alvo e chamar modificações. Como resultado, são geradas tabelas com informações como: nome do cromossomo, a fita de DNA, probabilidades da base alvo estar ou não metilada, cobertura e frequência de modificação.

Os comandos utilizados para gerar os dados via *DeepSignal2* foram: tombo resquiggle --dna fast5s/ path/to/genome/reference.fa --processes 10 para alinhar os sinais brutos ao genoma de referência, deepsignal2 extract -i fast5s -o fast5s.CG.features.tsv --corrected_group RawGenomeCorrected_000 --nproc 30 --motifs CG para verificar as características dos sinais, deepsignal2 call_mods -input_path fast5s/ --model_path model.dp2.CG.R9.4_1D.human_hx1.bn17_sn16.both_bilstm.b17_s16_epoch4.ckpt -result_file fast5s.CG.call_mods.tsv --corrected_group RawGenomeCorrected_000 -motifs CG -nproc 30 para fazer a chamada de metilação e python /path/to/deepsignal2/scripts/call_modification_frequency.py --input_path fast5s.CG.call_mods.tsv --result_file fast5s.CG.call_mods.frequency.tsv para verificar a frequência de metilação.

Na Figura 2 foi esquematizado um *pipeline* para melhor exposição do fluxo de trabalho empregado no pós-processamento dos dados.

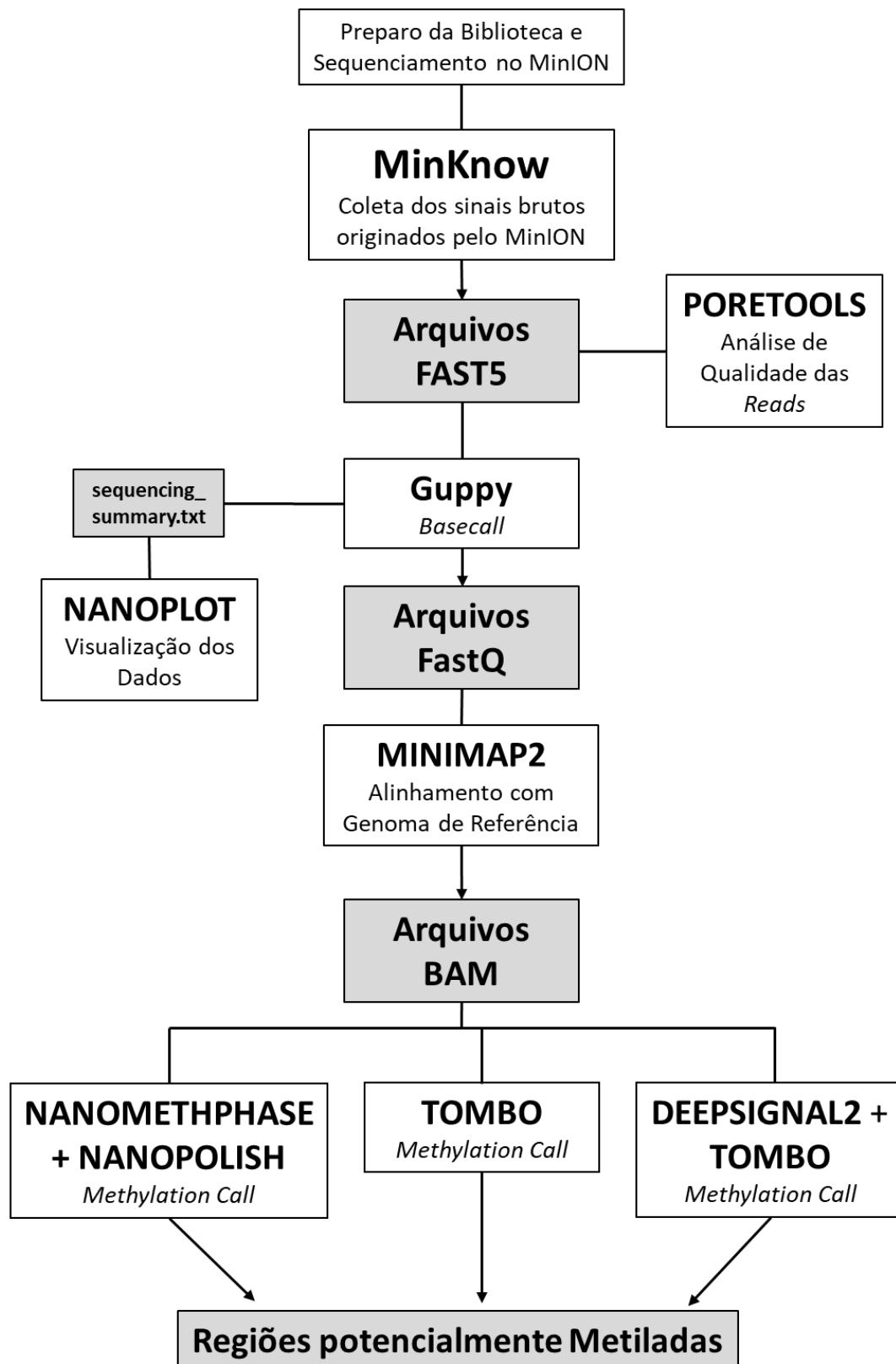


Figura 2. Fluxo de trabalho empregado para pós-processamento dos dados de sequenciamento via *ONT MinION*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Enriquecimento Ambiental (EA)

4.1.1 Teste de Preferência de Enriquecimento Ambiental (TPEA)

Os Testes de Preferência são ferramentas essenciais para identificar a escolha dos animais e permitir o desenvolvimento de novos estudos na área. Dessa forma, optamos por realizar este teste e verificar a preferência das fêmeas dentre alguns objetos de enriquecimento disponíveis como já fora mencionado anteriormente e detalhado no Apêndice A. Foram testados enriquecimentos do tipo nidificação e abrigo; e durante o teste a fêmea teve passagem livre pelo sistema de gaiolas interligadas (SGI), no qual estavam disponíveis os enriquecimentos como pode ser observado na Figura 3.



Figura 3. Interação da fêmea com os EAs durante o último teste de preferência.

Os dados de preferência obtidos resultaram em um único objeto preferido pelas fêmeas de todos os grupos avaliados, o rolo de papelão. Este objeto, previamente, foi pensado em ser tipo-abrigo, mas mostrou-se um material bastante versátil, pois ao mesmo tempo que pode ser utilizado como abrigo em animais púberes, também permitiu ser roído e utilizado como material para nidificação em fêmeas adultas e em fase materna (ROSA; MASUKI, PERIPATO, submetido).

4.2 Testes de emocionalidade e cuidado materno

4.2.1 Emocionalidade

A emocionalidade pode ser definida como o estado/traço de ser emocional e consiste em uma cooperação entre reações orgânicas, experienciais e expressivas que aumentam as condições excitadas do animal (HALL, 1934) e influenciam na resposta a diversos estímulos. Os testes de emocionalidade permitem avaliar o reflexo comportamental dos animais frente a ambientes distintos dos que estão habituados.

Na Tabela 3 são apresentados os dados de média da duração e frequência relativa nas áreas mais (centro) e menos (periferia) aversivas no teste de campo aberto que foram utilizados para avaliar a emocionalidade (traços ansiosos) das fêmeas LG/J, nas fases púbere, reprodutiva, materna e pós-desmame, em todos os grupos investigados.

Tabela 3. Dados médios de duração e frequência no centro do teste de campo aberto.

CAMPO ABERTO					
FASE	GRUPO	Duração Centro	Duração Periferia	Frequência Centro	Frequência Periferia
PÚBERE	G1	0,1021 ± 0,02*	0,8979 ± 0,02	0,189 ± 0,02*	0,811 ± 0,02
	G2	0,1255 ± 0,01*	0,8745 ± 0,01	0,2434 ± 0,02*	0,7608 ± 0,02
	G3	0,1522 ± 0,01*	0,8478 ± 0,01	0,2374 ± 0,01*	0,7626 ± 0,01
	G4	0,1448 ± 0,04*	0,8552 ± 0,04	0,2075 ± 0,02*	0,7925 ± 0,02
REPRODUTIVA	G1	0,0437 ± 0,01*	0,9563 ± 0,01	0,1434 ± 0,03*	0,8566 ± 0,03
	G2	0,0371 ± 0,01*	0,9629 ± 0,01	0,1437 ± 0,03*	0,8563 ± 0,03
	G3	0,0344 ± 0,01*	0,9656 ± 0,01	0,0967 ± 0,02*	0,9032 ± 0,02
	G4	0,0606 ± 0,02*	0,9394 ± 0,02	0,174 ± 0,04*	0,826 ± 0,04
MATERNA	G1	0,012 ± 0,01*	0,988 ± 0,01	0,0733 ± 0,01*	0,9267 ± 0,01
	G2	0,0258 ± 0,01*	0,9742 ± 0,01	0,105 ± 0,02*	0,895 ± 0,02
	G3	0,0178 ± 0,01*	0,9822 ± 0,01	0,0653 ± 0,01*	0,9347 ± 0,01
	G4	0,0296 ± 0,01*	0,9704 ± 0,01	0,1219 ± 0,02*	0,8781 ± 0,02
PÓS-DESMAME	G1	0,0221 ± 0,01*	0,9779 ± 0,01	0,0685 ± 0,02*	0,9315 ± 0,02
	G2	0,0329 ± 0,01*	0,9671 ± 0,01	0,0814 ± 0,02*	0,9186 ± 0,02
	G3	0,0160 ± 0,01*	0,9840 ± 0,01	0,0422 ± 0,01*	0,9578 ± 0,01
	G4	0,0184 ± 0,01*	0,9816 ± 0,01	0,0537 ± 0,01*	0,9463 ± 0,01

G1 representa o grupo controle positivo (enriquecimento frequente); G2 representa o grupo controle negativo (sem nenhuma exposição); G3 representa exposição ao enriquecimento na fase púbere (fêmeas de 3 a 4 semanas); e G4 representa exposição ao enriquecimento na fase materna. Dados com “*” indicam diferença significativa (<0,05) para as comparações entre Duração Centro com Duração Periferia e Frequência Centro com Frequência Periferia.

A Tabela 4, a seguir, apresenta os dados de média da duração e frequência relativa nas áreas mais (braço aberto) e menos (braço fechado) aversivas no teste de labirinto em cruz elevado das fêmeas LG/J, nas fases púbere, reprodutiva, materna e pós-desmame, em todos os grupos investigados.

Tabela 4. Dados médios de duração e frequência nos braços abertos do teste de labirinto em cruz elevado.

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO					
FASE	GRUPO	Duração Aberto	Duração Fechado	Frequência Aberto	Frequência Fechado
PÚBERE	G1	0,2976 ± 0,08*	0,5049 ± 0,08	0,2712 ± 0,07*	0,5799 ± 0,07
	G2	0,2556 ± 0,06*	0,4694 ± 0,07	0,2492 ± 0,05*	0,5628 ± 0,06
	G3	0,4085 ± 0,05*	0,5915 ± 0,05	0,3409 ± 0,04*	0,6591 ± 0,04
	G4	0,2336 ± 0,05*	0,5509 ± 0,06	0,2333 ± 0,05*	0,6001 ± 0,05
REPRODUTIVA	G1	0,0134 ± 0,01*	0,8832 ± 0,03	0,0164 ± 0,01*	0,8761 ± 0,02
	G2	0,0333 ± 0,01*	0,7833 ± 0,05	0,0371 ± 0,01*	0,8214 ± 0,03
	G3	0,1760 ± 0,04*	0,8240 ± 0,04	0,1291 ± 0,02*	0,8709 ± 0,02
	G4	0,0192 ± 0,01*	0,9015 ± 0,02	0,0214 ± 0,01*	0,8733 ± 0,02
MATERNA	G1	0,0142 ± 0,01*	0,9111 ± 0,02	0,02 ± 0,01*	0,8803 ± 0,02
	G2	0,0181 ± 0,01*	0,854 ± 0,04	0,0193 ± 0,01*	0,85 ± 0,02
	G3	0,1027 ± 0,02*	0,8973 ± 0,02	0,1286 ± 0,02*	0,8714 ± 0,02
	G4	0,0186 ± 0,01*	0,8923 ± 0,02	0,0198 ± 0,01*	0,8811 ± 0,01
PÓS-DESMAME	G1	0,0266 ± 0,01*	0,8629 ± 0,04	0,0318 ± 0,01*	0,845 ± 0,03
	G2	0,0213 ± 0,01*	0,8019 ± 0,04	0,0246 ± 0,01*	0,8275 ± 0,02
	G3	0,1142 ± 0,02*	0,8858 ± 0,02	0,1268 ± 0,01*	0,8732 ± 0,01
	G4	0,0257 ± 0,01*	0,9171 ± 0,02	0,0338 ± 0,01*	0,8673 ± 0,02

G1 representa o grupo controle positivo (enriquecimento frequente); G2 representa o grupo controle negativo (sem nenhuma exposição); G3 representa exposição ao enriquecimento na fase púbere (fêmeas de 3 a 4 semanas); e G4 representa exposição ao enriquecimento na fase materna. Dados com “*” indicam diferença significativa (<0,05) para as comparações entre Duração Aberto com Duração Fechado e Frequência Aberto com Frequência Fechado.

Campo aberto e Labirinto em Cruz Elevado são testes comportamentais que avaliam a ansiedade dos animais (HALL, 1934, LISTER, 1987). Ao contrastar os dados de visitas às áreas mais aversivas e as menos aversivas em ambos os aparatos, os dados indicam que as fêmeas, em todas as fases da vida, permaneceram e frequentaram significativamente ($p < 0,05$) mais as áreas menos aversivas dos testes campo aberto e labirinto em cruz elevado do que as áreas mais aversivas. Esses dados sugerem que as fêmeas LG/J exploraram mais a região central do que a periferia enquanto públicas.

Na Tabela 5 são apresentados os dados de média da duração e frequência relativa de imobilidade e mobilidade no teste de nado forçado, para avaliar possíveis traços depressivos das fêmeas LG/J.

Tabela 5. Dados médios de duração e frequência nos braços abertos do teste de nado forçado.

NADO FORÇADO					
FASE	GRUPO	Duração Imobilidade	Duração Mobilidade	Frequência Imobilidade	Frequência Mobilidade
PÚBERE	G1	0,0883 ± 0,03*	0,7797 ± 0,04	0,1781 ± 0,03*	0,4645 ± 0,03
	G2	0,1764 ± 0,03*	0,7376 ± 0,03	0,24 ± 0,03*	0,431 ± 0,02
	G3	0,1283 ± 0,03*	0,8717 ± 0,03	0,3939 ± 0,03*	0,6061 ± 0,03
	G4	0,176 ± 0,03*	0,7111 ± 0,04	0,2741 ± 0,03*	0,4197 ± 0,03
REPRODUTIVA	G1	0,5622 ± 0,06	0,4002 ± 0,05	0,4027 ± 0,03	0,4267 ± 0,02
	G2	0,5961 ± 0,05*	0,3803 ± 0,05	0,4212 ± 0,02	0,4181 ± 0,02
	G3	0,5891 ± 0,04*	0,4109 ± 0,04	0,4926 ± 0,02	0,5074 ± 0,01
	G4	0,6188 ± 0,03*	0,3693 ± 0,03	0,468 ± 0,01	0,478 ± 0,01
MATERNA	G1	0,4826 ± 0,08	0,4333 ± 0,06	0,346 ± 0,04	0,4733 ± 0,07
	G2	0,5865 ± 0,06*	0,3613 ± 0,05	0,3776 ± 0,04	0,3944 ± 0,02
	G3	0,6489 ± 0,05*	0,3511 ± 0,05	0,5129 ± 0,01	0,4870 ± 0,01
	G4	0,4222 ± 0,07	0,5131 ± 0,06	0,3519 ± 0,04	0,4342 ± 0,02
PÓS-DESMAME	G1	0,6827 ± 0,05*	0,2873 ± 0,04	0,4611 ± 0,02	0,4469 ± 0,01
	G2	0,6438 ± 0,06*	0,3409 ± 0,06	0,4849 ± 0,04	0,4266 ± 0,03
	G3	0,7845 ± 0,04*	0,2155 ± 0,04	0,5554 ± 0,02*	0,4446 ± 0,02
	G4	0,7049 ± 0,06*	0,2821 ± 0,06	0,4988 ± 0,02	0,4565 ± 0,01

G1 representa o grupo controle positivo (enriquecimento frequente); G2 representa o grupo controle negativo (sem nenhuma exposição); G3 representa exposição ao enriquecimento na fase púbera (fêmeas de 3 a 4 semanas); e G4 representa exposição ao enriquecimento na fase materna. Dados com “*” indicam diferença significativa (<0,05) para as comparações entre Duração Imobilidade com Duração Mobilidade e Frequência Imobilidade com Frequência Mobilidade.

Os resultados de NF revelam que as fêmeas permaneceram significativamente mais tempo móveis na fase púbera ($p < 0,05$), mas nas outras fases de vida (reprodutiva, materna e pós-desmame) esse comportamento se inverte: as fêmeas permanecem significativamente mais tempo imóveis ($p < 0,05$).

De maneira geral, sugere-se que as fêmeas da linhagem LG/J podem apresentar padrões comportamentais diferentes durante as fases de vida. É interessante notar aqui que em análises de outros trabalhos de nosso grupo, quando campáramos os animais LG/J com outra linhagem de camundongos, a SM/J, eles apresentaram comportamentos tipo-ansiosos e tipo-depressivos (SANTANA, PERIPATO, ROSA, 2016; LAU JÚNIOR, 2017; CONSTANTINO, 2018), porém esses estudos não avaliaram a variação comportamental entre as linhagens em diferentes fases do desenvolvimento.

4.2.1.1 Campo Aberto (CA) e Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O CA e o LCE são aparatos que apresentam áreas aversivas e mais expostas, consequentemente, desprotegidas, as quais são a região central do CA e os braços

abertos do LCE. Em vista disto, espera-se que os animais mais ansiosos evitem essas regiões e explorem menos os ambientes (CHOLERIS et al., 2001; RODGERS et al., 1997). Os resultados das análises dos testes foram comparados intragrupo e entre grupos.

Nas Figuras 4 e 5 estão apresentados dados intragrupos de comportamento das fêmeas LG/J, em diferentes fases da vida, no CA e LCE, respectivamente.

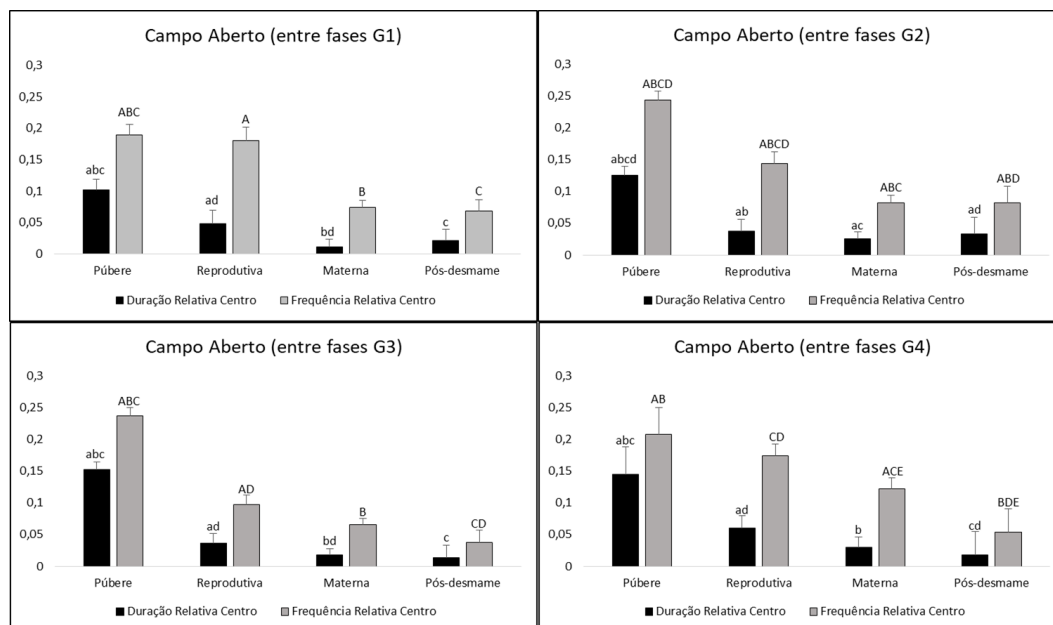


Figura 4. Diferença dentro dos grupos, entre as fases de vida, na duração e frequência de ambulação na região aberta do teste de emocionalidade Labirinto em Cruz Elivado. (A) resultados referentes ao G1 (exposição frequente ao enriquecimento), (B) resultados referentes G2 (não exposição a enriquecimento), (C) resultados referentes ao G3 (exposição ao enriquecimento na puberdade), e (D) resultados referentes ao G4 (exposição ao enriquecimento na fase materna). As letras iguais indicam diferença significativa, minúsculas para dados de duração e maiúscula para dados de frequência.

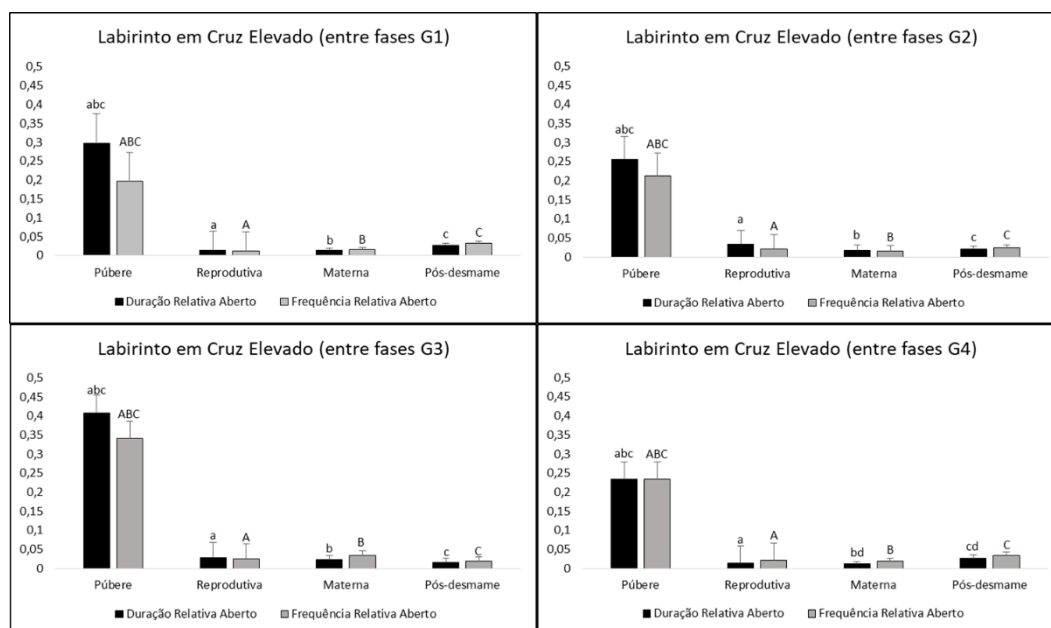


Figura 5. Diferença intragrupo entre as fases de vida, na duração e frequência de ambulação na região central do teste de emocionalidade Campo Aberto. (A) resultados referentes ao G1 (exposição frequente ao enriquecimento), (B) resultados referentes G2 (não exposição a enriquecimento), (C) resultados referentes ao G3 (exposição ao enriquecimento na puberdade), e (D) resultados referentes ao G4 (exposição ao enriquecimento na fase materna). As letras iguais indicam diferença significativa, minúsculas para dados de duração e maiúscula para dados de frequência.

Os resultados intragrupos revelaram que fêmeas de todos os grupos apresentaram significativamente maior tempo de ambulação e frequência de visitas à região central (mais aversiva do aparato) do CA na fase púbere ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram observados nos dados de LCE, os quais mostraram que as fêmeas de todos os grupos apresentaram significativamente maior tempo de ambulação e frequência de visitas à região dos braços abertos (mais aversiva do aparato) na fase púbere ($p < 0,05$). Esses dados sugerem uma menor ansiedade nas fêmeas na fase púbere do que nas demais fases. À priori, esses dados já corroboram a ideia discutida anteriormente de que as fêmeas púberes apresentam maior atividade locomotora ou maior agitação do que em outras fases de vida, o que possivelmente teve reflexo nos resultados de maior mobilidade no nado forçado.

A puberdade é marcada pela indução da maturação sexual, devido a secreção de hormônios gonadais (OJEDA, URBANSKY, 1994), também pela organização de vias neurais (CLOUGH, RODRIGUEZ-SIERRA, 1983) e pela ativação de comportamentos não sexuais dependentes do sexo (BEATTY, 1979). Geralmente, animais em fase púbere diferem-se dos adultos por seu comportamento espontâneo, mais lúdico e afiliativo (LAVIOLA et al., 1999; SPEAR, 2000), bem como buscam por novidades

(PALANZA, MORLEY-FLETCHER, LAVIOLA, 2001). Em humanos, adolescentes apresentam maior envolvimento com comportamentos imprudentes do que quando adultos (BERNT, 1979), apresentando assim menor preocupação em evitar danos e menores níveis de ansiedade (ARNETT, 1922; MAGGS et al., 1995). Os resultados aqui encontrados indicam um aumento na resposta comportamental com características tipo ansiosas em idades mais avançadas, revelando que as fêmeas responderam a fatores que influenciaram a emocionalidade ao decorrer das fases de sua vida. Esses resultados podem ser reflexo do envelhecimento dos animais, já que mudanças cognitivas e emocionais estão relacionadas, assim como foram observados em estudos de Meyza et al. (2011) e Inta et al (2013), que mostraram aumento dos níveis de comportamento tipo ansioso conforme o envelhecimento. Pensando nisso, podemos distinguir a ansiedade patológica e a adaptativa, em que a primeira pode ser considerada uma doença com efeitos de distúrbios cognitivos, emocionais e fisiológicos, e a segunda pode ser considerada útil, pois gera estratégias de sobrevivência, constituindo um mecanismo de alerta/alarme (GUTIÉRREZ-GARCIA, CONTRERAS, 2013). Neste quesito, o aumento de respostas ansiosas conforme a idade do animal podem estar relacionadas com o valor adaptativo desta emoção ajudando a lidar com situações ameaçadoras, refletindo no comportamento natural de busca por rotas de fuga de potenciais predadores por exemplo, visando sucesso reprodutivo dos filhotes (BECERRA-GARCÍA et al., 2007; SPIELBERGER, 2010; GUTIÉRREZ-GARCIA, CONTRERAS, 2013; MORRIS, 2019).

Ademais, os animais púberes, passam por um período crítico do desenvolvimento comportamental (MACRÌ et al., 2002). A exploração de novos ambientes está frequentemente associada à ansiedade e é potencialmente utilizada para busca de novos nichos, como fontes de alimentos e parceiros sexuais (MACRÌ et al., 2002) É na puberdade que roedores começam a explorar locais mais afastados do ninho e posteriormente começam a se dispersar (GALEF JR., 1981). A dispersão apresenta função adaptativa, pois nesse período de vida tal comportamento pode evitar os riscos de endocruzamentos e de competição intraspecífica (MACRÌ et al., 2002). No entanto, essa busca também pode ser perigosa devido à presença de diferentes riscos, como conspecíficos agressivos e predadores (BLANCHARD et al., 1990; LAVIOLA, ADRIANI, 1998).

As mudanças na exploração do ambiente também podem estar relacionadas com a idade do indivíduo devido ao desenvolvimento cerebral não ser linear (CHOI,

KELLOGG, 1996; CHOI, WEISBERG, KELLOGG, 1997), ou seja, existem períodos no ciclo de vida dos animais que são críticos para a aquisição de conhecimentos e aprimoramento de habilidades (BARTOSZECK, BARTOSZECK, 2007). De forma implícita, esse desenvolvimento não linear pode refletir no comportamento de camundongos adolescentes (fase de vida que abrange períodos de tempo antes e após a puberdade (SPEAR, BRAKE, 1983) que sofrem nessa fase de vida, por exemplo, um declínio no sistema cerebral serotoninérgico, mediador de respostas ao estresse (DILLON et al., 1991).

Dessa forma, os resultados das análises intragrupo sugerem que há uma diferença no padrão comportamental das fêmeas enquanto púberes e essa característica parece ser inata e fundamental para o desempenho das atividades espécie-específicas. Outro resultado que foi observado apenas nas fêmeas do grupo 4 (enriquecidas na fase materna) foi a indicação de menor ansiedade na fase materna do que na pós-desmame, pois as fêmeas frequentaram mais vezes o centro do aparato quando em fase materna ($p=0,0033$).

Esse resultado, embora significativo, pode apenas refletir o padrão comportamental desses animais e que provavelmente não foi encontrado nos outros grupos devido aos tratamentos e tamanho amostral. Interessantemente, o conjunto de comportamentos desempenhados por mamíferos durante a fase materna pode diferir daqueles exibidos em outros períodos de seus ciclos reprodutivos (FERREIRA et al., 2002). Essa mudança depende, principalmente, das alterações hormonais que caracterizam a gestação, o parto e a lactação (BITRAN, HILVERS, KELLOGG, 1991; HANSEN, FERREIRA, 1986). O cérebro em fase materna, passa por diversas modificações fisiológicas e comportamentais para lidar com as necessidades da prole (BOSCH, 2010). Também estão incluídos nas adaptações do cérebro materno, mecanismos neurobiológicos da ocitocina, arginina-vasopressina e prolactina que são importantes sistemas envolvidos na mediação da ansiedade e comportamento materno (BOSCH, 2010). No entanto, esta discussão será retomada posteriormente.

A mobilidade dos animais representa um fator importante a ser considerado nos testes comportamentais. Na Figura 6, observamos mobilidade por meio da distância percorrida entre os quadrados no teste de Campo Aberto.

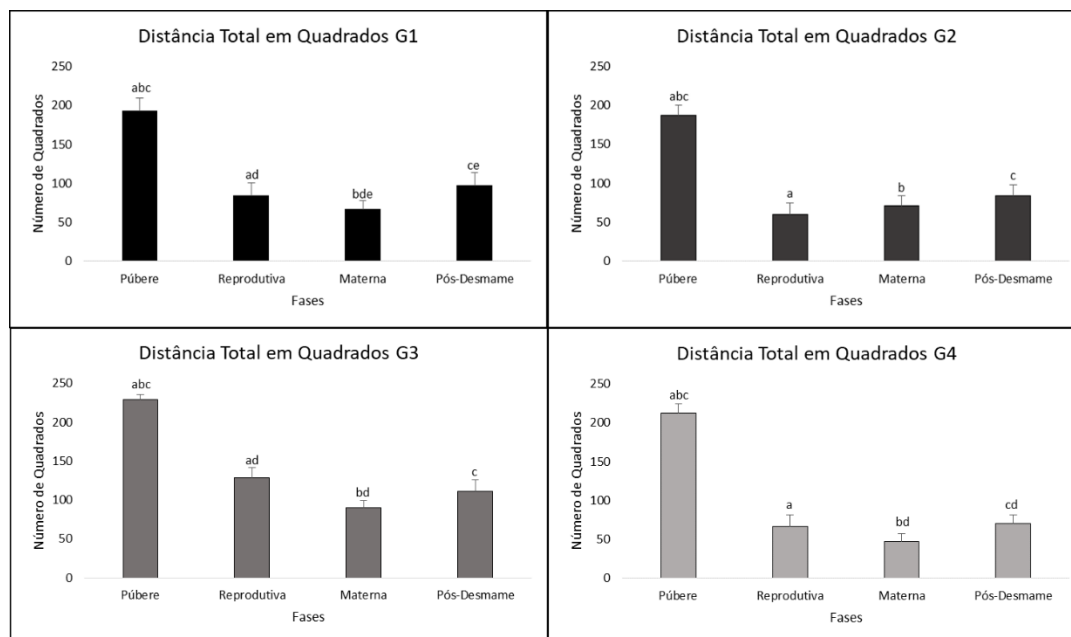


Figura 6. Distância total de quadrados percorridos no teste Campo Aberto em todas as fases avaliadas comparados intragrupo. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

É possível observar que em todos os grupos de estudo as fêmeas púberes percorrem mais quadrados do que nas outras fases de vida ($p < 0,0001$). Para os grupos 1 e 3 também foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as fases reprodutiva e materna, de modo que as fêmeas na fase reprodutiva apresentaram maior locomoção.

Os parâmetros avaliados no teste de CA, incluindo a locomoção, podem apresentar variações conforme a linhagem, sexo e idade dos animais (VALLE, 1970; ELIAS, 1975; VAN WAAS, SOFFIÉ, 1996; LEITE-ALMEIDA et al., 2009). Além disso, a locomoção, enquanto característica essencial da exploração de ambientes pode estar associada a dispersão dos animais nas idades mais jovens (como mencionado anteriormente) (KELLEY, 1993). Também se sugere que a diminuição de locomoção das fêmeas em fase materna seja reflexo da necessidade de ficar próxima ao ninho e dos filhotes.

Quanto aos grupos 1 e 4, esses animais apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fases materna e pós-desmame, sendo possível observar um aumento na ambulação na fase pós-desmame. Nota-se que, na fase pós-desmame, as fêmeas foram desmamadas de seus filhotes e alocadas com outras fêmeas de mesmo grupo e que passaram pelo mesmo processo. Existe um déficit de estudos que avaliem o

comportamento de fêmeas pós-desmame, sendo que a maioria da literatura disponível avalia o comportamento dos filhotes frente aos impactos do desmame até a vida adulta e seus reflexos. No entanto, nosso estudo mostrou um aumento na atividade locomotora pós-desmame. Algumas variáveis podem interferir neste resultado como: o estresse do desmame, o enriquecimento social, e também esse resultado pode ser apenas parte do comportamento normal das fêmeas.

De fato, o estresse pode aumentar a atividade locomotora nos animais (LEE, TSAI, CHAI, 1986). O enriquecimento social não parece ser o fator fundamental para o aumento na atividade locomotora das fêmeas, já que em estudo de Elliot e Grunberg (2005), foi demonstrado que a socialização reduz a locomoção nos animais. Ou, pelo menos, o tempo de exposição a outros conspecíficos não fora o suficiente para impactar nos resultados obtidos. Isso nos leva a crer que a variação encontrada possa ser devido as modificações comportamentais serem muito evidentes na fase materna, sugerindo que a locomoção das fêmeas no pós-desmame seja parte de seu comportamento padrão nessa fase.

Nos resultados entre grupos, ao analisarmos a fase púbere (4 semanas de vida) quanto a estarem expostas ao EA continuamente (G1), na ausência de interação com o EA (G2), na exposição atual com o EA (G3-EA na fase púbere), na exposição ao EA na fase materna (G4 – portanto nessa fase ainda sem exposição ao EA, como o G2), verificamos os desempenhos no CA e LCE na Figura 7.

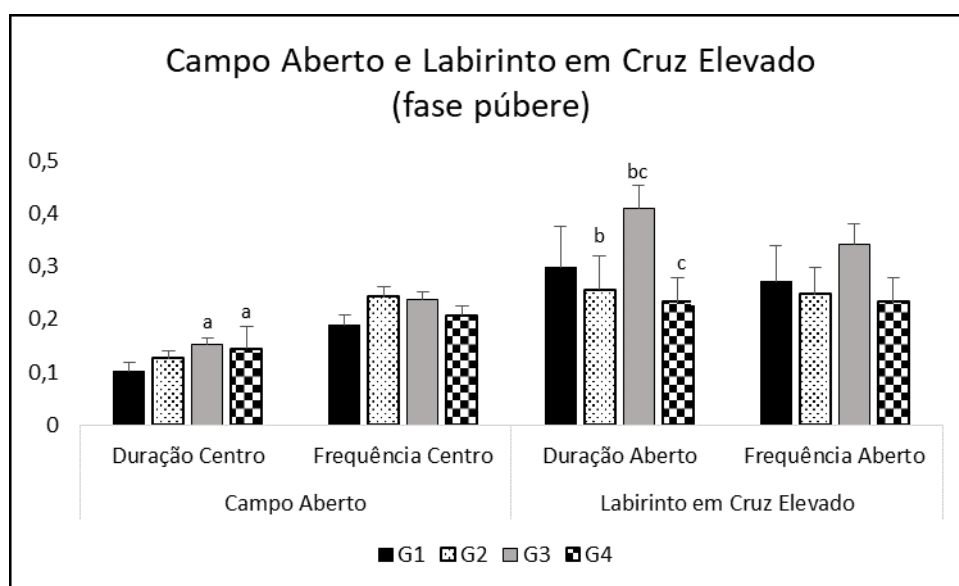


Figura 7. Resultados de duração e frequência dos testes de emocionalidade Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado na fase púbere. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Na ocasião dos testes, apenas as fêmeas do grupo 1 e 3 estavam expostas ao EA. Observa-se que as fêmeas do grupo 3 permaneceram significativamente ($p=0,0069$) mais tempo no centro do CA do que as fêmeas do grupo 4. Já os resultados do LCE mostram que as fêmeas do grupo 3 permaneceram mais tempo nos braços abertos do que as fêmeas do grupo 2 ($p=0,0087$) e 4 ($p=0,0101$).

Conforme discutido anteriormente, a fase púber confere aos animais uma resposta comportamental aos estímulos ambientais menos ansiosa do que nas outras fases de vida. No entanto, as fêmeas do grupo 3 que acabaram de ser expostas a um ambiente enriquecido apresentaram amenização de respostas tipo ansiosas em relação a fêmeas dos grupos 2 e 4, sugerindo influência do EA. O enriquecimento ambiental é capaz de diminuir a ansiedade dos animais e influenciar na plasticidade cerebral (SAMPEDRO-PIQUERO et al., 2013; HÜTTENRAUCH, SALINAS, WIRTHS, 2016). Inclusive, no estudo de Benaroya-Milshtein e colaboradores (2004), o enriquecimento ambiental influenciou não só na diminuição da ansiedade como também atenuou a resposta ao estresse em que os animais foram submetidos.

Na Figura 8 estão apresentados os resultados de CA e LCE da fase materna (12 semanas de vida) contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4.

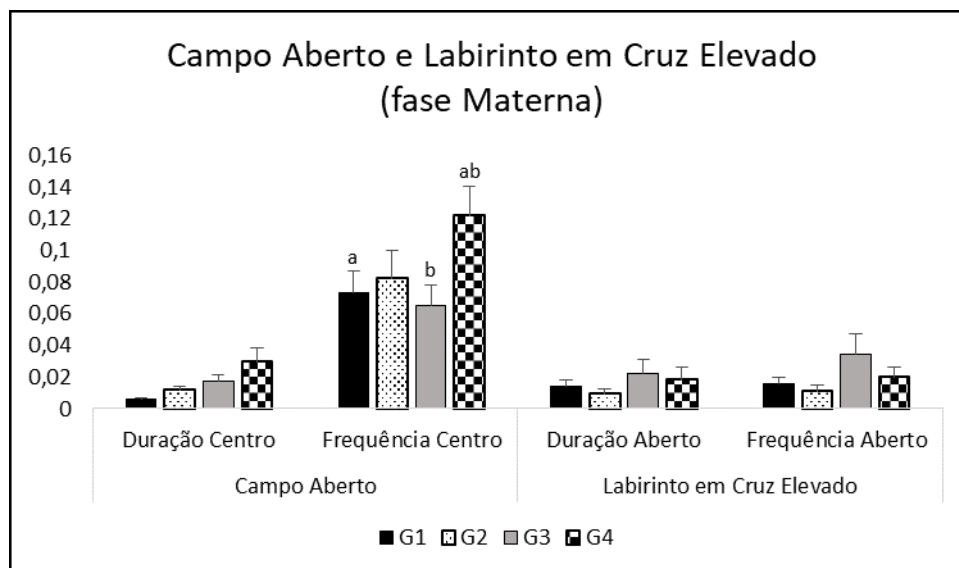


Figura 8. Resultados de duração e frequência dos testes de emocionalidade Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado na fase materna. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Neste momento de testes em fase materna, apenas as fêmeas do grupo 1 e 4 estavam expostas ao EA, sendo que para as fêmeas do grupo 4, o objeto era novidade, enquanto que o EA estava sendo oferecido continuamente para as fêmeas do grupo 1; as fêmeas do grupo 3 haviam sido expostas ao EA apenas nas 3^a e 4^a semanas de vida. Observa-se que as fêmeas do grupo 4 frequentaram significativamente mais vezes a região central do CA do que as fêmeas do grupo 1 ($p=0,0385$) e 3 ($p=0,0196$).

A partir dos resultados de CA, observa-se que as fêmeas do grupo 4 que estavam enriquecidas na fase materna apresentaram uma diminuição de comportamentos tipo ansioso bastante evidente devido às altas taxas de exploração do centro do CA. Esses dados corroboram que mudanças da fase materna parecem influenciar no seu padrão comportamental. Por exemplo, ratas em fase de lactação também apresentaram menores níveis de ansiedade no CA (FLEMING, LUEBKE, 1981;) e no LCE (BITRAN, HILVERS, KELLOGG, 1991, KELLOG, BARRET, 1999; NEUMANN, TORNER, WIGGER, 1999; LONSTEIN, 2005). Além disso, o contato com os filhotes também está relacionado com a diminuição de ansiedade nessa fase (LONSTEIN, 2005). Ferreira e colaboradores (2002) sugeriram que os comportamentos exibidos na fase materna são condição necessária para a expressão de ansiólise, agressão e redução de medo. Neste mesmo estudo, ratas lactantes, sensibilizadas (tratadas com esteroides para simular o perfil endócrino do final do período gestacional e parto) e ovariectomizadas foram contrastadas no teste LCE e também observaram que as fêmeas lactantes (em fase materna) apresentaram menores níveis de ansiedade no teste do que as outras fêmeas. As fêmeas sensibilizadas apresentaram, mesmo que em menores níveis do que as lactantes, ataques contra intrusos. E ambas as fêmeas sensibilizadas e lactantes apresentaram menores níveis de medo do que as ovariectomizadas. Dessa forma, além do comportamento materno, fatores endócrinos parecem alterar o padrão comportamental tipo ansioso das fêmeas, como a progesterona e seus metabólitos que exercem papel fundamental nos efeitos ansiolíticos (FERNANDEZ-GUASTI, PICAZO, 1993; BITRAN, PURDY, KELLOG, 1993). Como já discutido anteriormente a presença de enriquecimento ambiental é capaz de atenuar comportamentos tipo ansiosos e nossos resultados indicam a possibilidade do EA realçar os efeitos ansiolíticos das mudanças hormonais naturais que já ocorrem na fêmea desde a fase gestacional ao pós-parto.

Neste resultado de CA, também foi interessante o aparecimento de diferença significativa entre o grupo 4 que acabara de ser exposto ao EA e o grupo 1 que esteve

exposto ao mesmo EA durante toda a sua vida. Nesse caso, um dos motivos pode estar relacionado à provável habituação do animal ao EA. A habituação é um fenômeno que ocorre quando o animal é exposto a um objeto de enriquecimento a longo prazo e nesse caso, o EA passa a ser menos interessante e parte de um ambiente padrão (KUCZAJ, 2002). Uma das formas mais comuns de verificar a habituação em roedores é o decréscimo de comportamentos exploratórios em resposta a exposição repetida a um novo ambiente (LESSUIS, BOLIVARB, 2006).

Na Figura 9 estão apresentados os resultados de CA e LCE da fase pós-desmame (15 semanas de vida) contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 5.

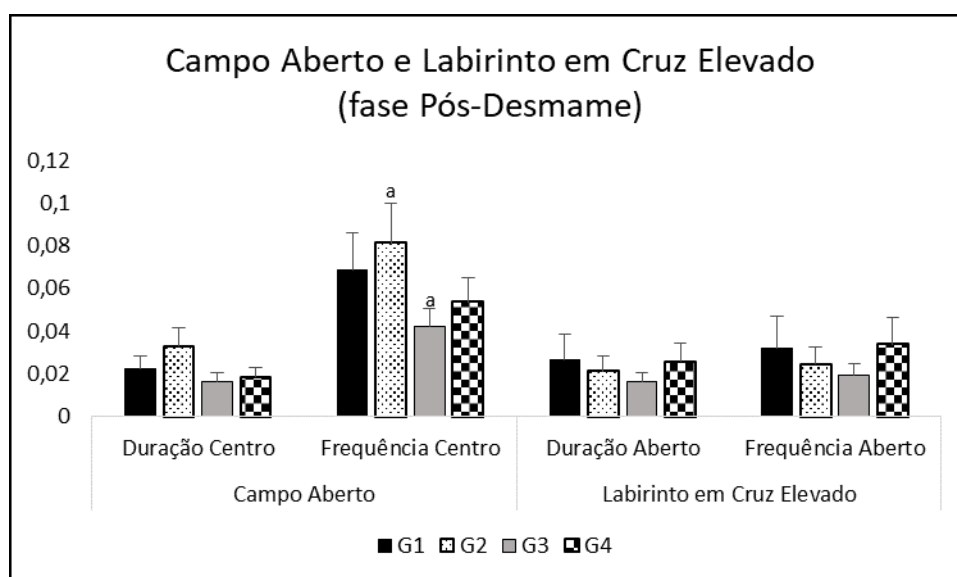


Figura 9. Resultados de duração e frequência dos testes de emocionalidade Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado na fase pós-desmame. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

No momento em que tais testes foram realizados, nenhuma das fêmeas estava em contato com o EA. Apenas as fêmeas dos grupos 1 (EA-contínuo), 3 (EA-puberdade) e 4 (EA-Fase materna) tiveram contato com o rolo de papelão nas fases de vida pré-estabelecidas. Observa-se que as fêmeas do grupo 2 frequentaram significativamente mais vezes a região central do CA do que as fêmeas do grupo 3 ($p=0,0373$). Interessantemente, este resultado mostra que aqueles animais expostos ao enriquecimento ambiental apenas no início da vida (duas semanas após o desmame – grupo 3) apresentaram aumento de respostas tipo ansiosas na fase adulta. Indicando que condições de vida positivas nas fases iniciais da vida, se não forem mantidas até/na idade adulta, podem ter consequências emocionais negativas como baixos níveis de

exploração do centro do aparato, consistente com altos níveis de ansiedade (NADER et al., 2012). Dessa forma, os efeitos do EA relacionados à ansiedade são perdidos quando a exposição é interrompida. Contudo, no estudo de Nader e colaboradores (2012) foi observado que estes efeitos positivos podem ser rapidamente readquiridos quando o EA é novamente implementado.

No teste de CA também é possível avaliar a locomoção dos animais verificando a distância percorrida em quadrados. Na Figura 10 estão apresentados os resultados de locomoção no teste de CA e os contrastes entre os grupos 1, 2, 3 e 5.

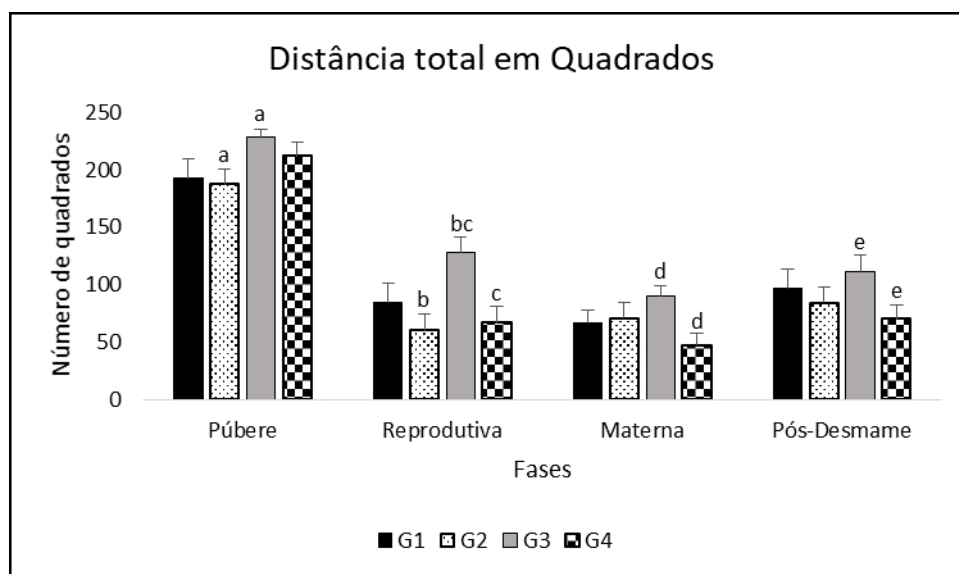


Figura 10. Resultados distancia total de quadrados percorridos no teste Campo Aberto em todas as fases avaliadas. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Observa-se que, na fase púbere, as fêmeas do grupo 3 percorreram mais quadrados do que as fêmeas do grupo 2 ($p=0,0027$). Já na fase reprodutiva, as fêmeas do grupo 3 percorreram significativamente mais quadrados do que as fêmeas do grupo 2 ($p=0,0014$) e 5 ($p=0,0035$). Na fase materna, as fêmeas do grupo 3 percorreram mais quadrados do que as fêmeas do grupo 5 ($p=0,0046$). E por fim, na fase pós-desmame, as fêmeas do grupo 3 percorreram mais quadrados do que as fêmeas do grupo 5 ($p=0,0381$). Neste resultado, pode-se observar que as fêmeas do grupo 3 se sobressaíram na locomoção no aparato do CA. No entanto, apenas a avaliação da atividade locomotora pode não refletir o estado emocional dos animais. Os efeitos positivos esperados pela exposição ao EA foram percebidos na fase púbere das fêmeas do grupo 3, porém, a descontinuação dessas fêmeas em um ambiente enriquecido não

atenuou respostas comportamentais tipo ansiosas. Dessa forma, as fêmeas do grupo 3 apresentam maior atividade locomotora do que as fêmeas dos outros grupos, porém esta atividade parece ter se concentrado nas áreas mais protegidas/menos aversivas do aparato; dessa forma, diminuindo a exploração do ambiente, já que a exploração é um resultado da combinação da curiosidade, medo e ansiedade provocados pelos novos estímulos do CA (LEE, TSAI, CHAI, 1986).

Em resumo, a análise dos dados de ansiedade sugere que esse comportamento é uma característica natural dos camundongos e parece estar evidente nas fases de vida mais tardias. A puberdade e a fase materna parecem ter alterações no padrão de resposta comportamental tipo ansiosa. Além disso, a atividade locomotora dos animais não parece refletir a emocionalidade dos mesmos. O enriquecimento ambiental, enquanto novidade, parece ter papel fundamental na atenuação de comportamentos tipo ansiosos. No entanto, a habituação das fêmeas ao enriquecimento transforma o mesmo em parte do alojamento padrão e anula os efeitos positivos desejados. Por fim, a descontinuidade do enriquecimento na fase púbere parece refletir na fase adulta em estados emocionais indesejados.

4.2.1.2 Nado Forçado (NF)

O NF permite avaliar traços tipo-depressivos dos animais porque o teste expõe o animal à um ambiente completamente aversivo, sem possibilidade de escape, e aqueles que se apresentarem imóveis podem ser considerados deprimidos (PORSOLT et al. 1977; CRYAN, MOMBÉREAU, 2004). Os resultados das análises dos testes foram comparadas entre e intragrupo.

Os resultados de indícios de depressão intragrupos, apresentados por fase de desenvolvimento (púberes, reprodutiva, materna e pós-desmame), podem ser visualizados na Figura 11.

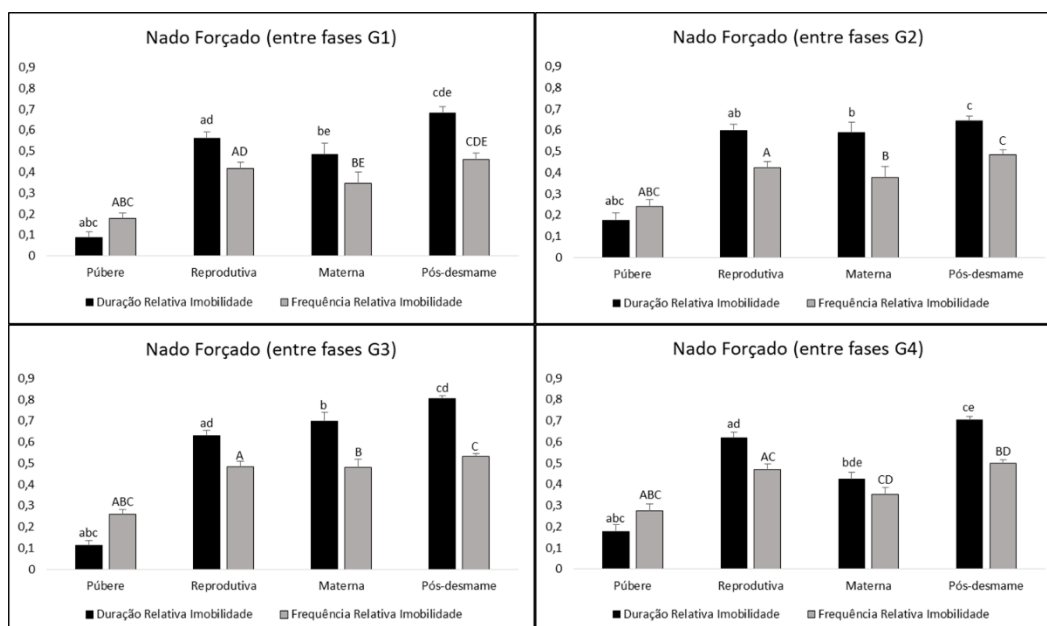


Figura 11. Resultados de duração e frequência de imobilidade do teste de emocionalidade Nado Forçado contrastado entre as fases de vida. (A) resultados referentes ao grupo 1 (G1), (B) resultados referentes ao grupo 2 (G2), (C) resultados referentes ao grupo 3 (G3) e (D) resultados referentes ao grupo 4 (G4). As letras iguais entre as barras dos gráficos indicam diferença significativa, minúscula para duração e maiúscula para frequência.

Observa-se que as fêmeas de todos os grupos apresentaram menor duração de imobilidade no teste de nado forçado na fase púbere ($p < 0,05$). As fêmeas do grupo 1 e 3 apresentaram diferenças significativas no tempo e frequência de imobilidade (para o grupo 1, $p = 0,0094$ para duração e $p = 0,0268$ para frequência e para o grupo 3, $p = 0,0007$ para duração), nesse caso, as fêmeas em fase pós-desmame permaneceram mais tempo e mais vezes imóveis do que na fase reprodutiva. As fêmeas em fase de pós-desmame também permaneceram mais tempo e mais vezes imóveis do que as fêmeas em fase materna. Essas diferenças foram significativas para os grupos 1 ($p = 0,0052$ para duração e $p = 0,0044$ para frequência) e para o grupo 4 ($p < 0,0001$ para duração e $p = 0,0002$ para frequência).

De acordo com os resultados intragrupo, no desempenho no NF, os animais apresentaram aumento na resposta comportamental com características ansiosas e depressivas conforme as fases de vida, indicando que as fêmeas responderam a fatores que influenciaram a emocionalidade nestas fases. Esses resultados podem ser reflexo do envelhecimento dos animais, já que mudanças cognitivas e emocionais estão relacionadas com o amadurecimento. Resultados semelhantes foram observados em estudos de Meyza et al. (2011) e Inta et al (2013), que mostraram aumento dos níveis de

ansiedade com o envelhecimento (como observado na discussão anterior) e depressão (ANISMAN, MATHESON, 2005).

Foi sugerido que a imobilidade pode ser reflexo do isolamento social (PANKSEPP et al., 1991), pensando nisso, as diferenças encontradas entre a fase púbere (na qual as fêmeas ficaram alocadas com até 3 por caixa) e a fase materna quando elas permaneceram isoladas da detecção da prenhez até o nascimento dos filhotes poderiam responder por esse resultado. No entanto, a diferença entre a fase púbere e reprodutiva também foi significativa e em ambas as fases as fêmeas tiveram contato social direto. Dessa forma, sugere-se que os resultados encontrados estejam relacionados com a idade dos animais.

Diferente de resultados já encontrados no nosso grupo de estudo (observações não publicadas) e outros trabalhos com camundongos machos avaliados pelo teste NF, estes animais permaneceram menos tempo imóveis em idades mais avançadas (SHOJI et al. 2016). No entanto, a forma de avaliação dos testes é subjetiva: um dos estudos avaliou a imobilidade em duas sessões do teste de NF, uma no início e outra ao final e durante a última metade da sessão os camundongos idosos apresentaram maior imobilidade do que os camundongos de meia idade (SHOJI, MIYAKAWA, 2019).

É importante observar que as fêmeas do grupo 1 e 4 apresentaram uma queda na imobilidade da fase materna, sendo evidentes os resultados encontrados no grupo 4 em que as fêmeas apresentaram menor duração e frequência de imobilidade na fase materna do que na fase reprodutiva ($p=0,0211$ para duração e $p=0,0250$ para frequência). A linhagem LG/J, utilizada neste trabalho, apresentou mais comportamentos tipo-depressivos do que as fêmeas da linhagem SM/J em outro estudo do grupo (dados não publicados), caracterizando-a com mais traços depressivos. Os animais com tendência a comportamento depressivo apresentaram maior imobilidade no teste NF durante a fase materna, indicando a presença de depressão pós-parto (DPP) (LAVI-AVNON et al., 2005). A DPP pode estar associada à hiperatividade neuroendócrina, levando alterações no cuidado materno e também na própria nutrição e auto-cuidado (MAGUIRE, MODY, 2008; FERNANDEZ et al., 2014). Contudo, nossos resultados do grupo 4 não condizem com a hipótese de DPP. Indicando que as características biológicas que regem a experiência materna nesse caso, não foram suficientes para induzir respostas tipo depressivas nas fêmeas e sugere-se que algum componente ambiental pode ter influenciado sobre nossos resultados.

No contraste da imobilidade relativa das fêmeas entre grupos, o desempenho das fêmeas na fase púber (4 semanas) pode ser visualizado na Figura 12.

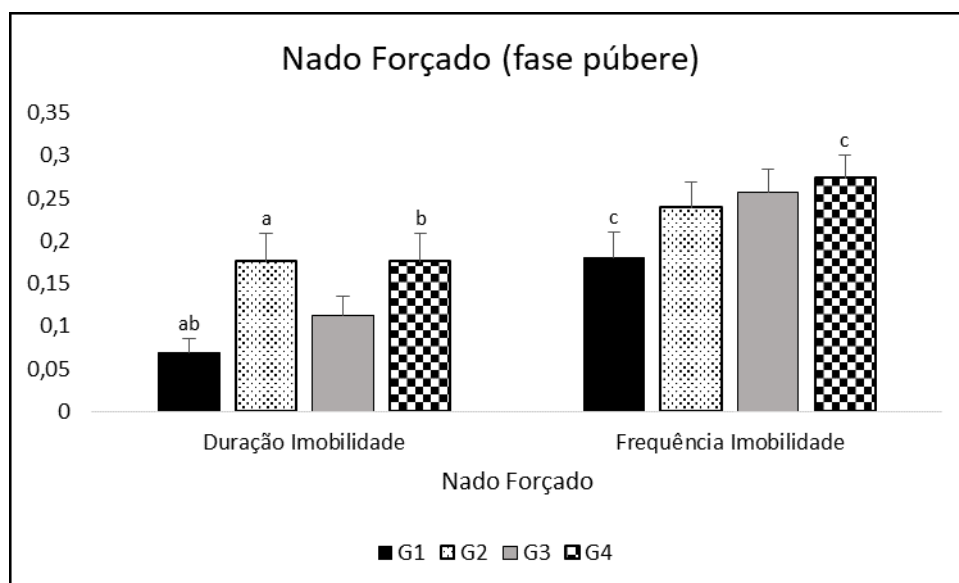


Figura 12. Resultados de duração e frequência de imobilidade no teste de emocionalidade Nado Forçado na fase púber. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Vale ressaltar que no momento do teste NF, apenas as fêmeas do grupo 1 e 3 estavam expostas ao EA. Observa-se que as fêmeas do grupo 1 permaneceram menos tempo imóveis do que as fêmeas do grupo 2 ($p=0,0061$) e 4 ($p=0,0058$). Além disso, as fêmeas do grupo 1 apresentaram menor frequência de imobilidade do que as fêmeas do grupo 4 ($p=0,0217$).

A puberdade é um período crítico de desenvolvimento dos animais, já que é caracterizado por aumento das interações sociais, respostas a estressores (SPEAR, 2000) e rearranjos neuroanatômicos (CLOUGH, RODRIGUEZ-SIERRA, 1983; ZEHR et al., 2006). Embora as diferenças hormonais tenham sua contribuição, sua influência sobre a depressão é mínima quando comparada com experiências sociais negativas (BROOKS-GUNN, EARREN, 1989). Por exemplo, em estudo, Sheperd e colaboradores (2018) mostraram que uma separação mínima de 24 horas dos filhotes de suas mães foi capaz de aumentar a imobilidade no teste NF em ratos adolescentes. Os animais avaliados nessa fase haviam sido desmamados da mãe há duas semanas e apenas os do grupo 1 e 3 foram expostos ao EA logo no dia do desmame. Embora não tenha sido significativo para o grupo 3, os animais dos grupos 1 e 3 apresentaram menor duração de imobilidade

do que os grupos não enriquecidos. Indicando possível influência do enriquecimento sobre a emocionalidade das fêmeas, mais precisamente na atenuação de comportamentos reflexo de traços tipo-depressivos.

O EA foi capaz de reduzir comportamentos tipo depressivos em roedores estressados (SHILPA et al., 2017; SEONG et al., 2018) e pode causar diversos benefícios ao cérebro, estimulando a neurogênese, melhorando o aprendizado e memória, reduzindo a ansiedade (como discutido anteriormente) e influenciando nos sistemas de neurotransmissores (VAN PRAAG, KEMPERMANN, GAGE, 2000; SIMPSON, KELLY, 2011; KEMPERMANN, 2019). Borba e colaboradores (2021) demonstraram que o EA exerceu um efeito semelhante a um antidepressivo em machos e fêmeas, na adolescência e idade adulta. Além disso, mostrou que as experiências no início de vida desses animais podem causar, além de alterações comportamentais, alterações epigenéticas influenciadas pelo sexo e fase de vida, e que o EA pode reverter a maioria dessas alterações.

Na Figura 13 estão apresentados os resultados de NF da fase reprodutiva (8 semanas de vida) contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4.

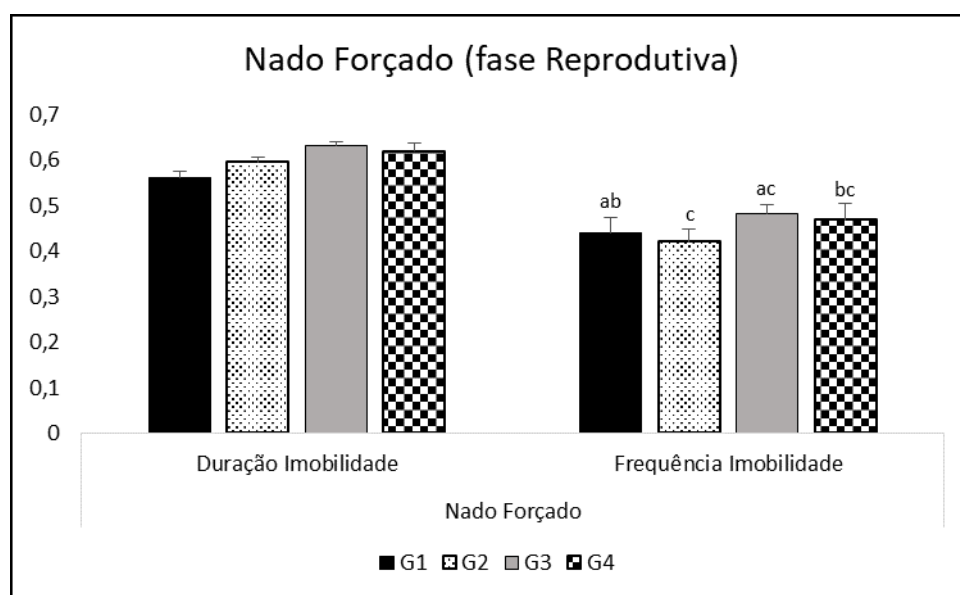


Figura 13. Resultados de duração e frequência de imobilidade no teste de emocionalidade Nado Forçado na fase reprodutiva. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Na realização do teste de Nado Forçado na fase reprodutiva, vale lembrar que apenas as fêmeas do grupo 1 estavam expostas ao EA; as fêmeas do grupo 3 já haviam

sido expostas ao EA apenas nas semanas 3 e 4 de vida. É possível observar que fêmeas do grupo 1 apresentaram menor duração (dados não significativos) e menor frequência de imobilidade do que as fêmeas dos grupos 3 ($p=0,0115$) e 4 ($p=0,0490$). Além disso as fêmeas do grupo 2 também apresentaram menor frequência de imobilidade do que as fêmeas do grupo 3 ($p=0,0078$) e 4 ($p=0,0217$). Os dados demonstram que as fêmeas que tiveram contato com EA no início da vida, mas posteriormente foram privadas dessa condição, apresentaram maior frequência de imobilidade do que as fêmeas que ainda estão com o EA e daquelas que nunca tiveram contato com o enriquecimento. Este resultado reforça que benefícios do EA, como os efeitos antidepressivos, são perdidos com a interrupção da exposição as novidades, inclusive, estudos mostraram que além do desenvolvimento de emoções negativas, pode aumentar comportamentos indesejados, como o vício em drogas (NADER et al., 2012).

Na Figura 14 estão apresentados os resultados de NF da fase materna (12 semanas de vida), contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 5.

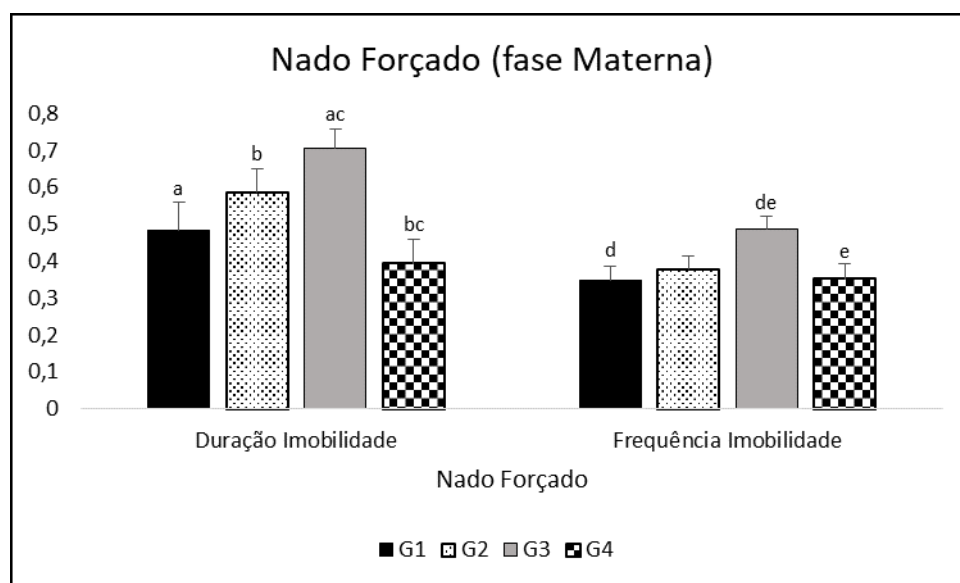


Figura 14. Resultados de duração e frequência de imobilidade no teste de emocionalidade Nado Forçado na fase materna. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

As fêmeas do grupo 1 e 4 estavam expostas ao EA no momento da realização do teste de NF na fase materna, em que para as fêmeas do grupo 4, o objeto era novidade, enquanto que o EA estava sendo oferecido continuamente para as fêmeas do grupo 1; as fêmeas do grupo 3 já haviam sido expostas ao EA apenas na semana 3 e 4 de vida. A

análise dos dados revela que as fêmeas do grupo 4, apresentaram menor tempo de imobilidade do que as fêmeas do grupo 2 e 3 ($p=0,0367$ e $p=0,0006$, respectivamente).

Como mencionado anteriormente, algumas linhagens de camundongos podem ser mais sensíveis a alterações de diversas naturezas e responder com comportamentos tipo depressivos frente ao teste NF. A linhagem utilizada neste trabalho já mostrou traços tipo-depressivos em outros estudos do grupo quando comparada à outra linhagem (dados não publicados). Os dados que obtivemos referentes às fêmeas enriquecidas na fase materna (grupos 1 e 4) corroboram a sugestão de que a ausência de comportamento tipo-depressivo pós-parto teve relação com a presença de algum componente ambiental: nesse caso, o enriquecimento ambiental.

Na Figura 15 estão apresentados os resultados de NF da fase pós-desmame (15 semanas de vida) contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4.

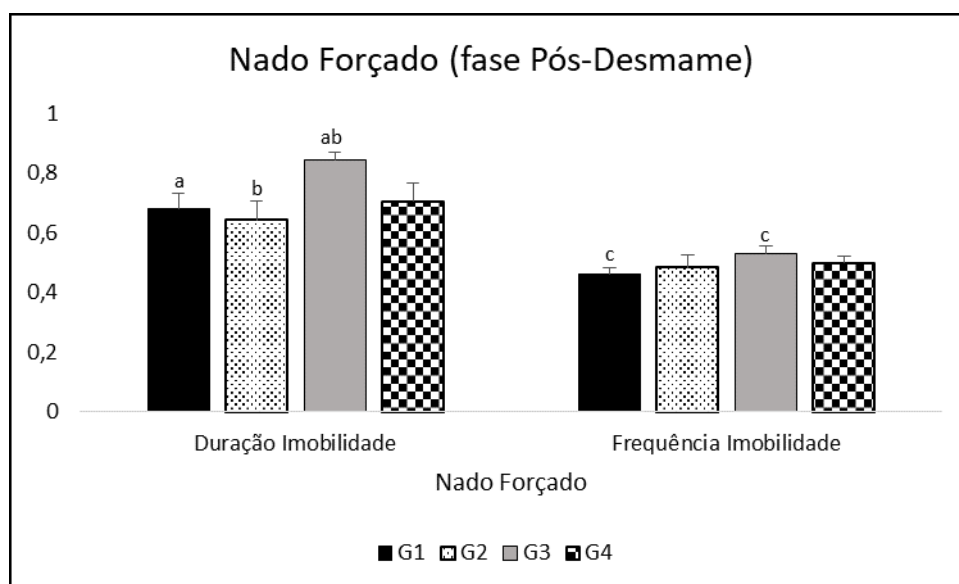


Figura 15. Resultados de duração e frequência de imobilidade no teste de emocionalidade Nado Forçado na fase pós-desmame. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Na realização do teste de NF na fase pós-desmame, nenhuma das fêmeas estava em contato com o EA. Apenas as fêmeas dos grupos 1, 3 e 4 tiveram contato com o rolo de papelão nas fases de vida pré-estabelecidas. Observa-se que as fêmeas do grupo 3 apresentaram maior tempo de imobilidade do que as fêmeas dos grupos 1 ($p=0,0073$) e 2 ($p=0,0078$). Já as fêmeas do grupo 1 apresentaram menor frequência de imobilidade do que as fêmeas do grupo 3 ($p=0,0320$). As fêmeas do grupo 3 também apresentaram

comportamentos tipo-depressivos na fase materna (ver Figura 15), quando comparadas às fêmeas do grupo 1 ($p=0,0233$ e $p=0,0342$, respectivamente) e do grupo 4 ($p=0,0391$). Este resultado reforça as ideias discutidas anteriormente. Como as fêmeas do grupo 3 apresentaram maior imobilidade, infere-se que apresentaram mais comportamentos tipo-depressivo do que as fêmeas dos outros grupos. Os efeitos do estresse em ratos adultos são geralmente transitórios (PAVIDLES, NIVÓN, MCEWEN; 2002), mas no caso de estresse no início da vida, evocado por exemplo pelo manejo diário e separações maternas, podem causar alterações neuroendócrinas e causar reflexos na vida adulta incluindo depressão e transtornos de estresse pós-traumático (CUI et al., 2006).

Dessa forma, nossos dados sugerem que a exposição do EA na puberdade parece ter auxiliado as fêmeas a lidar com o estresse do desmame. Contudo, interromper o uso do enriquecimento gerou impactos negativos sobre a emocionalidade desses animais, que refletiram na emocionalidade da idade adulta. Em suma, a depressão é uma resposta comportamental que parece estar mais evidente nas fases de vida mais tardias. O EA parece ter efeitos antidepressivos. No entanto, a descontinuidade do EA na adolescência tem impactos negativos até a fase adulta dos camundongos.

4.2.2 Cuidado materno

O cuidado materno é uma característica complexa desempenhada pela fêmea e está relacionado a comportamentos nas fases, pré-gestacional, gestacional e pós-parto (PERIPATO; CHEVERUD, 2002). Neste estudo, os dados de cuidado materno coletados foram contrastados entre os grupos e intragrupo. Os resultados estão separados entre dados de comportamento materno e de teste de recuperação dos filhotes. Vale ressaltar que as fêmeas caracterizadas como “boas mães” foram aquelas que mantiveram vivo pelo menos um dos filhotes nascidos.

4.2.2.1 Comportamento materno

O comportamento materno foi avaliado na fase materna das fêmeas dos grupos 1, 2, 3 e 4 e contrastados entre eles. Vale ressaltar que, no momento da avaliação, apenas as fêmeas do grupo 1 e 4 estavam expostas ao EA, sendo que para as fêmeas do grupo 4, o objeto era novidade, enquanto o EA estava sendo oferecido continuamente para as fêmeas do grupo 1. Os comportamentos avaliados foram: tamanho de ninhada,

aspectos da construção de ninho/temperatura do ninho, peso dos filhotes (oferta de leite pelas mães), placentofagia e agressividade contra intrusos.

Na Figura 16 estão apresentados os resultados de tamanho de ninhada contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4; esses dados foram verificados no dia do parto (tamanho de ninhada ao nascimento) e no sétimo dia pós-parto (tamanho de ninhada viável, pois a perda de filhotes geralmente ocorre nos primeiros dias de vida).

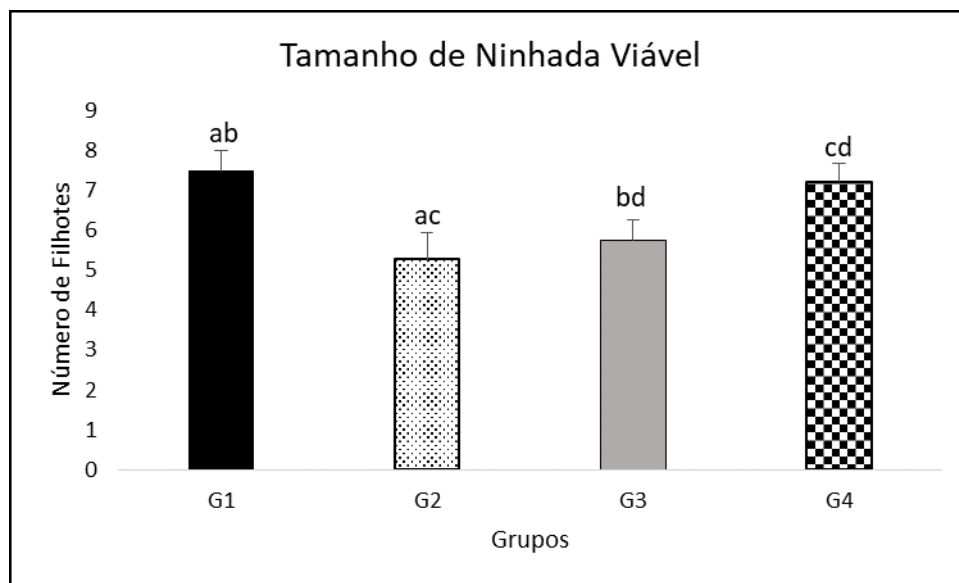


Figura 16. Resultados do tamanho de ninhada ao nascimento e tamanho de ninhada viável das fêmeas classificadas como boas mães. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Observa-se que as diferenças significativas encontradas foram entre os dados de tamanho de ninhada viável (ou seja, quantos filhotes sobreviveram). Nesse caso, as fêmeas que estavam enriquecidas, grupo 1 (EA-contínuo) e 4 (EA- fase materna) apresentaram, significativamente, maior tamanho de ninhada viável do que as fêmeas que não estavam enriquecidas nessa fase (grupo 2 e 3, $p < 0,05$).

O enriquecimento ambiental parece ter influenciado na sobrevivência dos filhotes. No entanto, apenas a presença do material no ambiente não é o suficiente, as discussões posteriores serão em torno dos efeitos do enriquecimento em diversas características que podem ter culminado na sobrevivência dos filhotes. Por exemplo, o desempenho da mãe em manter seus filhotes vivos depende de fatores diretos e indiretamente ligados à prole. No caso daqueles relacionados à mãe, nota-se a capacidade de reconhecer os filhotes (NOIROT, 1972); a aprendizagem e memorização,

avaliada em diversos estudos comparando fêmeas primíparas e multíparas (SEEGAL, DENENBERG, 1974; DWYER, LAWRENCE, 2000; GUARDINI et al., 2015) e a emocionalidade das fêmeas, incluindo estudos sobre ansiedade, depressão e medo (MAYER, ROSENBLATT, 1987; BRUNNER et al, 1999). Há também os comportamentos diretamente ligados à prole, que envolvem a disponibilidade de leite (MCLEAN, SPEAKMAN, 1997; GOÉS, SAUCE, PERIPATO, 2012) e construção de ninhos por exemplo (BULT, LYNCH, 1997).

Na Figura 17 estão apresentados os resultados de altura do ninho contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4; esses dados foram verificados durante os sete dias pós-parto.

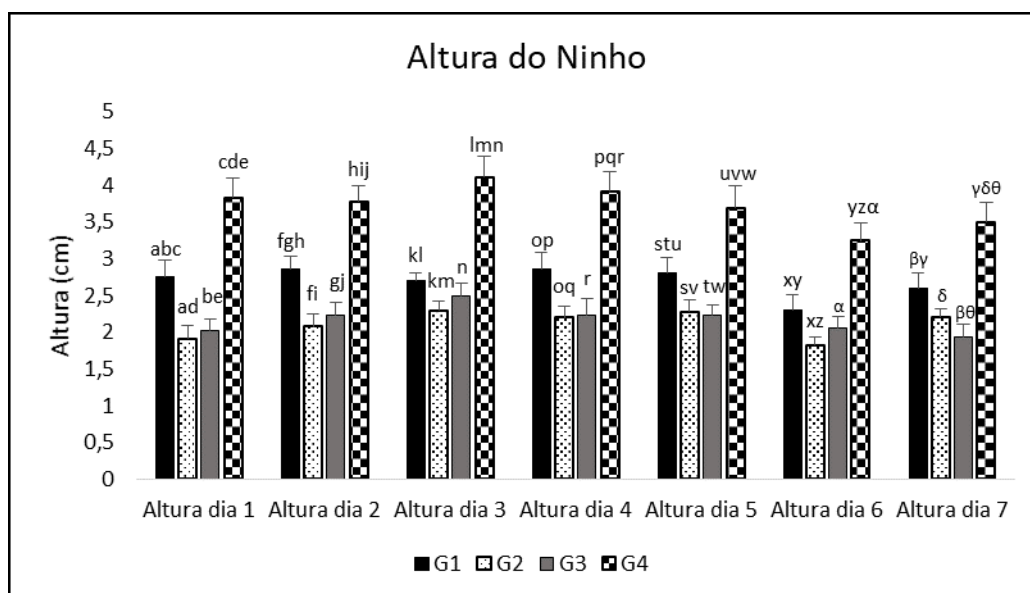


Figura 17. Resultados referentes à altura do ninho das fêmeas analisadas. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

É possível observar que os ninhos das fêmeas do grupo 4 foram mais altos do que as fêmeas dos grupos 1, 2 e 3 ($p < 0,05$) em todos os dias avaliados. Já as fêmeas do grupo 1 apresentaram ninhos mais altos do que as fêmeas do grupo 2 e 3 ($p < 0,05$) nos dias 1, 2 e 4. Nos dias 3, 4, 5 e 6 os ninhos das fêmeas do grupo 1 foram mais altos do que as fêmeas do grupo 2 ($p = 0,0158$, $p = 0,0183$, $p = 0,0248$ e $p = 0,0356$, respectivamente); no dia 7 os ninhos das fêmeas do grupo 1 foram mais altos do que os das fêmeas do grupo 3 ($p = 0,0211$).

Tanto camundongos machos, quanto fêmeas adultas, constroem ninhos, cujas as principais vantagens são: ser um local para repouso e potencializarem a termorregulação (LYNCH, POSSIDENTE JR, 1978; WEBER, OLSSON, 2008). Em ambiente natural, os ninhos são construídos utilizando materiais como pelos, gramas e outras plantas (LISK et al., 1969; ALCOCK, 2001) e em laboratório, são construídos com os materiais de nidificação oferecidos. Os ninhos também protegem contra possíveis predadores e, no caso de ambiente laboratorial, os protegem contra coespecíficos agressivos e também fornecem abrigo contra superexposição à luz (VAN DE WEERD, 1997). As fêmeas também constroem o ninho para receber seus filhotes, já que nos primeiros dias de vida, os filhotes necessitam do auxílio da mãe inclusive para a manutenção da temperatura corporal, já que em ambientes de temperaturas baixas eles logo ficam comatosos, param de vocalizar e em casos extremos param de respirar (NOIROT, 1972). Dessa forma, o ninho da fase materna apresenta outras funções, como proteção dos filhotes contra predadores e manutenção da temperatura (WEBER, OLSSON, 2008). Além disso, mantém os filhotes agrupados facilitando o cuidado materno (FLEMING, O'DAY, KRAEMER, 1999) e otimiza o intercâmbio de água corporal dos filhotes (FRIEDMAN, BRUNO, 1976). A construção do ninho nessa fase também pode variar conforme as influências hormonais, principalmente da progesterona, que influenciam na variação de tamanho do ninho (aumenta na fase gestacional e diminui gradualmente após o nascimento dos filhotes (BROIDA, SVARE, 1982) com principal objetivo de preparar as melhores condições para a prole (LISK et al., 1969).

Estudos com camundongos e ratos de laboratório mostraram que o uso de materiais para construção de ninhos reduziu a mortalidade dos filhotes pré-desmame e também aumentou o número de ninhadas (PORTER, LANE-PETTER, 1965; NOLEN, ALEXANDER, 1966). Dessa forma, a ideia de que o enriquecimento teve influência na sobrevivência dos filhotes é reforçada. Nos resultados observados durante o trabalho, as fêmeas também apresentaram diferentes formas de utilização do rolo de papelão para construir seus ninhos e essas diferenças podem estar associadas com a fase de vida em que foram expostas ao EA. Essas observações são apresentadas nas Figuras 18 e 19, e também podem explicar as diferenças encontradas nas alturas dos ninhos do grupo 1 e 4.



Figura 18. Tipos de ninhos avaliados: (A) ninho aberto construído sem a utilização do EA, apenas com a maravalha disponível. (B) ninho fechado construído com a utilização do EA (rasgado). (C) ninho aberto construído com a utilização do EA (rasgado).



Figura 19. (A, B e C) ninhos construídos com a utilização do EA sem que estivesse totalmente rasgado. Esse tipo de ninho foi apresentado apenas por fêmeas do grupo 4.

Como pode ser observado na Figuras 19, as fêmeas do grupo 4 manipularam de forma diferente o material de nidificação disponível, nesse caso, foi o único grupo que utilizou a estrutura do rolo de papelão como parte do ninho e não totalmente roído como no caso dos outros grupos (Figura 18). Dessa forma, os ninhos das fêmeas do grupo 4 foram mais altos inclusive do que os ninhos das fêmeas do grupo 1 que também estavam enriquecidas.

Além da utilização do EA para construção de ninho pela mães, foi observado que o rolo de papelão, dependendo da fase, foi utilizado de diferentes formas (Figura 20).

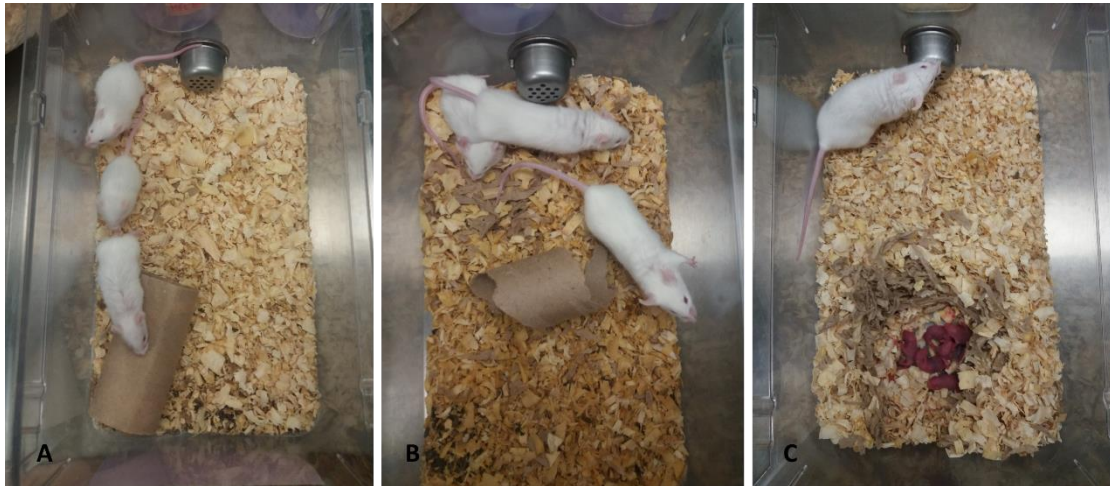


Figura 20. Diferentes métodos de utilização do enriquecimento e fases de vida.

Observa-se que a utilização do rolo de papelão pelas fêmeas púberes (Figura 20.A) envolvia abrigo/proteção e atividades exploratórias como subir na estrutura do objeto e passar pelo “túnel”; as fêmeas adultas virgens utilizaram parcialmente como abrigo/proteção e como ninhos (Figura 20.B) e as fêmeas em fase materna utilizaram o rolo de papelão essencialmente como material para construção de seus ninhos (Figura 20.C). Isto também mostra sobre a versatilidade do enriquecimento escolhido, já que o mesmo pode ser utilizado de diferentes maneiras: como refúgio, abrigo para as condições de luminosidade, permite exploração como escalar o tubo, se locomoverem por dentro e além disso, permite ser roído/rasgado para a construção de ninhos mais estruturados. Dessa forma, estes dados podem embasar novos estudos na área (ROSA; MASUKI: PERIPATO, submetido).

Na Figura 21 estão apresentados os resultados de temperatura do ninho contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4; esses dados foram coletados no segundo (D2), quarto (D4) e sexto (D6) dia pós-parto.

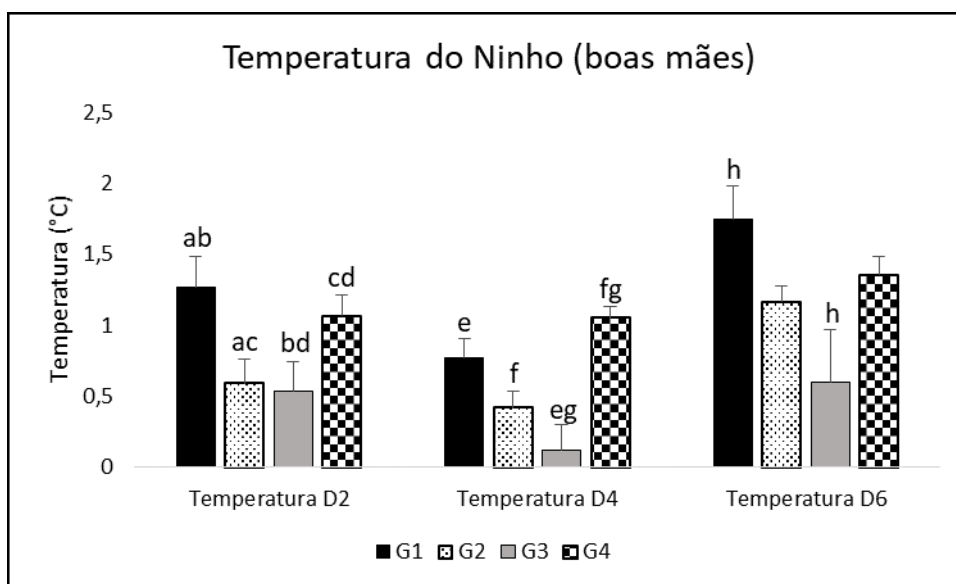


Figura 21. Resultados referentes à temperatura do ninho das fêmeas classificadas como boas mães. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna). E D2, D4, e D6 significam respectivamente: dia 2, dia 4 e dia 6 pós-parto.

Observa-se que no segundo dia pós-parto a temperatura dos ninhos das fêmeas enriquecidas (grupos 1 e 4) foi maior do que àqueles das fêmeas não enriquecidas neste momento (grupos 2 e 3, $p < 0,05$). Já no quarto dia pós-parto a temperatura dos ninhos das fêmeas enriquecidas foi maior do que a de ninhos das fêmeas do grupo 3 ($p = 0,0104$ para contraste com grupo 1 e $p < 0,0001$ para contraste com grupo 4). Neste mesmo dia, as fêmeas do grupo 5 também apresentaram ninhos mais quentes do que o de fêmeas do grupo 2 ($p = 0,0001$). No sexto dia pós-parto a temperatura dos ninhos das fêmeas do grupo 1 foi maior do que o das fêmeas do grupo 3 ($p = 0,0128$).

A construção de ninhos, de fato, é de suma importância para a sobrevivência dos filhotes, e já foi positivamente correlacionada com o número de filhotes nascidos e desmamados (LYNCH, POSSIDENTE JR, 1978; BULT, LYNCH, 1997). A manutenção da temperatura corporal dos filhotes é fundamental, pois os camundongos nascem ectotérmicos e apresentam baixas habilidades termorregulatórias até 2 a 3 semanas de idade (LYNCH, POSSIDENTE JR, 1978). Dessa forma, ninhos com temperaturas mais altas nessas primeiras semanas de vida dos filhotes são fundamentais para a diminuição da mortalidade pré-desmame dos mesmos. Nossos resultados sugerem que a utilização do EA para a construção de ninhos foi importante para estruturação de ninhos termorregulatórios. O tamanho de ninhada maior dos grupos

enriquecidos também pode ter influenciado na temperatura do ninho. Além disso, embora o ninho influencie diretamente a sobrevivência e bem-estar dos filhotes, a possibilidade de satisfazer a motivação para construir o ninho também afeta diretamente o bem-estar das fêmeas (WEBER, OLSSON, 2008).

Do mais, devido ao fato de não serem encontradas diferenças significativas entre os grupos 1 e 4 (enriquecidos), a diferença de manipulação do EA não parece não ter influência sobre a temperatura dos ninhos. De fato, a construção de ninhos aumenta o sucesso reprodutivo e é uma ferramenta termorregulatória essencial (BULT, LYNCH, 1997). A emocionalidade dos animais também influencia na construção dos ninhos, por exemplo, animais ansiosos parecem apresentar redução ou ausência na construção dos mesmos (KALUEFF, 2006; BELFORTE, 2010; JIRKOF, 2014). Segundo nossos dados e os aspectos discutidos até o momento, o EA parece influenciar em diversas características emocionais e comportamentais dos animais. E essas ainda estão interligadas de forma que o bem-estar gerado pela introdução do enriquecimento na fase materna atua realçando as propriedades ansiolíticas e antidepressivas dessa fase que por sua vez, também impactam sobre os ninhos e o sucesso reprodutivo.

Na Figura 22 estão apresentados os resultados de pesagem diária dos filhotes contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4; esses dados foram verificados durante os sete dias pós-parto.

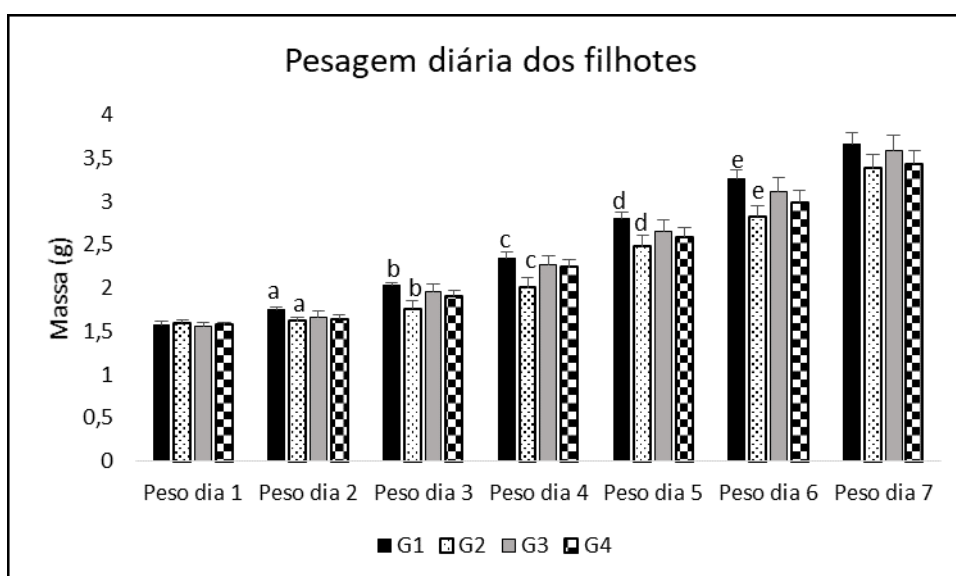


Figura 22. Resultados referentes à pesagem diária dos filhotes. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

É possível observar que os filhotes das fêmeas do grupo 1 foram mais pesados nos dias 2 ($p=0,0039$), 3 ($p=0,0100$), 4 ($p=0,0078$), 5 ($p=0,0413$) e 6 ($p=0,0650$) pós-parto. Os resultados encontrados sobre o peso dos filhotes podem indicar que, ao nascimento, o tamanho dos filhotes é semelhante, mas a partir do segundo dia pós parto os filhotes de fêmeas G1 enriquecidas se apresentaram mais pesados do que os do G2. Um ponto a ser considerado é a oferta de leite, fonte de energia que contém componentes essenciais para a nutrição e crescimento dos filhotes (SILVER, 1995). A presença de leite no estômago dos filhotes (Figura 23) permite verificar a oferta de leite pela mãe.



Figura 23. Observa-se, na região destacada, o leite no estômago do filhote.

Embora os filhotes dos grupos 3 e 4 (fêmeas dos grupos que foram enriquecidas nas fases púber e materna, respectivamente) tenham se apresentado um pouco maiores do que os filhotes do grupo 2, todos os animais viáveis foram amamentados, assim não foram encontradas diferenças significativas em relação ao peso e a oferta de leite. Contudo, já foi observado que mães enriquecidas se envolvem em amamentação de forma mais ativa (SPARLING; BARBEAU; BOILEAU; KONKLE, 2020).

Também foram coletados e analisados alguns dados qualitativos (categóricos binários tipo sim/não) sobre o cuidado materno, envolvendo as variáveis placentogia e agressividade contra intrusos.

A placentofagia foi verificada, pela ingestão da placenta pela fêmea, na ocasião do parto. Os resultados significativos mostraram que menos fêmeas do grupo 3 apresentaram placentofagia do que as fêmeas dos grupo 1 ($p=0,0407$) e grupo 2 ($p=0,0079$). A placentofagia pode ser definida como o comportamento de comer o cordão umbilical, as membranas amnióticas e coriônicas, e os fluidos amnióticos. É um comportamento encontrado em diversos grupos de mamíferos, mas ainda não está evidentemente claro se há uma vantagem ou múltiplos benefícios pela ingestão da placenta (KRISTAL, 1980). Existem algumas hipóteses das vantagens da placentofagia como, por exemplo, limpar o local do ninho para evitar ataques de predadores ou para nutrir as fêmeas pós-parto (KRISTAL, 1980; JOHNSON, 2019), no entanto, os benefícios desse comportamento são específicos para o grupo de animais que esteja em estudo.

No comportamento relativo a agressividade contra o manuseador da gaiola dos animais (pesquisadores) durante os sete dias pós-parto, verificamos que as fêmeas do grupo 4 apresentaram-se significativamente mais agressivas do que as fêmeas dos grupo 2 ($p=0,0016$) e grupo 3 ($p=0,0255$). Depois, também foi verificado se havia diferença significativa na agressividade no primeiro dia pós-parto e nesse caso, as fêmeas do grupo 4 também se apresentaram mais agressivas do que as fêmeas do grupo 2 ($p=0,0020$). O termo agressão materna refere-se àquelas fêmeas lactantes que demonstram comportamento agressivo frente a fatores hostis, visando defender a ninhada (WEBER, OLSSON, 2008). Em ambiente natural, uma das maiores ameaças para roedores neonatos são machos coespecíficos (OSTERMEYER, 1981). Uma das grandes vantagens para machos infanticidas em matarem filhotes sem parentesco é que a fêmea retorne seu ciclo estral normal permitindo uma oportunidade de acasalamento mais rápida e aumentando suas chances de reprodução (HRDY, 1979). Da mesma forma, as fêmeas protegem seus filhotes e conseqüentemente todo o investimento e gasto energético que elas já tiveram e garantem seu sucesso reprodutivo (OSTERMEYER, 1981). À vista disso, as fêmeas do grupo 4 (enriquecido na fase materna) parecem proteger mais seus filhotes do que as fêmeas que não estavam expostas ao EA nessa fase.

De maneira geral, a presença de enriquecimento ambiental do tipo físico parece auxiliar no desempenho do cuidado materno das fêmeas LG/J, corroborando estudos que avaliaram comportamentos de cuidado materno frente à exposição de enriquecimentos do tipo físico e social e avaliaram tendência positiva do uso de EA para aumento dos cuidados maternos (SPARLING, BARBEAU, BOILEAU, KONKLE 2020). Ademais, nossos resultados permitem inferir que a importância da exposição de fêmeas em fase materna não está apenas na melhoria de aspectos isolados do cuidado materno, como construir ninhos maiores, mas também, na melhora do bem-estar dessas fêmeas para que o desempenho desses comportamentos seja positivamente acentuado.

4.2.2.2 Teste de Recuperação dos Filhotes (RF)

Os testes de recuperação de filhotes foram realizados nos dias 3 (TR1) e 7 (TR2) pós-parto. Esse teste permite avaliar o comportamento materno de proteção contra intrusos, pelo qual a fêmea promove a segurança dos filhotes agrupando-os no ninho (WEBER, OLSSON, 2008). A diferença entre esse teste e a análise de agressividade contra intrusos é que o primeiro foi realizado pela filmagem da interação da mãe com os filhotes por seis minutos, e o segundo, relatado anteriormente na sessão “Comportamento Materno,” foi apenas o relato de esquiva ou não da mãe no manuseio dos filhotes pela pesquisadora. No teste RF, as análises foram diferenciadas em comportamentos relacionados à mãe (*self grooming*) e comportamentos de interação mãe-filhotes (*licking*, *nursing* e tempo de resgate da ninhada).

Na Figura 24 e 25 estão apresentados os resultados de duração e frequência de *self-grooming*, respectivamente, contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4.

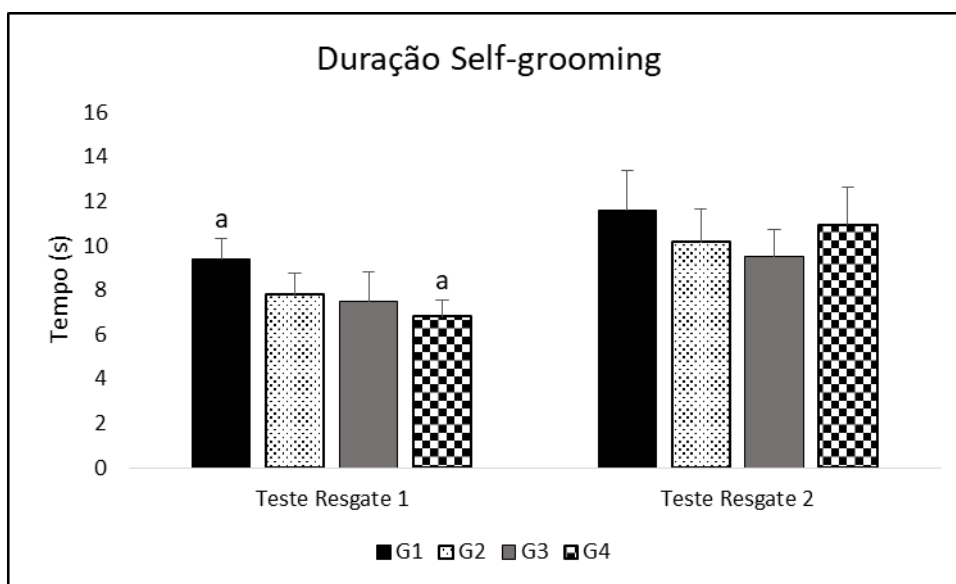


Figura 24. Resultados de duração de self-grooming coletados do primeiro e segundo Teste de Recuperação dos Filhotes. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

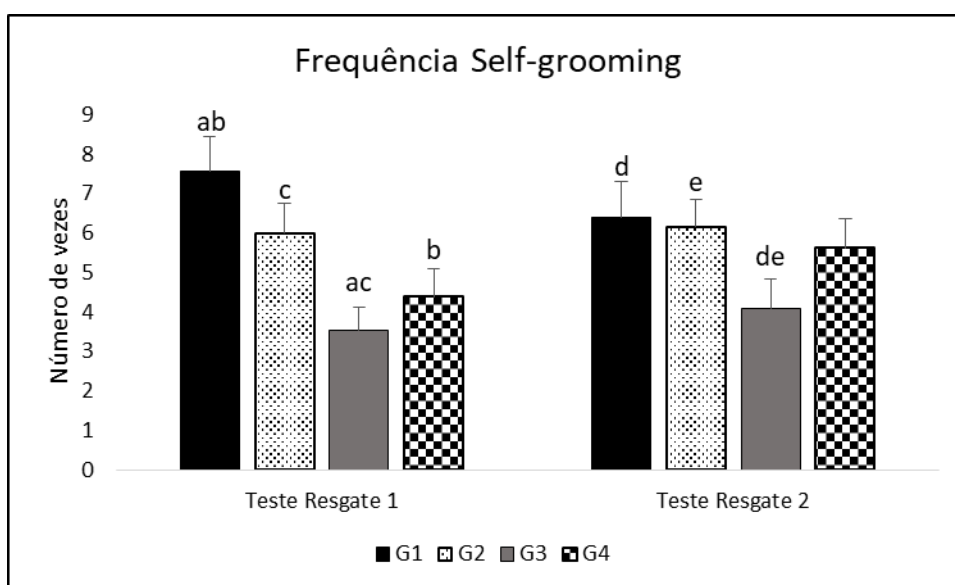


Figura 25. Resultados de frequência de self-grooming coletados do primeiro e segundo Teste de Recuperação dos Filhotes. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Quanto à duração do *self-grooming*, observa-se que as fêmeas do grupo 1 permaneceram mais tempo se autolimpando do que as fêmeas do grupo 4 ($p=0,0292$) no TR1. Porém, as fêmeas do grupo 1 permaneceram mais vezes realizando o *self-grooming* do que as fêmeas do grupo 3 e 4 ($p=0,0007$ e $p=0,0069$, respectivamente) no

TR1; ainda, as fêmeas do grupo 2 também apresentaram maior frequência deste comportamento do que as fêmeas do grupo 3 ($p=0,0160$). No TR2, as fêmeas do grupo 3 apresentaram menor frequência de *self-grooming* do que as fêmeas dos grupo 1 e 2 ($p=0,0437$ e $p=0,0147$, respectivamente). Também foi comparado o tempo de desempenho do *self-grooming* do primeiro teste de recuperação com o segundo teste. Embora tenha se mantido o padrão entre as fêmeas dos diferentes grupos, em que elas aumentaram o tempo desse comportamento no TR2, apenas os resultados do grupo 4 foram significativos ($p=0,0004$).

O *self-grooming* é um comportamento inato e uma parte importante, complexa e ordenada, do conjunto comportamental de roedores (BERRIDGE, FENTRESS, PARR, 1987; ALDRIDGE, BERRIDGE, 1998). Neles, essa ação é particularmente sensível ao estresse e pode aumentar em duas situações opostas: em baixos ou altos níveis de estresse (KALUEFF, TUOHIMAA, 2004a). No primeiro caso, o *comfort grooming* é um ritual de cuidado corporal normal que ocorre, geralmente, na transição do descanso para a atividade (FENTRESS, 1977). Já em altos níveis de estresse, esse comportamento difere do habitual por se apresentar em atividades frequentes de escovação rápida, de curta duração, progressão anormal e episódios incompletos/interrompidos (FENTRESS, 1977), indicando também pela ligação entre os sistemas GABAérgico, ansiedade e *self-grooming* (KALLUEFF, TUOHIMAA 2005). A microestrutura que organiza o desenvolvimento do *self-grooming* é bastante complexa para ser compreendida apenas com os dados do RF, no entanto, os dados de duração e frequência, em conjunto, indicam que as fêmeas que haviam acabado de ser expostas ao enriquecimento (grupo 4) permaneceram menor tempo e menos vezes se limpando do que aquelas que não foram enriquecidas (grupo 2) ou já estavam habituadas ao EA (grupo 1). Os longos períodos desempenhando a autolimpeza e diversos interrompimentos podem estar associados à respostas ansiosas (KALUEFF, TUOHIMAA, 2004b) reforçando que as fêmeas enriquecidas na fase materna responderam de forma menos ansiosa do que as outras. Nessa fase, as fêmeas do grupo 3 (enriquecidas apenas na fase púbere) apresentaram-se mais ansiosas do que as do grupo 4, no entanto, os resultados de *self-grooming* são divergentes e indicariam baixos níveis de ansiedade. Contudo, a diferença encontrada pode ser devido ao tempo que essas fêmeas despenderam com a lambadura dos filhotes, o que será discutido posteriormente.

Na interação mãe-filhote, verificamos na Figura 26 a duração de *licking*, *nursing* e resgate, contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4.

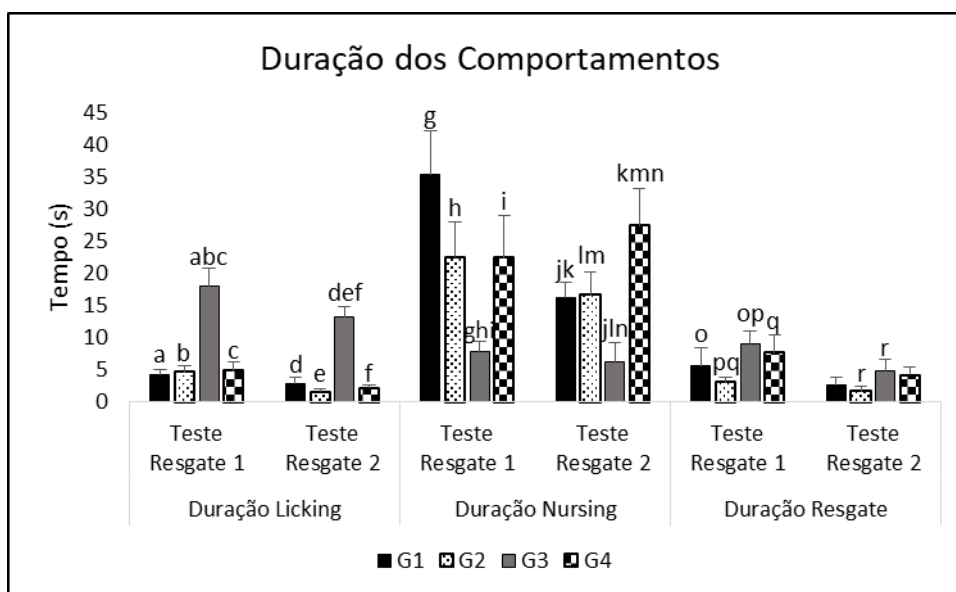


Figura 26. Resultados de duração de *licking*, *nursing*, e resgate coletados do primeiro e segundo Teste de Recuperação dos Filhotes. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Observa-se que em relação aos dados de *licking*, as fêmeas do grupo 3 se sobressaem às fêmeas dos grupo 1, 2 e 4, apresentando maior tempo de realização deste comportamento no TR1 ($p < 0,0001$ para grupo 1, $p < 0,0001$ para grupo 2 e $p < 0,0001$ para grupo 4) e no TR2 ($p < 0,0001$ para grupo 1, $p < 0,0001$ para grupo 2 e $p < 0,0001$ para grupo 4). No entanto, as fêmeas do grupo 3 apresentam menor tempo de *nursing* do que as fêmeas do grupo 1 ($p = 0,0008$), 2 ($p = 0,0232$) e 4 ($p < 0,0001$) no TR1. No TR2 o mesmo resultado é encontrado para as fêmeas do grupo 3 ($p = 0,0010$ para grupo 1, $p = 0,0006$ para grupo 2 e $p < 0,0001$ para grupo 4), e também, as fêmeas do grupo 4 se sobressaíram apresentando maior tempo de *nursing* do que as fêmeas dos outros grupos ($p = 0,0259$ para grupo 1, $p = 0,0401$ para grupo 2 e $p < 0,0001$ para grupo 3).

Na duração de resgate, ou seja, tempo em que as fêmeas permaneceram carregando os filhotes pelo ambiente, as fêmeas do grupo 3 se sobressaíram do que as fêmeas dos grupos 1 ($p = 0,0273$) e 2 ($p = 0,0011$) no TR1 e do que as fêmeas do grupo 2 ($p = 0,0393$) no TR2. Ainda no TR1, as fêmeas do grupo 4 permaneceram mais tempo resgatando os filhotes do que as fêmeas do grupo 2 ($p = 0,0214$).

Na Figura 27 estão apresentados os resultados de frequência de *licking*, *nursing* e resgate contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4.

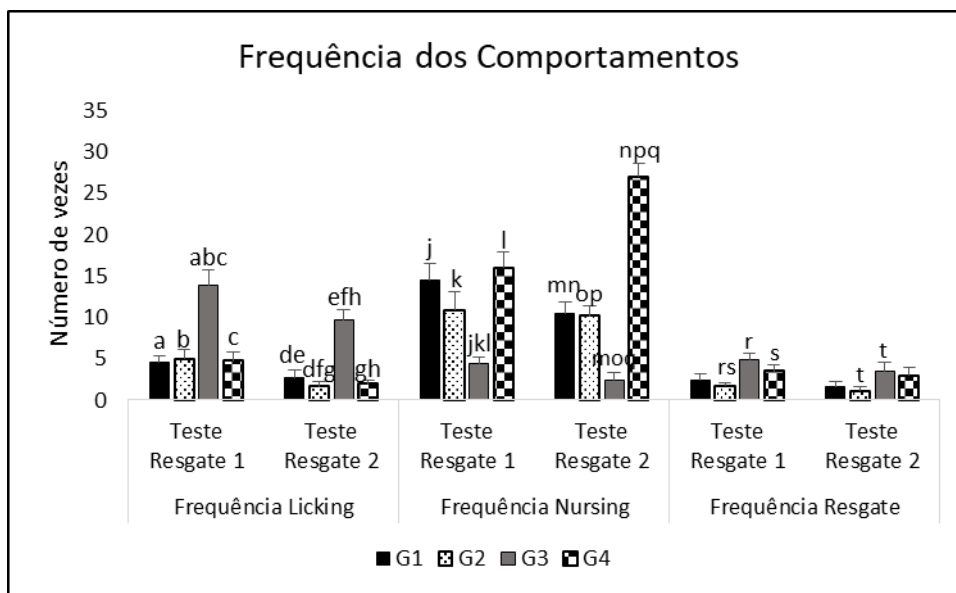


Figura 27. Resultados de frequência de *licking*, *nursing*, e resgate coletados do primeiro e segundo Teste de Recuperação dos Filhotes. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Observa-se que, em relação aos dados de *licking*, as fêmeas do grupo 3 se diferenciam na frequência deste comportamento em relação a fêmeas dos grupo 1, 2 e 4 no TR1 ($p < 0,0001$ para grupo 1, $p = 0,0002$ para grupo 2 e $p = 0,0001$ para grupo 4) e no TR2 ($p < 0,0001$ para grupo 1, $p < 0,0001$ para grupo 2 e $p < 0,0001$ para grupo 4). Além disso, no TR2, as fêmeas grupo 1 ($p = 0,0492$) e 4 ($p = 0,0477$) realizaram mais vezes o *licking* do que as fêmeas do grupo 2. No entanto, as fêmeas do grupo 3 apresentam menor frequência de *nursing* do que as fêmeas do grupo 1 ($p = 0,0001$), 2 ($p = 0,0180$) e 4 ($p < 0,0001$) no TR1. No TR2 o mesmo resultado é encontrado para as fêmeas do grupo 3 ($p < 0,0001$ para grupo 1, $p < 0,0001$ para grupo 2 e $p < 0,0001$ para grupo 4), e também, as fêmeas do grupo 4 se sobressaíram apresentando maior frequência de *nursing* do que as fêmeas dos outros grupos ($p = 0,0465$ para grupo 1 e $p = 0,0285$ para grupo 2).

A frequência de resgate, ou seja, número de vezes em que as fêmeas carregaram os filhotes ao ninho, as fêmeas do grupo 3 se sobressaíram do que as fêmeas dos grupo 2 ($p = 0,0005$) TR1 e TR2 ($p = 0,0495$). No TR1 o grupo 4 também se sobressaíram do que as fêmeas dos grupo 2 ($p = 0,0085$).

Os dados dos testes de resgate 1 e 2 também foram comparados intragrupo a fim de verificar se havia mudança de comportamento entre os dois testes. Foi observado que as fêmeas do grupo 2 e 4 diminuíram significativamente a duração ($p=0,0425$ e $p=0,0003$, respectivamente) e frequência ($p=0,0469$ e $p=0,0112$, respectivamente) que desempenharam o *licking* nos filhotes quando comparados os TR1 e TR2. As fêmeas do grupo 4 também apresentaram aumento na duração do *self-grooming* ($p=0,0004$) no TR2.

A lambedura/*licking* em roedores, geralmente se inicia logo após o parto com o consumo da placenta, e pela limpeza de todo o corpo dos neonatos com ênfase na região anogenital. A lambedura dessa região é de extrema importância, pois estimula a micção dos filhotes que geralmente não urinam até completarem uma semana de vida (PERIPATO, CHEVERUD, 2002). Por outro lado, a lambedura é vantajosa para a mãe, pois ao consumir a urina dos filhotes, ela consegue recuperar parte da água perdida pela produção do leite e também elimina odores atrativos para predadores (FRIEDMAN, BRUNO, 1976). Além de processos fisiológicos, esse comportamento está associado com o desenvolvimento comportamental individual dos filhotes e de suas respostas ao estresse (FRANCIS et al., 1999; FISH et al., 2004). As fêmeas do G1 sempre expostas ao enriquecimento e G3 que foram expostas apenas na fase púbera parecem desempenhar mais esse comportamento do que as que nunca foram expostas ou expostas apenas na fase materna.

Além dos resultados encontrados entre os grupos analisados, foi possível observar que o desempenho deste comportamento diminui tanto em duração quanto em frequência nos dois testes de recuperação ($p=0,0425$ para duração e $p=0,0469$ para frequência de G2; e $p=0,0290$ para duração e $p=0,0112$ para frequência de G4), sugerindo que este comportamento se torna menos frequente com o amadurecimento dos filhotes.

Licking/grooming dos filhotes ocorrem mais frequentemente antes ou durante os períodos em que a mãe desempenha o *nursing* com as costas arqueadas (FRANCIS et al., 1999).

Nursing é outro comportamento diretamente associado aos filhotes. Em estudo do grupo, foi observado que as fêmeas LG/J não demonstravam em nenhum dos dias analisados esse comportamento (FORTI, 2012). No presente estudo as fêmeas apresentaram *nursing* em ambos os dias analisados e também foi possível encontrar diferenças entre os grupos. Esse comportamento está associado à postura de proteção e

amamentação dos filhotes, e apresenta etapas para seu desenvolvimento: de início a fêmea se posiciona sobre os filhotes ou parte deles enquanto ainda está envolvida com outros comportamentos, como *licking* e *self-grooming*; com estímulos ventrais dos filhotes, a fêmea passa para um estado de quiescência/repouso em que seus movimentos de membros e cabeça diminuem; por fim, com o contínuo estímulo ventral dos filhotes, alguns já grudados aos mamilos, o ventre da fêmea flexiona causando arqueamento da coluna e suas pernas se estendem para acomodar os filhotes (STERN, JOHNSON, 1990). As fêmeas do grupo 4 se sobressaíram no desempenho desse comportamento.

Também foi observado diminuição desse comportamento quando comparados a duração do *nursing* de ambos os testes. Nesse caso, os grupos G1 e G3 apresentaram diminuição significativa ($p=0,0155$ e $p=0,0342$, respectivamente).

Outro comportamento analisado foi o resgate dos filhotes que consiste em a fêmea pegar os filhotes deslocados com os incisivos, geralmente pela região do pescoço, carregá-los para outra posição e depositá-los; geralmente são colocados no ninho (STERN, JOHNSON, 1990). Esse comportamento tem a finalidade de realocar os filhotes no ninho ou para carregá-los a um novo local de ninho. A recuperação dos filhotes é desempenhada pela mãe de forma proativa, diferentemente do *nursing* que necessita de estímulos dos filhotes. No entanto, esses comportamentos estão associados, pois a fêmea necessita de carregar seus filhotes até o ninho, local seguro e aquecido, para que a amamentação ocorra de forma adequada (BROWN et al., 1999). A melhor postura protetora da mãe está associada ao maior tempo em que ela passa resgatando seus filhotes, porém, quanto maior a frequência de resgate, pior a postura, pois indica que a fêmea derrubou por diversas vezes o filhote (FORTI, 2012).

As fêmeas dos grupos 3 e 4 se sobressaíram tanto em tempo quanto em frequência de resgate. No entanto, é possível sugerir que as fêmeas do grupo 4 apresentaram melhor postura de proteção, pois, mesmo com ninhadas maiores (que poderia responder o aumento na frequência) essas fêmeas passaram mais tempo resgatando e apresentaram frequência de resgate menores do que as fêmeas do grupo 2 e grupo 3 (embora não significativo para o último caso).

Não foi encontrada diferença significativa entre o tempo e frequência de resgate dos filhotes quando comparados os valores intragrupo entre os dois testes realizados; indicando que o resgate é desempenhado da mesma forma pelas fêmeas, independente do amadurecimento dos filhotes.

Como já mencionado anteriormente, o cuidado materno depende de um conjunto de fatores neurológicos, endócrinos, anatômicos, fisiológicos, emocionais e comportamentais que precisam cooperar para culminarem no sucesso reprodutivo. De forma implícita, a falta ou pior desempenho em alguns desses fatores parecem estar associados ao insucesso das fêmeas. Por exemplo, fêmeas que apresentaram menor mortalidade dos filhotes até o desmame também se sobressaíram em realizar a placentofagia, limpeza, ofertaram leite, construíram melhores ninhos e protegeram a prole (PERIPATO, CHEVERUD, 2002).

Das fêmeas analisadas, aquelas do grupo 4 se apresentaram na fase materna menos ansiosas e com traços depressivos atenuados, também se sobressaíram na construção e manutenção da temperatura dos ninhos, bem como, apresentaram desempenho favorável durante o teste de recuperação dos filhotes. De fato, as mudanças neuroendócrinas que ocorrem pré e pós-gestacional são de extrema importância para a expressão de características específicas do cuidado materno de cada espécie; no entanto, um ambiente enriquecido pode influenciar positivamente no desempenho desses comportamentos.

4.2.2.3 Variáveis quantitativas relacionadas ao Enriquecimento Ambiental

Os dados avaliados nas fêmeas, do período pós-parto ao desmame (ganho em peso) e pós-eutanásia (pesagem de gorduras corporais) e, em seus filhotes (pesagem semana e ganho em peso, ambos até o desmame) foram contrastados entre os grupos estudados (G1, G2, G3 e G4).

Na Figura 28 estão apresentados os resultados do ganho de peso até o desmame das mães (fêmeas que compuseram os grupos) contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4; esses dados foram verificados pela diferença de peso entre a primeira e terceira semana de vida.

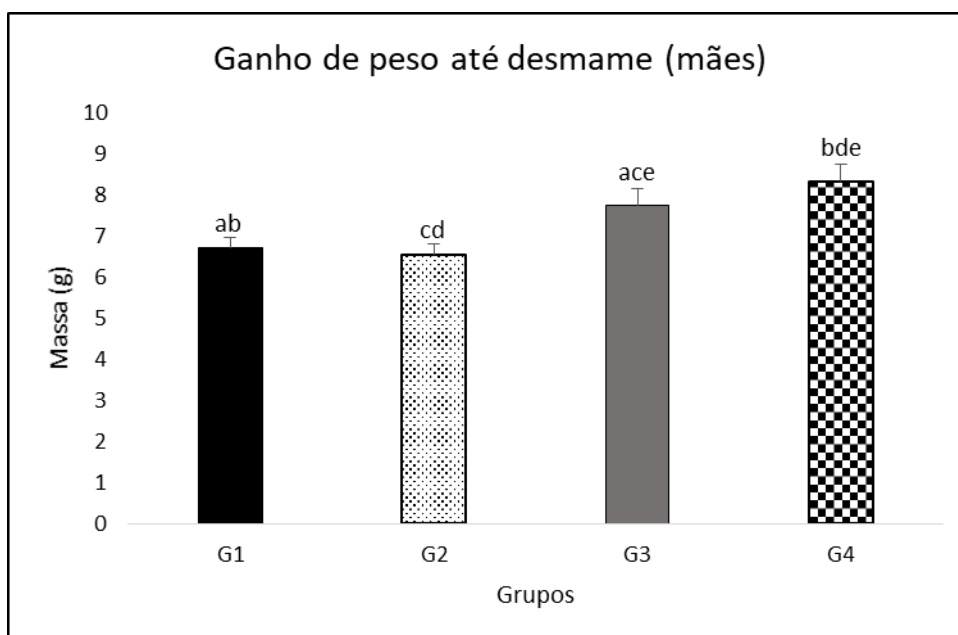


Figura 28. Resultados referentes ganho de peso das mães da primeira semana até a terceira semana de vida. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Observa-se que as fêmeas do grupo 4 apresentaram maior ganho de peso do que as fêmeas dos outros grupos ($p < 0,05$). E as fêmeas do grupo 3 apresentaram maior ganho de peso do que as fêmeas dos grupo 1 e 2 ($p = 0,0430$ e $p = 0,0205$, respectivamente).

Na Figura 29, é possível observar a pesagem das gorduras reprodutiva (localizada envolvendo os órgãos reprodutivos da fêmea – útero e ovários), renal (localizada envolvendo os rins) e mesentérica (localizada envolvendo os intestinos delgado e grosso).

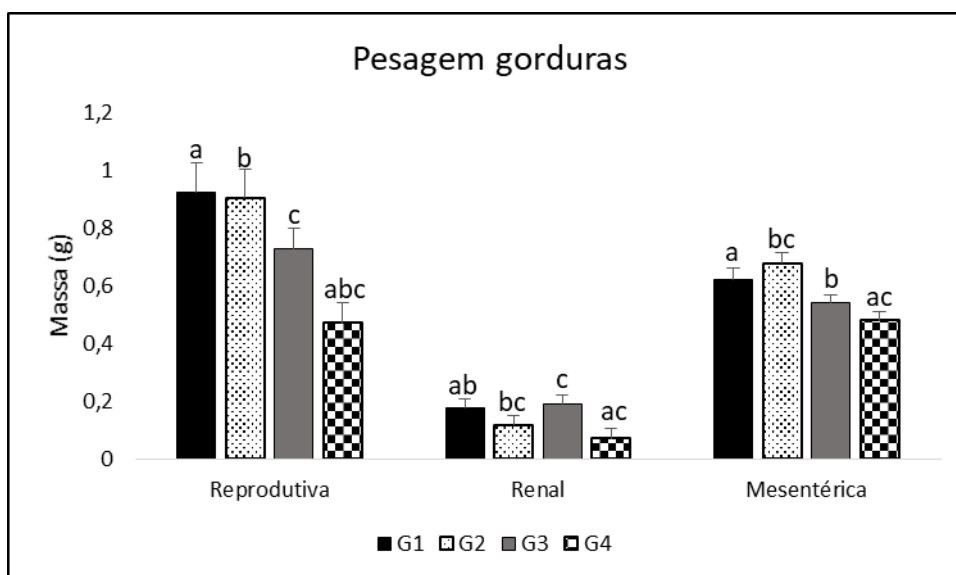


Figura 29. Pesagem das gorduras reprodutiva, renal e mesentérica coletadas na necropsia das fêmeas estudadas. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Os resultados demonstram que as fêmeas do grupo 4 apresentaram significativamente menos massa de gordura em todos os casos verificados ($p < 0,05$).

Os resultados de ganho em peso e acúmulo de gordura nas fêmeas revelam que, embora as fêmeas do G4 tenham apresentado maior ganho de peso nas primeiras semanas de vida, essa característica não refletiu em maior acúmulo de gordura até a fase pós-desmame. A exposição ao enriquecimento pode ter influenciado nesta característica, já que o EA iniciado em idades tardias pode levar à diversas modificações fisiológicas positivas, incluindo redução da adiposidade, melhora no controle glicêmico sistêmico, remodelação adiposa, supressão da hepatosteatose e produção de glicose, promovendo um envelhecimento saudável em camundongos (MCMURPHY et al., 2018).

Na Figura 30 estão apresentados os resultados de pesagem semanal dos filhotes contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4; esses dados foram verificados durante as três primeiras semanas de vida dos filhotes.

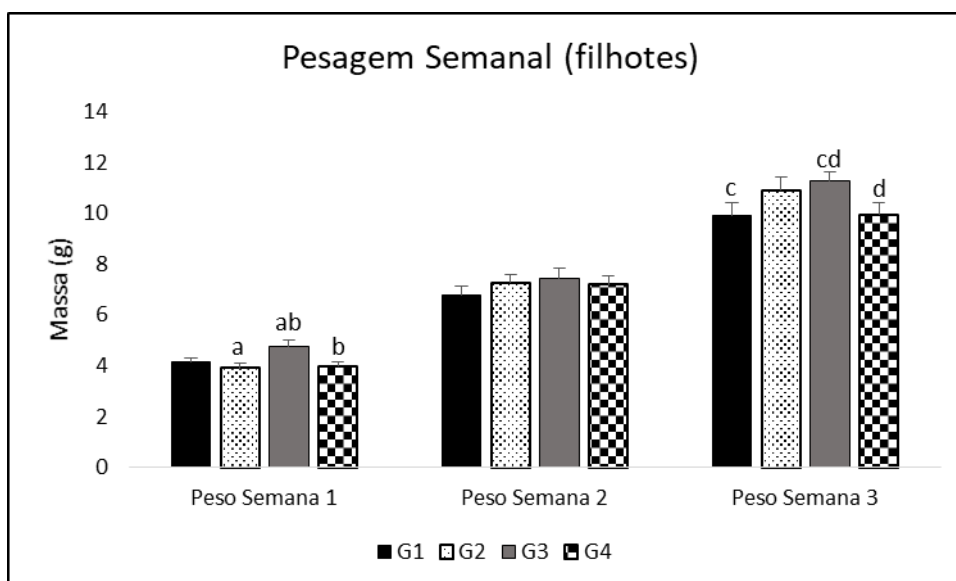


Figura 30. Resultados referentes à pesagem semanal dos filhotes. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Observa-se que os filhotes das fêmeas do grupo 3 são mais pesados na primeira semana do que os filhotes das fêmeas dos grupos 2 e 4 ($p=0,0495$ e $p=0,0134$, respectivamente). Na terceira semana, os filhotes das fêmeas do grupo 3 são mais pesados na primeira semana do que os filhotes das fêmeas dos grupos 1 e 4 ($p=0,0375$ e $p=0,0340$, respectivamente).

Na Figura 31 estão apresentados os resultados do ganho de peso até o desmame dos filhotes contrastados entre os grupos 1, 2, 3 e 4; esses dados foram verificados pela diferença de peso entre a primeira e terceira semana de vida dos filhotes.

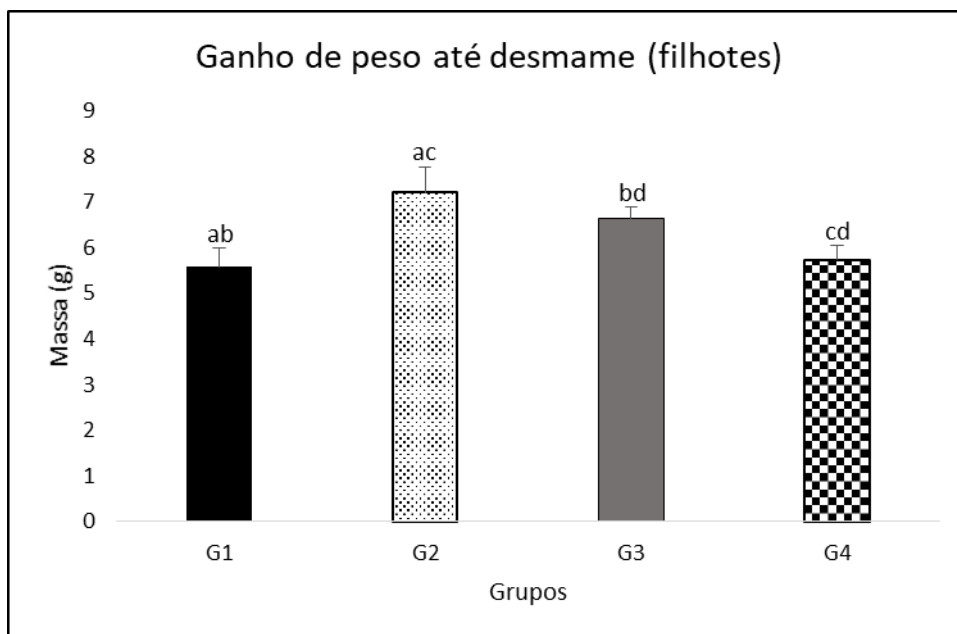


Figura 31. Resultados referentes ganho de peso dos filhotes da primeira semana até a terceira semana de vida. As letras iguais indicam diferença significativa. G1 (grupo 1: exposição frequente ao enriquecimento), G2 (grupo 2: não exposição a enriquecimento), G3 (grupo 3: exposição ao enriquecimento na puberdade), e G4 (grupo 4: exposição ao enriquecimento na fase materna).

Observa-se que os filhotes das fêmeas que não estiveram enriquecidas na fase materna (grupos 2 e 3) tiveram maior ganho de peso do que as fêmeas dos grupos 1 e 4 ($p < 0,05$).

Ao observar o contraste de dados sobre a pesagem dos filhotes, e visto que a base nutricional das mães e dos filhotes foram a mesma, pode-se sugerir que o ambiente que a mãe esteve exposta e as suas características de cuidado materno podem ter influenciado positivamente no desenvolvimento saudável dos filhotes. As fêmeas dos grupos enriquecidos nesta fase podem ter apresentado um cuidado materno mais ativo do que as outras fêmeas, por exemplo. Nesse caso, é possível que as fêmeas enriquecidas puderam manejar o tempo e organizar momentos para cuidado direto aos filhotes, como amamentação, *licking*, *grooming*, mas também para realizar tarefas do cuidado materno que não envolvem diretamente os filhotes, como por exemplo, aprimorar e/ou fazer a manutenção do ninho.

Embora nossos dados não tenham sido significativos para diferenças relacionadas à presença de leite, observa-se que os filhotes dos grupos não enriquecidos em fase materna parecem ser mais pesados do que aqueles que as mães estiveram expostas ao enriquecimento. Smart (1976) já havia mostrado que filhotes bem alimentados provocavam mais *licking* e isso pode ser devido à baixa resposta/estímulo

daqueles pouco alimentados levando a fêmea desempenhar menos este comportamento; ou também aqueles filhotes pouco alimentados poderiam ter dificuldade em sinalizar a necessidade/sofrimento. O *licking* também pode apresentar efeito calmante sobre os filhotes. Contudo, apenas as fêmeas do grupo 3 apresentaram significativamente mais *licking* do que as que estiveram enriquecidas na fase materna. Dessa forma, pode-se sugerir que os filhotes estarem mais pesados não indicam necessariamente que as fêmeas desempenharam melhor a amamentação e a lambedura como reflexo da alimentação dos filhotes. É possível que os tamanhos de ninhadas menores dessas fêmeas adicionado a um cuidado materno menos ativo e mais direto aos filhotes podem ter influenciado em menos competição entre os filhotes para a oferta de mamas do que no caso das fêmeas enriquecidas que tiveram tamanhos de ninhada maiores e um cuidado materno mais ativo. Essa competição ou conflito fraternal é exibida quando as mamas estão ocupadas e um novo filhote tenta desalojar outro que já esteja mamando e ocorre com movimentos de aproximação à mama associados à empurrões laterais (TAKAMATSU, A. T., 2007).

Mesmo assim, o estilo de vida materno também pode afetar potencialmente o metabolismo da prole por meio de vários mecanismos diferentes. Por exemplo, em camundongos, a ingestão elevada de gordura durante a gravidez aumenta as síndromes metabólicas em várias gerações de descendentes (JIMENEZ-CHILLARON, J. C. et al., 2009), e Wei et al. (2015) mostraram que a perda de peso da mãe também melhora a saúde geral de sua prole.

4.3 Procedimentos Moleculares

4.3.1 Extração de DNA

A retirada do cérebro e do hipotálamo de camundongos foi padronizada antes da extração do DNA. Testamos a remoção do hipotálamo no momento da eutanásia tanto com o tecido fresco, quanto após dias após sua extração com tais tecidos armazenados em *RNA Later* à -20°C. Durante a padronização da remoção do hipotálamo, foi verificado que o tecido cerebral perdia rapidamente suas características logo após ser colhido, por começar a se desmanchar e dificultar a identificação dos limites entre as regiões cerebrais, dificultando a remoção do hipotálamo. Com essa avaliação, optamos por retirar os cérebros dos animais estudados e imediatamente imergi-los na solução

estabilizadora de ácidos nucleicos e armazenados à -20°C por 48 horas e posteriormente à -80°C . Dessa forma, no dia da extração o cérebro estava mais rígido (ver Figura 32), o que possibilitou remover o hipotálamo com maior precisão. O restante do tecido cerebral permaneceu armazenado à -80°C para análises futuras.

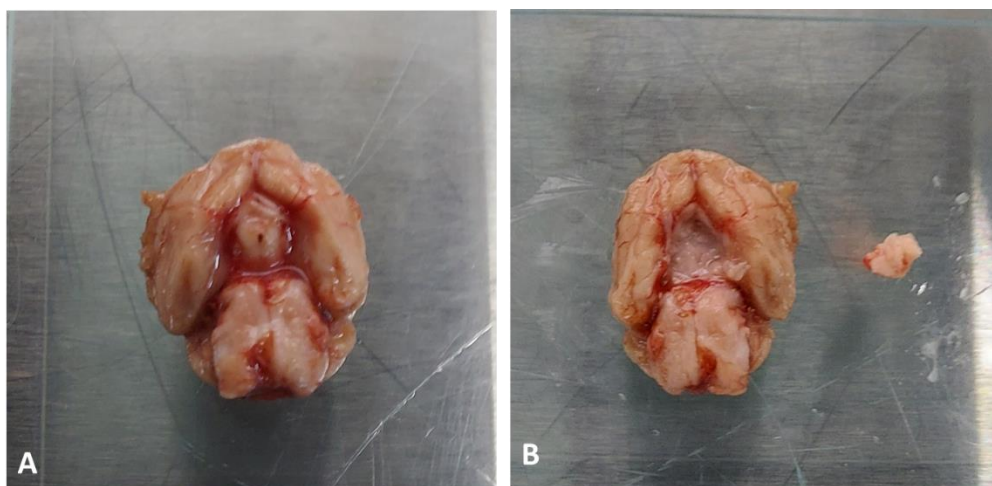


Figura 32. Cérebro de camundongo durante extração da hipotálamo. Em A cérebro antes da remoção e em B cérebro após a extração e hipotálamo extraído à direita.

A Extração de DNA de hipotálamo de camundongos foi padronizada com amostras de machos ($n=20$) e fêmeas ($n=14$) LG/J que estavam armazenadas a -80°C e em *RNA Later* a -20°C respectivamente. Foram utilizadas duas técnicas de extração: o protocolo de precipitação com Tiocianato de Guanidina (NELSON, KRAWETZ, 1992) e o Kit de Extração *Wizard SV 96 Genomic DNA Purification System* (PROMEGA). Também foi padronizada a melhor forma de maceração e para isso testamos o uso de pistilo e gilete em ambas as técnicas.

Com a extração pelo protocolo de Tiocianato de Guanidina foram extraídos em média $4450\text{ng}/100\text{uL}$ macerados com pistilo e $5750\text{ng}/100\text{uL}$ macerados com gilete. No entanto, durante o processo, foi observado que as amostras se apresentavam turvas (“nuvem branca”) mesmo após a centrifugação e precipitação das proteínas. Embora o volume total extraído dos macerados com gilete fosse maior, o tempo de maceração também o era, de forma que a maceração com pistilo tornou o processo mais otimizado para a quantidade de amostras a serem extraídas.

A padronização com o Kit de Extração *Wizard SV 96* também fez uso das duas formas de maceração mencionadas acima. Utilizando o gilete para macerar, foram obtidos em média $5373\text{ng}/450\text{uL}$ de DNA extraído; e com o pistilo, $5958\text{ng}/450\text{uL}$. Mesmo tendo observado médias semelhantes, optou-se pelo uso de pistilo para a

maceração por sua praticidade e rapidez. Testes subsequentes com o Kit de Extração *Wizard SV 96*, nesses processos renderam em média 6783,16ng/450uL de DNA. Assim, decidimos pela utilização do Kit de Extração *Wizard SV 96*.

Pensando no objetivo deste trabalho em avaliar tanto a emocionalidade quanto o cuidado materno das fêmeas LG/J, avaliamos que seria interessante proceder com as amostras de fêmeas consideradas “boas mães” de tal forma que avaliaríamos o metiloma de fêmeas que tiveram sucesso reprodutivo (n=12, para os 4 grupos). Contudo, após a extração de DNA do hipotálamo das fêmeas via Kit de Extração *Wizard SV 96*, verificamos que em média teríamos 8294,147ng ou aproximadamente 8ug de DNA para cada indivíduo. Contudo, posteriormente, verificamos que as quantificações estavam erradas por problemas no kit, foram refeitas e tínhamos em média 1,5ug de DNA para cada indivíduo.

O Sistema de Purificação de DNA Genômico *Wizard SV 96* produz DNA genômico com alto rendimento de células e tecidos cultivados, e tecidos animais incluindo tecido cerebral com rendimento médio de 6ug (PROMEGA, EUA). No entanto não obtivemos resultados satisfatórios para extrair DNA de amostras de hipotálamo. Dessa forma, para continuar os estudos com amostras cerebrais, são necessários novos testes para verificar o melhor método de extração e aproveitamento do material já extraído.

4.3.2 Metilação

Tanto a emocionalidade (PURBA et al., 1996; TANAKA et al. 2000), quanto o cuidado materno (BROWN et al., 1996; LEFEVBRE et al. 1998; LI et al., 1999; SCOTT et al., 2015), podem ser expressos e regulados geneticamente, principalmente por genes com expressão hipolâmica. Tal regulação também pode ser modulada por fatores ambientais, como o enriquecimento ambiental que agrega ao conjunto de variáveis das interações gene-ambiente capazes de modificar a expressão gênica *via* metilação do DNA associadas ao comportamento exploratório (ZOCHER et al., 2020). Dessa forma, buscamos avaliar o perfil epigenético de metilação (metiloma) das fêmeas LG/J que participaram do presente estudo, contrastando fêmeas expostas ou não ao enriquecimento ambiental. Foi organizado um perfil de fêmeas em que seriam avaliados padrões de metilação daquelas consideradas “boas mães”, separando-as em quatro conjuntos de amostras contendo três representantes de cada grupo (G1, G2, G3 e G4).

Nesse delineamento buscávamos contrastar fenótipos extremos, em que cada grupo havia se destacado. Nesse caso, fêmeas menos ansiosas e depressivas para o grupo 4 e mais ansiosas para os grupos 1, 2 e 3; fêmeas com maiores tamanhos de ninhada viável, e ninhos mais altos e mais quentes para os grupos 1 e 4 e menores para os grupos 2 e 3. Isso para que obtivéssemos o melhor contraste possível em cada placa de *Nanopore* sequenciada (cada uma comportando 12 amostras, ou seja, um total de 4 placas).

Devido a vários fatores, entre eles as medidas adotadas para o enfrentamento da pandemia de COVID-19, adequamos nosso procedimento de obtenção de dados. Nesse contexto, como não teríamos tempo hábil para todas as adequações, buscamos aprender as técnicas de análises de metilação do DNA, como uma oportunidade sem precedentes para garantir resultados promissores para estudos futuros do nosso grupo de pesquisa. Diferentes metodologias para análise da metilação do DNA já foram testadas e bem documentadas (KURDYUKOV; BULLOCK, 2016). No entanto, novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas, assim como o sequenciamento de quarta geração: a plataforma de sequenciamento *Oxford Nanopore Technologies*. O sequenciador de bolso, *MinION*, vem revolucionando as pesquisas que envolvem transcriptoma e genoma com sua capacidade de geração de dados e portabilidade. Além disso, os nanoporos são capazes de ler DNA ou RNA de tamanhos curtos à ultralongos (>4Mb) (*ONT* - <https://nanoporetech.com/products/minion>). Embora não tenha sido possível sequenciar as amostras de todas as fêmeas do presente estudo, demos início a um teste com 3 amostras: hipotálamo de uma das fêmeas LG/J do grupo 4 (G4), amostra de um exemplar de *A. fraterculus* (mosca-das-frutas, espécie de estudo do Laboratório de Genética de Populações e Evolução) e o controle com DNA do fago *Lambda*. Inicialmente, foi feita a checagem da *flow cell* que indicou 1492 poros disponíveis (originalmente, 2048) para o sequenciamento. Durante o preparo da biblioteca verificamos que logo na primeira etapa de *end-prep* e *DNA repair* tivemos uma perda relativamente maior do que o esperado (0,7ug) para esta etapa. Nesse caso, recuperamos 0,61ug de camundongo, 0,64ug de mosca e 1ug de DNA de *Lambda*. Mesmo assim, essa quantidade foi suficiente para dar continuidade ao protocolo com as etapas de ligação dos barcodes e adaptadores (necessários 0,5ug). As amostras foram então carregadas no sequenciador e foi possível correr a análise por pouco mais de 24 horas, pois o espaço de armazenamento não seria suficiente para completar as 72 horas de corrida. Nas Figuras 33, 34 e 35, geradas pelo *software Nanoplot*, estão apresentadas informações sobre o sequenciamento realizado.

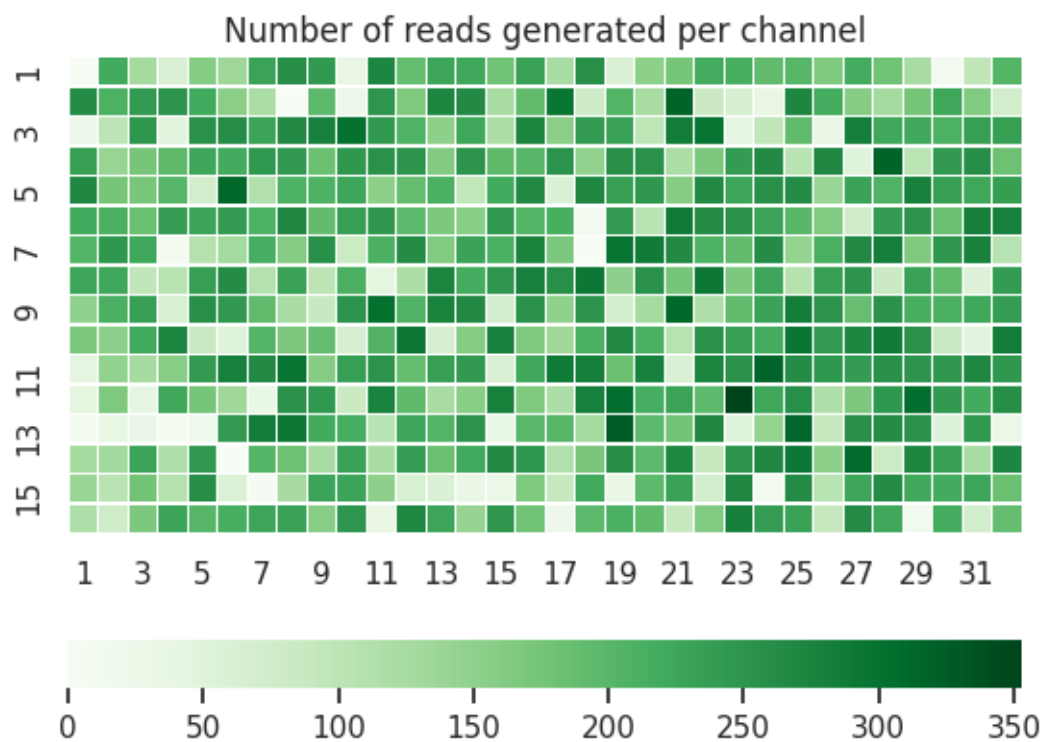


Figura 33. Representação gráfica do número de *reads* geradas por canal.

A Figura 33, mostra o número de *reads* geradas por cada canal disponível para sequenciamento. Nela, os canais representados pela cor mais esbranquiçada não sequenciaram ou sequenciaram muito poucos nucleotídeos, o que já era esperado, pois durante a checagem da *flow cell* foi verificado que pelo menos 556 poros dos 512 canais (cada canal contém 4 poros) estavam inativos. Durante o processo de sequenciamento, muitos dos poros disponíveis podem apresentar *status* de indisponibilidade por estarem entupidos ou sequenciando sequencias muito longas, por muito tempo. Essas informações podem ser obtidas pela verredura MUXscan que ocorre a cada 8 horas. A própria empresa disponibiliza um kit de lavagem com nucleasse que permite remover da *flow cell* a biblioteca inserida e recarregá-la com uma nova biblioteca para que dessa forma os poros sejam limpos e mudem de *status recovering/unavailable* para *active pores* (ONT, <https://store.nanoporetech.com/flow-cell-wash-kit-r9.html>).

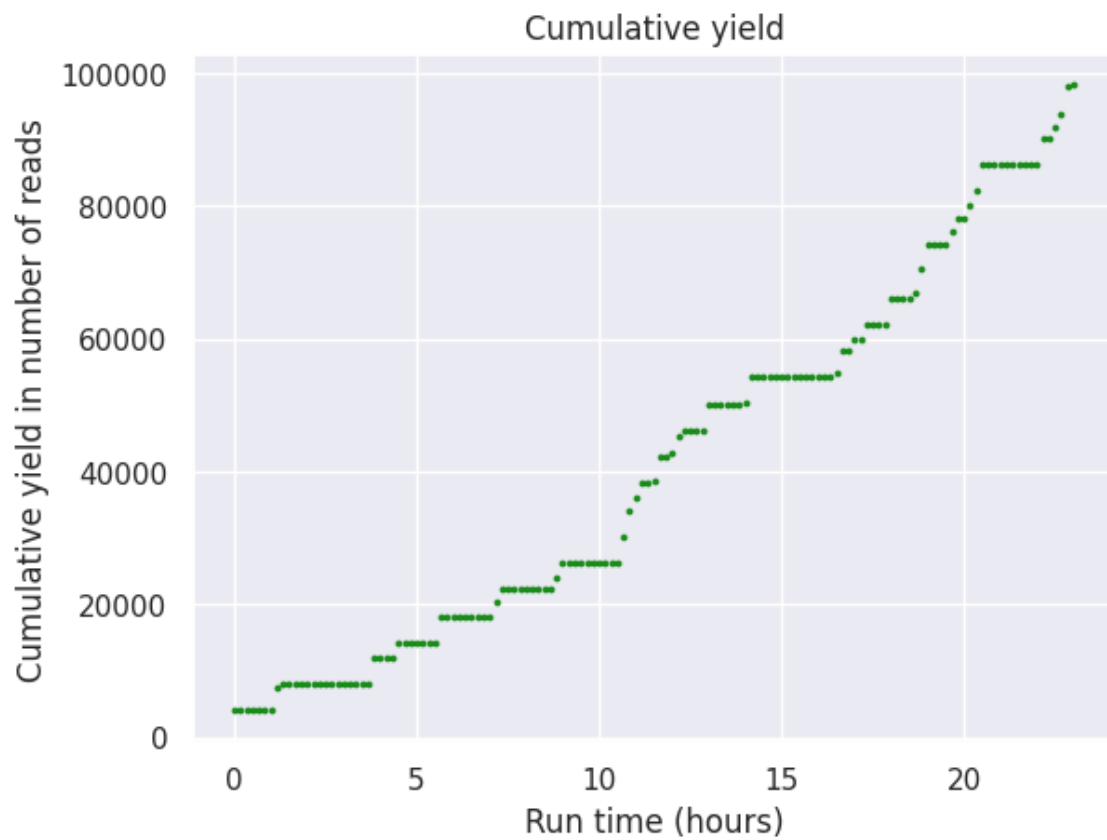


Figura 34. Representação gráfica do rendimento em número de *reads* durante o processo de sequenciamento.

Na Figura 34, observa-se que durante as primeiras 24 horas de sequenciamento a *flow cell* ainda apresentava rendimento acumulado em número de *reads* alto, indicando que o procedimento de geração de dados ocorria de forma consistente.

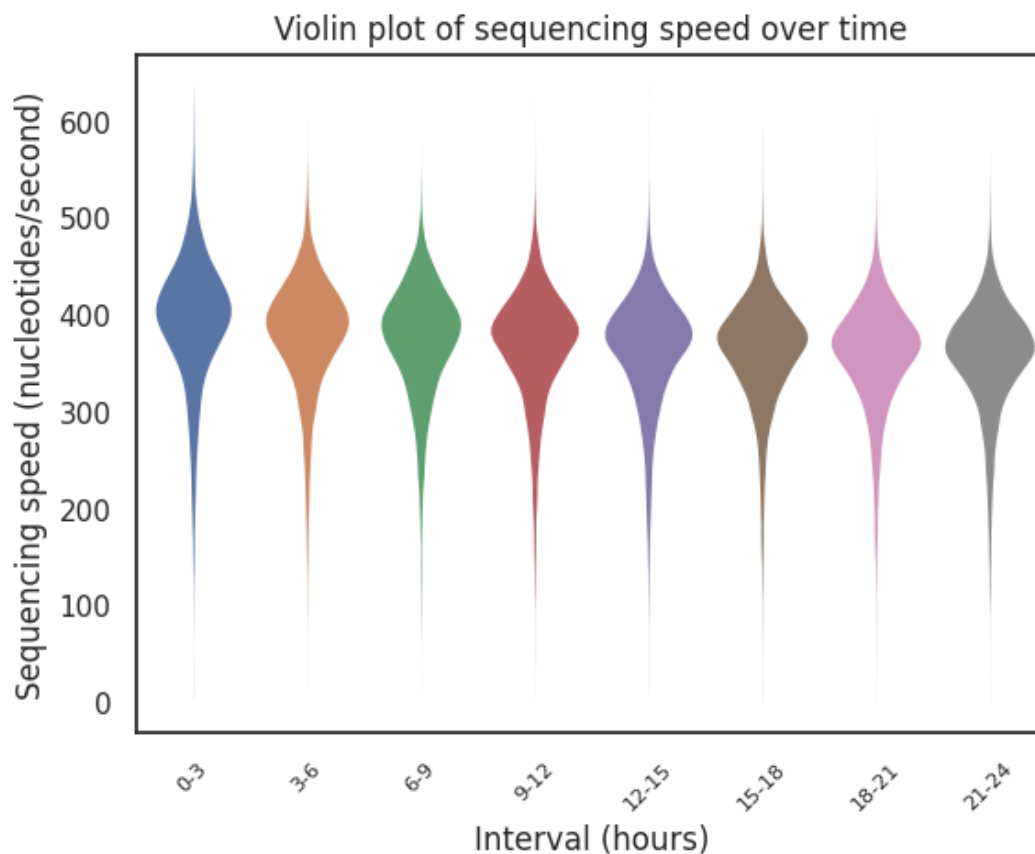


Figura 35. Representação gráfica da velocidade de sequenciamento em nucleotídeos/segundo durante as 24 horas de corrida.

A Figura 35 indica que não houve uma queda considerável no processo de sequenciamento das amostras durante as primeiras 24 horas de corrida, o que nos permite inferir que o processo parecia otimizado, sendo possível gerar mais dados se não houvesse atingido o limite de espaço de armazenamento no disco sólido do computador.

As análises do Nanoplot também permitiram avaliar a qualidade das *reads* geradas (representada na Figura 36) que estiveram acima dos cortes de qualidade: foram 89607 leituras >Q5 (91.2%), 84416 leituras >Q7 (85.9%), 62115 leituras >Q10 (63.2%) e 24048 leituras >Q12 (24.5%).

Read lengths vs Average read quality plot

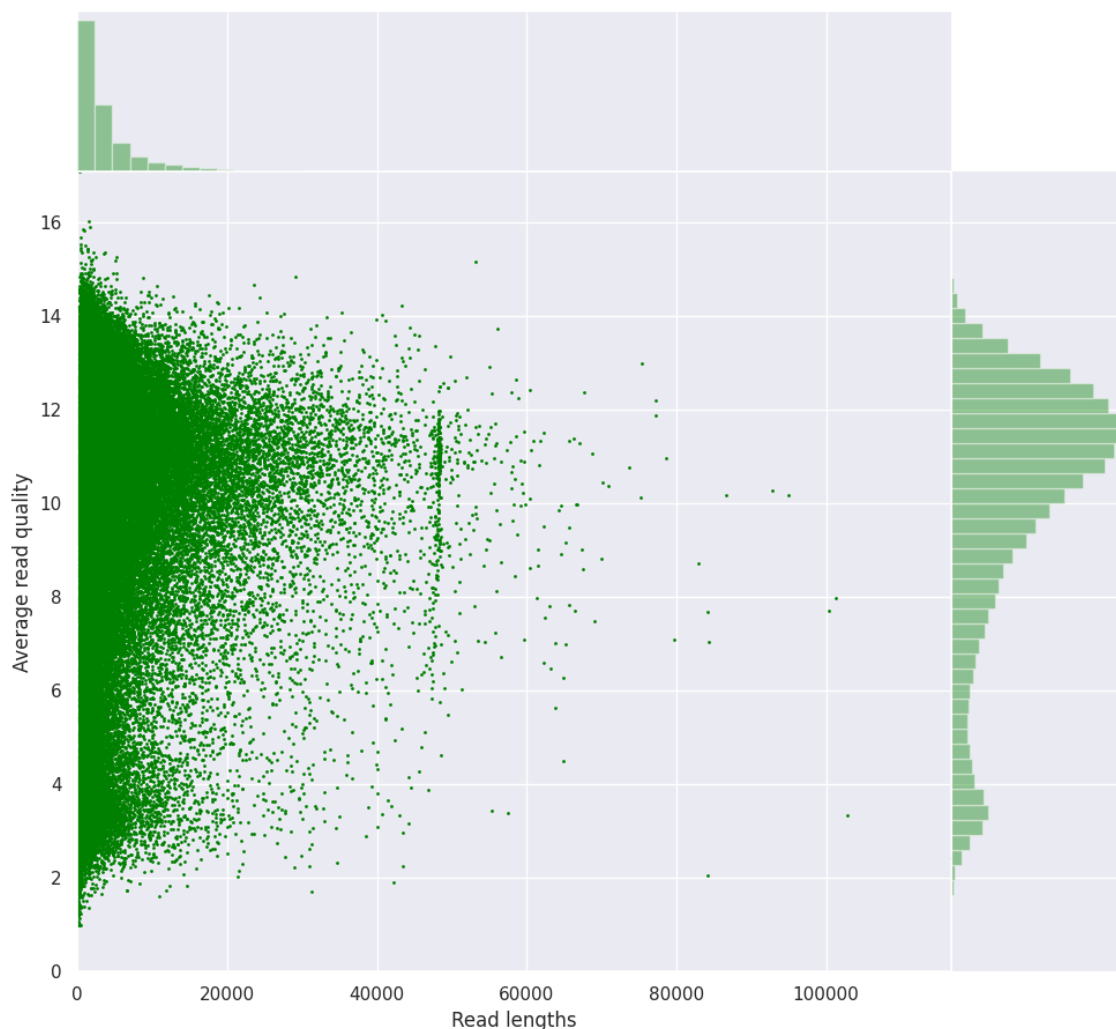


Figura 36. Representação gráfica da comparação entre o comprimento das leituras (*reads lengths*) e média de qualidade das *reads* (*average read quality*).

Foram gerados 105 GB de dados brutos neste primeiro teste. As análises genômicas são usualmente descritas por duas estatísticas: cobertura e N50. À medida que os dados eram gerados, o seu processamento ocorria em tempo real pelo *guppy*, que já fazia a detecção dos barcodes que indicam a qual biblioteca a *read* corresponderia. Contudo devido à limitação do espaço de armazenamento do computador, o processamento dos arquivos pelo *guppy* também foi interrompido gerando uma grande quantidade de dados não processados denominados “fast5_skip”. Demos continuidade às análises apenas dos dados “fast5_pass”. Avaliamos número e tamanho de leituras geradas via *Poretools* (Tabela 6).

Tabela 6. Conjunto de dados gerados a partir da análise stats da ferramenta *poertools*.

<i>PORETOOLS</i>			
Amostra	<i>M. musculus</i>	<i>A. fraterculus</i>	<i>Lambda</i>
Barcode	NB01	NB02	NB03
Total Reads	1854	2006	1230
Total Basepairs	9793061	5035932	11352750
Tamanho Médio	5282,13	2510,43	9229,88
Tamanho Mediano	2842	1517	5991
Tamanho Mínimo	119	103	127
Tamanho Máximo	86625	45425	67663
N25	25456	7739	27490
N50	12072	4323	16493
N75	5080	2390	8603

O resultado demonstrado na Tabela 6 nos informa sobre o tamanho das *reads* geradas. Como é possível observar, nesse nosso primeiro teste a amostra camundongo teve um tamanho médio aproximado de 5,2kb (N50 = 12kb), mosca 2,5kb (N50 = 4,3kb) e o controle *Lambda* teve um tamanho médio aproximado de 9kb (N50 =16,5kb).

No histograma (Figura 37) observa-se a distribuição dos comprimentos das *reads* que foram geradas para a amostra de camundongo e é possível verificar que a maioria das leituras teve tamanho entre 1000 e 10000 pares de bases.

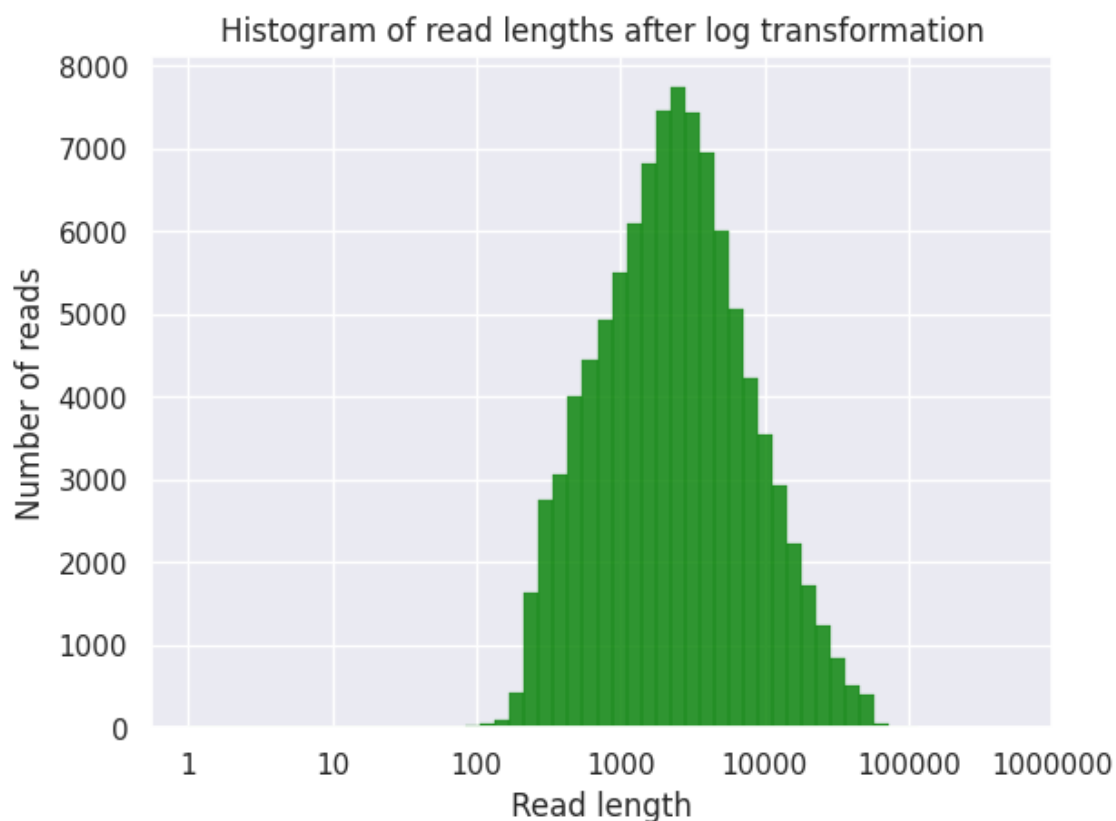


Figura 37. Histograma referente ao comprimento das *reads*.

Essas informações indicam que os tamanhos médios dos *reads* altos foram as do controle de sequenciamento do fago *Lambda*, fato que valida a metodologia empregada. Embora os resultados da biblioteca de mosca-das-frutas tenham gerado fragmentos significativamente menores aos do *Lambda*, os de camundongo estão bastante próximos, o que pode ser confirmado pela proximidade dos valores de N50, que representa a mediana do tamanho dos fragmentos gerados (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2001). A partir desses dados é possível inferir que o protocolo de extração escolhido parece ter quebrado as fitas de DNA em pequenos fragmentos, o que interfere no resultado final do sequenciamento, já que a tecnologia de nanoporos tem como objetivo sequenciar fragmentos de DNA de tamanho maior (média de 20 kb, mas com valores comumente acima de 30 kb) (LU; GIORDANO; NING, 2016).

Na Figura 38 é possível observar que o rendimento acumulado por comprimento das *reads* esteve em sua maioria reunido naquelas em comprimentos de leituras baixos. Essa informação nos permite inferir que possivelmente a extração de DNA pelo do Kit de Extração *Wizard SV 96* pode ter fragmentado as amostras, gerando um DNA com

tamanho médio mais baixo do que o recomendado para esse procedimento. A Figura 39, a seguir, confirma que tivemos um rendimento acumulado de *reads* de comprimentos menores.

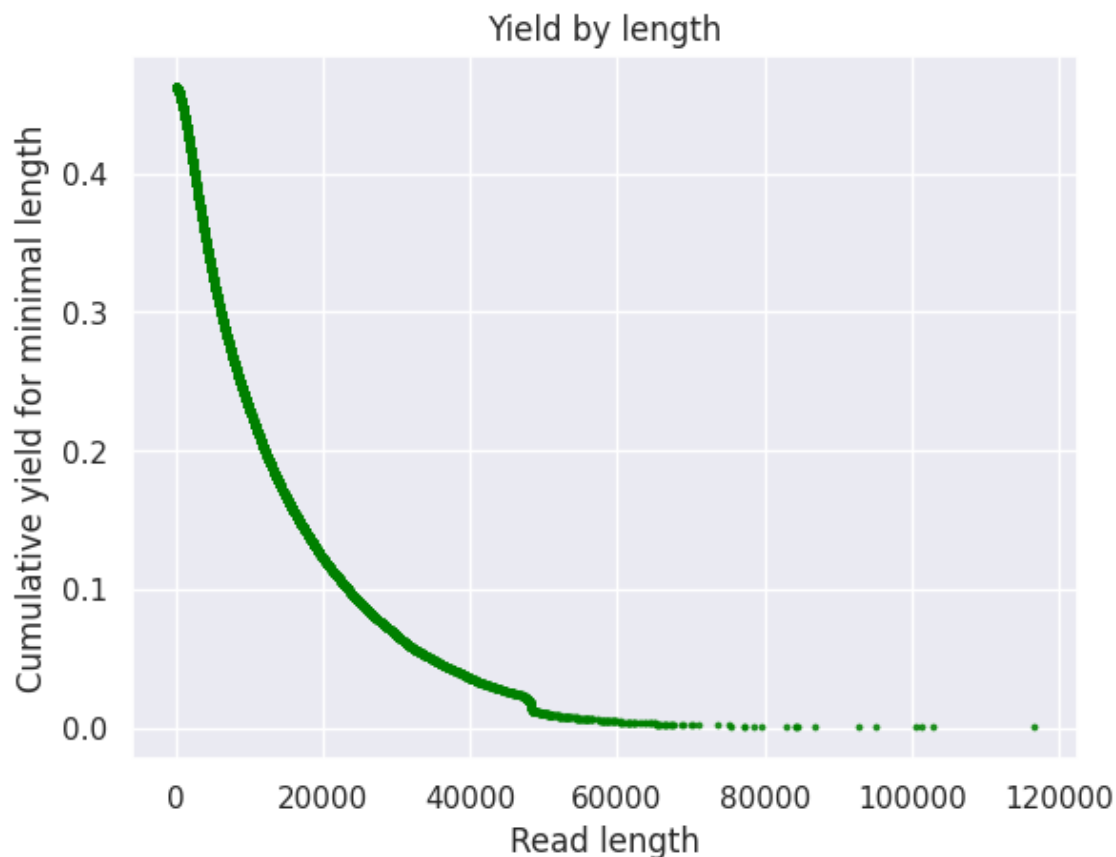


Figura 38. Rendimento por comprimento das *reads*.

O alinhamento da amostra de camundongo foi realizado utilizando o genoma de referência mais recente de *Mus musculus* da linhagem C57BL/6J (GRCm39) obtido do banco de dados de genomas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_000001635.27/).

Utilizamos o programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (THORVALDSDÓTTIR, ROBINSON, MESIROV, 2013) para explorar visualmente os dados genômicos alinhados, o que é representado nas Figuras 39 e 40 com apenas uma pequena parte do genoma visualizado.

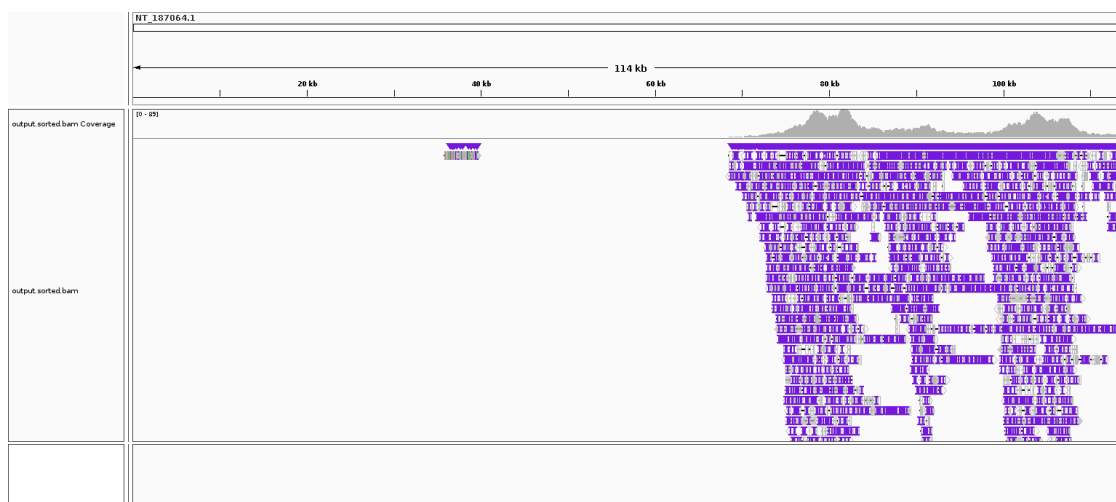


Figura 39. Visualização da região NT_187064.1 pelo programa IGV.



Figura 40. Visualização da região NC_005089.1 pelo programa IGV.

As visualizações da região NT_187064.1 (Figura 39) e da região NC_005089.1 (Figura 40) informam e expõem visualmente que o sequenciamento teste ocorreu e que foi possível alinhar os dados obtidos ao genoma de referência. Também é possível observar que o alinhamento das *reads* e mostra diversas regiões do genoma com cobertura reduzida, ou até mesmo ausente. Ao buscar informações sobre essas regiões no NCBI são obtidas as seguintes informações: a região NT_187064.1 é referente à um *scaffold* ainda não anotado, mas relacionado ao homólogo da proteína SF11 e ao pseudogene do fator de alongamento de tradução eucariótico 2 e a região NC_005089.1 é referente ao genoma mitocondrial completo de *Mus musculus*. Nesta visualização é interessante notar sobre a cobertura das regiões que foi posteriormente avaliada *via*

DeepSignal2. Foi verificado que apenas 4 *reads* tiveram cobertura máxima de 13X, a grande maioria das leituras tiveram cobertura de 1X (total de 40161 leituras), 849 *reads* tiveram cobertura maior igual à 2X e apenas 78 tiveram cobertura maior que 5X. A cobertura vertical indica a quantidade média leituras que cobrem cada região de um genoma com base no seu mapeamento (MARIANO, 2021). Embora muitos trabalhos envolvendo estudo da metilação do DNA apresentem cobertura média de 30X, sugere-se sequenciamentos de genoma com coberturas médias de 5X-20X (NIELSEN et al., 2011). Diversos métodos computacionais vêm sendo criados e são capazes de detectar modificações de DNA de todo o genoma de mamíferos no sequenciamento de nanoporos a partir de coberturas baixas, como 5X (LIU et al., 2021), apresentando resultados próximos aos de sequenciamento por bissulfito com cobertura profunda de 100X (SIMPSON et al., 2017). Mesmo assim, nossos dados de cobertura parecem estar enviesados devido à não finalização das 72 horas de corrida, terminando o experimento 48 horas antes.

O processamento dos dados foi realizado pelos *softwares* *DeepSignal2*, *NanoMethPhase* e *Tombo*. Na Tabela 7 estão descritos os dados de chamada de metilação gerados por esses *softwares*.

Tabela 7. Dados descritivos dos resultados de chamada de metilação pelos softwares DeepSignal2, NanoMethPhase e Tombo.

<i>Fluxo de Trabalho</i>	<i>Chamada de Metilação</i>					
	Total Regiões	Reads Forward	Reads Reverse	Regiões Metiladas	Regiões Não-metiladas	Regiões Metiladas Relativas
<i>DeepSignal2</i>	42504	21263	21241	28495	14009	67%
<i>NanoMethPhase</i>	39120	18941	20179	25899	13221	66%
<i>Tombo</i>	11	11	0	9	2	82%

Como é possível observar na Tabela 7, os resultados das análises pelo *DeepSignal2* e *NanoMethPhase* foram similares, mas os resultados obtidos pelo *software Tombo* foram bem mais baixos. É provável que as análises *via Tombo* sejam mais restritas às leituras com coberturas mais altas, em se considerando que esse programa faz uma análise estatística para a detecção de bases com modificações e nossos dados não atenderam às exigências da análise quanto à cobertura resultando em poucas regiões. O genoma do camundongo é de aproximadamente 2,7GB, com cerca de 22

milhões de sítios CpG e são encontradas no genoma haplóide de camundongos aproximadamente 37000 ilhas CpGs (ANTEQUERA, BIRD, 1993; MARCOLA, 2016).

As diferenças encontradas nos resultados obtidos podem estar relacionadas com a cobertura dos dados. Os fluxos de trabalho para a determinação de 5mC relacionados ao *DeepSignal2* e *NanoMethPhase* apresentam boa acurácia com coberturas baixas de 10X e 1X, respectivamente (NI, et al., 2019; XU, SEKI, 2020; AKBARI, et al., 2021). No entanto, *Tombo* tem melhor acurácia com coberturas altas (<https://github.com/nanoporetech/tombo>).

Foi avaliado o percentual de regiões potencialmente metiladas do total de *reads* e os resultados estão plotados na Figura 41.

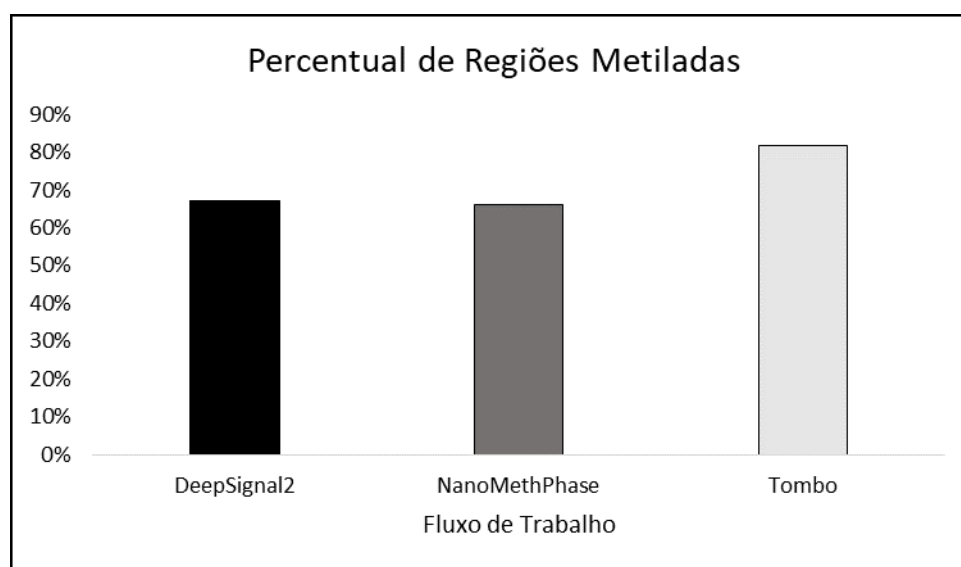


Figura 41. Percentual de regiões metiladas dos dados dos softwares utilizados (*DeepSignal2*, *NanoMethPhase* e *Tombo*).

Esses resultados indicam que as porcentagens de regiões potencialmente metiladas entre os dados de *DeepSignal2* e *NanoMethPhase* são bastante semelhantes e indicam que em média 66,5% das regiões chamadas para presença de 5mC estão potencialmente metiladas.

O hipotálamo é uma das regiões cerebrais envolvidas na mediação das respostas emocionais e cuidado materno. Interações gene-ambiente parecem estar associados à mudanças no cérebro que são dependentes da experiência e podem alterar a cognição, a emoção e o comportamento (ROGERS; RENOIR; HANNAN, 2019). Embora não tenha sido possível avaliar as regiões diferencialmente metiladas nas amostras hipotalâmicas de todos os grupos estudados, frente a tantas limitações impostas na condução

presencial das atividades do presente trabalho, os testes realizados na análise de metilação permitiram o treinamento utilizando diferentes *softwares* nos processamento dos dados, além fundamentar novos estudos na área validando a metodologia do *MinION* para os futuros trabalhos no nosso grupo de pesquisa.

Um dos objetivos propostos no presente trabalho seria a busca por genes metilados no hipotálamo. Apesar de termos identificado regiões metiladas, não foi possível definir os genes metilados nessas regiões. Essa etapa será importante, pois ela poderá indicar marcadores epigenéticos associados ao bem-estar animal, principalmente associados com a emocionalidade de fêmeas da linhagem LG/J.

5 CONCLUSÕES

A utilização de enriquecimentos ambientais tem fundamental contribuição ao bem-estar de animais de laboratório. Apesar de diferentes modelos de enriquecimento poderem ser utilizados para esse fim, testes de preferência são ferramentas importantes para verificar a escolha dos animais frente aos tipos de enriquecimentos. Os resultados do projeto piloto, desenvolvido inicialmente, identificou a preferência das fêmeas *Mus musculus* LG/J pelo rolo de papelão e este foi o objeto de enriquecimento ambiental utilizado no presente estudo.

A exposição dos animais ao rolo de papelão, em diferentes fases de vida, e o contraste com aqueles nunca expostos, permitiu investigar o papel desse enriquecimento sobre a emocionalidade das fêmeas. Nossos resultados sugerem que naturalmente, as fêmeas LG/J apresentam características tipo ansiosas e depressivas. Da mesma forma, esse padrão pode sofrer influências de fatores ambientais e biológicos. O enriquecimento ambiental, enquanto fator ambiental, parece atenuar a emocionalidade das fêmeas, porém fatores biológicos, determinados pelas fases de vida, também poderão ter influência na emocionalidade.

A utilização de enriquecimento ambiental na fase materna sugere a melhoria na postura materna e desempenho das fêmeas no comportamento de resgate dos filhotes, sendo favorável ao bem-estar das fêmeas nessa fase. A emocionalidade de fêmeas pós-desmame foi caracterizada, enriquecendo as informações relativas essa fase, que possui escassez de estudos.

A influência do Enriquecimento Ambiental em diferentes fases de vida sobre a emocionalidade e cuidado materno permitiu a obtenção de fenótipos utilizados para

seleção de análise do metiloma dessas fêmeas. No entanto, mesmo não sendo possível finalizar esses procedimentos, o ato de aprender metodologias de uma tecnologia de sequenciamento de quarta geração foi uma oportunidade sem precedentes, e garantiu resultados promissores para estudos futuros com o *Oxford Nanopore MinION*.

De modo geral, conclui-se que este estudo apresenta resultados relevantes para a área de pesquisa, gerando novas discussões, testando novas tecnologias e embasando novos trabalhos do grupo de pesquisa na busca de marcadores epigenéticos associados ao bem-estar animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARI, V. et al. Megabase-scale methylation phasing using nanopore long reads and NanoMethPhase. **Genome biology**, v. 22, n. 1, p. 1-21, 2021.
- ALCOCK, J. Animal behavior: An evolutionary approach. Sunderland: **Sinauer Associates**, 2001. In: WEBER, E. M.; OLSSON, I. A. S. Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: an ethological review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, n. 1-2, p. 1-22, 2008.
- ALDRIDGE, J. W.; BERRIDGE, K. C. Coding of serial order by neostriatal neurons: a “natural action” approach to movement sequence. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 2777-2787, 1998.
- ANISMAN, H.; MATHESON, K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 525-546, 2005.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 205-235, maio 1973. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-3472\(73\)80065-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-3472(73)80065-x).
- ARNETT, J. Reckless behavior in adolescence: A developmental perspective. **Developmental review**, v. 12, n. 4, p. 339-373, 1992.
- ANTEQUERA, F.; BIRD, A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 24, p. 11995-11999, 1993.
- BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. **Current opinion in pediatrics**, v. 21, n. 2, p. 243, 2009.
- BAILOO, J. D. et al. Effects of Cage Enrichment on Behavior, Welfare and Outcome Variability in Female Mice. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 12, 2018.
- BARTOSZECK, A. B.; BARTOSZECK, F. K. Neurociência dos seis primeiros anos: implicações educacionais. **EDUCERE. Revista da Educação**, v. 9, n. 1, p. 7-32, 2007.
- BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits and research. **Institute fo Laboratory Animal Research Journal**, v.46, n.2, p. 162-170. 2005.
- BEATTY, W. W. Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: Organizational and activational influences. **Hormones and behavior**, v. 12, n. 2, p. 112-163, 1979.
- BELFORTE, J. E. et al. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 76-83, 2010.

BENAROYA-MILSHTEIN, N. et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 1341-1347, 2004.

BERRIDGE, K. C.; FENTRESS, J. C.; PARR, H. Natural syntax rules control action sequence of rats. **Behavioural brain research**, v. 23, n. 1, p. 59-68, 1987.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, Antonio P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural brain research**, v. 108, n. 2, p. 197-203, 2000.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, Antonio P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. **Behavioural brain research**, v. 132, n. 2, p. 135-143, 2002.

BIRKE, L. I.A.; ARCHER, J. Open-field behaviour of oestrous and dioestrous rats: evidence against na “emotionality” interpretation. **Animal Behaviour**, [S.L.], v. 23, p. 509-512, ago. 1975. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472\(75\)90127-x](http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472(75)90127-x).

BITRAN, D.; HILVERS, R. J.; KELLOGG, C. K. Ovarian endocrine status modulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of! g-aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. **Behavioral neuroscience**, v. 105, n. 5, p. 653, 1991.

BITRAN, D.; PURDY, R. H.; KELLOGG, C. K. Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical alloprenanolone and GABAA receptor function. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 45, n. 2, p. 423-428, 1993.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ehtoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol**; 39 (1): 43-68, 1988.

BLANCHARD, D. C. et al. Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. **Psychopharmacology**, v. 101, n. 4, p. 511-518, 1990.

BOEDER, A. M. **A RELAÇÃO DA MICROBIOTA COM A PRESSÃO ARTERIAL E PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE DUAS LINHAGENS ISOGÊNICAS DE RATOS**. 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

BORBA, L. A. et al. Environmental enrichment improves lifelong persistent behavioral and epigenetic changes induced by early-life stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 138, p. 107-116, 2021.

BOSCH, O. J. Maternal nurturing is dependent on her innate anxiety: the behavioral roles of brain oxytocin and vasopressin. **Hormones and behavior**, v. 59, n. 2, p. 202-212, 2011.

BRASIL. Constituição (1988). Lei nº 11794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Lei Nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008**: Legislação Federal. Brasília, 09 out. 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm. Acesso em: 06 jun. 2022.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 36, p. 178-196, 2015.

BROIDA, J.; SVARE, B. Strain-typical patterns of pregnancy-induced nestbuilding in mice: maternal and experiential influences. **Physiology & behavior**, v. 29, n. 1, p. 153-157, 1982.

BROOKS-GUNN, J.; WARREN, M. P. Biological and social contributions to negative affect in young adolescent girls. **Child development**, p. 40-55, 1989.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **British veterinary journal**, v. 142, n. 6, p. 524-526, 1986.

BROWN, J. R. et al. A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. **Cell**, v. 86, n. 2, p. 297-309, 1996.

BROWN, R. E. et al. Maternal behavior in female C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. **Physiology & behavior**, v. 67, n. 4, p. 599-605, 1999.

BRUNNER, D. et al. Anxiety, motor activation, and maternal–infant interactions in 5HT1B knockout mice. **Behavioral neuroscience**, v. 113, n. 3, p. 587, 1999.

BULT, A.; LYNCH, C. B. Nesting and fitness: lifetime reproductive success in house mice bidirectionally selected for thermoregulatory nest-building behavior. **Behavior genetics**, v. 27, n. 3, p. 231-240, 1997.

CALDJI C, TANNENBAUM B, SHARMA S, FRANCIS D, PLOTSKY PM, MEANEY MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of behavioral fearfulness in adulthood in the rat. **Proc Natl Acad Sci** 95:5335–5340, 1998.

CALDJI C, DIORIO J, MEANEY MJ. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. **Biological psychiatry** 48(12): 1164-74, 2000.

CARDENAS, F.; LAMPREA, M.R.; MORATO, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. **Behavioural brain research**, v. 122, n. 2, p. 169-174, 2001.

CAROLA, V. et al. Mating-related interactions share common features with anxiety in the mouse. **Behavioural brain research**, v. 186, n. 2, p. 185-190, 2008.

CHAMPAGNE, F. A. Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 29, n. 3, p. 386-397, 2008.

CHEMAT, R.; THIERRY, B.; MICO, J.A.; STERU, L.; SIMON, P. Adaptation of the tail suspension test to the rat. **J Pharmacol** v.17, p.348–350, 1986.

CHIAVEGATTO, S. et al. Hypothalamic expression of Peg3 gene is associated with maternal care differences between SM/J and LG/J mouse strains. **Brain and behavior**, v. 2, n. 4, p. 365-376, 2012.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p.235-260, 2001.

CHOI, S.; KELLOGG, C. K. Adolescent development influences functional responsiveness of noradrenergic projections to the hypothalamus in male rats. **Developmental Brain Research**, v. 94, n. 2, p. 144-151, 1996.

CHOI, S.; WEISBERG, S. N.; KELLOGG, C. K. Control of endogenous norepinephrine release in the hypothalamus of male rats changes over adolescent development. **Developmental Brain Research**, v. 98, n. 1, p. 134-141, 1997.

CLOUGH, R. W.; RODRIGUEZ-SIERRA, J. F. Synaptic changes in the hypothalamus of the prepuberal female rat administered estrogen. **American Journal of Anatomy**, v. 167, n. 2, p. 205-214, 1983.

CONSTANTINO, Lara Boschési. **Comportamento depressivo e o cuidado materno em fêmeas de camundongos LG/J e imprinting genômico**. 2018. 50 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

COSTALL, B.J. et al. Exploration of a mice a black and white box: validations as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**. 32: 777-785. 1989.

COSTELLO, J. F.; PLASS, Christoph. Methylation matters. **Journal of medical genetics**, v. 38, n. 5, p. 285-303, 2001.

COSTER, W, et al. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 34, n. 15, p. 2666-2669, 14 mar. 2018.

CRAWLEY, Jacqueline; GOODWIN, Frederick K.. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 167-170, ago. 1980. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90067-2](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2).

CRAWLEY, J. N. What's wrong with my mouse?: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. **John Wiley & Sons**, 2007.

CRYAN, J. F.; HOLMES, Andrew. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 9, p. 775-790, 2005.

CUI, M.; YANG, Y.; YANG, J.; ZHANG, J.; HAN, H.; MA, W.; LI, H.; MAO, R.; XU, L.; HAO, W. Enriched environment experience overcomes the memory deficits and depressive-like behavior induced by early life stress. **Neuroscience Letters**, [S.L.], v. 404, n. 1-2, p. 208-212, ago. 2006.

DAMATTA, R. A. Modelos animais na pesquisa biomédica. **Scientia Medica**, v. 20, n. 3, p. 210-211, 2010.

DARWIN, C. The expression of emotions in man and animals. **Chicago: University of Chicago Press**. (trabalho original publicado em 1872), 1995.

DARWIN, C. **A origem das espécies**. 2009.

DENENBERG, V. H.; ZARROW, M. X.; TAYLOR, Rhoda E. Maternal behavior in the rat: an investigation and quantification of nest building. **Behaviour**, v. 34, n. 1-2, p. 1-16, 1969.

DERKS, S. et al. Methylation-specific PCR unraveled. **Cellular Oncology**, v. 26, p.291-299, 2004.

DILLON, K. A. et al. Autoradiographic analysis of serotonin 5-HT1A receptor binding in the human brain postmortem: effects of age and alcohol. **Brain research**, v. 554, n. 1-2, p. 56-64, 1991.

DWYER, C.; LAWRENCE, A. Maternal behaviour in domestic sheep (*Ovis aries*): constancy and change with maternal experience. **Behaviour**, v. 137, n. 10, p. 1391-1413, 2000.

EDITION, F. et al. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. **Am Psychiatric Assoc**, v. 21, 2013.

EL-MAARRI, O. **Peroxisomal Disorders and Regulation of Genes**. Nova York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 198, 2003.

ELIAS, P. K.; ELIAS, M. F.; ELEFThERIOU, B. E. Emotionality, exploratory behavior, and locomotion in aging inbred strains of mice. **Gerontology**, v. 21, n. 1, p. 46-55, 1975.

ELLIOTT, B. M.; GRUNBERG, N. E. Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague–Dawley rats. **Behavioural brain research**, v. 165, n. 2, p. 187-196, 2005.

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

FERREIRA, A. et al. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiology & behavior**, v. 77, n. 2-3, p. 197-204, 2002.

FERREIRA, M.B.; ANJOS, M. **MiniAurélio Século XXI Escolar: o mini dicionário da língua portuguesa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 2000. 790 p.

FERNANDEZ-GUASTI, A.; PICAZO, O. Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterone. **Psychoneuroendocrinology**, v. 17, n. 6, p. 681-689, 1992.

FERNANDEZ, J. W. et al. Postpartum depression in rats: differences in swim test immobility, sucrose preference and nurturing behaviors. **Behavioural brain research**, v. 272, p. 75-82, 2014.

FLEMING, A. S.; LUEBKE, C. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. **Physiology & behavior**, v. 27, n. 5, p. 863-868, 1981.

FLEMING, A.S.; O'DAY, D. H.; KRAEMER, G. W. Neurobiology of mother–infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 673-685, 1999.

FLOW CELL WASH KIT: NANOPORE STORE OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. <https://store.nanoporetech.com/flow-cell-wash-kit-r9.html> (acesso em: 23 jul. 2022)

FENTRESS, J. C. The tonic hypothesis and the patterning of behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 290, n. 1, p. 370-395, 1977.

FISH, E. W. et al. Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1036, n. 1, p. 167-180, 2004.

FORTI, I., R., N. **Bases genéticas do comportamento materno agressivo de proteção contra intrusos em camundongos**. 2012. Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. São Carlos, 2012.

FOYER, P.; WILSSON, E.; JENSEN, P. Levels of maternal care in dogs affect adult offspring temperament. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.

FRANCIS, D. et al. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, v. 286, n. 5442, p. 1155-1158, 1999.

FRANCIS DD, SZEGDA K, CAMPBELL G, MARTIN WD, INSEL TR. Epigenetic sources of behavioral differences in mice. **Nature Neurosci**. 6: 445–446, 2003.

FRIEDMAN, M. I.; BRUNO, J. P. Exchange of water during lactation. **Science**, v. 191, n. 4225, p. 409-410, 1976.

GALEF, B. G. The ecology of weaning. In: Parental care in mammals. **Springer**, Boston, MA, 1981. p. 211-241.

GBERARDI, F. The Oxford Companion to Animal Behaviour. **Oxford**: 1988.

GOÉS, C. P.; SAUCE, B.; PERIPATO, A. C. Milk ejection in mice LG/J x SM/J. **Mamm Genome**, v. 23 p. 770–779, 7 out. 2012.

GONÇALVES, M.A.B. et al. Comportamento e bem-estar animal: o enriquecimento ambiental. In: ANDRADE, A. et al. (Orgs.). **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica**. Rio de Janeiro. Fiocruz, p. 137-160. 2010.

GÖRTZ, N. et al. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. **Behavioural brain research**, v. 191, n. 1, p. 43-48, 2008.

GRIEBEL, G. et al. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. **Psychopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 164-170, 2000.

GRIER, J. W. Biology of Animal Behavior. St. Louis: **Times Mirror**, 1984.

GUARDINI, G. et al. Maternal behaviour in domestic dogs: a comparison between primiparous and multiparous dogs. **Dog Behavior**, v. 1, n. 1, p. 22-33, 2015.

GUÉNET, J. L. The mouse genome, **Genome Research**, v.15, p.1729-1740, 2005.

GUO, J. U. et al. Neuronal activity modifies DNA methylation landscape in the adult brain. **Nat Neurosci**, v. 14, n. 10, p. 1345–1351, 2012.

HALLER, J.; ALICKI, M. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. **Current Opinion In Psychiatry**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 59-64, jan. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/yco.0b013e32834de34f>.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403. 1934.

HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. **Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais**. Revista Científica de Medicina Veterinária, ano XIV, n. 26, jan 2016.

HANSEN, S.; FERREIRA, A. Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rat: control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. **Behavioral neuroscience**, v. 100, n. 1, p. 64, 1986.

HATTORI, S. et al. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. **Behavioural brain research**, v. 180, n. 1, p. 69-76, 2007.

HOLMES, A.; GUIQUET, A. M. L.; VOGEL, E.; MILLSTEIN, R. A.; LEMAN, S.; BELZUNG, C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 29, n. 8, p. 1335-1346, jan. 2005.

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

HRDY, S. B. Infanticide among animals: a review, classification, and examination of the implications for the reproductive strategies of females. **Ethology and Sociobiology**, v. 1, n. 1, p. 13-40, 1979.

HURNIK, J.F. Behaviour (chapter 13). In: PHILIPS, C.; PIGGINGS, D. (Eds.). **KICKHÖFEL, E.H.P. A lição de anatomia de Andreas Vesalius e a ciência moderna**. *Sci. stud.*, Set 2003, vol.1, no.3, p.389-404.

HÜTTENRAUCH, M.; SALINAS, G.; WIRTHS, O. Effects of long-term environmental enrichment on anxiety, memory, hippocampal plasticity and overall brain gene expression in C57BL6 mice. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 9, p. 62, 2016.

IMHOF, J. T. et al. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural brain research**, v. 56, n. 2, p. 177-180, 1993.

INTA, D. et al. Significant increase in anxiety during aging in mGlu5 receptor knockout mice. **Behavioural brain research**, v. 241, p. 27-31, 2013

INSEL, T. R.; CHARNEY, Dennis S. Research on major depression: strategies and priorities. **Jama**, v. 289, n. 23, p. 3167-3168, 2003.

IP, C. L. C. et al. MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 1 data release and analysis. **F1000Research**, v. 4, n. 1075, 2015.

IZIDIO, G. S. et al. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes, Brain and Behavior**, v. 4, n. 7, p. 412-419, 2005.

JAIN, M. et al. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2016.

JHA, S.; DONG, B.; SAKATA, K. Enriched environment treatment reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis and protein levels of brain-derived neurotrophic factor in mice lacking its expression through promoter IV. **Translational psychiatry**, v. 1, n. 9, p. e40, 2011.

JIMENEZ-CHILLARON, J. C. et al. Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. **Diabetes**, v. 58, n. 2, p. 460-468, 2009.

JIRKOF, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. **Journal of neuroscience methods**, v. 234, p. 139-146, 2014.

JOHNSON, M. D. et al. Single Nucleotide Analysis of Cytosine Methylation by Whole-Genome Shotgun Bisulfite Sequencing. **Current protocols in molecular biology**, v. 99, n. 1, p. 21.23. 1-21.23. 28, 2012.

JOHNSON, V.S. Aspects of placentophagy. 2019.

KALUEFF, A.V.; TUOHIMAA, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain Research Protocols**, v. 13, n. 3, p. 151-158, 2004a.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. **Journal of neuroscience methods**, v. 143, n. 2, p. 169-177, 2004b.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. **European journal of pharmacology**, v. 508, n. 1-3, p. 147-153, 2005.

KALUEFF, A. V. et al. Behavioural anomalies in mice evoked by “Tokyo” disruption of the Vitamin D receptor gene. **Neuroscience research**, v. 54, n. 4, p. 254-260, 2006.

KAWAK, C.; LEE, S. H.; KAANG, B. K. Social Isolation Selectively Increases Anxiety in Mice without Affecting Depression-like Behavior. **Korean J Physiol Pharmacol**, v.13, p.357-360, 2009.

KELLEY, Ann E. Locomotor activity and exploration. In: Techniques in the behavioral and neural sciences. **Elsevier**, 1993. p. 499-518.

KELLOGG, C. K.; BARRETT, K. A. Reduced progesterone metabolites are not critical for plus-maze performance of lactating female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 63, n. 3, p. 441-448, 1999.

KEMPERMANN, G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 235-245, 2019.

KIKUSUI T, NAKAMURA K, KAKUMA Y, YUJI M. Early weaning augments neuro-endocrine stress responses in mice. **Behav Brain Res** 175: 96–103, 2006.

KINSLEY, C. H.; LAMBERT, K. G. Reproduction-induced neuroplasticity: Natural behavioural and neuronal alterations associated with the production and care of offspring. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, n. 4, p. 515-525, 2008.

KRISTAL, M. B. Placentophagia: a biobehavioral enigma (or De gustibus non disputandum est). **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 4, n. 2, p. 141-150, 1980.

KUCZAJ, S. et al. Keeping environmental enrichment enriching. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 15, n. 2, 2002.

KURDYUKOV, S.; BULLOCK, M. DNA methylation analysis: choosing the right method. **Biology**, v. 5, n. 1, p. 3, 2016.

KURODA, K. O.; TACHIKAWA, K.; YOSHIDA, S.; TSUNEOKA, Y.; NUMAN, M. Neuromolecular basis of parental behavior in laboratory mice and rats: With special emphasis on technical issues of using mouse genetics. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, p. 1205–1231, 2011.

KUZEL, M. A. et al. 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.

LA SALLE, S.; TRASLER, J. M. Epigenetic patterning in male germ cells: importance of DNA methylation to progeny outcome. In: DE JONGE, D. J.; BARRAT, L. T. *The Sperm Cell. Production, maturation, fertilization, regeneration*. Cambridge University Press, 2006.

LAU JÚNIOR, W. A **ESCOLHA DO PARCEIRO E O INVESTIMENTO MATERNO EM FÊMEAS DE CAMUNDONGOS SM/J: UMA ABORDAGEM EPIGENÉTICA**. 2017. 46 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

LAVI-AVNON, Y. et al. Immobility in the swim test and observations of maternal behavior in lactating Flinders sensitive line rats. *Behavioural brain research*, v. 161, n. 1, p. 155-163, 2005.

LAVIOLA, G., TERRANOVA, M.L.. A mouse model of early social interactions after prenatal drug exposure: a genetic investigation. *Psychopharmacology*, v. 113, n. 3, p. 388-394, 1994.

LAVIOLA, G.; ADRIANI, W. Evaluation of Unconditioned Novelty-Seeking and d-Amphetamine-Conditioned Motivation in Mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, n. 4, p. 1011-1020, 1998.

LAVIOLA, G. et al. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p. 993-1010, 1999.
SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, v. 24, n. 4, p. 417-463, 2000.

LEE, A.; BROWN, R. Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*). **Behavioural Neuroscience**. 116: 968-975, 2002.

LEE, E. HY; TSAI, M. J.; CHAI, C. Y. Stress selectively influences center region activity of mice in an open field. **Physiology & behavior**, v. 37, n. 4, p. 659-662, 1986.

LEE, Y. K. et al. Improved reduced representation bisulfite sequencing for epigenomic profiling of clinical samples. **Biological procedures online**, v. 16, n. 1, p. 1, 2014.

LEFEBVRE, L. et al. Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. **Nature genetics**, v. 20, n. 2, p. 163, 1998.NA

LEITE-ALMEIDA, H. et al. The impact of age on emotional and cognitive behaviours triggered by experimental neuropathy in rats. **PAIN®**, v. 144, n. 1-2, p. 57-65, 2009.

LEUSSIS, M. P.; BOLIVAR, V. J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 7, p. 1045-1064, 2006.

LI, L.-L. et al. Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed Peg3. **Science**, v. 284, n. 5412, p. 330-334, 1999.

LIU, Dong et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659-1662, 1997.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**. 92:180-185. 1987.

- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac Ther.** 1990, 46:321-40.
- LISK, R. D. et al. Hormonal stimulation necessary for elicitation of maternal nest-building in the mouse (*Mus musculus*). **Animal behaviour**, v. 17, n. 4, p. 730-737, 1969.
- LIU, Y. et al. DNA methylation-calling tools for Oxford Nanopore sequencing: a survey and human epigenome-wide evaluation. **Genome biology**, v. 22, n. 1, p. 1-33, 2021.
- LONSTEIN, J. S. Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. **Hormones and behavior**, v. 47, n. 3, p. 241-255, 2005.
- LU, H.; GIORDANO, F.; NING, Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 265-279, out. 2016.
- LYNCH, C. B.; POSSIDENTE JR, B. P. Relationships of maternal nesting to thermoregulatory nesting in house mice (*Mus musculus*) at warm and cold temperatures. **Animal Behaviour**, v. 26, p. 1136-1143, 1978.
- LYNCH CB (1994) Evolutionary inferences from genetic analyses of cold adaptation in laboratory and wild populations of the house, pp.278-301 in **Quantitative Genetic Studies of Behavioral Evolution**, editado por Boake CRB. The University of Chicago Press, Chicago.
- MACRÌ, S. et al. Risk taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. **Animal Behaviour**, v. 64, n. 4, p. 541-546, 2002.
- MAGGS, J. L.; ALMEIDA, D. M.; GALAMBOS, N. L. Risky business: The paradoxical meaning of problem behavior for young adolescents. **The Journal of Early Adolescence**, v. 15, n. 3, p. 344-362, 1995.
- MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; BRANDAO, M. L. Role of resocialization and of 5-HT1A receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. **Physiology & behavior**, v. 54, n. 4, p. 753-758, 1993.
- MAGALHÃES, H. R. **Análise do padrão de metilação do gene Peg3 em diferentes regiões do cérebro de bovinos da raça Nelore**. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração: genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, p. 70, 2009.
- MAGUIRE, J.; MODY, I. GABAAR plasticity during pregnancy: relevance to postpartum depression. *Neuron*, v. 59, n. 2, p. 207-213, 2008.
- MARCOLA, TG. **INVESTIGAÇÃO DA VARIAÇÃO DA METILAÇÃO DE DNA EM MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *L.(L.) AMAZONENSIS* E *L.(L.)INFANTUM***. 2016. 102 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- MARIANO, DCB. Cobertura horizontal versus cobertura vertical: tipos de cobertura em sequenciamento genômico. In: **BIOINFO - Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**. 1. Ed. Vol. 1. Lagoa Santa: Editora Alfabelix, 2021.
- MATTERN, F. et al. Prenatal and postnatal experiences associated with epigenetic changes in the adult mouse brain. **Behavioural brain research**, v. 359, p. 143-148, 2019.
- MATTARAIA, V.G.M. Enriquecimento Ambiental. In: LAPCHICK, 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.
- MAYER, A. D.; ROSENBLATT, J. S. Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. **Hormones and Behavior**, v. 21, n. 2, p. 253-267, 1987.

- MESQUITA, R.; DUARTE, F. **Dicionário de psicologia**. Lisboa: Plátano, 1996.
- MCFARLANE, H. G.; KUSEK, G. K.; YANG, M.; PHOENIX, J. L.; BOLIVAR, V. J.; CRAWLEY, J. N. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. **Genes, Brain And Behavior**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 152-163, mar. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-183x.2007.00330.x>.
- MCKINNEY, W. T.; BUNNEY, W. E. Animal model of depression: I. Review of evidence: Implications for research. **Archives of general psychiatry**, v. 21, n. 2, p. 240-248, 1969.
- MCLEAN, J. A.; SPEAKMAN, J. R. Non-nutritional maternal support in the brown long-eared bat. **Animal Behaviour**, v. 54, n. 5, p. 1193-1204, 1997.
- MCMILLAN, F. D. Influence of mental states on somatic health in animals. **Journal-American Veterinary Medical Association**, v. 214, p. 1221-1225, 1999.
- MCMURPHY, T. et al. Implementation of environmental enrichment after middle age promotes healthy aging. **Aging (Albany NY)**, v. 10, n. 7, p. 1698, 2018.
- MEDINA, M. P. Efeitos do enriquecimento ambiental no comportamento e bem-estar de animais de laboratório convencionais. Trabalho de Graduação. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2011.
- MENEZES, H. S. Ética e pesquisa em animais. **Revista Amrigs: Simpósio sobre ética**, Porto Alegre, v. 46, n. 34, p. 105-108, jul./dez. 2002. Semestral.
- MEYZA, K. Z. et al. Age increases anxiety and reactivity of the fear/anxiety circuit in Lewis rats. **Behavioural brain research**, v. 225, n. 1, p. 192-200, 2011.
- MOFFIT TE, CASPI A, RUTTER M. Measured gene-environment interactions in psychopathology: concepts, research strategies, and implications for research, intervention, and public understanding of genetics. **Perspectives on Psychological Science** 1:5-27, 2006.
- MOLLY M. Preparation of 1.5 mg/mL Sera-mag carbolylate modified magnetic particles. **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.g2abyae>, 2017. Disponível em: https://ethanomics.files.wordpress.com/2012/08/serapure_v2-2.pdf.
- MOLENTO, C. F. M. Repensando as cinco liberdades. Curitiba: **LABEA-UFPR**, 2006.
- MONTE, B. G. O. **QTLs associados com emocionalidade em fêmeas pós parto de camundongos LG/J x SM/J**. 2012.
- MOREZZI, B. B. et al. Enriquecimento ambiental em zoológicos. **PubVet**, v. 15, p. 188, 2020.
- NADER, J. et al. Loss of Environmental Enrichment Increases Vulnerability to Cocaine Addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 7, pág. 1579-1587, 2012.
- NAKAMURA K, KIKUSUI T, TAKEUCHI Y, MORI Y. The influence of early weaning on aggressive behavior in mice. **J Vet Med Sci** 65: 1347-1349, 2003.
- NELSON, J.E.; KRAWETZ, S.A. Purification of cloned and genomic DNA by guanidine thiocyanate/isobutyl alcohol fractionation. **Analytical Biochemistry**, v.207, p.197-201, 1992.
- NELSON, W.; SCHEVING, L.; HALBERG, F. Circadian rhythms in mice fed a single daily meal at different stages of lighting regimen. **The Journal of Nutrition**, v. 105, n. 2, p. 171-184, 1975.
- NEUMANN, I. D.; TORNER, L.; WIGGER, A. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. **Neuroscience**, v. 95, n. 2, p. 567-575, 1999.

NEVES, S. M. P.; et. al. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/US. São Paulo: Universidade de São Paulo - FCF-IQ/USP, 2013.

NEWBERRY, R. C. Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 44, n. 2-4, p. 229-243, 1995.

NGUN, T.C.; GHARAMANI, N.; SÁNCHEZ, F.J.; BOCKLANDT, S.; VILAIN, E. The genetics of sex differences in brain and behavior. **Front Neuroendocrinol**, v.32, n.2, p.227-46, 2010.

NI, P. et al. DeepSignal: detecting DNA methylation state from Nanopore sequencing reads using deep-learning. **Bioinformatics**, v. 35, n. 22, p. 4586-4595, 2019.

NIELSEN, Rasmus et al. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 6, p. 443-451, 2011.

NUMAN M, NUMAN MJ, MARZELLA SR, PALUMBO A. Expression of c-fos, fos B, and egr-1 in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis during maternal behavior in rats. **Brain Research** 792: 348–352. 1998.

NOIROT, E. Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. **Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology**, v. 5, n. 4, p. 371-387, 1972.

NOLEN, G. A.; ALEXANDER, J. C. Effects of diet and type of nesting material on the reproduction and lactation of the rat. **Laboratory animal care**, v. 16, n. 4, p. 327-336, 1966.

NUMAN, M. Neural Control of Maternal Behavior. In: KRASNEGOR, N. A., BRIDGES, R. S. *Mammalian Parenting. Biochemical, Neurobiological, and Behavioral Determinants*. New York: **Oxford University Press**, p.231, 1990.

OJEDA, S. R.; URBANSKY, H. F. Puberty in the rat. In: **The Physiology of Reproduction**, 2nd edn. (Ed. by E. Knobil & J. D. Neill), pp. 363–409. New York: Raven Press, 1994.

Olazabal DE, Ferreira A (1997) Maternal behavior in rats with kainic acid–induced lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Physiology and Behavior* 61:779–784.

OLIVARES, M.C.M.F.V.; SANTOS, R. Enriquecimento Ambiental em Biotério: Avaliação da Aplicabilidade e Elaboração de Cartilha. **III Encontro Nacional de Ensino de Ciências da Saúde e do Ambiente**. Rio de Janeiro. 2012.

OLIVEIRA, G.M.; BRÜCK, M.A.; MARTINS, T.V.A. Enriquecimento Ambiental: Qual a melhor forma de utilização do Enriquecimento Ambiental para camundongos em biotério? 1 ed., 119p., Rio de Janeiro: Fiocruz, 2018.

OLSSON, I. A. S.; DAHLBORN, Kristina. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment'. **Laboratory animals**, v. 36, n. 3, p. 243-270, 2002.

Organização das Nações Unidas. Código de Nuremberg. 1949. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/bioetica/nuremcod.htm>. Acesso em: 10 abr 2022.

OSTERMEYER, M. C. The parental behaviour of the house mouse (*Mus musculus* L.). Tese de Doutorado. **Queen's University of Belfast**. 1981.

PALANZA, P.; MORLEY-FLETCHER, S.; LAVIOLA, G. Novelty seeking in periadolescent mice: sex differences and influence of intrauterine position. **Physiology & Behavior**, v. 72, n. 1-2, p. 255-262, 2001.

PANKSEPP, J. et al. Simple ethological models of depression: social-isolation induced “despair” in chicks and mice. In: OLIVIER, B.; MOS, J.; SLANGEN, J.L. *Animal models in psychopharmacology*. **Birkhäuser Verlag**, p. 161-181, 1991.

PARRA, A.; VINADER-CAEROIS, C.; MONLEON, S.; SIMÓN, V. M. Learned immobility is also involved in the forced swimming test in mice. **Psicothema**, v. 11, n. 2, p. 239 – 246, 1999.

PATTERSON, K., MOLLOY, L., QU, W., CLARK, S. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. **J. Vis. Exp.**, n. 56, e3170, 2011.

PAU, Henry; HAWKER, Kelvin; FUCHS, Helmut; ANGELIS, Martin H.; STEEL, Karen P. Characterization of a New Mouse Mutant, Flouncer, with a Balance Defect and Inner Ear Malformation, *Otology & Neurotology*, v.25, p.707-713, 2004.

PAVLIDES, Constantine; NIVÓN, Lucas G.; MCEWEN, Bruce S. Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. **Hippocampus**, v. 12, n. 2, p. 245-257, 2002.

PERIPATO, A. C. et al. Epistasis affecting litter size in mice. **Journal of evolutionary biology**, v. 17, n. 3, p. 593-602, 2004.

PERIPATO, A. C.; CHEVERUD, J. M. Genetic influences on Maternal Care. **The American Naturalist**: v. 160S, p. S173-S185, dez. 2002.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, 177, p. 245–255, 2005.

POINDRON, Pascal. Mechanisms of activation of maternal behaviour in mammals. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 341-351, 2005.

PORSOLT, R. D. et al. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977.

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/123456789/2385/9508876.pdf>>. Acesso em: 13 jun 2022.

PORTER, G.; LANE-PETTER, W. The provision of sterile bedding and nesting materials with their effects on breeding mice. **Journal of the Animal Technician Association**, v. 16, p. 5-8, 1965.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. **Eur. J. Pharmacol.** 463, 3-33.

PURBA, J. S. et al. Increased number of vasopressin-and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. **Archives of general psychiatry**, v. 53, n. 2, p. 137-143, 1996.

RAMOS, André; MORMÈDE, Pierre. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 33-57, dez. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0149-7634\(97\)00001-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0149-7634(97)00001-8).

RAMOS, André et al. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. **Behavioural brain research**, v. 96, n. 1-2, p. 195-205, 1998.

RAND, A. C. et al. Mapping DNA methylation with high-throughput nanopore sequencing. *Nature Methods*, p. 1–6, 2017.

RAYMUNDO, M. M.; GOLDIM, J. R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Revista Bioética**, v. 10, n. 1, 2009.

REARDON, L. E.; LEEN-FELDNER, E. W.; HAYWARD, C. A critical review of the empirical literature on the relation between anxiety and puberty. **Clinical psychology review**, v. 29, n. 1, p. 1-23, 2009.

RODGERS, R.J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 3, p. 289-304, 1997.

ROGERS, J; RENOIR, T; HANNAN, AJ.. Gene-environment interactions informing therapeutic approaches to cognitive and affective disorders. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 145, p. 37-48, fev. 2019.

ROSA, N. M.; MASUKI, N. S. S. ; MACHADO JUNIOR, E. L. ; ALVES, L. O. ; PERIPATO, A. C. . Enriquecimento Ambiental e a modulação da emocionalidade em camundongos fêmeas LG/J. In: XXXVIII Encontro Anual de Etologia & III Reunião de Biologia do Comportamento do Cone Sul, 2021, Juiz de Fora. **Anais do XXXVIII Encontro Anual de Etologia III Reunião de Biologia do Comportamento do Cone Sul A Etologia em um Mundo em Transformação**, 2021.

ROSENZWEIG, M. R. Environmental complexity, cerebral change, and behavior. **American Psychologist**, v. 21, n. 4, p. 321, 1966.

RUSSEL W, BURCH R. The principles of humane experimental technique. **London, Methuen**; 1959. 238p

RUSO, V. E. A., MARTIENSSEN, R. A. & RIGGS, A. D. *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury. 1996.

SAMPEDRO-PIQUERO, Patricia et al. Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. **Brain research bulletin**, v. 98, p. 1-9, 2013.

SANTANA, B. C.; PERIPATO, A. C. ; ROSA, N. M. . Parâmetros emocionais de camundongos LG/J e SM/J e sua influência no cuidado materno em suas parceiras. In: XXXIV Encontro Anual de Etologia, 2016, Jaboticabal. **Anais do Encontro Anual de Etologia**, 2016. v. 1.

SANTOS, Belmira Ferreira dos. Modelo Animal. In: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sérgio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. 20. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. Cap. 2, p. 388. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/sfwjtj>. Acesso em: 10 jun. 2022.

SAUCE, B. **Arquitetura genética do comportamento materno de construção de ninho**. Dissertação. Universidade Federal de São Carlos, 2010.

SAUCE, B.; DE BRITO, R. A.; PERIPATO, A. C. Genetic architecture of nest building in mice LG/J× SM/J. **Frontiers in Genetics**, v. 3, 2012.

SCHATZ, M. C. Nanopore sequencing meets epigenetics. **Nature methods**, v. 14, n. 4, p. 347-348, 2017.

SCOTT, N. et al. A sexually dimorphic hypothalamic circuit controls maternal care and oxytocin secretion. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 519, 2015.

SEEGAL, R. F.; DENENBERG, V. H. Maternal experience prevents pup-killing in mice induced by peripheral anosmia. **Physiology & behavior**, v. 13, n. 2, p. 339-341, 1974.

SEONG, Ho-Hyun; PARK, Jong-Min; KIM, Youn-Jung. Antidepressive effects of environmental enrichment in chronic stress-induced depression in rats. **Biological research for nursing**, v. 20, n. 1, p. 40-48, 2018.

SHEPARD, R. D. et al. Ketamine reverses lateral habenula neuronal dysfunction and behavioral immobility in the forced swim test following maternal deprivation in late adolescent rats. **Frontiers in synaptic neuroscience**, v. 10, p. 39, 2018

SHILPA, B. M. et al. Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 76, p. 88-100, 2017.

SHOJI, H. et al. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. **Molecular brain**, v. 9, n. 1, p. 11, 2016.

SHOJI, Hirotaka; MIYAKAWA, Tsuyoshi. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57 BL/6J strain maintained under a genetic stability program. **Neuropsychopharmacology reports**, v. 39, n. 2, p. 100-118, 2019.

SILVA, Nelci Lopes et al. Individual housing from rearing modifies the performance of young rats on the elevated plus-maze apparatus. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 6, p. 1391-1396, 1996.

SIMPSON, J. T. et al. Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. **Nature Methods**, v. 14, p. 1-7, 2017.

SIMPSON, Joy; KELLY, John P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural brain research**, v. 222, n. 1, p. 246-264, 2011.

SMART, J. L. Maternal behaviour of undernourished mother rats towards well fed and underfed young. **Physiology & Behavior**, v. 16, n. 2, p. 147-149, 1976.

SPARLING, Jessica E.; BARBEAU, Kheana; BOILEAU, Kayla; KONKLE, Anne T.M.. Environmental enrichment and its influence on rodent offspring and maternal behaviours, a scoping style review of indices of depression and anxiety. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [S.L.], v. 197, p. 172997, out. 2020.

SPEAR, L. P.; BRAKE, S. C. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, v. 16, n. 2, p. 83-109, 1983.

SPEAR, Linda P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, v. 24, n. 4, p. 417-463, 2000.

STERN, J. M.; JOHNSON, S. K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. **Physiology & behavior**, v. 47, n. 5, p. 993-1011, 1990.

STERU, Lucien et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

STRZELEWICZ, Arielle R. et al. Access to a high resource environment protects against accelerated maturation following early life stress: A translational animal model of high, medium and low security settings. **Hormones and behavior**, v. 111, p. 46-59, 2019.

TAKAMATSU, A. T. **Aloamentação em cobaias *Cavia porcellus***. Dissertação de mestrado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

TANAKA, M. et al. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. **European journal of pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 397-406, 2000.

THORVALDSDÓTTIR, H.; ROBINSON, J. T.; MESIROV, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. **Briefings in bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 178-192, 2013.

TORO, C., A.; AYLWIN, C., F.; LOMNICZI, A. Hypothalamic epigenetics driving female puberty. **Journal of neuroendocrinology**, v. 30, n. 7, p. e12589, 2018.

UK PUBLIC GENERAL ACTS. **The Cruelty to Animals Act**. 39 & 40 Vict. Ch. 77. Reino Unido: 15 agosto 1876. Disponível em: <https://www.legislation.gov.uk/ukpga/Vict/39-40/77/enacted>. Acesso em: 06 junho 2022.

- URIARTE, Natalia et al. Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive functions in male and female rats. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, v. 49, n. 5, p. 451-462, 2007.
- VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American journal of psychology**, p. 103-111, 1970.
- VAN DE WEERD, H. A. et al. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. **Laboratory animals**, v. 31, n. 2, p. 133-143, 1997.
- VAN HASSELT, F. N. et al. Maternal care received by individual pups predicts hippocampal glucocorticoid receptor expression and dentate synaptic plasticity later in life. **Hippocampus**, v. 22, p. 255-266, 2012.
- VAN PRAAG, Henriette; KEMPERMANN, Gerd; GAGE, Fred H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 191-198, 2000.
- VAN WAAS, M.; SOFFIÉ, M. Differential environmental modulations on locomotor activity, exploration and spatial behaviour in young and old rats. **Physiology & behavior**, v. 59, n. 2, p. 265-271, 1996.
- WARTELLA, J. et al. Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. **Physiology & behavior**, v. 79, n. 3, p. 373-381, 2003.
- WEAVER, Ian CG et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847-854, 2004.
- WEBER, Elin M.; OLSSON, I. Anna S. Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: an ethological review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, n. 1-2, p. 1-22, 2008.
- XU, M.; HILL, J. W.; LEVINE, J. E. Attenuation of luteinizing hormone surges in neuropeptide Y knockout mice. **Neuroendocrinology**, v. 72, n. 5, p. 263-271, 2000.
- XU, L; SEKI, M. Recent advances in the detection of base modifications using the Nanopore sequencer. **Journal of human genetics**, v. 65, n. 1, p. 25-33, 2020.
- ZEHR, Julia L. et al. Dendritic pruning of the medial amygdala during pubertal development of the male Syrian hamster. **Journal of neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 578-590, 2006.
- ZILLER, Michael J. et al. Coverage recommendations for methylation analysis by whole-genome bisulfite sequencing. **Nature methods**, v. 12, n. 3, p. 230, 2015.
- ZULUAGA, M; AGRATI, D; PEREIRA, M; URIARTE, N; A FERNANDEZGUASTI,; A FERREIRA,. Experimental anxiety in the black and white model in cycling, pregnant and lactating rats. **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 84, n. 2, p. 279-286, 15 fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.12.004>.

APÊNDICE A

Manuscrito aceito para publicação na revista *Biological Models Research and Technology*

TESTE DE PREFERÊNCIA ENTRE ENRIQUECIMENTOS AMBIENTAIS PARA PROMOÇÃO DO BEM-ESTAR DE FÊMEAS LG/J

Environmental enrichment preferences for female LG/j mice

Rosa, N. M.^{1,2}; Masuki, N.S.S.^{1,3} & Peripato AC¹

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

²Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

³Curso de graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

RESUMO

A experimentação animal permite estudos avançados na pesquisa básica e aplicada nas mais diferentes áreas. A utilização de animais ainda se faz necessária para obtenção de respostas biológicas desconhecidas, principalmente utilizando animais modelo como o camundongo. No entanto, para que a pesquisa seja realizada de forma satisfatória, faz-se necessário seguir procedimento éticos, utilizando o princípio humanitário dos 3 Rs: *Reduce* (Redução), *Refine* (Refinamento) e *Replace* (Substituição) e buscando o bem-estar animal. Nessa perspectiva, o presente trabalho investigou, por meio de teste de preferência, o enriquecimento ambiental selecionado por fêmeas de camundongos da linhagem LG/J. Assim, fêmeas (n=18) em diferentes fases de desenvolvimento (Púberes, Adultas Virgens e Adultas) foram submetidas a dois diferentes tipos de enriquecimentos ambientais: Bateria 1. nidificação (papel toalha e algodão); Bateria 2. abrigo/proteção (rolo de papelão e rolo de PVC). No primeiro contraste (Bateria 1), a preferência das fêmeas, de todas as fases, foi pelo material algodão. No segundo contraste (Bateria 2), houve consenso entre as fêmeas de todas as fases pela escolha do rolo de papelão. No contraste final (Bateria 3), foi testada a preferência das fêmeas pelos enriquecimento escolhidos nas baterias anteriores, o algodão e o rolo de papelão. O enriquecimento ambiental escolhido, pela maioria das fêmeas Púberes, Adultas Virgens e Adultas, foi o rolo de papelão. Esse enriquecimento parece oportuno, pois pode permitir o abrigo/proteção, principalmente para as fêmeas Púberes, mas também pode ser utilizado, quando rasgado, como material de nidificação, importante para

termorregulação e na maternidade. Além de ser versátil e de fácil adequação para utilização em biotérios, o rolo de papelão é de baixo-custo e pode proporcionar o bem-estar dos animais de laboratório.

Palavras-chave: Rolo de papel; enriquecimento ambiental, camundongo, construção de ninho.

ABSTRACT

Animal experimentation allows advanced studies in basic and applied research in the most different areas. The use of animals is still necessary to obtain unknown biological responses, especially using animal model such as mice. However, for the research to be carried out satisfactorily, it is necessary to follow ethical procedures, principally by using the humanitarian principle (Reduce, Refine and Replace) and looking for animal welfare. This paper investigated, by using preference test, the environmental enrichment selected by female LG/J mice. Thus, females (n=18) in different stages of development (Pubescent, Virgins Adults, and Adults) were exposed to two different types of environmental enrichment: 1. Nesting-kind (paper towel and cotton); 2. Shelter/Protection-kind (cardboard roll and PVC roll). In the first contrast, the preference for females, of all phases, was for the cotton. In the second contrast, there was a consensus among the females of all stages for choosing the cardboard roll. In the final contrast, the preference of females for the enrichment chosen in the previous batteries, cotton, and cardboard rolls, was tested. The environmental enrichment chosen by most Pubescent, Virgin Adults, and Adults females, was the cardboard roll. This enrichment seems appropriate, as it may allow shelter/protection, especially for pubescent females, but it may

also be used, when ripped, as nesting material, important source for thermoregulation and maternity. In addition, it is not only versatile, and easy to adapt for use in animal facilities, but also is low-cost and can provide the well-being of laboratory animals.

Keywords: Cardboard roll; environmental enrichment; mouse; nest building; nestability.

INTRODUÇÃO

O avanço científico em pesquisa básica e aplicada, na saúde animal e humana, tem como uma de suas peças-chave a utilização de experimentação animal¹. Muitos animais modelos têm sido estudados, e o camundongo representa um organismo de grande interesse biomédico e para pesquisa em geral, uma vez que possui facilidade no cruzamento, intervalos curtos de gerações e disponibilidade de muitas linhagens especializadas e caracterizadas geneticamente, com sintenia com outros mamíferos². No entanto, condutas apropriadas na criação e experimentação tem sido almejada e investigada pela comunidade científica.

Um questionamento importante, no que tange a utilização de animais em pesquisa, seria suas barreiras éticas, ao utilizar animais sencientes. Apesar de diversas posições referentes ao termo, desde atribuições a capacidade de sentir dor, baseada na analogia com a estruturas humanas³, à capacidade do organismo em perceber e responder aos estímulos externos, possuindo algum grau de consciência⁴, essa inquietação ética delineou novas posturas na condução de experimentação animal. Vale ressaltar que, ao utilizar a vivisseção (“cortar vivo”) de um animal com finalidade de observar fenômenos fisiológicos ou anatômicos, surgiram movimentos de oposição a atividades envolvendo experimentação animal⁵. Um grande marco na reflexão sobre utilização de animais na pesquisa, foi o estabelecimento do princípio dos 3Rs: *Reduce* (Redução), *Refine* (Refinamento) e *Replace* (Substituição)⁶, em que sugere a redução do número de animais por experimento, o refinamento de técnicas e procedimentos e a substituição dos animais por modelos de experimentação não sensíveis⁷. No Brasil, em 1979 foi implementada a Lei da Vivisseção (Lei 6.638/79) que autorizava a vivisseção apenas com o uso de anestesia e em centros de pesquisa com supervisão especializada⁵. Revogando essa lei, foi elaborado um novo conjunto de regras para criação e utilização de vertebrados em

atividades de ensino e pesquisa em 1995, sancionado em 2008, na Lei 1.153/2008, conhecido como “Lei Arouca”, em referência a seu proponente, o sanitarista e deputado Sérgio Arouca. Sob a vigência dessa lei, foram institucionalizadas Comitês de Ética no Uso de Animais (CEUAs) em cada centro de pesquisa, assim como o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), o órgão responsável por assuntos referentes ao uso e experimentação com animais na pesquisa científica⁸.

Com o progresso das pesquisas com animais, surgiram novas abordagens e conceitos passaram a ser aprimorados. Dentre eles, a procura pelo bem-estar animal, cujo consenso entre sua definição está a incorporação de três questões centrais: Esfera física (relacionada ao desenvolvimento físico e biológico), comportamental/naturalidade (proximidade com ambiente natural para exercer comportamentos típicos) e mental (livre de estresse)⁹. A utilização de apenas uma das esferas parece inapropriada, portanto, o ideal seria a união das três ao se utilizar a experimentação animal. Assim, agrupando todas as esferas, a abordagem de utilização de Enriquecimento Ambiental (EA) pode tornar as condições de alojamento mais complexas¹⁰, proporcionar oportunidades do animal exercer comportamentos espécie-específicos¹¹ e atender as necessidades básicas dos animais, de forma que amenize os efeitos indesejados de animais de laboratório¹². Embora possa haver resistência ao uso do EA, em relação às possíveis alterações na rotina dos biotério ou na obtenção de resultados, a introdução de enriquecimento, como materiais de nidificação e abrigo, mostrou promover o bem-estar sem afetar resultados experimentais ou perda de comparabilidade entre estudos¹³. Isso sugere que é possível adequar o ambiente do biotério para que haja a complementariedade de todas as esferas relacionadas ao bem-estar.

Adequando-se ao bem-estar, a oferta de enriquecimentos que possam ser utilizados não somente como desafios para desestressar os animais de laboratório, mas que os possibilite explorá-los para seu conforto ou enfrentamento de situações de risco, podemos categorizar dois tipos de Enriquecimento Ambiental: relacionados a nidificação e a abrigo/proteção. No primeiro caso, a construção de ninho é um comportamento de termorregulação usual em roedores adultos¹⁴, mesmo sendo típico na fase materna¹⁵ e, materiais para sua construção permitem

edificar construções elaboradas que trarão melhor conforto ao animal^{16,17}. Para abrigo/proteção, enriquecimentos que possam contribuir nesse sentido podem auxiliar na divisão de recintos, comportamento comum em roedores, em que tendem a designar diferentes áreas em seu ambiente, como por exemplo espaço para alimentação e excreção¹⁸. Portanto, uma das estratégias para designar o melhor enriquecimento ambiental atribuído a uma linhagem/espécie animal, seria a apresentação de diferentes enriquecimentos em um teste de preferência¹⁹. Essa exposição pode permitir identificar objetos de EA que realmente funcionarão como estímulos para o bem-estar e que não serão possíveis fatores de estresse. Assim, o presente trabalho investigou, por meio de teste de preferência, o enriquecimento ambiental selecionado por fêmeas de camundongos da linhagem LG/J, para definir o melhor enriquecimento a ser utilizado em nosso grupo de pesquisa em experimentos subsequentes. O estudo verificou a preferência das fêmeas, em diferentes fases da vida (puberdade, adultas virgens e adultas com experiência sexual/materna), quanto a dois diferentes tipos de enriquecimentos ambientais: nidificação e abrigo/proteção.

MODELO BIOLÓGICO

No presente estudo, a experimentação animal teve como alvo camundongos (*Mus musculus*) da linhagem LG/J (Linhagem #: 000675, nome comum: Large). Em 2015, a primeira geração dessa linhagem foi importada do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, EUA) e, a partir de então, tem sido mantida no Biotério do Laboratório de Genética do Comportamento do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos *campus* São Carlos. Os camundongos são mantidos em rack ventilada (Alesco - SP), alimentados *ad libitum* com ração autoclavável para roedores (Nuvilab, Colombo - RS) e água filtrada autoclavada, em maravalha autoclavada (pinus – JR Maravalha, Paulínia-SP). As gaiolas possuem a dimensão de 30 cm x 19 cm (comprimento x largura). A sala é mantida à 22°C±2 °C em ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 6 horas da manhã). Todos os animais são manuseados pela manhã, em fluxo laminar, em ambiente com circulação controlada, em que o manuseador está paramentado com toca, máscara, luvas, jaleco e pró-pé.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição de conduta com os animais

Para a criação/manutenção da linhagem LG/J, os animais foram alocados em gaiolas sexo-específicas, com até cinco (5) animais por gaiola. Os cruzamentos foram organizados em duplas macho/fêmea em animais após a sétima semana de vida. Após a detecção da prenhez, o macho foi separado da fêmea, em que foi monitorada até o nascimento dos filhotes. Uma semana após o parto, os filhotes foram pesados, identificados e desmamados na terceira semana de vida. Da primeira a sétima semana os animais foram pesados semanalmente. Após alcançado os objetivos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus órgãos (fígado, baço, rins, coração e cérebro) foram retirados, pesados e armazenados em ultra freezer, para utilização em procedimentos laboratoriais moleculares.

Crítérios de amostragem e formação de grupos

Foram delineados três grupos idade-específicos diferentes de fêmeas LG/J (n=18): G1 – Púberes (3 a 5 semanas de vida; n=6), G2 - Adultas virgens (8 a 10 semanas de vida sem experiência sexual, n=6) e G3 - Adultas (8 a 10 semanas de vida, todas com uma experiência sexual, resultando em um parto com ninhada normal, n=6). A formação dos grupos objetivou investigar se havia preferência por certo tipo de EA em janelas específicas da fase de vida das fêmeas. Consequentemente, o EA que fosse de fácil aceitação seria adotado como padrão pelo nosso grupo de pesquisa, que trabalha com cuidado materno e emocionalidade, buscando o bem-estar animal.

O tamanho amostral foi determinado utilizando a abordagem de Equação de Recursos (*Resource Equation Approach*)²⁰. Como teríamos seis opções de EA (vide Figura 1), o resultado obtido foi de um tamanho mínimo de 16 e máximo de 20 animais totais a serem utilizados para que os objetivos do presente trabalho fossem alcançados. Utilizando o princípio humanitário dos 3Rs, optamos por utilizar 18 animais.

Teste de Preferência pelo Enriquecimento Ambiental

A avaliação da preferência dos animais aos enriquecimentos ambientais fez-se com a utilização do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI), baseado em OLIVEIRA *et al.*²¹. O equipamento foi construído artesanalmente, e consistiu em duas gaiolas/ambientes (30cm (comprimento)x19cm (largura), Alesco,

Atibaia/SP) interligados por um tubo de PVC (4 polegadas) que permitia a passagem livre do animal entre os dois ambientes. O equipamento foi higienizado com solução à base de Cloreto de Benzalcônio (HerbalVet, Ourofino) e etanol 70% e a base das gaiolas foi coberta por maravalha autoclavada (*pinus* – JR Maravalha, Paulínia/SP), higienizada e substituída a cada uso.

A adaptação ao equipamento e os testes foram realizados na área de experimentação do biotério, no período da manhã (das 07:00h às 11:00). Previamente, os animais foram apresentados ao equipamento sem os objetos de enriquecimento, somente com maravalha, por três dias consecutivos, durante 15 minutos, para adaptação. Os animais sempre foram colocados no ambiente à esquerda (ambiente A), para início da adaptação. No dia do teste definitivo, o animal foi apresentado ao equipamento, nas mesmas condições que no período da adaptação, porém, com os enriquecimentos posicionados em cada ambiente, e a conduta da fêmea foi filmada por 60 minutos. Ao final, os animais foram devolvidos às respectivas gaiolas.

Foram realizadas três diferentes exposições em três baterias de teste de preferência: Bateria 1 - tipo nidificação (papel e algodão), Bateria 2 - tipo abrigo/proteção (rolo de papelão e rolo de PVC no mesmo tamanho) e Bateria 3 - Resultado final (resultado da preferência do enriquecimento tipo nidificação e resultado da preferência do enriquecimento tipo abrigo/proteção). Vale ressaltar que o papel utilizado foi o Inter folha natural (20cm x 21 cm). O algodão foi o material prensado, em quadrados (Sussex) e o rolo de papelão foi utilizado os que compõe o interior do papel higiênico comercial (10cm (comprimento) x 4 cm (diâmetro)). Esses itens foram esterilizados por autoclavagem. Os tubos de PVC tinham a mesma dimensão do rolo de papelão (10cm (comprimento) x 4 cm (diâmetro)) e foram higienizados por solução à base de Cloreto de Benzalcônio e posterior aplicação de etanol 70%). O delineamento final pode ser resumido na Figura 1.

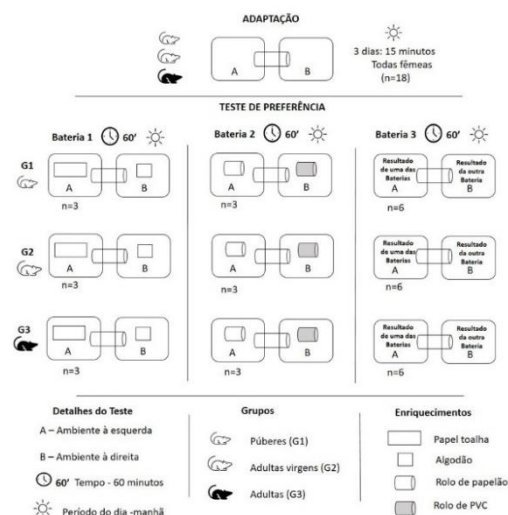


Figura 1. Delineamento experimental.

As 18 fêmeas foram agrupadas da seguinte maneira: G1 - Púberes (n=6), G2 - Adultas virgens (n=6) e G3 - Adultas (n=6). A primeira bateria envolveu a utilização de escolha entre enriquecimentos envolvidos com a nidificação dos animais, ou seja, o papel toalha e algodão (Figura 2). Ela foi realizada nas fêmeas de todas os grupos (n=3/grupo).



Figura 2. Disposição da bateria de testes. A: Enriquecimento Ambiental do tipo nidificação. Em todos os testes da bateria o papel toalha estava disposto no ambiente à esquerda e o algodão à direita; B: Enriquecimento Ambiental do tipo abrigo/proteção. Em todos os testes da bateria o rolo de papelão estava disposto no ambiente à esquerda e o rolo de PVC à direita; C: Enriquecimento Ambiental do tipo abrigo/proteção preferido pela maioria das fêmeas da Bateria 2 (rolo de papelão) disposto no ambiente à esquerda e o EA do tipo nidificação preferido pela maioria das fêmeas

da Bateria 1 (algodão) à direita. Os enriquecimentos foram mantidos no ambiente que estavam nas baterias prévias.

A segunda bateria testou as fêmeas de todos os grupos (n=3/grupo) entre a escolha dos enriquecimentos associados com abrigo/proteção, o rolo de papelão e rolo de PVC (Policloreto de Vinila) (Figura 2).

A terceira bateria foi delineada para ser realizada entre os enriquecimentos escolhidos de nidificação e os de abrigo/proteção. Assim, as seis fêmeas de cada grupo foram testadas para escolha entre os enriquecimentos selecionadas nas Baterias 1 e 2.

Análise dos dados

As gravações do teste de preferência foram analisadas por meio do Programa de Registro Comportamental *X-Plo-Rat*, 2005 (<http://www.oocities.org/xplorat/>). As preferências pelo ambiente e pelo enriquecimento ambiental foram calculadas baseadas em Zinck e Lima²². Resumidamente:

- a. O tempo/frequência de interação dos animais com os diferentes ambientes foram avaliados como:

$$\text{Preferência Ambiente} = \frac{\text{Frequência ambiente A ou B}}{\text{Soma da Frequência nos ambientes A e B}}$$

sendo ambiente A, o ambiente à esquerda do Sistema de Gaiolas interligadas, e o ambiente B o local à esquerda do equipamento.

Vale ressaltar que para os animais adaptados ao equipamento é esperado que a frequência seja proporcional em ambos os ambientes A e B. No entanto, a diferença será a presença do Enriquecimento Ambiental (EA). Assim, o tempo e frequência de interação com o EA que irá refletir a preferência.

- b. O tempo e frequência de interação dos animais com os diferentes Enriquecimentos Ambientais (EA) foram avaliados como:

$$\text{Preferência EA} = \frac{\text{Tempo ou Frequência interação EA/ambienteA ou EA/ambienteB}}{\text{Soma Tempo ou Frequência de interação de ambos os objetos}}$$

sendo ambiente A, o ambiente à esquerda do Sistema de Gaiolas interligadas, e o ambiente B o local à esquerda do equipamento.

O ambiente e/ou enriquecimento que tiveram interação do animal por no mínimo 60% do tempo e acima de 60% das vezes foi considerado o escolhido por ele. Os dados para cada grupo foram avaliados e o enriquecimento com o maior número de animais que o escolheu foi considerado o preferido. Todas as atividades desenvolvidas nesse trabalho foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSCar (CEUA nº 7096180319).

RESULTADOS

Teste de Preferência pelo Enriquecimento Ambiental

Adaptação ao equipamento

A adaptação ao equipamento foi importante para que os animais estivessem familiarizados ao ambiente e não fosse um fator de equívoco na obtenção da preferência pelo EA. Na realização do teste de preferência, essa adaptação pôde ser mensurada pela frequência similar das fêmeas em ambos os ambientes, independente dos enriquecimentos ofertados. Estes resultados podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência relativa de ambulação das fêmeas pelos ambientes do Sistema de Gaiolas Interligadas.

Fase	Ambiente	Bateria 1	Bateria 2	Bateria 3
G1 - Púberes	A	0,504	0,497	0,504
	B	0,496	0,503	0,496
G2 - Adultas virgens	A	0,506	0,520	0,522
	B	0,494	0,480	0,496
G3 - Adultas	A	0,485	0,478	0,485
	B	0,515	0,521	0,515

Ambiente A refere-se ao ambiente à esquerda do Sistema de Gaiolas Interligadas e Ambiente B o ambiente à direita ao equipamento.

Verificamos que em todas as baterias, as fêmeas, independente das fases de vida, ambularam similarmente (~50% das vezes) nos dois ambientes do Sistema de Gaiolas Interligadas.

Preferências pelo Enriquecimento Ambiental

Ao contrastarmos a preferência das fêmeas por enriquecimentos associados a nidificação (papel ou algodão) e abrigo/proteção (rolo de papelão ou rolo de PVC), o tempo e a frequência de interação com esses objetos podem ser visualizados na Tabela 2

Tabela 2. Duração e frequência relativa da interação das fêmeas com todos os enriquecimentos ambientais, das Baterias 1 e 2.

Grupos	EA	Duração Relativa	Frequência Relativa
G1 - Púberes – Bateria 1	Algodão	0,545	0,552
	Papel	0,455	0,448
G1 - Púberes – Bateria 2	Rolo papelão	0,583	0,577
	Rolo PVC	0,417	0,423
G2 - Adultas virgens -Bateria 1	Algodão	0,608	0,608
	Papel	0,391	0,392
G2 - Adultas virgens -Bateria 2	Rolo papelão	0,664	0,676
	Rolo PVC	0,335	0,324
G3 - Adultas - Bateria 1	Algodão	0,535	0,483
	Papel	0,464	0,517
G3 - Adultas - Bateria 2	Rolo papelão	0,753	0,670
	Rolo PVC	0,247	0,330

EA significa Enriquecimento Ambiental. Duração Relativa é o tempo que os animais interagiram com o EA, e a frequência é o número de vezes de interação com o EA.

Na Tabela 2, os resultados reuniram todas as fêmeas de cada grupo. No entanto, cada fase analisada apresentava três fêmeas e os resultados individuais podem ser verificados na Figura 3.

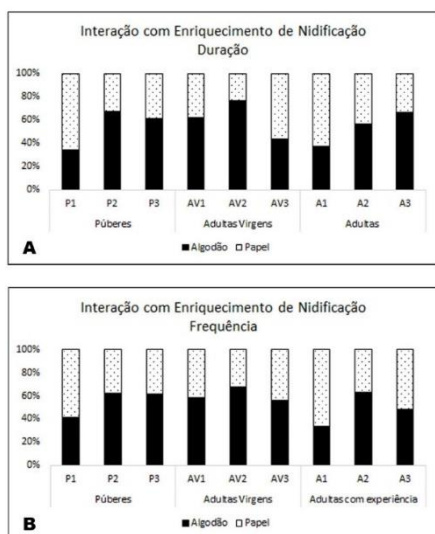


Figura 3. Interação das fêmeas das diferentes fases com os enriquecimentos relativos à nidificação: algodão e papel. Em A observamos os resultados relativos à duração de cada fêmea com os respectivos enriquecimentos; em B observamos a frequência relativa de cada fêmea com os enriquecimentos. P significa Púbere, AV significa Adultas Virgens, e A significa Adultas. A numeração (1, 2 e 3) refere-se a cada fêmeas de casa grupo.

Como pode ser observado na Figura 3, pelo menos duas em cada três das fêmeas de

cada grupo apresentaram interação maior ou igual a 60% em tempo (duração) e número de vezes (frequência) com o algodão, enriquecimento de nidificação.

Ao analisarmos a interação com o enriquecimento relacionado a abrigo/proteção, os dados gerais podem ser verificados na Tabela 2, e os dados individuais, por grupos, podem ser visualizados na Figura 4.

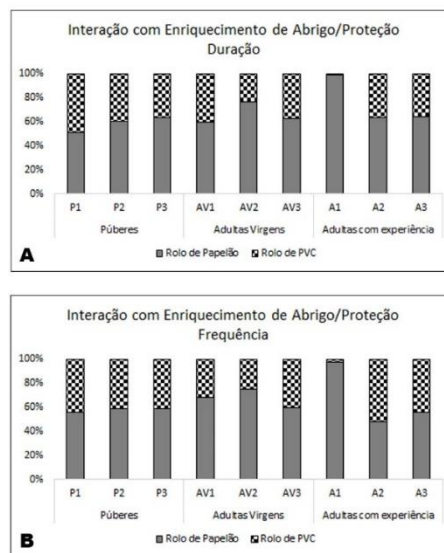


Figura 4. Interação das fêmeas das diferentes fases com os enriquecimentos relativos à abrigo/proteção: Rolo de papelão e Rolo de PVC. Em A observamos os resultados relativos à duração de cada fêmea com os respectivos enriquecimentos; em B observamos a frequência relativa de cada fêmea com os enriquecimentos. P significa Púbere, AV significa Adultas Virgens, e A significa Adultas. A numeração (1, 2 e 3) refere-se a cada fêmeas de casa fase.

Os resultados de interação com enriquecimentos de abrigo/proteção revelaram a preferência de pelo menos duas em cada três fêmeas, em cada fases, pelo rolo de papelão. Assim sendo, as Baterias 1 e 2 revelaram como enriquecimentos preferidos na categoria de nidificação, o algodão e, na categoria abrigo/proteção, o rolo de papelão.

Para elegermos o enriquecimento ambiental final de preferência, de nidificação ou abrigo, os enriquecimentos algodão e rolo de papelão foram disponibilizados no equipamento no mesmo ambiente que ocupavam no teste prévio (Figura 2) e foi realizada a Bateria 3 do teste de Preferência.

No contraste final entre os enriquecimentos escolhidos, rolo de papelão e algodão, verificamos a preferências das fêmeas, em todas as fases, para um único

enriquecimento, conforme pode ser verificado na Tabela 3 e Figura 5.

Tabela 3. Duração e frequência relativa da interação das fêmeas com os enriquecimentos ambientais finais, algodão e rolo de papelão (Bateria 3)

Grupos	EA	Duração Relativa	Frequência Relativa
G1 - Púberes	Rolo de papelão	0,596	0,564
	Algodão	0,404	0,436
G2 – Adultas Virgens	Rolo de papelão	0,628	0,561
	Algodão	0,372	0,439
G3 - Adultas	Rolo de papelão	0,680	0,631
	Algodão	0,320	0,369

EA significa Enriquecimento Ambiental. Duração Relativa é o tempo que os animais interagiram com o EA e a frequência é o número de vezes que os animais interagiram.

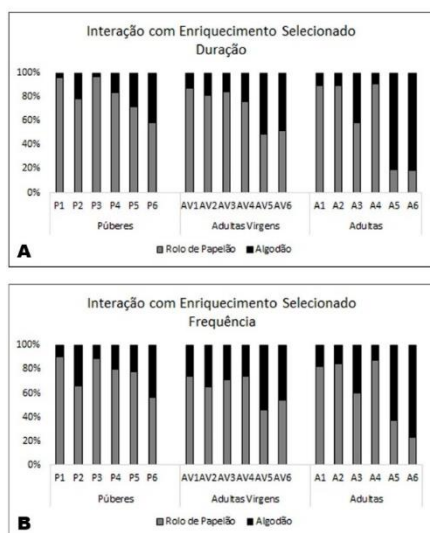


Figura 5. Interação das fêmeas das diferentes fases com os enriquecimentos selecionados nas Baterias 1 e 2: Rolo de papelão e Algodão. Em A observamos os resultados relativos à duração de cada fêmea com os respectivos enriquecimentos; em B observamos a frequência relativa de cada fêmea com os enriquecimentos. P significa Púbere, AV significa Adultas Virgens, e A significa Adultas. A numeração (1, 2, 3, 4, 5 e 6) refere-se a cada fêmeas de casa fase.

Tanto a duração quanto a frequência relativa indicam que as fêmeas, independente das fases, ambularam e permaneceram mais tempos interagindo com o enriquecimento ambiental associado a abrigo/proteção. Ao verificarmos os dados individuais, as fêmeas púberes, adultas virgens e adultas, em sua maioria, interagiram mais que 60% do tempo e das vezes com o enriquecimento de rolo de papelão.

DISCUSSÃO

A experimentação animal requer critérios rígidos para que possa ser conduzida e mesmo replicada por diferentes grupos de pesquisa. Ambientes novos tendem a gerar alterações emocionais em animais, e para que os resultados possam ser confiáveis, todos os elementos que não são esperados precisam ser controlados. A habituação indica que a experiência passiva e recorrente de novos estímulos promove um processo psicológico de redução da resposta a esses estímulos²³, sendo essencial em avaliações cognitivas²⁴. No presente trabalho, as fêmeas foram expostas ao Sistema de Gaiolas Interligadas para adaptação ao equipamento. A redução de respostas à novidade do ambiente por aclimatação de no mínimo três dias já é suficiente para que os animais retornem as suas condições fisiológicas²⁵. Aqui, nas baterias de testes de preferência 1, 2 e 3, verificamos que as visitas entre os dois ambientes foram equivalentes, sugerindo que as fêmeas estavam adaptadas, e que somente a interação com os enriquecimentos seria o elemento destoante para avaliar a preferência.

A exposição aos diferentes enriquecimentos em ambientes já conhecidos permitiu avaliar a preferência das fêmeas por vários materiais. O EA tipo nidificação permitem aos camundongos construírem seus ninhos como se estivessem em seu ambiente natural. Os materiais, algodão e papel toalha, escolhidos para avaliar a preferência dos animais na Bateria 1, além de serem baratos e de fácil manipulação e troca durante a higienização das caixas, são absorventes, podem ser autoclavados e não oferecem risco aos neonatos. A oferta de material para construção de ninho é algo desejável em camundongos pois permite a criação de microambientes, nos quais podem construir e manipular seus ninhos para aconchegar-se, controlar sua temperatura corporal, umidade e condições de luminosidade^{16,17}. Ambos os materiais oferecidos permitiam que fossem desfiados/rasgados e usados para a criação de ninhos e, dessa forma, que os animais estruturassem seus microambientes. No contraste entre o algodão e o papel toalha, a grande vantagem do algodão (material de nidificação preferido pelas fêmeas em todas as fases) frente ao papel, parece ser a capacidade de moldar o ninho da forma desejada. Isto porque, a natureza do material de nidificação oferecido não é tão importante quanto a sua estrutura, que determina a *nestability*, ou seja,

a capacidade de encaixe e manipulação do material²⁶.

Os tubos de papelão e PVC fazem jus a sua categoria, proporcionando sua utilização como abrigo e permitindo proteção, principalmente, às condições de luminosidade do ambiente. A oferta de enriquecimentos como tubos pré-fabricados podem não melhorar o bem-estar animal se eles não forem motivados a realizar atividades espécies-específicas²⁷, principalmente a construção de ninhos, não sendo o caso deste trabalho, pois havia a presença de maravalha, material também usado para o preparo do ninho. Contudo, os tubos poderiam servir para outros fins como por exemplo, refúgio ou separar o microambiente destinado à excreção¹⁸. Mesmo assim, o EA preferido pelos animais foi o rolo de papelão. É possível que a vantagem do rolo de papelão sobre o de PVC tenha sido devido à sua *nestability*²⁶, pois poderia ser rasgado e utilizado também para moldar seus ninhos. O rolo de papelão também possui a vantagem de, como no caso do algodão e papel toalha, serem de fácil manipulação e troca durante a higienização das caixas. Embora ambos os objetos ofereçam a possibilidade de exploração como escalar e passar através, é possível que a versatilidade do rolo de papelão, como um material que também pode ser manipulado, tenha influenciado na escolha das fêmeas.

As vantagens relativas ao rolo de papelão parecem prevalecer às do algodão. Como verificado na Bateria 3, entre o enriquecimento que possibilite abrigo/proteção (rolo de papelão), mas que também permita a utilização como material de construção de ninho, comparado ao que disponibiliza somente material para a construção de ninho (algodão), as fêmeas escolheram o primeiro. Como os enriquecimentos ambientais são medidas utilizadas para prevenção de estresse e doenças correlatas, eles têm uma das funções essenciais, que é motivar os animais a desempenhar padrões comportamentais espécie-específicos, e assim, em conjunto podem alcançar o bem-estar animal²⁸. O rolo de papelão parece alcançar esses objetivos, pois, além de ser material de abrigo e ninho, permite oportunidades para exploração e locomoção (como subir no tubo, por exemplo). Apesar de ter a disponibilidade de apenas uma escolha, a combinação de materiais é um dos comportamentos observados em animais, para construção de ninhos mais estruturados e complexos²⁶. No presente estudo, uma das fêmeas (adultas) inicia a transferência de

algodão para o ambiente com o rolo de papelão (Figura 6), indicando uma possível preferência para a combinação de materiais. Estudos adicionais seriam necessários para corroborar essa observação. Mas o fato é que todas as fêmeas também dispunham de maravalha para combinar com o material do rolo de papelão.



Figura 6. Possível combinação de material para construção de ninho. Fêmea adulta transfere algodão para o ambiente B, no qual está presente o rolo de papelão.

O contraste entre as fases de vida das fêmeas e a preferência entre os enriquecimentos ambientais ofertados revelaram que todas as fases tiveram a mesma preferência para o tipo de enriquecimento. Impreterivelmente, as fêmeas púberes, adultas virgens e adultas, tiveram como resultado no teste de preferência o rolo de papelão. Sabe-se que o envelhecimento apresenta efeitos em diversos aspectos biológicos, incluindo alterações no desempenho cognitivo²⁹, e na emocionalidade^{30,31}. À vista disso, era esperado que as fêmeas apresentassem diferenças na preferência com relação as diferenças de idade e experiências de vida, como a maternidade. Sabe-se muito sobre os impactos do enriquecimento em diferentes fases de vida e a influência em diversos aspectos biológicos, incluindo fisiológicos e comportamentais^{32,33}, mas a escolha frente a diferentes fases e experiências de vida ainda não foi bem documentada. Em nosso grupo de pesquisa, verificamos diferenças entre a utilização do rolo de papelão nas diferentes fases de desenvolvimento das fêmeas (dados não publicados). Os exemplos podem ser visualizados na Figura 7, em que as fêmeas púberes utilizam o enriquecimento como abrigo/proteção e atividades exploratórias (Figura 7.a.), as adultas virgens utilizam parcialmente como abrigo/proteção e como ninhos (Figura 7.b), e a mães o utilizam para construção de ninho (Figura 7.c).

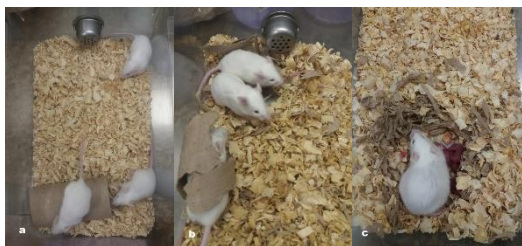


Figura 7. Utilização do rolo de papelão nas diferentes fases de desenvolvimento das fêmeas LG/J. Em a, temos as fêmeas púberes; em b as fêmeas adultas virgens; em c, as fêmeas em fase materna (dados não publicados).

Dessa forma, a escolha das fêmeas pelo rolo de papelão parece ter sido influenciada pela versatilidade do enriquecimento, já que o mesmo pode ser utilizado de diferentes maneiras: como refúgio, abrigo para as condições de luminosidade, permite exploração como escalar o tubo, se locomoverem por dentro e além disso, permite ser roído/rasgado para ser combinado à maravalha (sempre presente na caixa) para a construção de ninhos mais estruturados, além da versatilidade ao longo das fases de desenvolvimento dos animais.

A procura pelo bem-estar animal dever ser prática comum na experimentação animal. A utilização de elementos ao ambiente do animal de laboratório, que busque motivação e outras consequências favoráveis, deve ser testada, para que não seja um fator estressante a mais a esse animal. Apesar de termos utilizado um tamanho amostral reduzido, pois o estudo tinha intuito de apontar uma escolha para que outros experimentos fossem desenvolvidos em nosso laboratório, esse resultado se mostrou favorável e o rolo de papelão tem sido utilizado como enriquecimento ambiental em experimentos de nosso grupo de pesquisa.

CONCLUSÃO

A implementação de enriquecimentos ambientais pode trazer grande contribuição ao bem-estar animal. Diversos modelos de enriquecimento podem ser utilizados para esse fim, no entanto, antes da exposição definitiva, é recomendado o uso de testes de preferência para verificar a real escolha dos animais. Neste trabalho, o algodão foi o objeto de nidificação preferido entre as fêmeas LG/J possivelmente devido a sua capacidade de estruturação de ninhos (*nestability*). E o objeto de abrigo/proteção preferido foi o rolo de papelão, que quando contrastado com o algodão, também foi o preferido para todas as

fêmeas nas diferentes fases analisadas (Púbere, Adultas virgens e Adultas). Como visto em trabalhos do nosso grupo de pesquisa, o rolo de papelão permite ser utilizado de diferentes formas conforme a necessidade dos animais e a fase de vida em que estão, por exemplo, podem utilizar para estruturar o recinto, ou também, seus ninhos. Dessa forma, além da versatilidade ser uma das principais características do rolo de papelão, pois pode ser usado como abrigo/proteção tanto como material para construção de ninhos, também é um objeto de fácil acesso, permite autoclavagem, é atóxico e de baixo custo. Os resultados deste trabalho também permitiram o desenvolvimento de novas pesquisas do grupo utilizando o rolo de papelão como enriquecimento ambiental, e principalmente embasar a investigação das diferenças de preferência e utilização de enriquecimentos em diferentes fases de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento da bolsa de mestrado de NMR e ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) pela bolsa de iniciação científica (PIBIC/UFSCar) de NSSM. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2013/22339-0. Aos servidores da UFSCar, Antônio Donizetti Aparecido da Silva (Tonim) e Luiz Henrique da Silva (Piau), pela construção do Sistema de Gaiolas Interligadas. À equipe do Biotério do Laboratório de Genética de Comportamento: Lindomar de Oliveira Alves e Edgar Lima.

REFERÊNCIAS

- ¹Franco NH. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals (Basel)*. 2013, 3:238-273.
- ²Lyon Mf, Rastan S, Brown, SDM. *Genetic variants and strains of the laboratory mouse*. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford; 1996.1840 p.
- ³Luna SPL. Dor, senciência e bem-estar em animais. *Ciênc Vet Tróp*. 2008 11(1):17-21.
- ⁴Broom DM. Welfare assessment and relevant ethical decisions: key concepts. *Annu Rev Biomed Sci*. 2008 10:79-90.
- ⁵ Salles MR. Vivisseção: Legislação acerca do tema e direito à objeção de consciência. *RVS* 2017 5(1): 27.
- ⁶ Russel W, Burch R. *The principles of humane experimental technique*. London, Methuen; 1959. 238p.

- ⁷ Neves SMP, Mancini Filho J, Menezes EW. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: Universidade de São Paulo - FCF-IQ/USP; 2013. 216p.
- ⁸ Guimarães MV, Freire JECM, Bezerra LM. Utilização de animais em pesquisa: breve revisão da legislação no Brasil. *Rev. Biot.* 2016 24:217-224.
- ⁹ Fraser D. *Understanding Animal Welfare: The science in its cultural context.* Wiley-Blackwell: Oxford; 2008. 324 p.
- ¹⁰ Medina MP. Efeitos do enriquecimento ambiental no comportamento e bem-estar de animais de laboratório convencionais [Trabalho de Conclusão de Curso]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária; 2011.
- ¹¹ Yerkes RM. *Almost human.* Century Company; 1925. 278p.
- ¹² Fischer ML, Rodrigues GS, Aguero WP, Zotz R, Simão-Silva DP. Refinement as ethics principle in animal research: Is it necessary to standardize the Environmental enrichment in laboratory animals? *An Acad Bras Cienc Mar.* 2021 93(1): e20191526.
- ¹³ André V, Gau C, Scheideler A, Aguilar-Pimentel JA, Amarie OV, Becker L, Garrett L, et al. Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. *PLoS Biol.* 2018 16(4):e2005019.
- ¹⁴ Weber EM, Olsson AIS. Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: an ethological review. *Appl Anim Behav Sci.* 2008 114:1–22.
- ¹⁵ Lynch CB. Evolutionary inferences from genetic analyses of cold adaptation in laboratory and wild populations of the house. In: Boake CRB. *Quantitative Genetic Studies of Behavioral Evolution.* The University of Chicago Press, Chicago; 1994. p. 278-301.
- ¹⁶ Baumans V. The laboratory mouse. In: Poole T. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals.* 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. v.1, p. 282-312.
- ¹⁷ Koolhaas JM. The laboratory rat. In: Poole T. *The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals.* 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. v.1, p.313-330.
- ¹⁸ Baumans, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR Journal.* 2005 46(2):162-70.
- ¹⁹ Kuzel MAA, Oliveira FS, Demarque KC, Rangel JÁ, Rodrigues FVB, Batista WS, et al. Estudo da hierarquia de camundongos Swiss Webster através do uso de Sistemas com Gaiolas Interligadas (SGI). *RESBCAL.* 2013 2 (1):49-60.
- ²⁰ Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays J Med Sci.* 2017;24(5):101–105.
- ²¹ Oliveira G, Brück M, Veronez T. *Enriquecimento Ambiental: qual a melhor forma do enriquecimento ambiental para camundongos em biotério?* 1a. ed. Fiocruz; 2018. 120p.
- ²² Zinck L, Lima SQ. Mate choice in *Mus musculus* is relative and dependent on the estrous state. *PLoS One.* 2013 8 (6):e66064.
- ²³ Sanderson DJ, Bannerman DM. The role of habituation in hippocampus-dependent spatial working memory tasks: evidence from GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice. *Hippocampus.* 2012 22 (5):981-94.
- ²⁴ Longordo F, Fan J, Steimer T, Kopp C, Lüthi A. Do mice habituate to "gentle handling?" A comparison of resting behavior, corticosterone levels and synaptic function in handled and undisturbed C57BL/6J mice. *Sleep.* 2011 34(5):679-81.
- ²⁵ Lapchik VBV, Mattaraia VGM, KO GM. *Cuidados e manejo de animais de laboratório.* São Paulo: Atheneu; 2009. 708p.
- ²⁶ Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Laboratory animals.* 1997 31(2):133-143.
- ²⁷ Sherwin CM. The influence of standard laboratory cages on rodents and the validity of research data. *Anim Welf.* 2004 13(1):9-15.
- ²⁸ Olsson IAS, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Anim.* 2002 36(3):243-270.
- ²⁹ Mora-Gallegos A, Rojas-Carvajal M, Salas S, Saborío-Arce A, Fornaguera-Trías J, Brenes J. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial memory and

- neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem.* 2015 118:96-104.
- ³⁰Meyza KZ, Boguszewski PM, Nikolaev E, Zagrodzka J. Age increases anxiety and reactivity of the fear/anxiety circuit in Lewis rats. *Behav Brain Res.* 2011 225(1):192-200.
- ³¹Inta D, Vogt MA, Luoni A, Filipovic D, Lima-Ojeda JM, Pfeiffer N, et al. Significant increase in anxiety during aging in mGlu5 receptor knockout mice. *Behav Brain Res.* 2013 241:27-31.
- ³²Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci.* 2004 20(5):1341-1347.
- ³³Kempermann G. Activity dependency and aging in the regulation of adult neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 7.11:a018929.

ANEXO A

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Enriquecimento Ambiental e a modulação da emocionalidade, cuidado materno e metilação de genes em camundongos fêmeas LG/J.", protocolada sob o CEUA nº 5335140519 (ID 001222), sob a responsabilidade de **Andréa Cristina Peripato e equipe; Natalia Marques Rosa; Nathália Sayuri Servulo Masuki ; Edgar de Lima Machado Junior; Reinaldo Otávio Alvarenga Alves de Brito** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 29/05/2019.

We certify that the proposal "Environmental Enrichment and the modulation of emotionality, maternal care and gene methylation in females mice LG/J.", utilizing 100 Isogenics mice (100 females), protocol number CEUA 5335140519 (ID 001222), under the responsibility of **Andréa Cristina Peripato and team; Natalia Marques Rosa; Nathália Sayuri Servulo Masuki ; Edgar de Lima Machado Junior; Reinaldo Otávio Alvarenga Alves de Brito** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 05/29/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2019 a 03/2021** Área: **Genética E Evolução**

Origem: **Biotério Externo**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **3 a 16 semanas**

N: **100**

Linhagem: **LG/J**

Peso: **6 a 40 g**

Local do experimento: Biotério do Laboratório de Genética de Comportamento

São Carlos, 29 de maio de 2019

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

ANEXO B

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Teste de preferência a diferentes enriquecimentos ambientais em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 7096180319 (ID 001206), sob a responsabilidade de **Andréa Cristina Peripato e equipe; Natália Marques Rosa; Natália Sayuri Servulo Masuki; Edgar de Lima Machado Junior; Reinaldo Otávio Alvarenga Alves de Brito** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 14/05/2019.

We certify that the proposal "Preference test for different environmental enrichment in mice", utilizing 18 Isogenics mice (18 females), protocol number CEUA 7096180319 (ID 001206), under the responsibility of **Andréa Cristina Peripato and team; Natália Marques Rosa; Natália Sayuri Servulo Masuki; Edgar de Lima Machado Junior; Reinaldo Otávio Alvarenga Alves de Brito** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 05/14/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [04/2019](#) a [09/2019](#) Área: [Genética E Evolução](#)

Origem:	Biotério Externo	sexo:	Fêmeas	idade:	3 a 10 semanas	N:	18
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	6 a 19 g		
Linhagem:	LG/j						

Local do experimento: Os experimentos serão conduzidos no Biotério do Laboratório de Genética de Comportamento do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos.

São Carlos, 14 de maio de 2019

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos