

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

EDGAR DE LIMA MACHADO JUNIOR

**INFLUÊNCIA TRANSGERACIONAL DO ENRIQUECIMENTO
AMBIENTAL NOS ASPECTOS FENOTÍPICOS E EPIGENÉTICOS
EM FÊMEAS DE *MUS MUSCULUS* DA LINHAGEM LG/J**

SÃO CARLOS - SP

2022

EDGAR DE LIMA MACHADO JUNIOR

INFLUÊNCIA TRANSGERACIONAL DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NOS ASPECTOS FENOTÍPICOS E
EPIGENÉTICOS EM FÊMEAS DE MUS MUSCULUS DA LINHAGEM LG/J

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna, da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em conservação da fauna.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Cristina Peripato

São Carlos-SP

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Edgar de Lima Machado Junior, realizada em 31/10/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato (UFSCar)

Profa. Dra. Samira Chahad Ehlers (UFSCar)

Prof. Dr. Bruno Rafael Santos de Cerqueira (UFABC)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha mãe pelo apoio dado durante toda minha vida.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe, Maria de Jesus Costa, pelo apoio incondicional no meu desenvolvimento acadêmico, sem ela não teria conseguido concluir essa dissertação, sou grato pelo seu carinho e amor ofertado e pelas inúmeras mensagens de apoio e incentivo no âmbito pessoal e profissional.

Não poderia de deixar de agradecer minha orientadora Prof^a. Dr^a. Andréa Cristina Peripato pela oportunidade, paciência, ensinamentos, dedicação e acima de tudo pelo enorme incentivo para que eu realizasse e concluísse a dissertação frente diversos momentos de adversidades.

Gostaria de agradecer a todo o corpo do Laboratório de Genética do Comportamento da Universidade Federal de São Carlos, por me ensinarem a rotina de manejo do biotério, pelos momentos compartilhados de conhecimento, pelo suporte nas partes práticas desse estudo e por sempre estarem a disposição quando precisei.

Gostaria de agradecer a minha colega de mestrado Pâmela Modena e seu marido Raphael Carletti, o suporte e carinho de ambos no meu período morando em São Carlos foi fundamental.

Agradeço a Joyce Veita e Lucas Melchiori pela ajuda dada para meu retorno a São Paulo e pelo apoio resultante da suspensão da bolsa de estudo por consequência da pandemia.

Sou grato a Kimberlly Brito, pois seus conselhos foram essenciais para eu buscar ajuda quanto a minha saúde mental, sem isso, não teria tido forças para a conclusão do estudo.

Não posso deixar de agradecer às amigas que me deram suporte emocional, me incentivaram e estiveram ao meu lado durante essa fase. Amo cada um de vocês.

Gostaria de agradecer a todos os professores do PPGCFau pelas disciplinas ofertadas e conhecimentos divididos.

Agradeço à Comissão de Pós-Graduação da UFSCar, ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna e à Fundação Parque Zoológico de São Paulo pela oportunidade.

RESUMO

Atualmente, usado largamente em zoológicos e aquários, além de estar sendo aderido em biotérios, o enriquecimento ambiental visa permitir que o animal cativo expresse seus comportamentos espécie-específico, melhorando sua qualidade de vida. Intrínseco à emocionalidade se tem o cuidado materno, pois uma fêmea para cuidar satisfatoriamente da sua prole precisa estar em ótimas condições fisicamente e emocionalmente. Quando pensamos nos mamíferos, é sabido que o cuidado materno tem bases genéticas complexas e é suscetível à interferência de fatores do ambiente. Resultado da interação indivíduo-ambiente, a epigenética compreende mudanças moleculares no DNA e proteínas histonas, que são passíveis de serem herdadas, não modificam a sequência do DNA e podem sofrer reversibilidade. Esse estudo teve por objetivo verificar a influência do enriquecimento ambiental de modo transgeracional em fêmeas de *Mus musculus* LG/J sobre os aspectos da emocionalidade e cuidado materno. As fêmeas estudadas foram divididas em quatro grupos e nunca tinham sido expostas ao enriquecimento ambiental, sendo elas: fêmeas filhas de mães que foram expostas ao enriquecimento ambiental da fase púbere à materna, fêmeas filhas de mães que nunca foram expostas ao enriquecimento ambiental, fêmeas filhas de mães que foram submetidas ao enriquecimento ambiental na fase materna e fêmeas filhas de mães que foram expostas ao enriquecimento ambiental apenas na fase materna. A emocionalidade foi analisada pelos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e nado forçado. O cuidado materno foi analisado pelas posturas da mãe em construir ninho, realizar a placentofagia, ofertar leite aos filhotes, ter o comportamento de agressividade contra intrusos e pela manutenção do tamanho de ninhada nascida. Os resultados mostraram que fenotipicamente não foram herdadas as influências do enriquecimento ambiental na emocionalidade e cuidado materno, com as fêmeas oriundas de mães não enriquecidas tendo maior sucesso reprodutivo e uma menor taxa de ansiedade. O estudo mostrou que nesse caso o enriquecimento ambiental deve ser aplicado continuamente, logo, se uma geração foi enriquecida a descendência não pode ser privada de tal mecanismo que visa melhorar o bem-estar animal.

Palavras-chave: emocionalidade; enriquecimento ambiental; epigenética; cuidado materno; descendência; *Mus musculus*; camundongo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Delineamento da formação dos grupos de estudo	26
Figura 2 - Equipamento Campo Aberto	27
Figura 3 - Equipamento Labirinto em Cruz Elevado	28
Figura 4 - Recipiente utilizado no teste de nado forçado	29
Figura 5. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase púbere, na região central e periférica do Campo Aberto.	31
Figura 6. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase reprodutiva, na região central e periférica do Campo Aberto.	32
Figura 7. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase materna, na região central e periférica do Campo Aberto.	33
Figura 8. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase pós-desmame, na região central e periférica do Campo Aberto	34
Figura 9. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase púbere, nos braços aberto e fechados do Labirinto em Cruz Elevado.	36
Figura 10. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase reprodutiva, nos braços aberto e fechados do Labirinto em Cruz Elevado.	37
Figura 11. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase materna, nos braços aberto e fechados do Labirinto em Cruz Elevado.	38
Figura 12. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase pós-desmame, nos braços aberto e fechados do Labirinto em Cruz Elevado	39
Figura 13. Duração e frequência relativa de mobilidade e imobilidade das fêmeas, na fase púbere, no teste de Nado forçado.	43
Figura 14. Duração e frequência relativa de mobilidade e imobilidade das fêmeas, na fase reprodutiva, no teste de Nado forçado.	44
Figura 15 Duração e frequência relativa de mobilidade e imobilidade das fêmeas, na fase materna no teste de Nado forçado.	45
Figura 16. Duração e frequência relativa de mobilidade e imobilidade das fêmeas, na fase pós-desmame, no teste de Nado forçado	45

Figura 17. Diferença entre o tipo de mãe comparada dentre os grupos de estudo.	48
Figura 18. Comportamento de placentofagia entre as fêmeas dos grupos estudados	50
Figura 19. Amamentação dos filhotes, verificada entre grupos.	51
Figura 20. Postura materna de agressividade contra intrusos	52
Figura 21. Comportamento de construção de ninho verificado pela sua altura	53
Figura 22. Tamanho de ninhada entre os grupos estudados	55

LISTA DE SIGLAS

CA – Campo aberto

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DRAD: Duração relativa nos braços abertos fase pós-desmame

DRAM: Duração relativa nos braços abertos fase materna

DRAP: Duração relativa nos braços abertos fase púbere

DRAR: Duração relativa nos braços abertos fase reprodutiva

DRCD: Duração relativa no centro fase pós-desmame

DRCM: Duração relativa no centro fase materna

DRCP: Duração relativa no centro fase púbere

DRCR: Duração relativa no centro fase reprodutiva

DRFD: Duração relativa nos braços fechados fase pós-desmame

DRFM: Duração relativa nos braços fechados fase materna

DRFP: Duração relativa nos braços fechados fase púbere

DRFR: Duração relativa nos braços fechados fase reprodutiva

DRIMD: Duração relativa imobilidade fase pós-desmame

DRIMM: Duração relativa imobilidade fase materna

DRIMP: Duração relativa imobilidade fase púbere

DRIMR: Duração relativa imobilidade fase reprodutiva

DRMD: Duração relativa mobilidade fase pós-desmame

DRMM: Duração relativa mobilidade fase materna

DRMP: Duração relativa mobilidade fase púbere

DRMR: Duração relativa mobilidade fase reprodutiva

DRPD: Duração relativa na periferia fase pós-desmame

DRPM: Duração relativa na periferia fase materna

DRPP: Duração relativa na periferia fase púbere

DRPR: Duração relativa na periferia fase reprodutiva

EA – Enriquecimento Ambiental

FRAD: Frequência relativa nos braços abertos fase pós-desmame

FRAM: Frequência relativa nos braços abertos fase materna

FRAP: Frequência relativa nos braços abertos fase púbere

FRAR: Frequência relativa nos braços abertos fase reprodutiva

FRCD: Frequência relativa no centro fase pós-desmame

FRCM: Frequência relativa no centro fase materna

FRCP: Frequência relativa no centro fase púbere

FRCR: Frequência relativa no centro fase reprodutiva

FRFD: Frequência relativa nos braços fechados fase pós-desmame

FRFM: Frequência relativa nos braços fechados fase materna

FRFP: Frequência relativa nos braços fechados fase púbere

FRFR: Frequência relativa nos braços fechados fase reprodutiva

FRIMD: Frequência relativa imobilidade fase pós-desmame

FRIMM: Frequência relativa imobilidade fase materna

FRIMP: Frequência relativa imobilidade fase púbere

FRIMR: Frequência relativa imobilidade fase reprodutiva

FRMD: Frequência relativa mobilidade fase pós-desmame

FRMM: Frequência relativa mobilidade fase materna

FRMP: Frequência relativa mobilidade fase púbere

FRMR: Frequência relativa mobilidade fase reprodutiva

FRPD: Frequência relativa na periferia fase pós-desmame

FRPM: Frequência relativa na periferia fase materna

FRPP: Frequência relativa na periferia fase púbere

FRPR: Frequência relativa na periferia fase reprodutiva

LCE – Labirinto em cruz elevado

NF – Nado forçado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	CAMUNDONDO	14
1.2	ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	15
1.3	EMOCIONALIDADE	18
1.4	CUIDADO MATERNO	20
1.5	EPIGENÉTICA	21
2	OBJETIVOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	ANIMAIS	24
3.2	ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL (EA)	25
3.3	TESTES DE COMPORTAMENTO PARA AVALIAR EMOCIONALIDADE	27
3.3.1	Emocionalidade	27
3.3.2	Campo aberto (CA)	27
3.3.3	Labirinto em cruz elevado (LCE)	28
3.3.4	Nado forçado (NF)	29
3.4	CUIDADO MATERNO	29
3.5	ANÁLISE DE DADOS	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	CUIDADO MATERNO	31
4.2	EMOCIONALIDADE	47
	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A intervenção do ser humano no globo tem sido tão impactante e veloz no meio ambiente, que simplesmente as espécies não estão tendo a capacidade de acompanhar e se adaptar as alterações existentes (REZENDE, 2014; FELIPPE; ADANIA, 2014; PATRIOTA, 2018). Como resultado da maior ação antrópica no planeta, diversas espécies animais passaram a ter dificuldade e até mesmo impossibilidade de manterem seus ciclos de vida e hábitos originais, comprometendo a sua sobrevivência e ocasionando extinções (FRANCISCO; SILVEIRA, 2013). Por esse motivo, a manutenção e reprodução de espécies animais em um ambiente cativo são excelentes estratégias que se somam à conservação *in situ* (FRANCISCO; SILVEIRA, 2013). Além disso, os animais em cativeiro podem auxiliar em pesquisas, elaboração de *studbooks* e manuais de cuidado, servirem de banco genético, auxiliarem em programas de reprodução, entre outros (CONWAY, 2003; WAZA, 2005; FRANCISCO; SILVEIRA, 2013).

A manutenção de animais em cativeiro tem sido uma prática para as mais diversas finalidades, desde ações ligadas à conservação das espécies até pesquisas experimentais com uso de animais (DEL-CLARO, 2004). No campo científico, a utilização de animais de laboratório tem sua relevância para o desenvolvimento de pesquisas e aplicações da ciência básica, a ciência aplicada nas mais diversas áreas (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Foi durante os séculos XVI e XVIII que se tornou mais comum no continente Europeu a experimentação animal (FEIJÓ; BRAGA; PITREZ, 2010). O uso de animais em pesquisas foi fundamental para a conclusão de estudos científicos que levaram a inúmeras descobertas, podendo-se citar como exemplos o desenvolvimento de vacinas, uso terapêutico de antibióticos, utilização de fármacos antidepressivos e anestésicos, desenvolvimento de técnicas de transplantes de órgãos, entre outros (PAIXÃO; SCHRAMM, 1999; FAGUNDES; TAHA, 2004; FEIJÓ, 2005). Entre os animais utilizados na experimentação podemos citar os camundongos, que são pequenos mamíferos amplamente utilizados modelos para estudo em seres humanos e outros mamíferos.

1.1 Camundongo

O camundongo é uma espécie cosmopolita adaptada a uma elevada gama de condições ambientais (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). A espécie comumente utilizada em biotérios e pesquisas em geral é *Mus musculus*, da Classe *Mammalia*, da Ordem *Rodentia*, da Família *Muridae*, Sub-família *Murinae*, Gênero *Mus* (SANTOS, 2002). Esses animais são sociáveis e curiosos, possuem pequeno porte, corpo fusiforme e flexível, uma cauda sem pelos e (MOREIRA et al., 2005; POOLE, 1987).

Os camundongos possuem um olfato altamente desenvolvido, que pode ser usado para detecção de alimentos e predadores, além de ser utilizado na determinação de diversos sinais comportamentais entre a espécie. Eles criam padrões de deposição de urina, para demarcar com seu odor o território e para reconhecimento, tanto individual quanto do grupo (RIVIERA, 2009). A audição responde a uma grande variedade de frequências e a visão não distingue cores, pois há poucos cones em sua retina (RIVERA, 2009). Apresentam hábito noturno e realiza a maior parte dos seus comportamentos sociais e reprodutivos no escuro, além de expressar fortemente comportamentos característicos como a construção de ninhos e alojamento em tocas (ALCOCK, 1993; GALLEF et al., 1993; SUCKOW et al., 2001).

Ao nascimento, os filhotes não possuem pelos e a pele apresenta um tom avermelhado (linhagens albinas), que possibilita visualizar o leite no estômago dos filhotes após sua alimentação. Eles possuem olhos e pavilhão auricular fechados e orelhas aderidas à cabeça (KO, 2009). Por volta do terceiro e quarto dia de vida, a pele dos filhotes vai clareando no caso dos *Mus musculus* albinos e há o surgimento dos pelos (SANTOS, 2002). No quarto dia ocorre o desprego da orelha de forma total do crânio, com o pavilhão auricular se abrindo aproximadamente aos doze dias. Com sete a oito dias após o nascimento o corpo do animal já está coberto pela pelagem típica da linhagem. Os dentes superiores e os inferiores rompem a gengiva com dez e onze dias respectivamente e os olhos se abrem após o décimo segundo dia (MOREIRA et al., 2005). O desmame ocorre entre o vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dia após o nascimento (SANTOS, 2002; MOREIRA et al., 2005).

Reprodutivamente, a fêmea possui ciclo estral de quatro a cinco dias de duração e são poliéstricas, com ovulação espontânea, aproximadamente oito a onze

horas após o início do estro, cio pós-parto e gestação com dezenove a vinte um dias de duração (KO, 2009). Com vinte e quatro dias de vida, fêmeas de *Mus musculus* tem a abertura vaginal e o primeiro cio podem ocorrer (CUNLIFFE-BEAMER; LES, 1987).

Atualmente, sabe-se que a sensibilidade do animal é semelhante à do ser humano quando se refere à dor, instinto de sobrevivência, tristeza e memória (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2013). Hoje se sabe que animais condicionados em ambientes enriquecidos são modelos mais apropriados para extrapolar resultados experimentais para seres humanos do que animais criados em ambientes extremamente artificiais (AUGUSTSSON; VAN DE WEER; KRUITWAGEN; BAUMANS, 2003; VAN DE WEERD; VAN LOO; VAN ZUTPHEN; KOOLHAAS; BAUMANS, 1997; WÜRBEL, 2001).

1.2 Enriquecimento ambiental (EA)

A terminologia enriquecimento ambiental (EA) foi cunhado por Robert Yerkes em 1925. O psicólogo identificou a partir de uma série de estudos de observação que o desenvolvimento e instalação de determinados aparatos no ambiente de animais cativos resultou na oportunidade de os mesmos expressarem reações saudáveis no ambiente que estavam inseridos (YERKES, 1925; GARCIA; BERNAL, 2015; OLIVEIRA; BRÜCK; MARTINS, 2018). Segundo Yerkes (1925), o animal mantido em cativeiro deve pelo menos ter a possibilidade de se expressar positivamente frente a aparatos e invenções colocados em seu recinto, quando eles não têm a chance de exercerem seus comportamentos naturais. Posteriormente Hediger (1950; 1969), reforçou a significância do ambiente social e físico de animais em cativeiro bem como seu efeito no bem-estar.

Pode-se definir enriquecimento ambiental como uma alteração no meio em que vivem os animais em cativeiro, proporcionando-lhes oportunidades de expressarem seus comportamentos naturais, ou seja, a chance de demonstrarem seus comportamentos espécie-específico e, desta maneira, aumentar o grau de bem-estar (SOCIEDADE MUNDIAL DE PROTEÇÃO ANIMAL, 2003; GNADT, 2006; MATTARARIA, 2009; VAN DE WEERD; BAUMANS, 1995). O enriquecimento ambiental estipula ações que objetivam aprimorar o ambiente, considerando questões ligadas ao bem-estar atreladas à restrição do comportamento nos sistemas de alojamento (OLSSON; DAHLBORN, 2002).

O ambiente natural se encontra em contínua mudança, fazendo com que os organismos se adaptem aos novos cenários (PATRIOTA, 2018). Os animais em vida livre estão em atividade constante, como, por exemplo a busca por alimento, parceiros para reprodução e fuga de predadores (PATRIOTA, 2018). Já o ambiente em cativeiro tem uma mutabilidade de cenário extremamente menor, além de proporcionar um menor dinamismo quando comparado com o ambiente natural (BERESCA, 2014). Assim, o EA, pelo aumento na complexidade no ambiente cativo, promove o comportamento espécie-específico dos animais em resposta ao dinamismo do ambiente, seja encontrando o alimento, demarcando território, construindo ninhos, interagindo com outros da mesma espécie, entre outros (RUMBAUGH et al., 1989; SNOWDON; SAVAGE, 1989; MILLER et al., 1990; SHEPHERDSON, 1994; FRANCISCO; SILVEIRA, 2013).

Sendo uma série de medidas que alteram o ambiente físico ou social, o enriquecimento ambiental promove situações que possibilitam os animais em cativeiro exercer suas demandas etológicas, resultando em uma melhora na qualidade de vida, bem como permitindo a aferição do bem-estar, tendo em consideração as implicações do ambiente no crescimento e desenvolvimento (BOERE, 2001; LINE, 1987). Um enriquecimento ambiental precisará resultar no acréscimo da frequência de comportamentos naturais para a espécie e/ou à redução de outros considerados anormais e estereotipados, através da diminuição ou até mesmo eliminação de fatores de *stress* e frustração ou pela estimulação de comportamentos novos (MASON et al., 2007).

Para traçar as estratégias de EA, é necessário entender a complexidade comportamental da espécie em questão, além de levar em consideração a história e repertório natural do animal, idade, sexo e rotina (HUTCHINSON. AVERY; VANDEWOUDE, 2005; POOLE; DAWKINS, 2006; BOERE, 2001; MEEHAN; MENCH, 2007). Além disso, é essencial compreender os motivos que ocasionam determinado comportamento indesejável (VELOSO, 2017).

Não podendo ser considerado uma ferramenta opcional e leviana, o enriquecimento ambiental necessita suprir às necessidades comportamentais do indivíduo para o qual é ofertado (POOLE; DAWKINS, 2006). O uso do enriquecimento ambiental deve, antes de tudo, estabelecer uma meta a ser atingida com a implantação desse manejo, pois sem direcionamento, pode haver resultados

pouco satisfatórios (OLIVEIRA; BRUCK; VERONEZ, 2018). Para evitar efeitos negativos oriundos da aplicação dessas técnicas, deve-se levar em conta que o excesso de estimulação e estímulos inadequados podem levar o animal a sofrer de alergias, ingestão, geração de reações adversas e comportamentos estereotípicos (BERESCA, 2014; VELOSO, 2017; WELLS, 2009; VEEDER; TAYLOR, 2009; POOLE; DAWKINS, 2006). Uma maneira de avaliar os tipos de enriquecimento é realizando testes de preferência, pois assim é possível identificar quais aparatos chamam mais a atenção dos animais e quais são desinteressantes ou até potencialmente danosos (MATTARAIA, 2009; CHMIEL; NOONAM, 1996; VAN DE WEERD; BAUMANS, 1995). E para a perpetuação do interesse dos animais pelas novidades apresentadas, o EA necessita ter um cronograma aleatório, incentivando a capacidade adaptativa (BERESCA, 2014).

Atualmente as técnicas de enriquecimento ambiental podem ser classificadas em cinco grupos (NASCIMENTO; SANTOS; ALMEIDA, 2011; BERESCA, 2014): EA físico (objetiva a alteração do ambiente, reduzindo na medida do possível, as limitações da restrição de espaço, utilizando-se de objetos de distração ou alteração na estrutura do local, as modificações podem ser permanentes ou temporárias); cognitivo (tem como finalidade promover situações motivadoras recorrendo-se a desafios ou jogos com conseqüências recompensadoras quando a resolução do desafio é satisfatória); alimentar (consiste na alternância da maneira em que é ofertada a dieta, variações dos tipos de alimentos oferecidos e alterações nos horários e frequência de alimentação. A alteração na maneira como a alimentação é ofertada somada a imprevisibilidade no período da alimentação promovem a repetibilidade de comportamentos mais naturais); social (engloba a socialização dos animais, seja de forma direta ou indireta. Esse tipo de enriquecimento tem relevância principalmente quando ofertado a animais sociais); e sensorial (promove estímulos em um ou mais fatores que compõem os cinco sentidos e leva em consideração a ideia de que, em vida livre, os animais estão expostos continuamente a uma diversidade de estímulos) (SOCIEDADE MUNDIAL DE PROTEÇÃO ANIMAL, 2003; GONÇALVES et al., 2010; HONES; MARIN, 2006; BAUMANS, 2005; WELLS, 2009; YOUNG, 2003; CARLSTEAD et al. 1991; GILBERT-NORTON et al., 2009).

Sendo adotado mais fortemente pelos zoológicos na década de 1970 e hoje sendo uma peça fundamental para o bem-estar animal em zoológicos e aquários, o enriquecimento ambiental ainda não é largamente usado em biotérios, já que o EA representa um acréscimo na rotina diária de manejo, além do que, os espaços em que os animais de biotério vivem normalmente são locais pobres do ponto de vista estrutural, prática essa justificada pela uniformização ambiental, facilitação na rotina de manutenção e manejo e especialmente pela necessidade da reprodutibilidade dos resultados científicos obtidos (OLSSON; DAHLBORN, 2002; OLIVEIRA; BRÜCK; VERONEZ, 2018). Porém é inegável que o uso do enriquecimento ambiental em biotérios está se difundindo (OLIVEIRA; BRÜCK; VERONEZ, 2018). Regulamentações para a utilização de animais na pesquisa tiveram inícios na década de 1980, em nosso país, apenas em 2008 foi sancionada a Lei 1.153/2008, com os conjuntos de regras para a criação e utilização de animais em ensino e pesquisa. Em 2016, o Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica passou a dedicar um capítulo dedicado a orientar sobre estratégias de enriquecimento ambiental em biotérios para roedores e lagomorfos, após a RN nº 33, de 18 de novembro de 2016 (OLIVEIRA; BRÜCK; VERONEZ, 2018; BRASIL, 2016b), e, buscar do bem-estar dos animais em biotério.

O ambiente enriquecido e a inserção de ferramentas que burilem o cativeiro são considerados como práticas de suma importância para a emocionalidade dos animais, devido à diminuição de reações adversas ou agressivas e as alterações na rotina diária são medidas competentes para estimular e melhorar o desempenho psicológico, o físico e o bem-estar dos animais em cativeiro (BOERE, 2001; COE, 1985).

1.3 Emocionalidade

A emocionalidade refere-se a alterações comportamentais as quais são seguidas por elevada atuação do sistema nervoso simpático (ARCHER, 1973). Tal termo é usado para descrever uma diversidade de fatores complexos ligados com o estado de ser emocional, além da suscetibilidade ao *stress* (WALLACE; ROSEN, 2000; HALL, 1934).

Um dos componentes que compõe a emocionalidade é a ansiedade, sendo esse um dos mais relevantes (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972). Esse comportamento, comumente acompanhado do aumento da excitabilidade do tônus muscular e do aumento da pressão arterial, frequência respiratória e cardíaca, além da dilatação da pupila, relaciona-se a uma avaliação de uma situação de risco (ameaça em potencial), mas que pode ser engatilhada por exposição a um ambiente novo, ou porque houve um perigo no passado, mas que não está mais presente, ou seja, é uma reação de defesa frente a uma ameaça em potencial (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; BLANCHARD; BLANCHARD, 1972). Por ser uma característica subjetiva, a emocionalidade e seus componentes não podem ser aferidos diretamente, e assim se desenvolveu testes que permitem mensurar a emocionalidade e comportamento animal (COSTALL et al., 1989). Tais testes tem como premissa a reação do animal diante um ambiente novo e seu conflito entre evitar ameaças em potencial e conhecer o local em que foi inserido (STEIMER; DRISCOLL, 2003). Dentre esses testes há o campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro escuro (COSTALL et al., 1989; LISTER, 1987; PELOW et al., 1985; HALL, 1934).

A depressão faz parte do elenco compondo a emocionalidade do animal. Ela pode ser definida com um estado melancólico (MESQUITA; DUARTE, 1996) e apresenta sintomas em níveis psicológicos, comportamentais e fisiológicos (CRYAN; HOLMES, 2005). Entre os testes de investigação de indícios de depressão temos os testes de nado forçado e suspensão da cauda (PORSOLT et al., 1977; STÉRU et al., 1985). Majoritariamente os modelos animais de depressão estão relacionados com uma exposição aguda ou crônica a um estressor específico, com o objetivo de se ter um ou mais sintomas do transtorno (NUNES; HALLAK, 2014). O indício de depressão pode vir a ser observado nos animais a partir dos testes citados, pois eles seguem a premissa de que os camundongos após um período temporal se esforçando vigorosamente, empregarão uma postura de imobilidade frente a impossibilidade de escapar (COSTA et al., 2013). Quanto maior o tempo imóvel no decorrer das experiências, maiores as chances de o animal sofrer de depressão (MCGONIGLE, 2014).

Para promover a melhoria do bem-estar dos animais, diminuindo comportamentos que possam ser vislumbrados como negativos em um etograma da

espécie, dentre eles, uma ansiedade excessiva, depressão, entre outros, a análise comportamental dos animais em cativeiro permitem identificar os problemas emocionais que ajudam a pensar questões ligadas ao EA que auxiliam a diminuir os impactos de tais problemas. Animais confinados podem estar sujeitos a certas necessidades comportamentais, e a inserção do enriquecimento ambiental pode promover um aumento na qualidade de vida dos mesmos (YOUNG; ABELSON; LIGHTMAN, 2004). Vale ressaltar, que comportamentos relacionados à emocionalidade também podem ser influenciados por fatores biológicos, como etapas de vida dos animais, por exemplo em fêmeas adultas, que passam por influências hormonais, principalmente na fase materna.

1.4 Cuidado materno

Segundo König e Markl (1987), o sucesso reprodutivo de uma espécie não está relacionado apenas com uma alta descendência, juntamente a isso, tem que se ter a viabilidade da prole e sua reprodução deixando descendentes. Diversas espécies, visando a perpetuação de suas descendências, despendem energia para cuidar, proteger e alimentar seus filhotes até que esses tenham condições de subsistir por meios próprios. Os gastos energéticos relacionados com esse comportamento são denominados investimento parental (KÖNIG; MARKL, 1987).

Diversas ações são adotadas pela genitora a fim de manter viável sua descendência. Neste conjunto de comportamentos é possível observar a construção de ninhos para manutenção de temperatura e agrupamento dos filhotes, *grooming*, lactação, placentofagia e postura de agressividade contra invasores como forma de proteção da prole, entre outros (PERIPATO; CHEVERUD, 2002; SMOLINKSY et al., 2009). A fêmea precisa estar em ótimas condições para que a interação mãe-prole seja exímia, tanto no âmbito físico quanto no emocional, para isso, além da parte física, ela precisa estar bem psicologicamente, pois por meio dessa relação a progenitora poderá influenciar no bem-estar psicológico e fisiológico de sua cria (CHAMPAGNE, 2008). Quando pensamos nos mamíferos, é conhecido que o cuidado materno tem bases genéticas complexas e é suscetível a interferência do ambiente (PERIPATO; CHEVERUD, 2002). Além disso, o período de lactação é de suma importância nos dias iniciais da vida da prole, pois os nutrientes contidos no

leite são extremamente relevantes para o desenvolvimento dos filhotes (BLASS; TEICHER, 1980).

A performance materna está ligada a componentes mais generalistas (identificação da prole, memorização e aprendizagem) e a fatores relacionados com a ansiedade, depressão e medo (DWYER; LAWRENCE, 2000; MAYER; ROSENBLATT, 1987; HANSEN; FERREIRA, 1986; BRUNNER et al., 1999). O ambiente materno proporcionado pela mãe influencia diretamente nos filhotes, já se constatou que genitoras com desvio de comportamento materno geraram filhos mais estressados, além do mais, investigações moleculares relataram alterações epigenéticas na expressão de genes (FRANCIS et al., 1999; YOUNGSTON; WHITELOW, 2008). Há observações experimentais em animais que propõem que o estado emocional das genetrizes pode impactar no comportamento de seus filhotes (ALMEIDA, 2016). Quando focamos nos roedores, o período pós-parto assemelha-se com a maioria dos mamíferos, pois é definido pelos cuidados mãe-prole (NORO; GON, 2015). Mães consideradas boas demonstram níveis elevados de cuidados maternos (CHAMPAGNE, 2008).

O uso do enriquecimento ambiental pode diminuir vários fatores que em cativeiro poderiam prejudicar o cuidado materno, pois ele visa aumentar o grau de bem-estar do animal cativo (SOCIEDADE MUNDIAL DE PROTEÇÃO ANIMAL, 2003) e a emocionalidade é um fator relevante no sucesso materno. Além disso a inserção do EA no ambiente pode desencadear mudanças epigenéticas, pois tais alterações se dão pela relação entre o indivíduo e o ambiente (MULLER; PRADO, 2008).

1.5 Epigenética

Termo originado na metade do século XX alterações epigenéticas são processos biológicos que compreendem mudanças moleculares no DNA e proteínas histonas, que são passíveis de serem herdadas e não modificam a sequência do DNA (OLIVEIRA. PLANELLA; ANDIA; PARDO, 2010; KEVERNE; CURLEY, 2008).

As mudanças epigenéticas se distinguem das resultantes pela genética convencional porque à reversibilidade dos efeitos, pois elas dependem da interação indivíduo-ambiente (MULLER; PRADO, 2008; SAUGSTAD, 2006). Dessa maneira, o fenótipo passa a ser o resultante do genótipo e do epigenótipo, o qual propicia um

segundo nível de controle da expressão gênica (GIBBS, 2007; JIANG; BRESSLER; BEAUDET, 2004; JIRTLE, 2007; WEIDMAN et al., 2007).

Os mecanismos epigenéticos que modulam a expressão gênica, no nível molecular são as modificações das histonas, os RNAs não codificadores ou microRNAs e a metilação do DNA (MULLER; PRADO, 2008; KAMINKER, 2007; MOSS; WALLRATH, 2007). A dinâmica entre a ligação das histonas e a condensação da cromatina é regada por padrões epigenéticos de metilação do DNA e alterações químicas das histonas por enzimas como DNA metiltransferases, histonas metiltransferases, proteínas de ligação a grupos metis, histonas acetilases e histonas deacetilases (COSTA; PACHECO, 2013; MULLER; PRADO, 2008; KAMINKER, 2007; MOSS; WALLRATH, 2007; KIEFER, 2007; WAGGONER, 2007; WEIDMAN et al., 2007). Além do mais, episódios como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação, acontecem normalmente na cauda das histonas que se estendem do centro dos nucleossomos (HOWELL et al., 2009; MOSS; WALLRATH, 2007). Os RNA não codificantes e os microRNAs são caracterizados por um grupo de ribonucleotídeos que agem interferindo na transcrição dos genes (FERNANDES-SILVA et al., 2012; BARTEL, 2009). A metilação do DNA consiste na adição de um grupamento metila (CH_3) nas ilhas CpG do DNA, alterando a expressão gênica dos genes metilados (LEWIN et al., 2001). A metilação, e de modo consequente o silenciamento de genes num período específico, seja do ciclo ou do desenvolvimento celular ou até mesmo em determinados tipos celulares, faz parte da estratégia evolutiva que resultou na homeostase (FANTAPPIÉ, 2013), mas fatores ambientais também podem interferir na modulação da expressão gênica para os mecanismos epigenéticos. Enquanto alterações no genoma são lentas, mudanças no epigenoma podem ocorrer rapidamente em resposta aos vários sinais que a célula pode receber e assim um novo padrão epigenético será transmitido para a futura descendência (FANTAPPIÉ, 2013).

A exceção parece ser com os genes que apresentam *imprinting* genômico. O *imprinting* genômico é um fenômeno de regulação da expressão gênica no qual determinados genes são expressos por apenas um alelo parental, enquanto o outro é silenciado (JONES; TAYLOR, 1980). Genes que exibem *imprinting* são normalmente marcados por metilações no DNA em dinucleotídeos CpG e mudanças em histonas e são expressos exclusivamente por um dos alelos parentais (MURREL;

HEESON; REIK, 2004). Esse perfil será mantido e esse padrão não será alterado por mudanças ambientais. Porém, outros genes podem estar suscetíveis a alterações epigenética devido fatores ambientais.

O comportamento de um ser vivo é regido pela ação do sistema nervoso central (SNC). O sistema nervoso central é passível da modulação epigenética, expondo assim a relevância da interação entre comportamento e epigenética (KEVERNE; CURLEY, 2008). Diversos fatores ambientais são capazes de provocar algum tipo de alteração no epigenoma, variando desde fatores químicos e nutricionais, como a contaminação por substâncias tóxicas, vírus ou bactérias e a dieta materna durante o período de prenhez, até fatores ambientais mais relacionais como o nível de cuidado materno e a exposição ao estresse em períodos específicos, conforme citado anteriormente (DUDLEY et al., 2011; MURREL; HEESON; REIK, 2004). Várias pesquisas vêm confirmando que o ambiente pode vir a afetar fatores epigenéticos do indivíduo, seja em sua fase gestacional ou após seu nascimento (MATTERN; POST; SOLGER; O'LEARY; SLATTERY; REIF; HAAF, 2019; ALMEIDA, 2016; LAU; JOBIM; ALMEIDA; ROCHA, 2016; RUTTER; MOFFIT; CASPI, 2006). Segundo Lau et al., em 2016, após pesquisas com camundongos Swiss, a exposição ao EA perinatal das progenitoras impacta os comportamentos ligados à ansiedade de sua descendência, supostamente por mecanismos epigenéticos. O enriquecimento ambiental pode provocar, além de alterações comportamentais que asseguram o bem-estar, alterações epigenéticas e que podem ser herdadas transgeracionalmente (ALMEIDA, 2016).

2 OBJETIVOS

a. Objetivo geral

O presente trabalho teve por intuito avaliar a influência do enriquecimento ambiental em mães de fêmeas de camundongo *Mus musculus* da linhagem LG/J, sobre os aspectos da emocionalidade e cuidado materno das filhas não enriquecidas, para verificar a possível influência transgeracional desse enriquecimento.

b. Objetivos específicos

- Averiguar a emocionalidade das filhas de mães expostas ou não ao enriquecimento ambiental por meio dos testes de Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Nado Forçado (NF), em quatro fases de vida (púbere, reprodutiva, materna e pós-desmame).
- Investigar os cuidados maternos das filhas de mães expostas ou não ao enriquecimento ambiental com sua prole.
- Contrastar os resultados de emocionalidade e cuidado materno das filhas com a mães enriquecidas ou não.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste presente estudo, utilizou-se fêmeas de camundongos da linhagem LG/J (*Large*) importadas primeiramente do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, EUA). Essa linhagem tem sido cruzada e mantida no biotério do Laboratório de Genética de Comportamento do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, *campus* São Carlos, desde 2015.

Todos os camundongos usados permaneceram alocados em um rack ventilado (ALESCO) e em um ambiente controlado, de modo que a temperatura se encontrava na média de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e o ciclo claro-escuro com a duração de 12 horas (luzes se acendem às 6 horas da manhã e se apagam às 18 horas). Os animais se alimentaram *ad libitum* com ração para roedores Nuvilab CR-1 Autoclavável (QUIMTIA SA, Colombo - PR) e se hidrataram com água filtrada, ambas autoclavadas.

O monitoramento das caixas ocorreu diariamente e a troca de maravalha e limpeza das caixas se deu semanalmente. Vale ressaltar, que a maravalha (pinus – JR Maravalha, Paulínia – SP) e demais materiais utilizados foram autoclavados, proporcionando assim a esterilização do que foi usado.

Após o desmame dos filhotes (três semanas de vida), houve a separação por sexo, com o limite de cinco animais por caixa. As fêmeas de camundongos foram

submetidas a testes comportamentais em datas específicas (verificar item Testes de comportamento para avaliar emocionalidade) e quando atingiram a idade reprodutiva (7 a 10 semanas) ocorreu o pareamento com os machos no período de cópula, no qual cada casal teve uma caixa individual. Para constatação da prenhez, as fêmeas foram pesadas semanalmente e verificadas a conformação abdominal. Detectada a prenhez, os progenitores machos foram alocados em outras caixas e posteriormente eutanasiados, já as matrizes fêmeas passaram a ser observadas e submetidas a testes que demonstrassem seus cuidados maternos e emocionalidade durante o período pré e pós-parto (ver item Cuidado materno). Após o desmame, a genetriz foi submetida a testes de pós desmame e subseqüentemente eutanasiada por deslocamento cervical. Na necropsia se retirou o baço, fígado, rins e coração que foram armazenados para procedimentos moleculares em projetos futuros. Além dos órgãos citados, foi retirado o cérebro total que teve seu armazenamento em reagente estabilizador de ácidos nucleicos (15 ml de *RNAholder- BioRAD*), possibilitando estudos futuramente.

Todos os procedimentos no manuseio e na experimentação com os animais foram avaliados e protocolados sob o CEUA nº 4178180719 (Anexo A).

3.2 Enriquecimento ambiental (EA)

O presente trabalho foi a extensão de outro trabalho de nosso grupo (ROSA, 2022). Naquele trabalho, utilizou-se fêmeas da linhagem LG/J, separadas em grupos de 20 fêmeas:

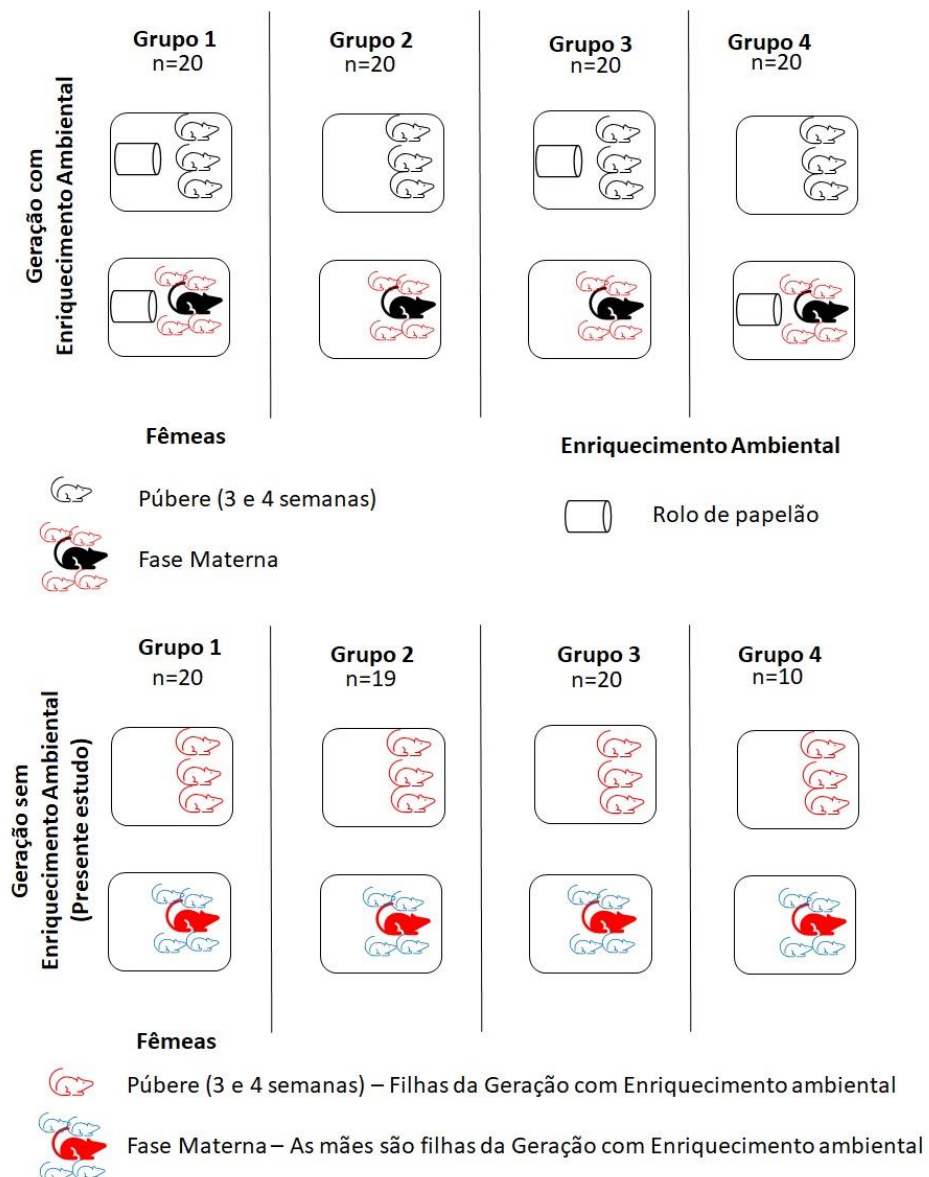
1. G1 (Grupo Controle Positivo) – Vivenciou a exposição ao enriquecimento ambiental desde a fase púbere à materna;
2. G2 (Grupo Controle Negativo) – Não teve exposição ao enriquecimento ambiental em qualquer uma das fases;
3. G3 (Grupo Púbere; fêmeas de 3 a 4 semanas) – Foi submetido ao enriquecimento ambiental na fase púbere;
4. G4 (Grupo Materno; fase materna) – Esteve exposto ao enriquecimento ambiental na fase materna.

O enriquecimento ambiental empregado para as mães das fêmeas utilizadas no presente estudo, o rolo de papelão, foi selecionado em teste piloto (Rosa et al.,

2022) entre os materiais de proteção (tubo de PVC e rolo de papelão) e de termorregulação/nidificação (algodão e papel).

Para o presente trabalho, foram utilizadas as fêmeas geradas das ninhadas dos grupos acima, e os grupos utilizados representaram de qual grupo essas fêmeas compunham na geração anterior. O delineamento pode ser verificado na Figura 1, em que G1 (n=20) são filhas das mães do Grupo G1 (Grupo Controle Positivo), G2 (n=19) são filhas das mães do Grupo 2 (Grupo Controle Negativo), G3 (n=20) são filhas das mães do Grupo 3 (Grupo Púberes) e G4 (n=10) são filhas das mães do Grupo 4 (Grupo Materno).

Figura 1. Delineamento da formação dos grupos de estudo



Fonte: Autoria própria.

3.3 Testes de comportamento para avaliar emocionalidade

3.3.1 Emocionalidade

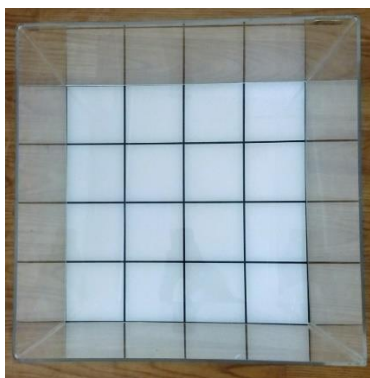
Os testes utilizados para avaliar a emocionalidade foram o Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e o Nado Forçado (NF). Os testes, nessa ordem, em dias diferentes, realizaram-se na segunda semana de cada diferente fase de vida das fêmeas: na fase púbera (com 3 a 4 semanas de vida), na fase reprodutiva (com 7 a 8 semanas de vida), na fase materna (com 11 a 12 semanas) e na fase pós desmame (~15 semanas de vida).

Todos os testes ocorreram no biotério do Laboratório de Genética de Comportamento/UFSCar em sala ambiente e respeitando a mesa faixa horária matutina (das 8 horas às 13 horas).

3.3.2 Campo aberto (CA)

O equipamento utilizado para realização do teste comportamento de Campo Aberto foi baseado em Hall (1934), em que se fundamenta na presença de uma área aberta e iluminada que, por sua vez, e de interesse deste projeto, possibilita mensurar diferentes reações comportamentais reflexo da emocionalidade do animal. O teste também é utilizado para avaliar a locomoção do animal (OLIVARES et al., 2012). O equipamento utilizado tinha uma base quadrada de 40 cm de comprimento por 40 cm de largura, com 16 quadrados marcados em sua base cuja medidas de cada um era de 10 cm de comprimento por 10 cm de largura e com as laterais em acrílico (Figura 2).

Figura 2. Equipamento Campo Aberto



Fonte: Arquivo pessoal

Para desenvolvimento do teste, o equipamento teve sua higienização com *HerbalVet* e álcool 70%. As fêmeas foram colocadas no centro do teste e filmadas por 5 minutos e ao final, se contou os bolos fecais. Após a realização do teste, as fêmeas foram retornadas a suas gaiolas. As gravações foram analisadas via *software* (X-plo-Rat®).

3.3.3. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste é utilizado para analisar ansiedade dos animais, em que esse parâmetro pode ser mensurado pela evitação aos braços abertos do equipamento (LISTER, 1987). O equipamento utilizado possuía uma estrutura em forma de cruz elevado a 40 cm do chão, com dois braços sem paredes laterais, denominado braços abertos, e com dois braços fechados, que contém paredes em suas laterais (Figura 3). Os braços abertos possuem 30 cm de comprimento, 6 cm de largura e 0,25 cm de altura enquanto os braços fechados possuem as mesmas dimensões, porém com 15 cm de altura.

Figura 3. Equipamento Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: Arquivo pessoal.

Para a realização do teste, os braços abertos e fechados foram higienizados com *HerbalVet* e álcool 70%. Colocou-se as fêmeas no centro do teste e elas foram

filmadas por 5 minutos, após a realização do teste, as fêmeas foram retornadas a suas gaiolas. Os vídeos obtidos foram analisados via *software* (X-plo-Rat®).

3.3.4 Nado forçado (NF)

O teste avalia comportamento tipo-depressivo pela imobilidade gerada frente a uma situação estressante (recipiente com água) (Porsolt et al.,1977). No presente estudo ele foi realizado em fluxo laminar. Um Becker com 40 cm de profundidade e 20 cm de diâmetro (Figura 4) acrescido de 3000 mililitros ou 19,5 cm de água à 24° C foi utilizado para o teste. A água usada foi filtrada e teve sua esterilização em luz UV pelo período mínimo de 20 minutos. A fêmea teve sua inserção no interior desse recipiente e foi filmada pelo período de seis minutos. Após o teste, a fêmea foi retirada da água, seca em papel toalha e devolvida a sua caixa. Os vídeos foram analisados através do software X-plo-Rat®.

Figura 4. Recipiente utilizado no teste de nado forçado



Fonte: Arquivo pessoal.

3.4 Cuidado materno

O cuidado materno foi avaliado logo após o nascimento dos filhotes. A caixa da mãe foi aberta em fluxo laminar (Veco CFLH-09), e os parâmetros avaliados foram:

1. Presença e manutenção do ninho: ocorreu a verificação diária do ninho e sua manutenção a partir do parto até o sétimo dia (D1 ao D7), levando em consideração sua altura e temperatura.

2. Placentofagia: no dia do nascimento foi verificado a presença ou ausência de placenta.

3. Presença de leite: diariamente, durante os sete primeiros dias de vida (D1 ao D7), os filhotes foram avaliados para presença de leite em seus estômagos (Figura 5), indicando que estavam sendo amamentados e que a mãe teve ejeção de leite.

4. Pesagem: a pesagem diária da prole ocorreu durante toda a primeira semana de vida (D1 ao D7), sendo que ao término da primeira semana, averiguou-se o peso dos filhotes semanalmente até o desmame dos mesmos (terceira semana

5. Agressividade contra intrusos: a percepção de comportamento agressivo das fêmeas foi visualizada pela postura materna ao se manipular os filhotes, nos momentos de pesagem e avaliação dos ninhos, visando a proteção de sua prole. Ela foi verificada na primeira semana de vida dos filhotes (D1 ao D7).

6. Tamanho de ninhada viável: foi observado se as fêmeas conseguiriam manter suas crias vivas após o período de cuidado materno.

3.5 Análise de dados

Os testes comportamentais foram analisados no Programa de Registro Comportamental X-Plo-Rat, 2005 (http://www.oocities.org/xplorat/pages/ingles/mainframe_en.htm). Os dados de cuidado materno foram registrados em planilhas de Excel (2013) em que foi realizada análise estatística descritiva.

Para aferir a emocionalidade, o teste utilizado foi o t de *Student*, de modo que os resultados foram expressos pela média, \pm erro padrão da média, seguidamente do valor de p. Os resultados apresentados foram obtidos com o auxílio do programa R Studio® (RStudio: Integrated Development for R). Dentre os dados obtidos para avaliar o cuidado materno, a análise intragrupo entre tamanho de ninhada nascida e o tamanho de ninhada viável e dos parâmetros tamanho de ninhada nascida,

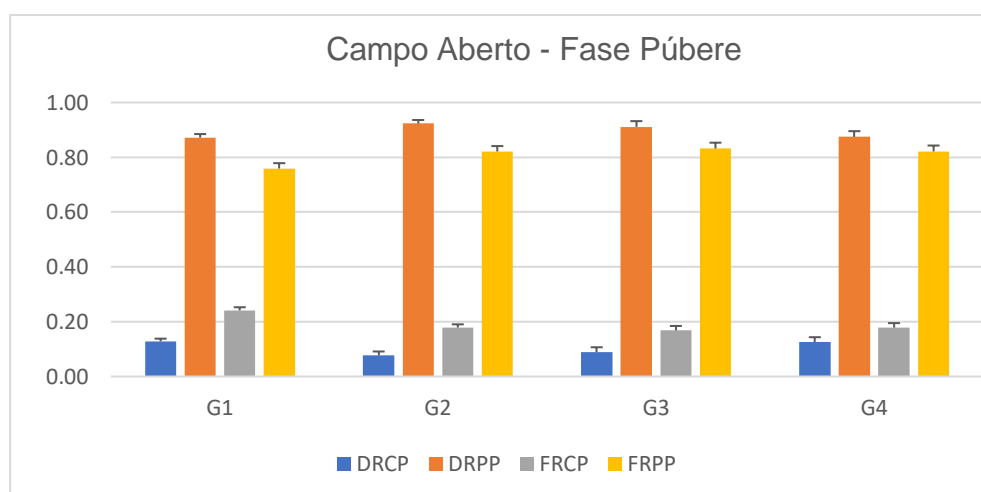
tamanho de ninhada viável, ganho de peso D1 – D7, ganho de peso 3 Semanas, temperatura do ninho e altura do ninho entre os grupos, se deu por meio do teste *t* de *Student*, de modo que os resultados foram expressos pela média, \pm erro padrão da média, seguidamente do valor de *p*. Os parâmetros boa-mãe, agressividade, presença de leite e placentofagia foram comparados entre grupos através do teste de qui-quadrado. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EMOCIONALIDADE

Definir o estado emocional de um animal não é trivial. As fêmeas que compuseram esse trabalho foram testadas para esse parâmetro pela exposição ao campo aberto e ao labirinto em cruz elevado. O contraste intragrupo (G1, G2, G3 e G4) dentro de cada fase pode ser visualizado nas Figuras 5 (púberes), 6 (reprodutiva), 7 (materna) e 8 (pós-materna).

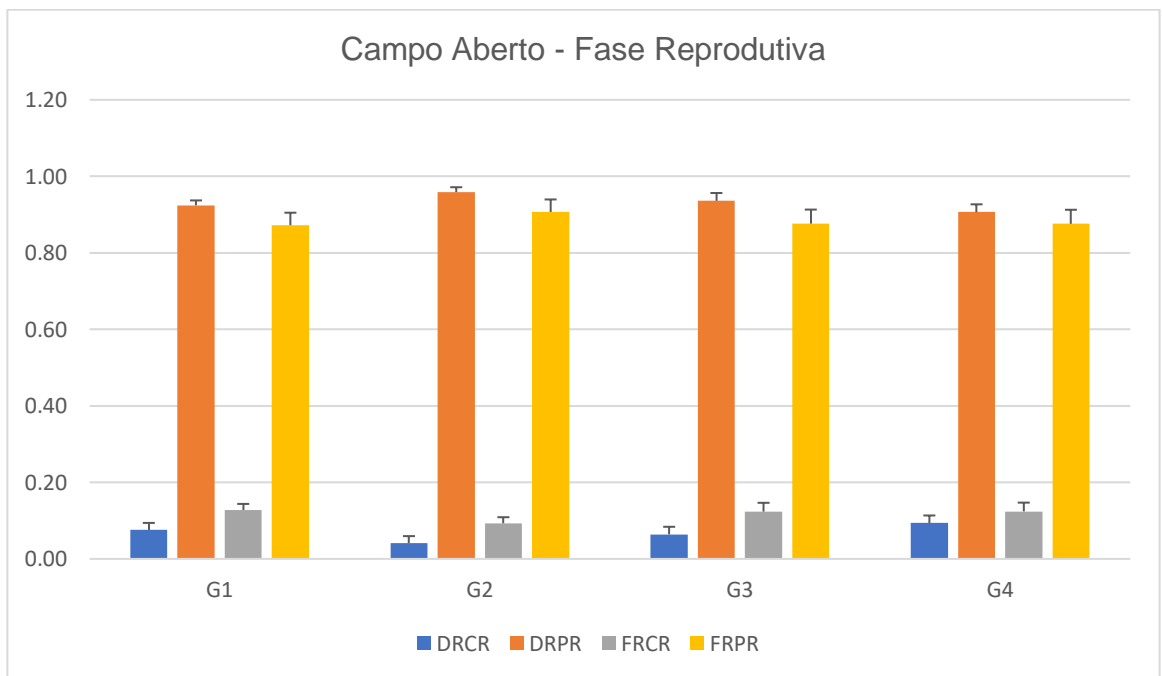
Figura 5. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase púberes, na região central e periférica do Campo Aberto.



Legenda: DRCP: Duração relativa no centro fase púberes; DRPP: Duração relativa na periferia fase púberes; FRCP: Frequência relativa no centro fase púberes; FRPP: Frequência relativa na periferia fase púberes.

Como pode ser observado, na análise intragrupo da fase púber, os grupos 1 (DRCP = $0,13 \pm 0,01$ vs. DRPP = $0,87 \pm 0,01$; $t = 9.99928E-31$), 2 (DRCP = $0,08 \pm 0,01$ vs. DRPP = $0,92 \pm 0,01$; $t = 1.49657E-33$), 3 (DRCP = $0,09 \pm 0,01$ vs. DRPP = $0,91 \pm 0,01$; $t = 3.2797E-36$) e 4 (DRCP = $0,13 \pm 0,02$ vs. DRPP = $0,87 \pm 0,02$; $t = 5.60053E-16$) apresentaram diferenças significativas entre DRCP X DRPP, já com relação a frequência relativa no centro e frequência relativa na periferia os grupos 1 (FRCP = $0,24 \pm 0,02$ vs. FRPP = $0,76 \pm 0,02$; $t = 8.61867E-22$), 2 (FRCP = $0,18 \pm 0,02$ vs. FRPP = $0,82 \pm 0,02$; $t = 3.12149E-22$), 3 (FRCP = $0,17 \pm 0,02$ vs. FRPP = $0,83 \pm 0,02$; $t = 2.51526E-27$) e 4 (FRCP = $0,18 \pm 0,02$ vs. FRPP = $0,82 \pm 0,02$; $t = 3.55575E-14$) tiveram diferenças significativas entre si.

Figura 6. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase reprodutiva, na região central e periférica do Campo Aberto.

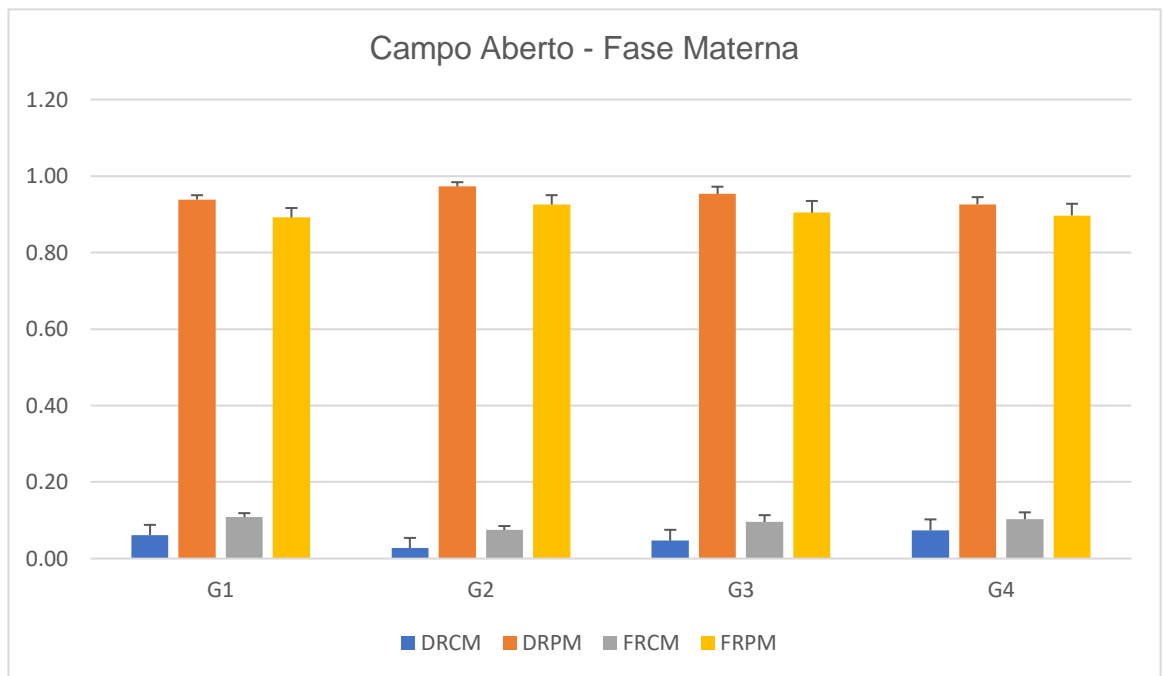


Legenda: DRCR: Duração relativa no centro fase reprodutiva; DRPR: Duração relativa na periferia fase reprodutiva; FRCR: Frequência relativa no centro fase reprodutiva; FRPR: Frequência relativa na periferia fase reprodutiva.

Na fase reprodutiva, temos novamente uma diferença significativa na duração relativa no centro e duração relativa na periferia nos grupos 1 (DRCR = $0,08 \pm 0,02$ vs. DRPR = $0,92 \pm 0,02$; $t = 5.78E-28$), 2 (DRCR = $0,04 \pm 0,01$ vs. DRPR = $0,96 \pm 0,01$; $t = 3.05522E-35$), 3 (DRCR = $0,06 \pm 0,02$ vs. DRPR = $0,94 \pm 0,02$; $t = 3.26806E-32$) e 4 (DRCR = $0,09 \pm 0,03$ vs. DRPR = $0,91 \pm 0,03$; $t = 8.93962E-13$) e

o mesmo ocorreu em relação a frequência relativa no centro e na periferia dos grupos 1 (FRCR = $0,13 \pm 0,02$ vs. FRPR = $0,87 \pm 0,02$; $t = 8.41089E-25$), 2 (FRCR = $0,09 \pm 0,02$ vs. FRPR = $0,91 \pm 0,02$; $t = 3.87948E-26$), 3 (FRCR = $0,12 \pm 0,02$ vs. FRPR = $0,88 \pm 0,02$; $t = 5.09256E-24$) e 4 (FRCR = $0,12 \pm 0,04$ vs. FRPR = $0,88 \pm 0,04$; $t = 2.38385E-11$).

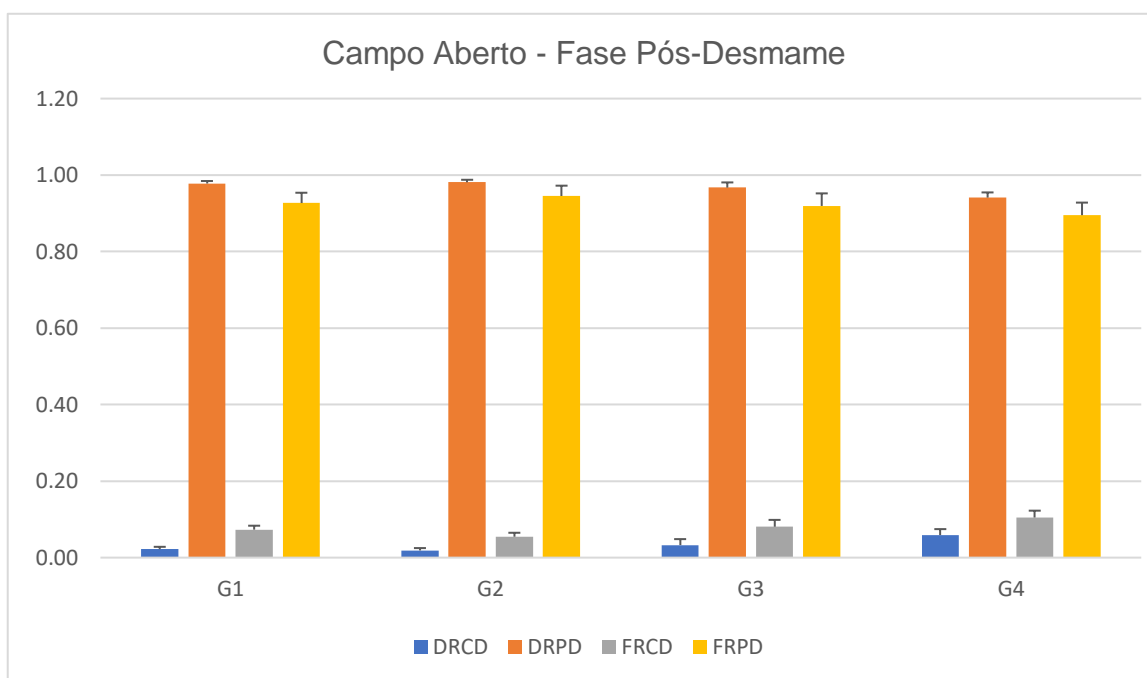
Figura 7. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase materna, na região central e periférica do Campo Aberto.



Legenda: DRCM: Duração relativa no centro fase materna; DRPM: Duração relativa na periferia fase materna; FRCM: Frequência relativa no centro fase materna; FRPM: Frequência relativa na periferia fase materna

Na fase materna a diferença significativa continua nos grupos 1 (DRCM = $0,06 \pm 0,03$ vs. DRPM = $0,94 \pm 0,03$; $t = 1.22837E-15$), 2 (DRCM = $0,03 \pm 0,01$ vs. DRPM = $0,97 \pm 0,01$; $t = 4.83291E-24$), 3 (DRCM = $0,05 \pm 0,01$ vs. DRPM = $0,95 \pm 0,01$; $t = 1.5921E-39$) e 4 (DRCM = $0,07 \pm 0,02$ vs. DRPM = $0,93 \pm 0,02$; $t = 3.03239E-15$) com relação a DRCM X DRPM e com relação a FRCM X FRPM os grupos 1 (FRCM = $0,11 \pm 0,03$ vs. FRPM = $0,89 \pm 0,03$; $t = 4.59709E-14$), 2 (FRCM = $0,07 \pm 0,02$ vs. FRPM = $0,93 \pm 0,02$; $t = 1.17499E-18$), 3 (FRCM = $0,10 \pm 0,02$ vs. FRPM = $0,90 \pm 0,02$; $t = 3.69749E-29$) e 4 (FRCM = $0,10 \pm 0,03$ vs. FRPM = $0,90 \pm 0,03$; $t = 4.32621E-13$) continuam com diferenças significativas, com as fêmeas apresentando maior tempo e frequência na área periférica.

Figura 8. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase pós-desmame, na região central e periférica do Campo Aberto.



Legenda: DRCD: Duração relativa no centro fase pós-desmame; DRPD: Duração relativa na periferia fase pós-desmame; FRCD: Frequência relativa no centro fase pós-desmame; FRPD: Frequência relativa na periferia fase pós-desmame

Durante a fase de pós-desmame, os grupos 1 (DRCD = 0,02 ± 0,01 vs. DRPD = 0,98 ± 0,01; $t = 7.24381E-30$), 2 (DRCD = 0,02 ± 0,01 vs. DRPD = 0,98 ± 0,01; $t = 1.9231E-26$), 3 (DRCD = 0,03 ± 0,01 vs. DRPD = 0,97 ± 0,01; $t = 2.45697E-40$) e 4 (DRCD = 0,06 ± 0,03 vs. DRPD = 0,94 ± 0,03; $t = 7.77788E-15$) apresentaram diferenças significativas entre DRCD X DRPD e os grupos 1 (FRCD = 0,07 ± 0,02 vs. FRPD = 0,93 ± 0,02; $t = 5.64764E-20$), 2 (FRCD = 0,05 ± 0,01 vs. FRPD = 0,95 ± 0,01; $t = 3.34414E-20$), 3 (FRCD = 0,08 ± 0,02 vs. FRPD = 0,92 ± 0,02; $t = 1.27814E-29$) e 4 (FRCD = 0,10 ± 0,03 vs. FRPD = 0,90 ± 0,03; $t = 1.57201E-12$) também apresentam diferenças significativas com relação a FRCD X FRPD.

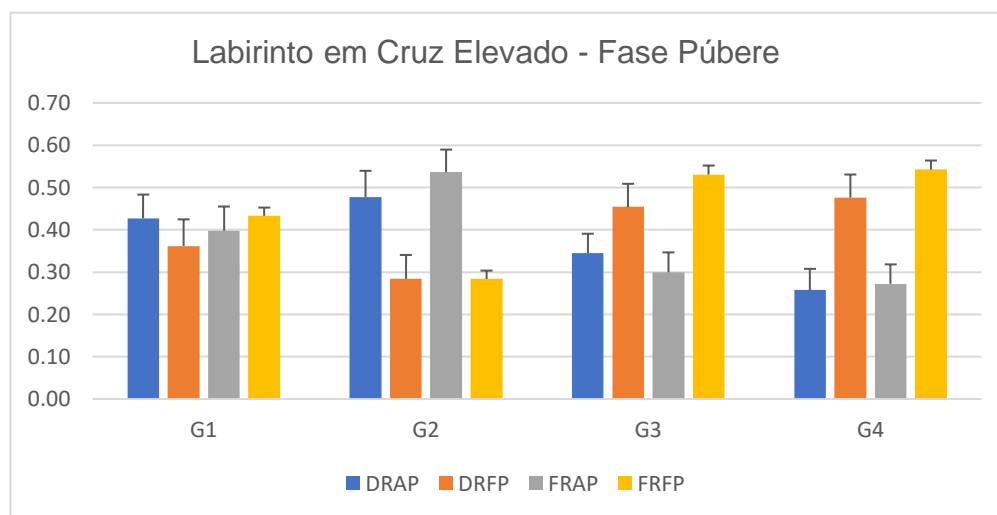
A ansiedade no campo aberto pode ser analisada pela exploração ao ambiente, em que animais menos ansiosos exploram mais o ambiente e visitam áreas mais expostas, que seria o mais próximo do centro do equipamento (CHOLERIS et al., 2001). No contraste entre os grupos por fase, em todos os casos foi possível observar que os animais apresentaram um comportamento mais análogo

a ansiedade, pois ficaram e se movimentaram majoritariamente na faixa periférica do aparato independentemente da sua fase de vida.

Quando comparados os grupos entre si, se observa que durante a fase púbere os animais do grupo 1 e 2 ($1 = 0,13 \pm 0,01$ vs. $2 = 0,08 \pm 0,01$; $t = 0,013$) e 1 e 3 ($1 = 0,13 \pm 0,01$ vs. $3 = 0,09 \pm 0,01$; $t = 0,045$) tiveram diferenças significativas em relação a duração relativa no centro. Com relação a duração relativa na periferia, os grupos 1 e 2 ($1 = 0,87 \pm 0,01$ vs. $2 = 0,92 \pm 0,01$; $t = 0,013$) e 1 e 3 ($1 = 0,87 \pm 0,01$ vs. $3 = 0,91 \pm 0,01$; $t = 0,045$) tiveram diferenças significativas entre si na fase púbere. Com relação a FRCP, o grupo 1 e 2 ($1 = 0,24 \pm 0,02$ vs. $2 = 0,18 \pm 0,02$; $t = 0,031$), 1 e 3 ($1 = 0,24 \pm 0,02$ vs. $3 = 0,17 \pm 0,02$; $t = 0,005$) e 1 e 4 ($1 = 0,24 \pm 0,02$ vs. $4 = 0,18 \pm 0,02$; $t = 0,037$) tiveram diferenças significativas entre si, já em relação a FRPP os grupos com diferenças significativas entre si foram o 1 e 2 ($1 = 0,76 \pm 0,02$ vs. $2 = 0,82 \pm 0,02$; $t = 0,031$), 1 e 3 ($1 = 0,76 \pm 0,02$ vs. $3 = 0,83 \pm 0,02$; $t = 0,005$) e 1 e 4 ($1 = 0,76 \pm 0,02$ vs. $4 = 0,82 \pm 0,02$; $t = 0,037$). Já durante as fases reprodutiva, materna e pós-desmame, os grupos não apresentaram diferenças significativas na duração relativa e frequência no centro e periferia entre si.

O teste em labirinto em cruz elevado é outro teste utilizado para analisar a ansiedade dos animais. Nele, ao mesmo tempo em que o ambiente novo pode vir a ativar a curiosidade, ele também proporciona medo (LISTER, 1987). O contraste intragrupo (G1, G2, G3 e G4) das fêmeas, no teste do labirinto em cruz elevado, dentro de cada fase, pode ser visualizado nas Figuras 9 (púberes), 10 (reprodutiva), 11 (materna) e 12 (pós-materna).

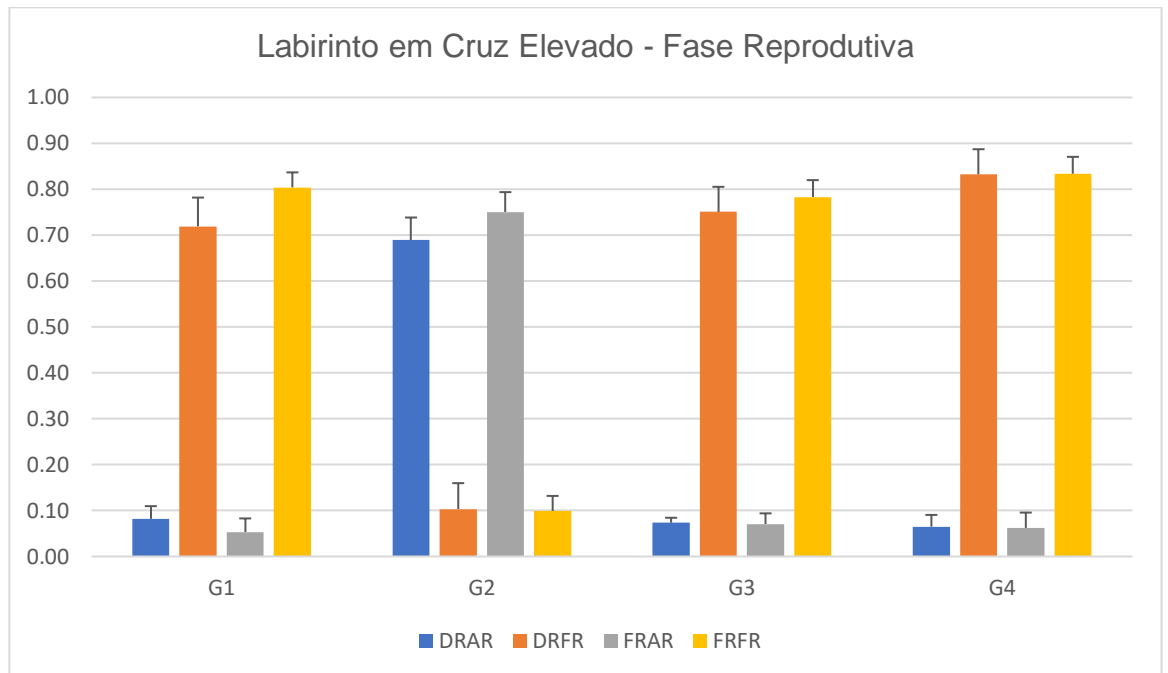
Figura 9. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase púber, nos braços aberto e fechados do Labirinto em Cruz Elevado.



Legenda: DRAP: Duração relativa nos braços abertos na fase púber; DRFP: Duração relativa nos braços fechados na fase púber; FRAP: Frequência relativa nos braços fechados na fase púber; FRFP: Frequência relativa nos braços fechados na fase púber.

Quando observamos intragrupo, se nota que na fase púber os animais dos grupos 2 (DRAP = $0,48 \pm 0,06$ vs. DRFP = $0,28 \pm 0,06$; $t = 0,03$) e 4 (DRAP = $0,26 \pm 0,02$ vs. DRFP = $0,48 \pm 0,02$; $t = 0,02$) apresentaram diferença significativa quanto a duração nos braços abertos em comparação com os braços fechados, já quando se observa a frequência, os grupos 2 (FRAP = $0,54 \pm 0,05$ vs. FRFP = $0,28 \pm 0,05$; $t = 0,002$) e 4 (FRAP = $0,27 \pm 0,02$ vs. FRFP = $0,54 \pm 0,02$; $t = 0,001$) apresentaram também diferença significativa. O grupo 3 não teve diferença significativa na comparação quanto a duração relativa nos braços abertos e fechados (DRAP = $0,34 \pm 0,06$ vs. DRFP = $0,45 \pm 0,05$; $t = 0,17$), contudo a frequência nos braços fechados foi significativamente maior do que nos braços abertos (FRAP = $0,30 \pm 0,05$ vs. FRFP = $0,53 \pm 0,05$; $t = 0,001$). O grupo 1 não apresentou diferença significativa em nenhum parâmetro.

Figura 10. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase reprodutiva, nos braços aberto e fechados do Labirinto em Cruz Elevado.

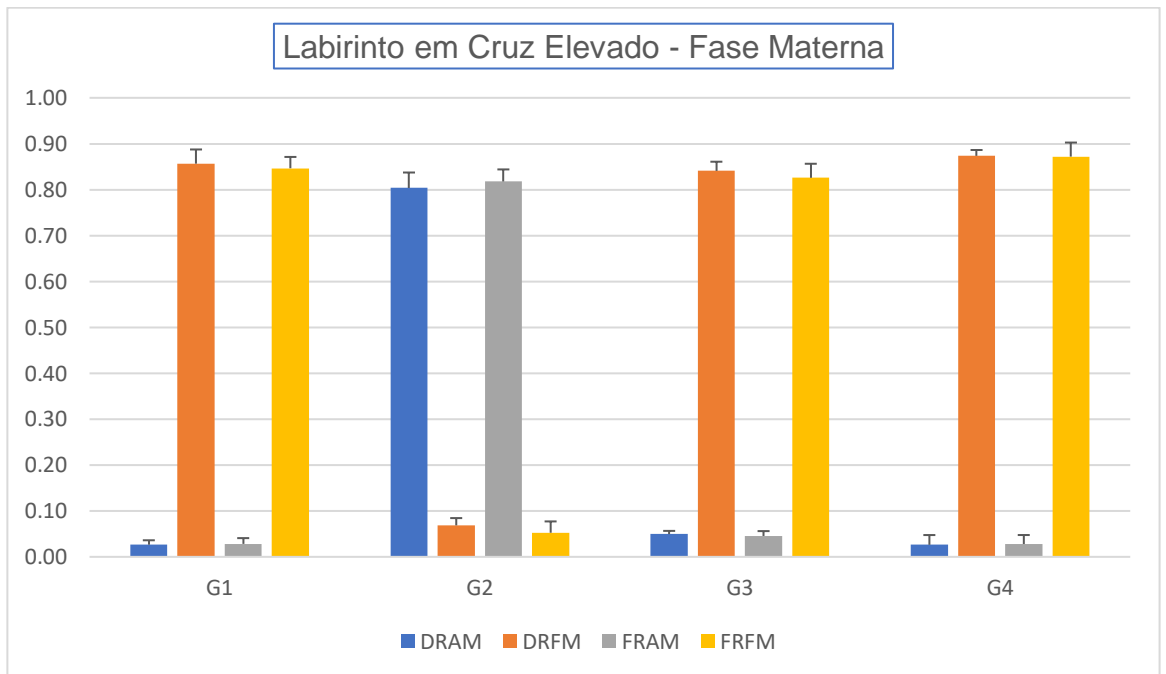


Legenda: DRAR: Duração relativa nos braços abertos na fase reprodutiva; DRFR: Duração relativa nos braços fechados na fase reprodutiva; FRAR: Frequência relativa nos braços fechados na fase reprodutiva; FRFR: Frequência relativa nos braços fechados na fase reprodutiva.

Na fase reprodutiva, o grupo 1 teve diferença significativas quanto a duração relativa nos braços abertos e fechados (DRAR = 0,08 ± 0,03 vs. DRFR = 0,72 ± 0,05; $t = 9.45215E-14$) e na frequência relativa nos braços abertos e fechados (FRAR = 0,05 ± 0,01 vs. FRFR = 0,80 ± 0,03; $t = 2.26839E-26$). O grupo 2 teve diferença significativa na DRAR quando comparada ao DRFR (DRAR = 0,69 ± 0,07 vs. DRFR = 0,10 ± 0,06; $t = 6.16337E-08$) e FRAR quando comparada na FRFR (FRAR = 0,75 ± 0,05 vs. FRFR = 0,10 ± 0,05; $t = 2.4884E-10$), o grupo 3 também apresenta diferença significativa na DRAR quando comparada ao DRFR (DRAR = 0,07 ± 0,03 vs. DRFR = 0,75 ± 0,04; $t = 1.74421E-15$) e FRAR quando comparada na FRFR (FRAR = 0,07 ± 0,02 vs. FRFR = 0,78 ± 0,03; $t = 8.54232E-20$) e o grupo 4 igualmente apresenta diferença significativa na DRAR quando comparada ao DRFR (DRAR = 0,06 ± 0,03 vs. DRFR = 0,83 ± 0,03; $t = 4.98265E-09$) e FRAR quando comparada na FRFR (FRAR = 0,06 ± 0,04 vs. FRFR = 0,83 ± 0,04; $t = 5.22632E-10$).

Na fase materna, os grupos 1 (DRAM = $0,03 \pm 0,01$ vs. DRFM = $0,86 \pm 0,03$; $t = 3.66881E-18$), 2 (DRAM = $0,80 \pm 0,03$ vs. DRFM = $0,07 \pm 0,02$; $t = 3.84955E-15$), 3 (DRAM = $0,05 \pm 0,01$ vs. DRFM = $0,84 \pm 0,03$; $t = 1.6851E-26$) e 4 (DRAM = $0,03 \pm 0,02$ vs. DRFM = $0,87 \pm 0,02$; $t = 1.73691E-18$) tiveram diferenças significativas entre a DRAM e DRFM.

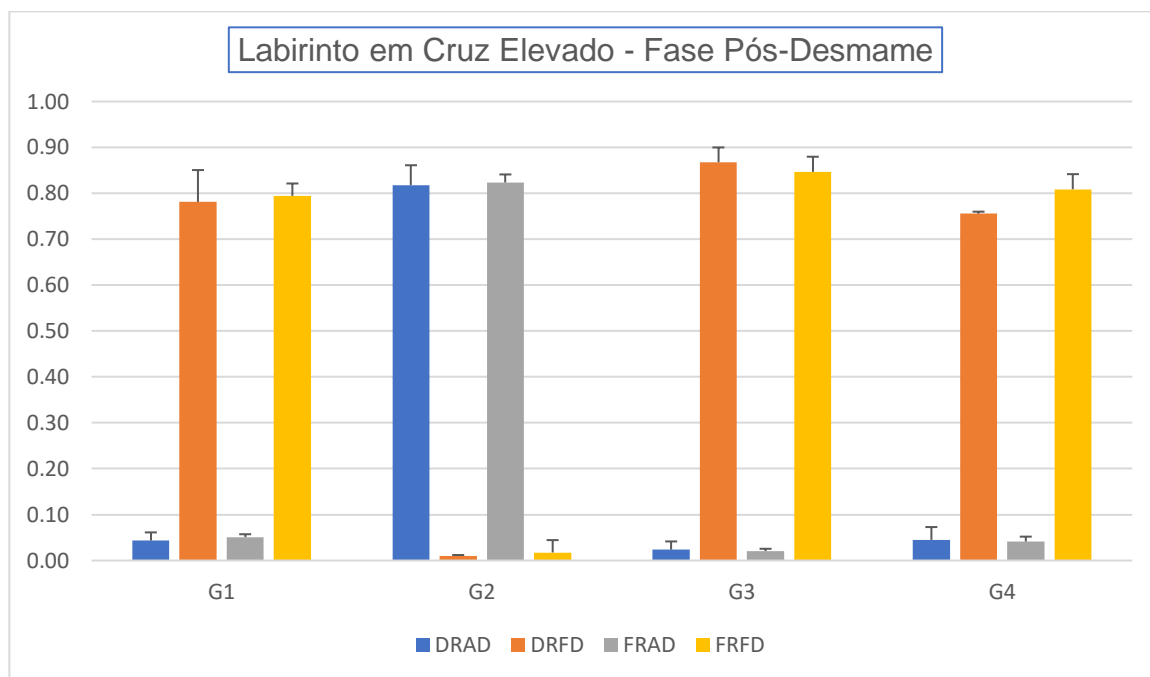
Figura 11. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase materna, nos braços aberto e fechados do Labirinto em Cruz Elevado.



Legenda: DRAM: Duração relativa nos braços abertos na fase materna; DRFM: Duração relativa nos braços fechados na fase materna; FRAM: Frequência relativa nos braços fechados na fase materna; FRFR: Frequência relativa nos braços fechados na fase materna.

Ao observar a frequência relativa na fase materna, ao se contrastar a frequência relativa nos braços abertos e fechados, os grupos 1 (FRAM = $0,03 \pm 0,01$ vs. FRFM = $0,85 \pm 0,02$; $t = 1.52984E-22$), 2 (FRAM = $0,82 \pm 0,02$ vs. FRFM = $0,05 \pm 0,01$; $t = 1.01597E-18$), 3 (FRAM = $0,05 \pm 0,01$ vs. FRFM = $0,83 \pm 0,02$; $t = 1.59309E-30$) e 4 (FRAM = $0,03 \pm 0,03$ vs. FRFM = $0,87 \pm 0,03$; $t = 1.30462E-20$) tiveram diferenças significativas entre si.

Figura 12. Duração e frequência relativa das fêmeas, na fase pós-desmame, nos braços aberto e fechados do Labirinto em Cruz Elevado.



Legenda: DRAD: Duração relativa nos braços abertos na fase pós-desmame; DRFD: Duração relativa nos braços fechados na fase pós-desmame; FRAD: Frequência relativa nos braços fechados na fase pós-desmame; FRFD: Frequência relativa nos braços fechados na fase pós-desmame.

Durante a fase de pós-desmame, a DRAD quando comparada com a DRFD teve diferença significativa no grupo 1 (DRAD = 0,04 ± 0,02 vs. DRFD = 0,78 ± 0,02; $t = 1.69E-13$), 2 (DRAD = 0,82 ± 0,07 vs. DRFD = 0,01 ± 0,00; $t = 2.28E-10$), 3 (DRAD = 0,02 ± 0,01 vs. DRFD = 0,87 ± 0,02; $t = 1.10E-34$) e 4 (DRAD = 0,05 ± 0,03 vs. DRFD = 0,76 ± 0,03; $t = 7.67E-14$), já ao se observar a FRAD e FRFD os grupos 1 (FRAD = 0,05 ± 0,02 vs. FRFD = 0,79 ± 0,03; $t = 1.22E-16$), 2 (FRAD = 0,82 ± 0,03 vs. FRFD = 0,02 ± 0,00; $t = 1.81E-16$), 3 (FRAD = 0,02 ± 0,01 vs. FRFD = 0,85 ± 0,01; $t = 1.25E-41$) e 4 (FRAD = 0,10 ± 0,03 vs. FRFD = 0,10 ± 0,03; $t = 4.41E-17$) apresentaram diferenças significativas.

O labirinto em cruz elevado é utilizado para mensurar a ansiedade de roedores frente a estímulos aversivos, ou seja, o teste mostra como o animal se comporta num determinado momento ao agente estressor, que no caso do teste é a exposição a espaços abertos (MOREIRA, 2015). Espera-se que o animal que se resguardar nos braços fechados, que são considerados menos aversivos, sejam

ansiosos (RODGERS et al., 1997; KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008). Os dados obtidos concordam com o encontrado no teste de Campo aberto, em que os animais, de maneira geral, apresentam um comportamento tipo-ansioso, e permanecem menos tempo nas áreas aversivas, ou seja, os braços abertos.

Quando se compara os grupos, ocorreram determinadas diferenças significativas em algumas situações. Na fase púber, ao se analisar a duração relativa nos braços abertos os grupos 1 e 4 ($1 = 0.43 \pm 0.06$ vs. $4 = 0.26 \pm 0.02$; $t = 0.018$) e 2 e 4 ($2 = 0.48 \pm 0.06$ vs. $4 = 0.26 \pm 0.02$; $t = 0.006$) tiveram diferenças significativas entre si. Ao analisar a DRFP os grupos 2 e 3 ($2 = 0.28 \pm 0.06$ vs. $3 = 0.45 \pm 0.05$; $t = 0.035$) e 2 e 4 ($2 = 0.28 \pm 0.06$ vs. $4 = 0.48 \pm 0.02$; $t = 0.049$) tiveram diferenças significativas entre si. Ao analisarmos e compararmos os grupos quanto a FRAP os grupos 2 e 3 ($2 = 0.28 \pm 0.05$ vs. $3 = 0.30 \pm 0.05$; $t = 0.002$) e 2 e 4 ($2 = 0.54 \pm 0.05$ vs. $4 = 0.27 \pm 0.02$; $t = 0.001$) tiveram diferenças significativas entre si, já em relação a FRFP as comparações entre os grupos 2 e 3 ($2 = 0.28 \pm 0.05$ vs. $3 = 0.53 \pm 0.05$; $t = 0.001$) e 2 e 4 ($2 = 0.28 \pm 0.05$ vs. $4 = 0.54 \pm 0.02$; $t = 0.002$) tiveram diferenças significativas entre si. Na fase reprodutiva ao contrastar a DRAR entre os grupos 1 e 2 ($1 = 0.08 \pm 0.03$ vs. $2 = 0.69 \pm 0.07$; $t = 7.73782E-09$), 2 e 3 ($2 = 0.69 \pm 0.07$ vs. $3 = 0.07 \pm 0.03$; $t = 5.46687E-09$) e 2 e 4 ($2 = 0.69 \pm 0.07$ vs. $4 = 0.06 \pm 0.03$; $t = 8.2708E-09$) houve diferenças significativas entre si, já com a DRFR os grupos 1 e 2 ($1 = 0.72 \pm 0.05$ vs. $2 = 0.10 \pm 0.06$; $t = 9.05161E-10$), 2 e 3 ($2 = 0.10 \pm 0.06$ vs. $3 = 0.75 \pm 0.04$; $t = 1.26679E-10$) e 2 e 4 ($2 = 0.10 \pm 0.06$ vs. $4 = 0.83 \pm 0.03$; $t = 6.96837E-10$) tiveram diferenças significativas entre si e o mesmo ocorreu entre os grupos 1 e 2 ($1 = 0.05 \pm 0.01$ vs. $2 = 0.75 \pm 0.05$; $t = 6.60034E-11$), 2 e 3 ($2 = 0.75 \pm 0.05$ vs. $3 = 0.07 \pm 0.02$; $t = 1.75215E-11$) e 2 e 4 ($2 = 0.75 \pm 0.05$ vs. $4 = 0.06 \pm 0.04$; $t = 3.26617E-11$) com FRAR e em relação a FRFR os grupos 1 e 2 ($1 = 0.80 \pm 0.03$ vs. $2 = 0.10 \pm 0.05$; $t = 3.75395E-12$), 2 e 3 ($2 = 0.10 \pm 0.05$ vs. $3 = 0.78 \pm 0.03$; $t = 3.96746E-12$) e 2 e 4 ($2 = 0.10 \pm 0.05$ vs. $4 = 0.83 \pm 0.04$; $t = 3.84629E-11$) apresentaram diferenças significativas entre si. Na fase materna, os grupos 1 e 2 tiveram diferenças significativas entre DRAM ($1 = 0.03 \pm 0.01$ vs. $2 = 0.80 \pm 0.03$; $t = 1.85389E-11$), DRFM ($1 = 0.86 \pm 0.03$ vs. $2 = 0.07 \pm 0.02$; $t = 1.27302E-13$), FRAM ($1 = 0.03 \pm 0.01$ vs. $2 = 0.82 \pm 0.02$; $t = 3.77268E-14$) e FRFM ($1 = 0.85 \pm 0.02$ vs. $2 = 0.05 \pm 0.01$; $t = 4.01829E-18$), além deles, os grupos 2 e 3 tiveram diferenças significativas entre DRAM ($2 = 0.80 \pm 0.03$; vs. $3 = 0.05 \pm 0.01$ $t = 4.894129E-12$),

DRFM (2 = 0,07 ± 0,02; vs. 3 = 0,84 ± 0,03 $t = 6.82412E-21$), FRAM (2 = 0,82 ± 0,02; vs. 3 = 0,05 ± 0,01 $t = 3.23579E-16$) e FRFM (2 = 0,05 ± 0,01; vs. 3 = 0,83 ± 0,02 $t = 2.05502E-24$) e os grupos 2 e 4 também tiveram diferenças significativas entre DRAM (2 = 0,80 ± 0,03; vs. 4 = 0,03 ± 0,02 $t = 3.03504E-11$), DRFM (2 = 0,07 ± 0,02; vs. 4 = 0,87 ± 0,02 $t = 2.10718E-16$), FRAM (2 = 0,82 ± 0,02; vs. 4 = 0,03 ± 0,03 $t = 2.48841E-14$) e FRFM (2 = 0,05 ± 0,01; vs. 4 = 0,87 ± 0,03 $t = 3.97187E-19$). Na fase de pós-desmame os grupos 3 e 4 tiveram diferenças significativas entre si quando comparadas a duração relativa nos braços fechados (3 = 0,87 ± 0,02; vs. 4 = 0,76 ± 0,03 $t = 0.009$). Os grupos 1 e 2 tiveram diferenças significativas entre si quando observamos a DRAD (1 = 0,04 ± 0,02 vs. 2 = 0,82 ± 0,07; $t = 2.59788E-07$), DRFD (1 = 0,78 ± 0,04 vs. 2 = 0,01 ± 0,00; $t = 1.7117E-09$), FRAD (1 = 0,05 ± 0,02 vs. 2 = 0,82 ± 0,03; $t = 6.46125E-13$) e FRFD (1 = 0,79 ± 0,03 vs. 2 = 0,02 ± 0,00; $t = 6.90241E-12$). Os grupos 2 e 3 apresentaram diferenças significativas entre DRAD (2 = 0,82 ± 0,07 vs. 3 = 0,02 ± 0,01; $t = 4.02474E-07$), DRFD (2 = 0,01 ± 0,00 vs. 3 = 0,87 ± 0,02; $t = 9.10837E-22$), FRAD (2 = 0,82 ± 0,03 vs. 3 = 0,02 ± 0,01; $t = 1.28894E-10$) e FRFD (2 = 0,02 ± 0,00 vs. 3 = 0,85 ± 0,01; $t = 4.82034E-30$) e os grupos 2 e 4 também tiveram diferenças significativas entre DRAD (2 = 0,82 ± 0,07 vs. 4 = 0,05 ± 0,03; $t = 3.81208E-07$), DRFD (2 = 0,01 ± 0,00 vs. 4 = 0,76 ± 0,03; $t = 2.61794E-09$), FRAD (2 = 0,82 ± 0,03 vs. 4 = 0,04 ± 0,03; $t = 7.56133E-12$) e FRFD (2 = 0,02 ± 0,00 vs. 4 = 0,81 ± 0,03; $t = 8.00013E-12$).

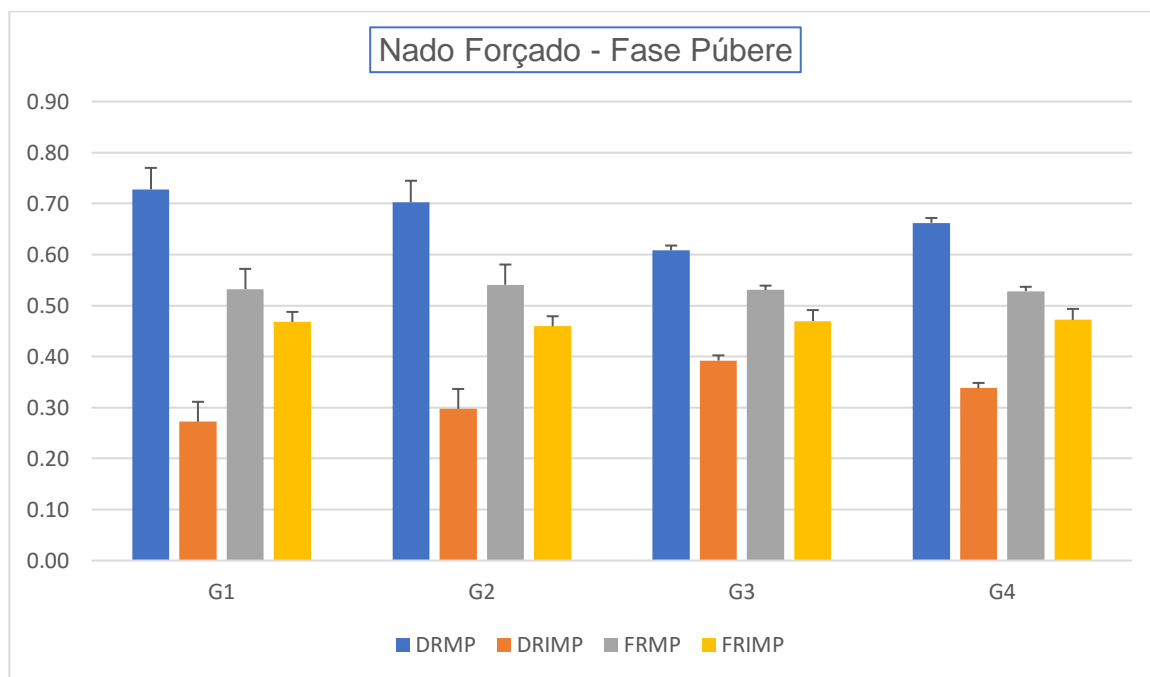
Em relação a esse teste foi possível notar que intragrupo o grupo 2 apresentou diferenças significativas em relação a duração relativa e frequência nos braços abertos e fechados. Diferentemente dos outros grupos como veremos a seguir, o grupo 2 se destacou por um comportamento mais exploratório, ocasionando a maior entrada e locomoção no ambiente tido como mais aversivo. Esse dado mostra que durante esse teste os animais desse grupo apresentaram um comportamento menos ansioso, contudo no teste de campo aberto se teve o oposto. Tal resultado é interessante, pois mostra que dependendo do aparato a resposta dos animais pode se alterar, contudo é perceptível que o grupo 2 pelo menos durante algum teste que afere comportamentos ansiosos demonstrou um comportamento menos ansioso. Quando comparado com os outros grupos (1, 3 e 4), o grupo 2 se destacou pelo comportamento predominantemente exploratório, enquanto os outros três buscaram ficar no ambiente menos aversivo. Tendo esse quadro, se pode

deduzir que durante esse período avaliativo os animais do grupo 2 estavam menos ansiosos do que os animais dos grupos 1, 3 e 4, mas não se pode desconsiderar que no outro teste para medir a ansiedade (campo aberto) tal padrão não ocorreu.

O grupo 4 apresentou diferenças significativas em relação a duração relativa e frequência nos braços abertos e fechados, sendo que a maior parte das ações se deram nos braços fechados. Os grupos 1 e 3 tiveram diferenças significativas majoritariamente nos pontos avaliativos intragrupo, com exceção da DRAP X DRFP (grupos 1 e 3) e FRAP X FRFP (grupo 1). Um ponto interessante é que no caso de DRAP x DRFP do grupo 1 as fêmeas se encontraram em média atuando mais nos braços abertos do que nos braços fechados, mesmo que com uma diferença não significativa, e essa característica se perde nas outras fases, com as fêmeas estando presentes majoritariamente nos braços fechados. Ao compararmos os grupos 1, 3 e 4 se percebe que a duração relativa e frequência nos braços abertos e fechados possuem valores semelhantes o que resulta na falta significância nos resultados, com exceção da duração relativa nos braços fechados na fase de pós-desmame entre os grupos 3 e 4, porém apesar da diferença, ambos os grupos tiveram seus animais mais tempo na área menos aversiva e esse resultado, sustenta baseado na literatura que esses três grupos tendem a serem mais ansiosos (TREIT et al.,1993).

O teste de nado forçado (NF) por submeter os animais a um ambiente completamente fora do habitual, leva os mesmos a um nível alto de estresse, proporcionando a verificação da presença de sinais tipo-depressivos nos camundongos (PORSOLT et al.,1977). A classificação comportamental usada foi a definida por Oliveira, Lima, Carobrez (2005) para ratos e se constitui na categoria de imobilidade (ausência de movimentos bruscos, o animal apresenta apenas movimentos mínimos para manter a cabeça sobre a água ou permanecer boiando) e mobilidade (movimentos horizontais do animal no aparato, com as patas se movimentando vigorosamente). O contraste intragrupo (G1, G2, G3 e G4) das fêmeas, no teste de nado forçado, dentro de cada fase, pode ser visualizado nas Figuras 13 (púberes), 14(reprodutiva), 15 (materna) e 16 (pós-materna).

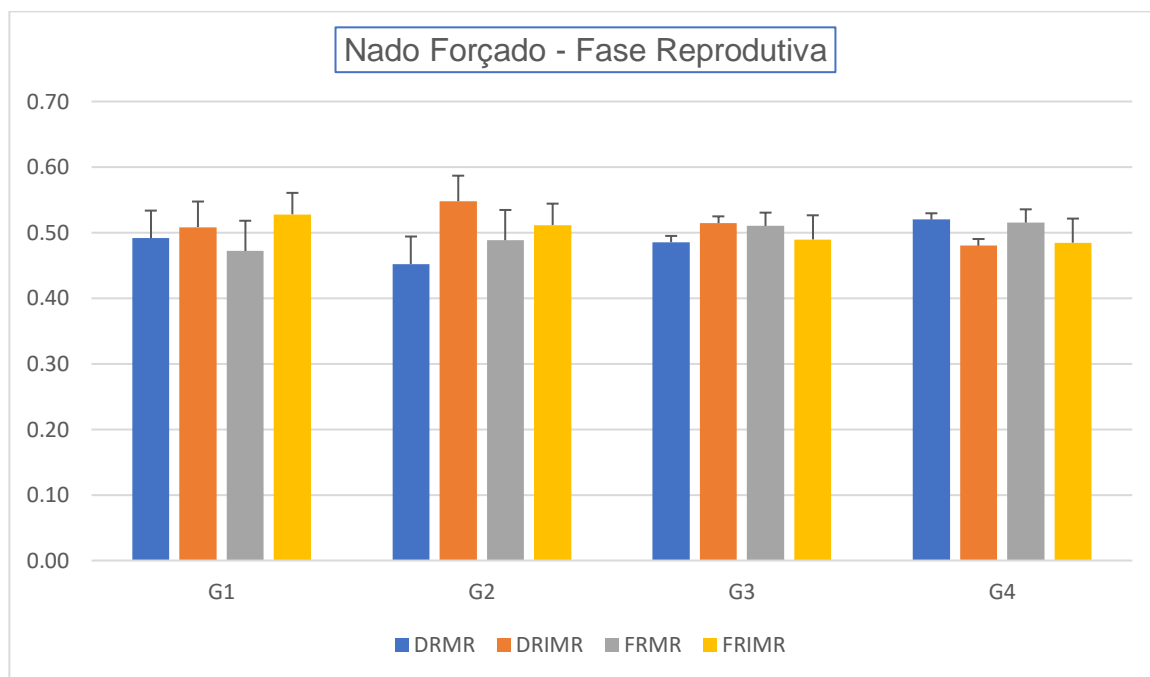
Figura 13. Duração e frequência relativa de mobilidade e imobilidade das fêmeas, na fase púbere, no teste de Nado forçado.



Legenda: DRMP: Duração relativa de mobilidade na fase púbere; DRIMP: Duração relativa de imobilidade na fase púbere; FRMP: Frequência relativa mobilidade na fase púbere; FRIMP: Frequência relativa de imobilidade na fase púbere.

Quando observamos a fase púbere intragrupo, os animais dos grupos 1 (DRMP = $0,73 \pm 0,04$ vs. DRIMP = $0,27 \pm 0,04$; $t = 3.26833E-09$), 2 (DRMP = $0,70 \pm 0,04$ vs. DRIMP = $0,30 \pm 0,04$; $t = 1.15129E-08$), 3 (DRMP = $0,61 \pm 0,04$ vs. DRIMP = $0,39 \pm 0,04$; $t = 0.0004$) e 4 (DRMP = $0,66 \pm 0,02$ vs. DRIMP = $0,34 \pm 0,02$; $t = 0.001$) apresentaram diferenças significativas entre si quando se compara a duração relativa de mobilidade com a duração relativa de imobilidade. Nesse período, os animais mostraram maior mobilidade do que imobilidade, o que denota uma tendência menos depressiva. Já com relação a frequência, ocorreu diferença significativa nos grupos 1 (FRMP = $0,53 \pm 0,01$ vs. FRIMP = $0,47 \pm 0,01$; $t = 2.8064E-05$), 2 (FRMP = $0,54 \pm 0,01$ vs. FRIMP = $0,46 \pm 0,01$; $t = 2.49337E-06$) e 3 (FRMP = $0,53 \pm 0,01$ vs. FRIMP = $0,47 \pm 0,01$; $t = 1.3016E-05$).

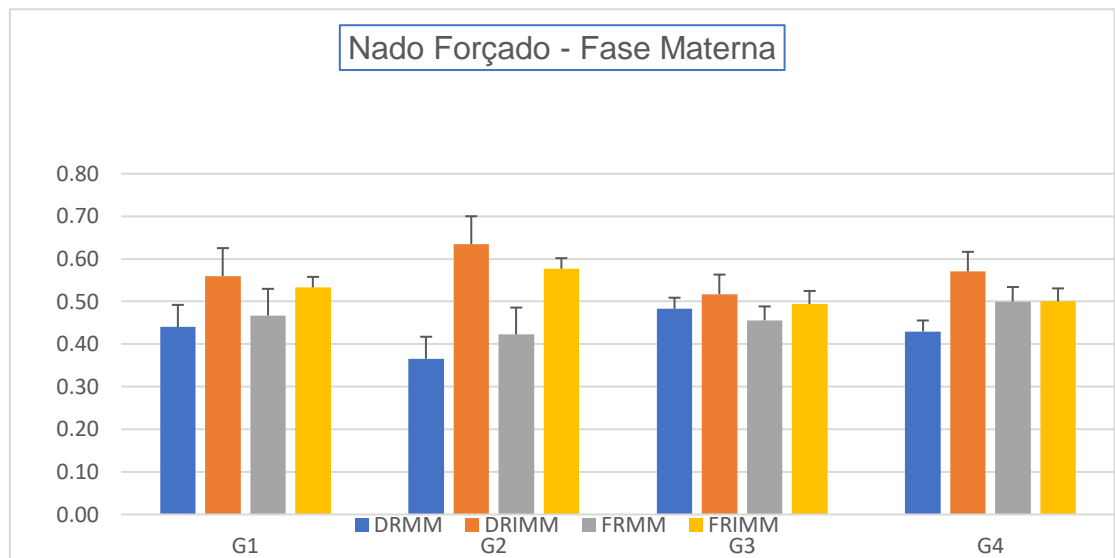
Figura 14. Duração e frequência relativa de mobilidade e imobilidade das fêmeas, na fase reprodutiva, no teste de Nado forçado.



Legenda: DRMR: Duração relativa de mobilidade na fase reprodutiva; DRIMR: Duração relativa de imobilidade na fase reprodutiva; FRMR: Frequência relativa mobilidade na fase reprodutiva; FRIMR: Frequência relativa de imobilidade na fase reprodutiva.

Na fase reprodutiva ocorreu diferença significativa apenas no grupo 1 no FRMR X FRIMR (FRMR = $0,47 \pm 0,01$ vs. FRIMR = $0,53 \pm 0,01$; $t = 0.01$).

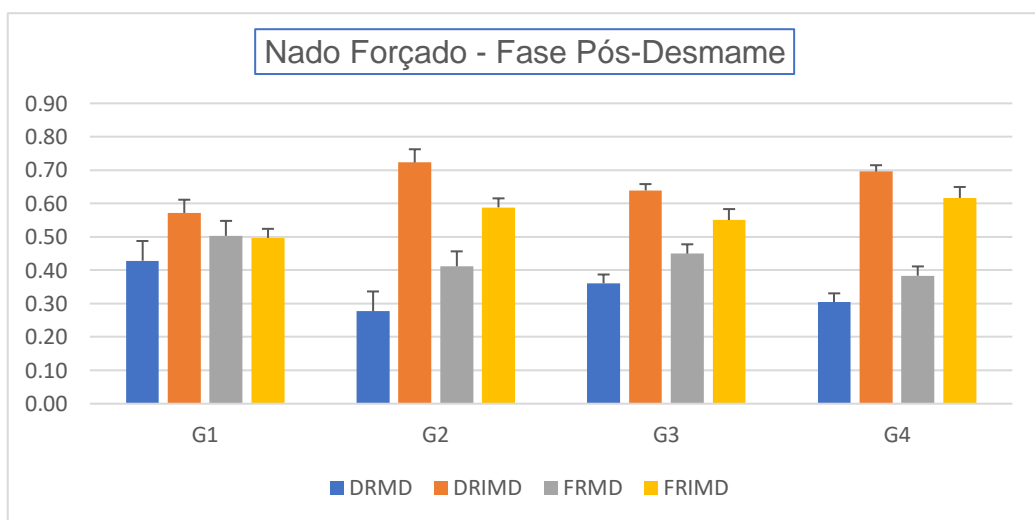
Figura 15 Duração e frequência relativa de mobilidade e imobilidade das fêmeas, na fase materna no teste de Nado forçado.



Legenda: DRMM: Duração relativa de mobilidade na fase materna; DRIMM: Duração relativa de imobilidade na fase materna; FRMM: Frequência relativa mobilidade na fase materna; FRIMM: Frequência relativa de imobilidade na fase materna.

Na fase materna o grupo 2 foi o único a ter diferenças significativas, tanto ao se comparar DRMM X DRIMM (DRMM = $0,45 \pm 0,04$ vs. DRIMM = $0,56 \pm 0,04$; $t = 0.01$) quanto na FRMM X FRIMM (FRMM = $0,49 \pm 0,01$ vs. FRIMM = $0,51 \pm 0,01$; $t = 0.03$), com a maior parte do tempo os animais apresentando maior imobilidade.

Figura 16. Duração e frequência relativa de mobilidade e imobilidade das fêmeas, na fase pós-desmame, no teste de Nado forçado.



Legenda: DRMD: Duração relativa de mobilidade na fase pós-desmame; DRIMD: Duração relativa de imobilidade na fase pós-desmame; FRMD: Frequência relativa mobilidade na fase pós-desmame; FRIMD: Frequência relativa de imobilidade na fase pós-desmame.

Durante o período de pós-desmame os animais dos grupos 2 (DRMD = $0,28 \pm 0,04$ vs. DRIMD = $0,72 \pm 0,04$; $t = 1.28885E-07$), 3 (DRMD = $0,36 \pm 0,04$ vs. DRIMD = $0,64 \pm 0,04$; $t = 8.72028E-05$) e 4 (DRMD = $0,30 \pm 0,03$ vs. DRIMD = $0,70 \pm 0,03$; $t = 0.0003$) tiveram diferenças significativas na análise intragrupo da DRMD X DRIMD e ao se comparara FRMD X FRIMD os grupos 2 (FRMD = $0,41 \pm 0,02$ vs. FRIMD = $0,59 \pm 0,02$; $t = 2.16201E-06$), 3 (FRMD = $0,45 \pm 0,03$ vs. FRIMD = $0,55 \pm 0,03$; $t = 0.01$) e 4 (FRMD = $0,38 \pm 0,03$ vs. FRIMD = $0,62 \pm 0,03$; $t = 0.0002$) tiveram diferenças significativas.

O que se pode observar é que enquanto na fase púbere os animais estão com tendências menos depressivas, tal cenário muda conforme eles vão envelhecendo, culminando com as fêmeas de 3 grupos tendo majoritariamente comportamentos ligados a imobilidade. Estudos anteriores mostraram que fêmeas da linhagem LG/J ficam mais tempo imóveis ao serem expostas ao teste do nado forçado (WATANABE; MONTE; PERIPATO, 2010). Esse dado deve ser levado em consideração para entendermos o cenário apresentado, contudo o comportamento majoritariamente móvel na fase púbere mostra que as fêmeas estavam com tendências menos depressivas nessa fase.

Na comparação entre os grupos, ocorreram diferenças significativas entre os grupos 1 e 3 na DRMP (1 = $0,73 \pm 0,04$ vs. 3 = $0,27 \pm 0,04$; $t = 0.045$) e DRIMP (1 = $0,61 \pm 0,04$ vs. 3 = $0,39 \pm 0,04$; $t = 0.045$). Os grupos 1 e 2 apresentaram diferenças significativas na DRMD (1 = $0,43 \pm 0,06$ vs. 2 = $0,28 \pm 0,04$; $t = 0.047$), DRIMD (1 = $0,57 \pm 0,06$ vs. 2 = $0,72 \pm 0,04$; $t = 0.047$), FRMD (1 = $0,50 \pm 0,03$ vs. 2 = $0,41 \pm 0,02$; $t = 0.01$) e FRIMD (1 = $0,50 \pm 0,03$ vs. 2 = $0,59 \pm 0,02$; $t = 0.01$). Os grupos 1 e 4 apresentaram diferenças significativas em relação a FRMD e FRIMD (1 = $0,50 \pm 0,03$ vs. 4 = $0,50 \pm 0,03$; $t = 0.01$).

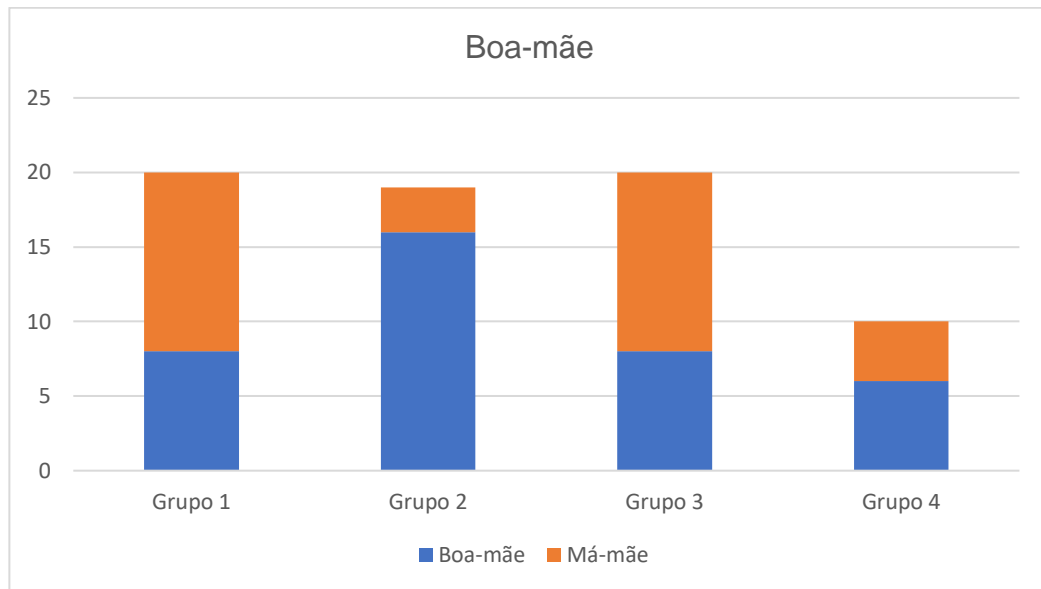
Ao se observar os 3 testes é importante levar em consideração que há estudos que afirmam que em camundongos há relação entre as vias metabólicas que modulam a ansiedade, depressão e estresse (MAGALHAES et al., 2010). Os grupos 1, 3 e 4 apresentaram de modo geral uma tendência ansiosa-depressiva,

com os animais estando majoritariamente em suas quatro fases de vida preferindo a periferia e braços fechados nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado respectivamente, além de ser perceptível a maior tendência a imobilidade no teste de nado forçado. O grupo 2, apresentou uma tendência ao ambiente menos aversivo no caso do campo aberto e no geral uma tendência a imobilidade no teste de nado forçado, contudo no teste de labirinto em cruz elevado esse grupo se difere dos outros três com suas componentes sendo extremamente exploratórias, porém, dado o contraste com o teste de campo aberto, não se pode afirmar categoricamente que as fêmeas do grupo 2 não são ansiosas, mas é notável que há uma maior tendência a entrar em áreas aversivas do que as outras fêmeas. Quanto ao teste de nado forçado, as fêmeas em três das quatro fases de sua vida apresentaram um comportamento análogo a depressão, porém no período de vida púbere, as fêmeas dos quatro grupos apresentaram um comportamento de maior mobilidade, o que mostra que as fêmeas conforme envelheceram perderam essa característica. Os resultados apresentados mostram que majoritariamente os quatro grupos apresentam uma emocionalidade ansiosa acompanhada de um padrão depressivo, porém o grupo 2 aparenta denotar de um grau ansioso um pouco menor. Aparentemente, a ausência do enriquecimento ambiental fez falta quanto olhamos a emocionalidade e o bem-estar dos animais cativos.

4.2 Cuidado materno

Dentre os resultados obtidos para caracterizar o sucesso materno, a característica boa-mãe (quando a fêmea consegue deixar pelo menos um descendente viável) é fundamental, pois como dito por dito por König e Markl (1987), a viabilidade da prole está relacionado com o sucesso reprodutivo. Na figura 17 podemos verificar as diferenças entre o tipo de mãe entre os grupos de estudo.

Figura 17. Diferença entre o tipo de mãe comparada dentre os grupos de estudo.



Como é possível analisar na Figura 17, ocorreram diferenças significativas na característica boa-mãe quando se compara os grupos 1 e 2 ($\chi^2 = 0,00456$; $p < 0,05$) e 2 e 3 ($\chi^2 = 0,00456$). Como na comparação entre os grupos 1 e 3 não se viu uma diferença significativa ($\chi^2 = 1$; $p > 0,05$), fica nítido que o grupo 2 se destacou quanto a essa característica. O grupo 2 foi o que teve o maior número de boas-mães (16 fêmeas), fato curioso, já que tais fêmeas são descendentes de fêmeas não enriquecidas. Os grupos 1 e 4 ($\chi^2 = 0,300623$; $p > 0,05$), 2 e 4 ($\chi^2 = 0,147569$; $p > 0,05$), e 3 e 4 ($\chi^2 = 0,300623$; $p > 0,05$) não mostraram diferenças significativas quando comparados.

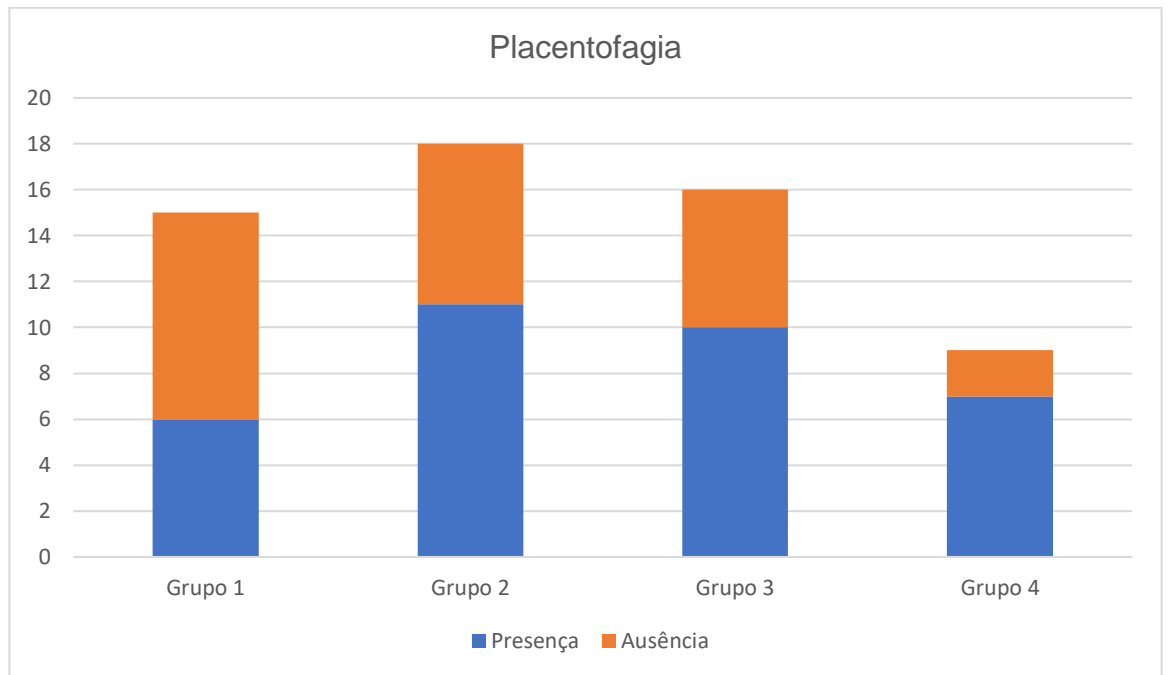
No estudo de Rosa (2022) o grupo 2 não apresentou essa diferença significativa de boas-mães quando comparado com os grupos de animais enriquecidos. O enriquecimento ambiental em determinadas ocasiões pode ser estressante para o animal, seja pelo momento de introdução do EA, ambientação e manutenção do EA no recinto ou pelo próprio enriquecimento escolhido (MASON, et al., 2007). Como no grupo 2 ocorreu uma estabilidade no ambiente em que as mães das fêmeas analisadas estavam alocadas (resultante da ausência do EA), é possível que um ambiente idêntico para as fêmeas estudadas nessa pesquisa levou a comportamentos que as promoveram como melhores genitoras do que as fêmeas dos outros grupos. Nos grupos 3 e 4, as matrizes das fêmeas analisadas nessa dissertação foram expostas ao enriquecimento ambiental nas fases púbere e

materna respectivamente, já as do grupo 1 tiveram sua exposição ao EA desde seu nascimento até o período de pós-desmame. Como já é sabido, o enriquecimento ambiental por normalmente promover um ambiente mais favorável para os animais cativos, seu comportamento é alterado positivamente e uma consequência pode ser um aumento no sucesso reprodutivo, porém esse crescimento no êxito reprodutivo dos animais em cativeiro não é uma regra (BOERE, 2001; LINE, 1987; MASON et al., 2007; BERESCA, 2014). No estudo de Rosa (2022), os grupos de animais enriquecidos demonstraram em determinados aspectos o efeito do enriquecimento ambiental, já aqui é possível ver que a descendência não demonstrou fenotipicamente os efeitos do EA de maneira positiva no que tange o sucesso reprodutivo, pois foi o grupo 2 que obteve as melhores taxas de boas-mães com 84% das fêmeas conseguindo deixar ao menos um descendente, seguido pelo grupo 4 com 60% e pelos grupos 1 e 3 empatados com 40%.

Para a viabilidade da prole diversas ações maternas são necessárias, sejam elas de proteção a invasores até a amamentação (PERIPATO; CHEVERUD, 2002; SMOLINKSY et al., 2009). Para conseguirmos analisar como as fêmeas lidaram com seus filhotes será apresentado a seguir uma comparação entre os grupos em relação a placentofagia, presença de leite no estômago dos filhotes, agressividade, altura do ninho, temperatura do ninho, ganho de peso das crias após o nascimento, tamanho de ninhada nascida e tamanho de ninhada viável. Intragrupo se comparou o tamanho de ninhada nascida com o tamanho de ninhada viável, para demonstrar se ocorreram perdas significativas de filhotes. Todos esses dados nos auxiliam a entender o que levou as fêmeas do grupo 2 a serem as melhores genitoras e como cada grupo se comportou.

Responsável por ser o vínculo primário entre a mãe e seu descendente, a placentofagia foi avaliada através da sua presença ou ausência (Figura 18).

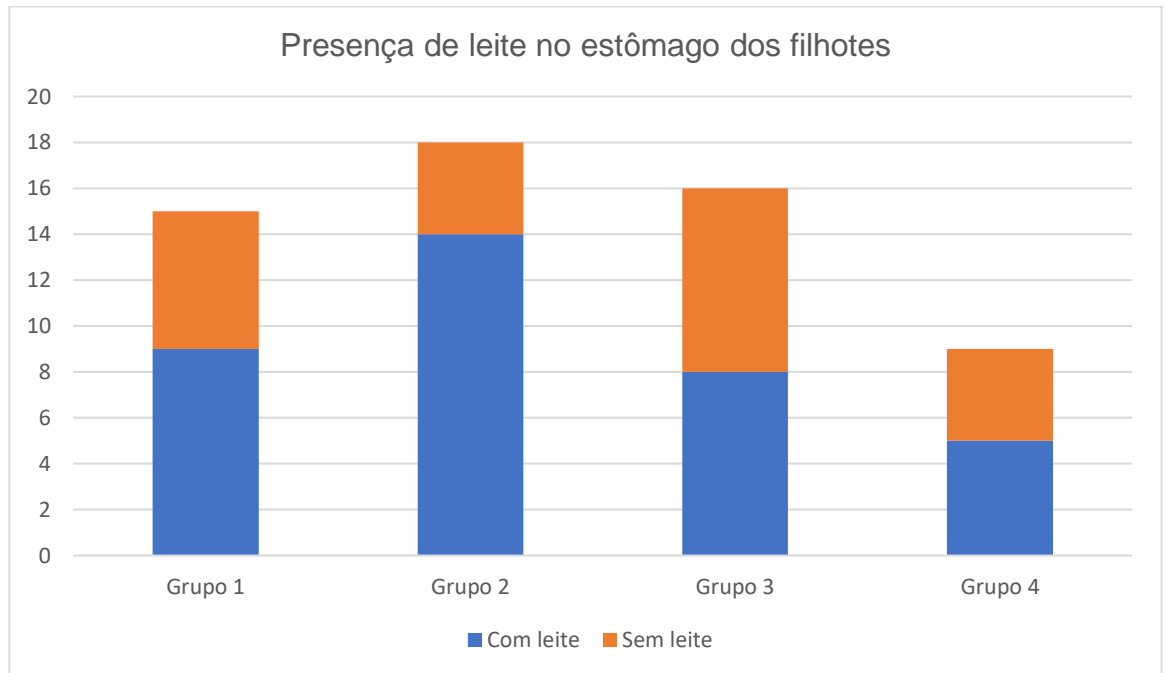
Figura 18. Comportamento de placentofagia entre as fêmeas dos grupos estudados



A placentofagia ocorre quando a genetriz ingere a placenta ao limpar o filhote (TOLEDO, 2005). Quando comparados os grupos 1 e 2 ($\chi^2 = 0,226942$; $p > 0,05$), 1 e 3 ($\chi^2 = 0,210298$; $p > 0,05$), 1 e 4 ($\chi^2 = 0,072143$; $p > 0,05$), 2 e 3 ($\chi^2 = 0,933708$; $p > 0,05$), 2 e 4 ($\chi^2 = 0,386476$; $p > 0,05$) e 3 e 4 ($\chi^2 = 0,431847$; $p > 0,05$), nenhum deles demonstraram diferenças de cunho significativo. Nesse parâmetro as genitoras do grupo quatro tiveram 77,7% das fêmeas que pariram ingerindo a placenta ao limpar o filhote e as fêmeas do grupo um apresentando pior desempenho com apenas 40% realizando tal comportamento.

Logo após o parto e no decorrer da primeira semana de vida, os neonatos são absolutamente dependentes do leite materno para sua sobrevivência e desenvolvimento, logo, uma boa genitora produz leite e amamenta sua prole (TUCKER, 1994; QUARRIE; ADDEY; WILDE, 1996). Os dados de leite no estômago dos animais, indicativos de amamentação, podem ser verificados na Figura 19.

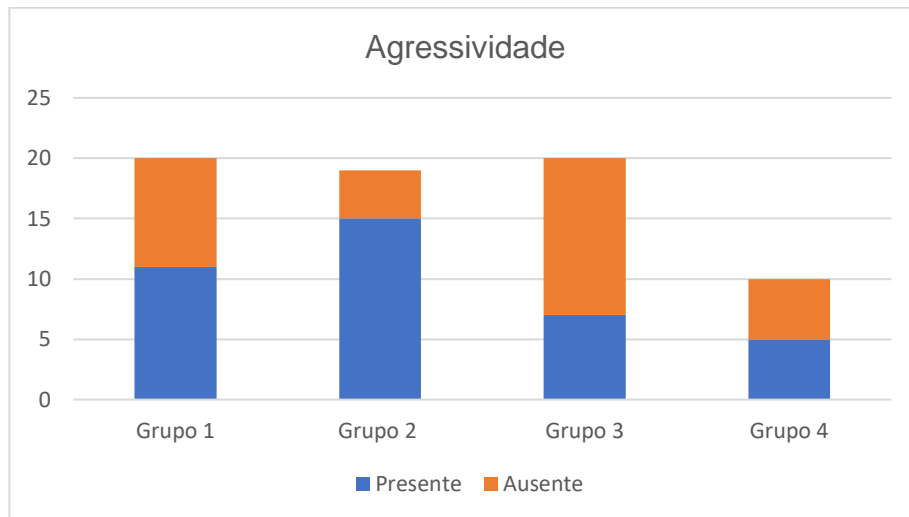
Figura 19. Amamentação dos filhotes, verificada entre grupos.



Foi observada a presença de leite no estômago dos filhotes ao longo dos seus sete primeiros dias de vida. Como se vê na Figura 19, os grupos 1 e 2 ($\chi^2 = 0,268509$; $p > 0,05$), 1 e 3 ($\chi^2 = 0,576086$; $p > 0,05$), 1 e 4 ($\chi^2 = 0,830696$; $p > 0,05$), 2 e 3 ($\chi^2 = 0,090697$; $p > 0,05$), 2 e 4 ($\chi^2 = 0,23323$; $p > 0,05$) e 3 e 4 ($\chi^2 = 0,789561$; $p > 0,05$) não tiveram diferenças significativas entre si. Contudo, vale ressaltar que os neonatos descendentes do grupo 2 apresentaram as maiores taxas de presença de leite no estômago, com 77,8% das fêmeas que pariram os alimentando de maneira satisfatória. Sendo sua única fonte de alimento nos dias seguidos de sua ascendência, para os filhotes as concentrações de proteínas, lactose e lipídeos no leite são primordiais para a sobrevivência da prole e seu bom desenvolvimento (MOREIRA, 2015; SHOJI; KATO, 2006).

Genitoras que apresentam um bom cuidado materno adotam um comportamento mais agressivo para defender seus filhotes e proteger seu ninho de possíveis agentes agressores (BONSIGNORE et al., 2006; MOREIRA, 2015). Para medir tal comportamento, se avaliou a postura da fêmea ao se manusear os filhotes para pesagem e durante a aferição da altura e temperatura do ninho (Figura 20).

Figura 20. Postura materna de agressividade contra intrusos

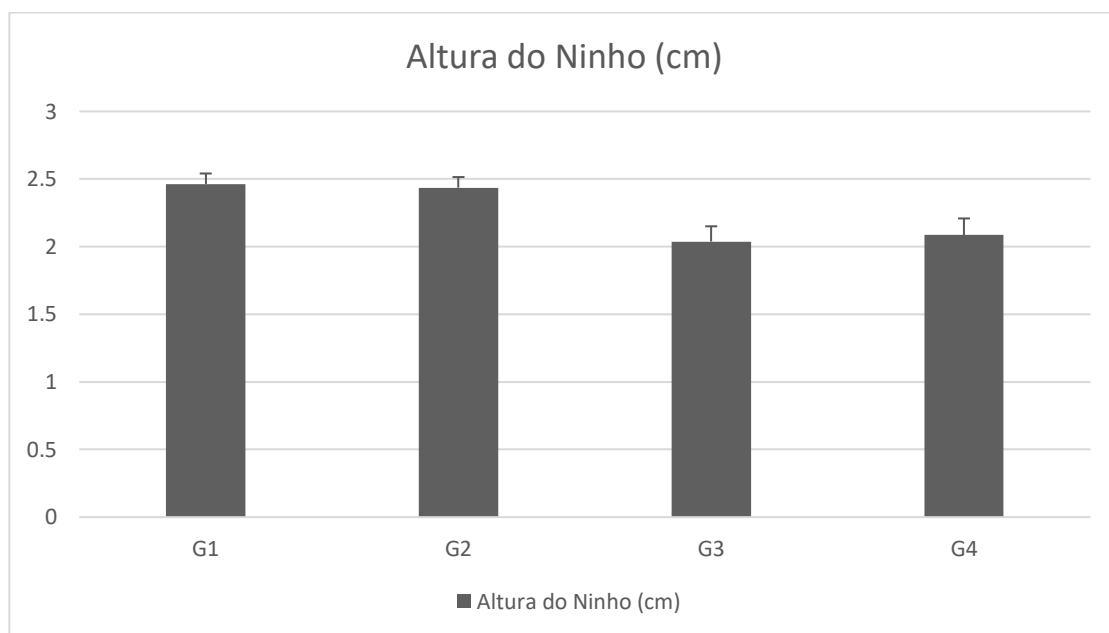


Como é possível observar na figura 20 ocorrem diferenças significativas quando comparados os grupos 2 e 3 ($\chi^2 = 0,005667$; $p < 0,05$). O grupo 2 possui o maior número de fêmeas demonstrando um comportamento agressivo durante o período materno, com 78,9% das fêmeas apresentando comportamentos de caráter agressivo. Apesar de serem os piores grupos no que diz respeito a deixarem pelo menos um descendente viável, houve uma diferença interessante quando observamos esse comportamento entre os grupos 1 e 3, com o grupo 1 tendo 55% das fêmeas reativas a ações externas e o grupo 3 apenas 35%, a menor porcentagem entre os 4 grupos. Além do cuidado materno, a presença ou ausência de agressividade pode estar relacionado com o estado emocional dos animais. Os grupos 1 e 2 ($\chi^2 = 0,11280$; $p > 0,05$), 1 e 3 ($\chi^2 = 0,2036278$; $p > 0,05$), 1 e 4 ($\chi^2 = 0,795809$; $p > 0,05$), 2 e 4 ($\chi^2 = 0,109248$; $p > 0,05$) e 3 e 4 ($\chi^2 = 0,4291953$; $p > 0,05$) não tiveram diferenças significativas entre si.

A construção do ninho tem sua importância pelo fato do mesmo proteger a prole de predadores, auxiliar na manutenção da temperatura corporal das crias e diminuição na evaporação de água no corpo, além de reforçar a ligação entre a mãe e o filhote, facilitando por consequência os cuidados maternos mediante ajuntamento das crias no ninho (BOAKE 1994; LYNCH, 1994; FRIEDMAN; BRUNO, 1976; FLEMING et al., 1999). Roedores iniciam o comportamento materno nos dias que precedem o parto com a construção de ninhos mais estruturados e sua manutenção ocorre após o nascimento da sua descendência (BRIDGES et al., 1996; WEBER; ANNA; OLSSON, 2008). Como não foi ofertado materiais para construção

do ninho, as fêmeas os construíram cavando a maravalha e criando um perímetro (Figura 21).

Figura 21. Comportamento de construção de ninho verificado pela sua altura



Na figura 21 podemos observar que os grupos 1 e 2 tiveram a média de ninhos mais altos e na comparação dos grupos 1 e 3 ($1 = 2,463651 \pm 0,077277$ vs. $3 = 2,037857 \pm 0,112673$; $t = 0,00564$) e 2 e 3 ($2 = 2,43609 \pm 0,078378$ vs. $3 = 2,037857 \pm 0,112673$; $t = 0,006515$) ocorreram diferenças significativas. Os grupos 1 e 2 ($1 = 2,463651 \pm 0,077277$ vs. $2 = 2,43609 \pm 0,078378$; $t = 0,818067$), 1 e 4 ($1 = 2,463651 \pm 0,077277$ vs. $4 = 2,085714 \pm 0,122831$; $t = 0,061854$), 2 e 4 ($2 = 2,43609 \pm 0,078378$ vs. $4 = 2,085714 \pm 0,122831$; $t = 0,07544$) e 3 e 4 ($3 = 2,037857 \pm 0,112673$ vs. $4 = 2,085714 \pm 0,122831$; $t = 0,812589$) não demonstraram diferenças significativas entre si.

Para aferir a temperatura do ninho se fez uma média de quantos graus Celsius o ninho estava mais quente do que o ambiente durante os 7 dias do período materno, nenhum dos grupos demonstraram diferenças significativas entre si, contudo o grupo 2 apresentou os ninhos com maior grau de temperatura, com em média $0,265^{\circ}$ C mais quente do que a temperatura ambiente. Já o grupo 3 se mostrou o que obteve os menores ganhos de temperatura, com uma média dos ninhos apenas $0,205^{\circ}$ C mais quente do que o ambiente. A temperatura afeta diretamente sobre os processos comportamentais e fisiológicos dos camundongos

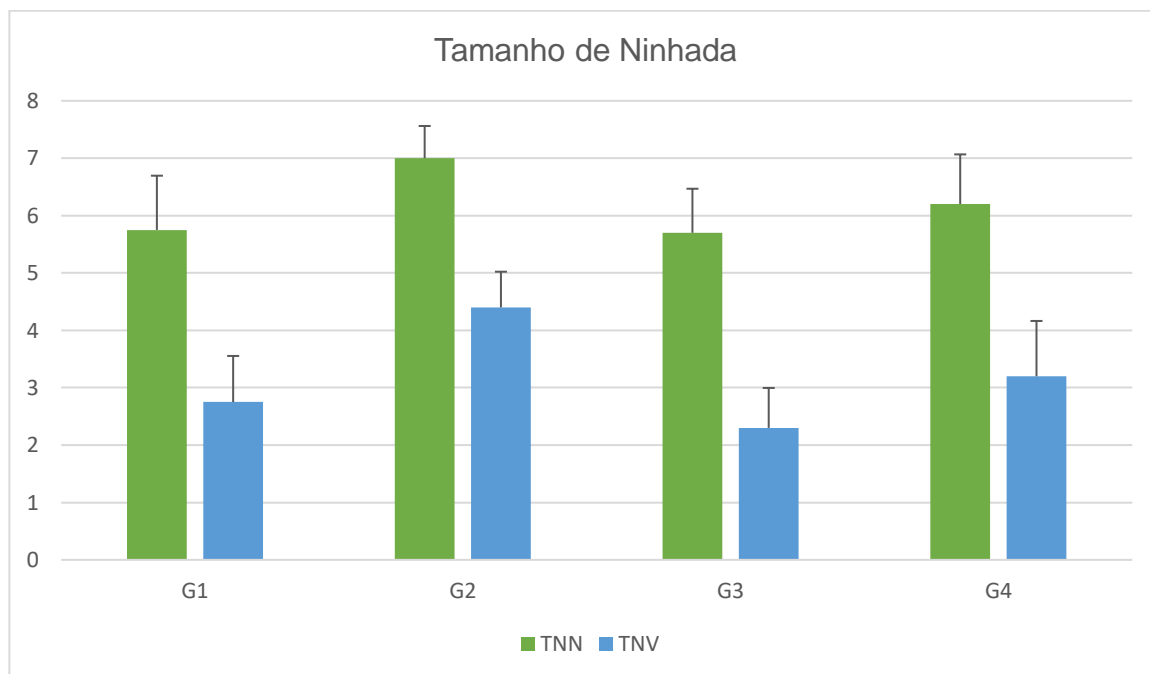
(MOREIRA, 2015). Esse dado reforça a ligação entre altura do ninho e temperatura do ninho, pois o grupo 2 foi o que obteve as maiores alturas de ninho e o 3 as menores. Quando vemos os comparativos entre grupos, se tem os resultados apresentados a seguir: 1 e 2 ($1 = 0,265385 \pm 0,056896$ vs. $2 = 0,275439 \pm 0,053581$; $t = 0,910588$), 1 e 3 ($1 = 0,265385 \pm 0,056896$ vs. $3 = 0,205 \pm 0,041554$; $t = 0,46939$), 1 e 4 ($1 = 0,265385 \pm 0,056896$ vs. $4 = 0,256667 \pm 0,10127$; $t = 0,930748$), 2 e 3 ($2 = 0,275439 \pm 0,053581$ vs. $3 = 0,205 \pm 0,041554$; $t = 0,30614$), 2 e 4 ($2 = 0,275439 \pm 0,053581$ vs. $4 = 0,256667 \pm 0,10127$; $t = 0,932959$) e 3 e 4 ($3 = 0,205 \pm 0,041554$ vs. $4 = 0,256667 \pm 0,10127$; $t = 0,533002$).

A pesagem mostra a variação de peso da progênie. Animais que possuíram um bom cuidado materno, possuem uma variação positiva de peso maior do que animais que não usufruíram um bom cuidado materno (BONSIGNORE et al., 2006). Calculou-se os ganhos de peso em gramas do nascimento da prole até o sétimo dia e o ganho de peso dos filhotes da primeira semana de vida até o desmame na terceira semana. Quando observamos os ganhos de peso da progênie nos quatro grupos durante os sete primeiros dias de vida, não se teve diferenças significativas entre os grupos 1 e 2 ($1 = 1,441111 \pm 0,106609$ vs. $2 = 1,32 \pm 0,128662$; $t = 0,569436$), 1 e 3 ($1 = 1,441111 \pm 0,106609$ vs. $3 = 1,35375 \pm 0,108087$; $t = 0,713492$), 1 e 4 ($1 = 1,441111 \pm 0,106609$ vs. $4 = 1,888 \pm 0,075867$; $t = 0,174177$), 2 e 3 ($2 = 1,32 \pm 0,12866$ vs. $3 = 1,35375 \pm 0,108087$; $t = 0,879148$), 2 e 4 ($2 = 1,32 \pm 0,12866$ vs. $4 = 1,888 \pm 0,075867$; $t = 0,089353$) e 3 e 4 ($3 = 1,35375 \pm 0,108087$ vs. $4 = 1,888 \pm 0,075867$; $t = 0,117967$). Ao analisar os ganhos de peso semanal, também não houve diferenças significativas entre os grupos 1 e 2 ($1 = 6,736667 \pm 0,403105$ vs. $2 = 6,29375 \pm 0,505253$; $t = 0,592926$), 1 e 3 ($1 = 6,736667 \pm 0,403105$ vs. $3 = 6,66875 \pm 0,209067$; $t = 0,922713$), 1 e 4 ($1 = 6,736667 \pm 0,403105$ vs. $4 = 5,94 \pm 0,668418$; $t = 0,283988$), 2 e 3 ($2 = 6,29375 \pm 0,505253$ vs. $3 = 6,66875 \pm 0,209067$; $t = 0,565283$), 2 e 4 ($2 = 6,29375 \pm 0,505253$ vs. $4 = 5,94 \pm 0,668418$; $t = 0,603316$) e 3 e 4 ($3 = 6,66875 \pm 0,209067$ vs. $4 = 5,94 \pm 0,668418$; $t = 0,176706$).

Resultado direto do comportamento materno das fêmeas, a quantidade de descendentes é de suma importância para se entender o cenário materno apresentado. Já sabemos que o grupo 2 foi aquele com maior número de genitoras com pelo menos um descendente viável, agora iremos analisar se houve perdas significativas intragrupo entre o tamanho de ninhada nascida (TNN) e tamanho de

ninhada viável (TNV) e se algum grupo se destacou significativamente quando comparados entre si em relação a quantidade de filhotes nascidos e viáveis após o período de cuidado materno (Figura 22).

Figura 22. Tamanho de ninhada entre os grupos estudados



Legenda: TNN: Tamanho de ninhada ao nascimento; TNV: Tamanho de ninhada viável.

Quando se observa o TNN dos grupos no gráfico 06 se nota que não ocorreram diferenças significativas entre os grupos, desse modo, quanto ao número de indivíduos nascidos os quatro grupos apresentaram uma média de nascimentos semelhantes. Comparação do TNN dos grupos 1 e 2 (1 = 5,8 ± 0,95 vs. 2 = 7 ± 0,56; $t = 0,26$), 1 e 3 (1 = 5,8 ± 0,95 vs. 3 = 5,7 ± 0,77; $t = 0,97$), 1 e 4 (1 = 5,8 ± 0,95 vs. 4 = 6,2 ± 0,87; $t = 0,73$), 2 e 3 (2 = 7 ± 0,56 vs. 3 = 5,7 ± 0,77; $t = 0,18$), 2 e 4 (2 = 7 ± 0,56 vs. 4 = 6,2 ± 0,87; $t = 0,45$) e 3 e 4 (3 = 5,7 ± 0,77 vs. 4 = 6,2 ± 0,87; $t = 0,67$).

Agora, ao compararmos os grupos quanto ao TNV, vemos no gráfico 06 que o grupo 2 apresentou uma diferença significativa quando comparado ao grupo 3 (2 = 4,4 ± 0,62 vs. 3 = 2,3 ± 0,70; $t = 0,03$). Tal resultado pode ter ligação com o fato do grupo 3 não ter se destacado positivamente nos parâmetros de cuidado materno, diferentemente do grupo 2. Juntamente com o grupo 1, o grupo 3 foi o que apresentou o menor número de boas-mães e aqui se nota que o grupo 3 teve o

menor número de TNV seguido pelo grupo 1. Os grupos 1 e 2 ($1 = 2,8 \pm 0,80$ vs. $2 = 4,4 \pm 0,62$; $t = 0,12$), 1 e 3 ($1 = 2,8 \pm 0,80$ vs. $3 = 2,3 \pm 0,70$; $t = 0,67$), 1 e 4 ($1 = 2,8 \pm 0,80$ vs. $4 = 3,2 \pm 0,96$; $t = 0,72$), 2 e 4 ($2 = 4,4 \pm 0,62$ vs. $4 = 3,2 \pm 0,96$; $t = 0,32$) e 3 e 4 ($3 = 2,3 \pm 0,70$ vs. $4 = 3,2 \pm 0,96$; $t = 0,46$) não tiveram diferenças significativas entre si.

Agora, ao se observar intragrupo, fica evidente pela figura 22 que os grupos 1 (TNN = $5,8 \pm 0,95$ vs. TNV = $2,8 \pm 0,80$; $t = 0,020564$), 2 (TNN = $7 \pm 0,56$ vs. TNV $4,4 \pm 0,62$; $t = 0,000752$), 3 (TNN = $5,7 \pm 0,77$ vs. TNV $2,3 \pm 0,70$; $t = 4,8E-0,5$) e 4 (TNN = $6,2 \pm 0,87$ vs. TNV $3,2 \pm 0,96$; $t = 0,013376$) tiveram perdas significativas entre TNN e TNV. Esse dado, mostra que nenhum dos quatro grupos tiveram matrizes que conseguiram manter um número de ninhada satisfatório quando comparado com a quantidade de filhotes nascidos. A falta de enriquecimento ambiental pode ter sua relevância nesse resultado, porém algo que fica claro é que não se percebeu os efeitos do EA aplicados na geração anterior dos grupos 1, 3 e 4, sendo que, as fêmeas do grupo 2 que não foram enriquecidas em nenhuma geração se saíram melhor, resultado da possível estabilidade do ambiente em que estavam inseridas, já que o EA e sua manutenção pode acabar tendo efeitos estressores.

5 CONCLUSÕES

O enriquecimento ambiental tem se mostrado de grande valia para a manutenção de animais em cativeiro, contudo é essencial avaliações constantes do comportamento dos animais, pois somente assim é possível validar o enriquecimento ambiental proposto. Estudos vem demonstrando a eficiência do enriquecimento ambiental e suas possíveis influências epigenéticas nos seres vivos. No caso dos animais objetos de estudo, o enriquecimento ambiental não demonstrou nenhum efeito transgeracional no aspecto da emocionalidade, com os *Mus musculus* LG/J apresentando tendências ansiosa-depressiva, além disso, o grupo 2 (descendentes de fêmeas não enriquecidas) foi o que apresentou uma tendência menos ansiosa no teste de LCE, indo contra o que era esperado, a de que esse grupo seria o mais ansioso.

Ao observar os parâmetros relacionados com o cuidado materno, o grupo 2 foi o que se destacou positivamente, tendo um número maior de fêmeas com pelo

menos um filhote viável. Por ser do grupo descendente de fêmeas não enriquecidas, mais uma vez não se demonstra fenotipicamente um efeito transgeracional do enriquecimento ambiental relacionado com o cuidado materno.

Enquanto se nota que o efeito transgeracional do EA não impactou fenotipicamente as fêmeas de *Mus musculus*, a emocionalidade pode ser relacionada com o sucesso materno. O grupo 2 foi o que apresentou menor tendência de ansiedade e foi justamente esse grupo o que teve maior sucesso reprodutivo, com 84% das fêmeas deixando um filhote viável, o que reforça a ligação já descrita na literatura entre a emocionalidade e o cuidado materno.

O enriquecimento ambiental é importante e através dos resultados obtidos fica a recomendação dele ser aplicado recorrentemente, ou seja, mesmo que na geração anterior se teve exposição ao EA, não se pode negligenciá-lo na geração subsequente.

REFERÊNCIAS

ALCOCK, J. **Animal behavior: an evolutionary approach**. 5 ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1993. 620 p.

ALMEIDA, C. S. **Enriquecimento ambiental perinatal, seu impacto sobre o comportamento análogo à ansiedade e implicações transgeracionais**. 2016. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, UFRRJ, Seropédica, 2016.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205-235, 1973.

AUGUSTSSON, H.; VAN DE WEERD, H. A.; KRUITWAGEN, C. L. J. J.; BAUMANS, V. Effect of enrichment on variation and results in the light/dark test. **Laboratory Animals**. v. 37, n. 4, p. 328-340, out. 2003.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Journal Cell**, v. 136, p. 215-236, 2009.

BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v. 46, n.2, p. 162-170. 2005.

BERESCA, A. M. Enriquecimento Ambiental. In: CUBAS, Z.; SILVA, J.; CATÃO-DIA, J. **Tratado de Animais Selvagens**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 2-9.

BLANCHARD, C. D.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 81, n. 2, p. 281-290, nov. 1972.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry**, n. 13, p. 3–14, 1989.

BLASS, E. M.; TEICHER, M. H. Suckling. **Science**, v. 210, p. 15-22, 1980.

BOAKE, C. R. B. **Quantitative Genetic Studies of Behavioral Evolution**. The University of Chicago Press, Chicago, 1994.

BOERE, V. **Environmental enrichment for Neotropical primates in captivity: a review**. *Ciência Rural*, 2001. p. 451 - 460. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n3/a31v31n3.pdf>>. Acesso em: 06 mai. 2022.

BONSIGNORE, L. T. et al. Acute perinatal asphyxia at birth has long-term effects on behavioural arousal and maternal behaviour in lactating rats. **Behavioural Brain Research**, v.172, p.54-62, 2006.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa no 33, de 18 de novembro de 2016b. Baixa o Capítulo "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 21 nov. 2016. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=5&data=21/11/2016>>. Acesso em 07 ago. 2022.

BRIDGES, R. S.; ROBERTSON, M. C.; SHIU, R. P.; STURGIS, J. D.; HENRIQUEZ, B. M.; MANN, P. E. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. **Endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 756-763, 1997.

BRUNNER, D. et al. Anxiety, motor activation, and maternal- infant interactions in 5HT1B knockout mice. **Behav Neurosci**, v. 113, n. 3, p. 587-600, 1999.

CARLSTEAD, K.; SEIDENSTICKER, J.; BALDWIN, R. Environmental enrichment for zoo bears. **Zoo Biology**, v. 10, n. 1, p. 3–16, 1991.

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

CHMIEL, D. J.; NOONAM M. Preference of laboratory rats for potentially enriching stimulus objects. **Laboratory Animals**, v. 30, p. 97-101, 1996.

CHOLERIS, E. et al. 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.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2007.

COE, J. C. **Design and perception: making the zoo world real**. **Zoo Biology**, 1985. p. 197-208.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos**. Brasília, 2013. 50 p.

CONWAY, W. The role of zoos in the 21st century. **International Zoo Yearbook**, v. 38, n. 1, p. 7-13. 2003.

COSTA, A. P. R. et al. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 150-155, 2013.

COSTALL, B. J.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; TOMKINS, D. M. Exploration of a mice a black and white box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 32, p. 777-785, 1989.

COSTA, E. B.; PACHECO, C. Epigenética: Regulação da Expressão Gênica em Nível Transcricional e Suas Implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 125-136, jul. 2013.

CUNLIFFE-BEAMER, T. L.; LES, E. P. The laboratory mouse. In: POOLE, T. B. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 6. ed. British: Blackwell Science, 1987. cap. 18, p. 275-308.

DEL-CLARO, K. **Comportamento Animal: Uma introdução a ecologia comportamental**. Jundiaí: Editora Livraria Conceito, 2004. 134p.

DUDLEY, K. J.; LI, X.; KOBOR, M. S.; KIPPIN, T. E.; BREDY, T. W. Epigenetics mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders. **Neurosci Biobehav Ver**, v. 35, p. 1544-1551, 2011.

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

FAGUNDES D. J.; TAHA M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras**, v.19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FANTAPPIÉ, M. Epigenética e Memória Celular. **Revista Carbono**, n. 03, 2013. Disponível em: <<http://revistacarbono.com/artigos/03-epigenetica-e-memoria-celular-marcelofantappie/>>. Acesso em 19 ago. 2022.

FEIJÓ, A. G. S. **Utilização de Animais na Investigação e Docência: uma reflexão ética necessária**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2005. 145 p.

FEIJÓ A. G. S.; BRAGA L. M. G. M.; PITREZ P. M. C. **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2010. 421p.

FELIPPE, P.; ADANIA, C. Conservação e Bem-estar Animal. In: CUBAS, Z.; SILVA, J.; CATÃO-DIA, J. **Tratado de Animais Selvagens**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2017. p. 2-9.

FERNANDES-SILVA, M. M.; CARVALHO, V. O.; GUIMARÃES, G. V.; BACAL, F.; BOCCHI, E. A. Exercício Físico e MicroRNAs: Novas Fronteiras na Insuficiência Cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n.5, p. 459-466, 2012.

- 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 and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 673-685, 1999.
- FRANCIS, D.; DIORIO, J.; LIU, D.; MEANEY, M. J. Nongenomic Transmission Across Generations of Maternal Behavior and Stress Responses in the Rat. **Science**, v. 286, p. 1155-1158, nov. 1999. GALRÃO, Ana Luiza Resende. **Metilação do gene transportador sódio-iodo (NIS) em tumores de tireoide**. 2011. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, 2011.
- FRANCISCO, M. R.; SILVEIRA, L. S. Conservação animal ex situ. In: PIRATELLI, A. J.; FRANCISCO, M. R. **Conservação da Biodiversidade: dos conceitos às ações**. Ed. 01. Rio de Janeiro: Technical Books, 2013. cap. 5, p. 117-130.
- FRIEDMAN, M. I.; BRUNO, J. P. Exchange of water during lactation. **Science**, v. 197, p. 409-410, ago. 1976.
- GALEF, J. R. B. G. Should large rats be housed in large cages. **Canadian Psychologie Canadienne**, v. 34, n. 2, p. 203-207, 1993.
- GARCIA, L. C. F.; BERNAL, F. E. M. Enriquecimento ambiental e bem-estar de animais de zoológicos. **Ciência Animal**, v. 25, n. 1, p. 46-52, 2015.
- GIBBS, W. W. Além do DNA. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 16, p. 44-51, 2007.
- GILBERT-NORTON, L. B.; LEAVER, L. A.; SHIVIK, J. A. The effect of randomly altering the time and location of feeding on the behaviour of captive coyotes (*Canis latrans*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 120, n. 3, p. 179–185, 2009.
- GNADT, B. J. Ethical and legal perspectives. In: SUCKOW, M. A.; WEISBROTH S. T.; FRANKLIN C. L. **The laboratory rat**. USA: Elsevier Academic Press, 2006. p. 53-70.
- 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.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual evolution in the emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403. 1934.
- 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. **Behav. Neurosci.**, v. 100, p. 64-70, 1986.
- HEDIGER, H. **Man and animal in the zoo**. London: Routledge and Kegan, 1969. 303 p.
- HEDIGER, H. **Wild animals in captivity**. London: Butterworths, 1950. 207 p.
- HONESS, P. E.; MARIN, C. M. Enrichment and aggression in primates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n.3, p.-413-436, 2006.

- HOWELL, P. M.; JR, L. S.; REN, S.; BEHLEN, C.; FODSTAD, O.; RIKER, A. I. Epigenetics in human melanoma. **Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center**, Tampa, v. 16, n. 6, p. 200- 218, 2009.
- HUTCHINSON, E.; AVERY, A.; VANDEWOUDE, S. Environmental enrichment for laboratory rodents. **ILAR Journal**, v. 46, n. 2, p. 148-161, 2005.
- JIANG, Y. H.; BRESSLER, J.; BEAUDET, A. L. Epigenetics and human disease. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 5, p. 479-510, 2004.
- JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, p. 253-262, 2007.
- JONES, P. A.; TAYLOR, S. M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. **Cell Press**, v. 20, n. 1, p. 85-93, 1980.
- KAMINKER, P. Epigenética, Ciencia de la Adaptación Biológica Heredable. **ArchArgentPediatr**, v. 105, n. 6, p. 529-553, 2007.
- KEVERNE, E. B.; CURLEY, J. P. Epigenetics, brain evolution and behaviour. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 29, n. 3, p. 398-412, 2008.
- KIEFER, J. C. Epigenetics in development. **Developmental Dynamics**, New York, v. 236, p. 1144-1156, 2007.
- KO, G. M. Camundongo. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 137-164.
- KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated Pluse Maze for Mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 22, p. 1088, 2008.
- KÖNIG, B.; MARKL, H. Maternal care in house mice. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 1987.
- LAU, R. S.; JOBIM, C. M. N.; ALMEIDA, C. S.; ROCHA, F. F. **Efeitos transgeracionais do enriquecimento ambiental perinatal no comportamento semelhante à ansiedade de camundongos machos**. 2016. 2 f. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.
- LEWIN, B. **Genes VII**. 7. ed. Oxford: Oxford University Pres, 2001. 1007 p.
- LINE, S. W. Environmental enrichment for laboratory primates. **J Am Vet Med Assoc**, v. 190, p. 854-859, 1987.
- LISTER R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**. n, 92, p. 180–185, 1987.
- LYNCH, C. B. Evolutionary inferences from genetic analyses of cold adaptation in laboratory and wild populations of the house, p.278-301. In: **Quantitative Genetic Studies of Behavioral Evolution**, editado por BOAKE, C. R. B. The University of Chicago Press, Chicago, 1994.
- MAGALHAES, A. C. et al. CRF receptor 1 regulates anxiety behavior via sensitization of 5-HT2 receptor signaling. **Nature Neurosc.**, v. 13, p. 622-629, 2010.

MASON, G.; CLUBB, R.; LATHAM, N.; VICKERY, S. Why and how should we use environmental enrichment to tackle stereotypic behaviour? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, p. 163–188, 2007.

MATTARAIA, V. G. M. Enriquecimento ambiental. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA V. G. M.; KO G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 537-547.

MATTERN, F.; POST, A.; SOLGER, F.; O'LEARY, A.; SLATTERY, D. A.; REIF, A.; HAAF, T. Prenatal and postnatal experiences associated with epigenetic changes in the adult mouse brain. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 143-148, 2019.

MAYER A. D.; ROSENBLATT J. S. Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. **Horm Behav**, v. 21, n. 2, p. 253-267, 1987.

MCGONIGLE, P. Animal models of CNS disorders. **Biochem Pharmacol**. v. 87, p. 140-149, 2014.

MEEHAN C. L.; MENCH, J. A. The challenge of challenge: Can problem solving opportunities enhance animal welfare? **Applied Animal Behaviour Science**, n. 10, p. 246-261, 2007.

MILLER, B.; BIGGINS, D.; WEMMER, C.; POWELL, R.; CALVO, L.; HANEBURY, L.; WHARTON, T. Development of survival skills in captive-raised Siberian polecats (*Mustela eversmanni*) II: predator avoidance. **J. Ethol.**, v. 8, p. 95-104, 1990.

MOREIRA, V. B.; TAVORA, M. F. C. L. F.; RODRIGUES, U. P.; GHIURO, E. J. V.; MATTARAIA, V. G. M. Development of BALB/c mice in the Biotério Central of the Instituto Butantan. In: REUNIÃO ANNUAL DO INSTITUTO BUTANTAN, 12., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Butantan, 2005.

MOREIRA, V. G. **Eficiência reprodutiva e comportamento parental de camundongos isogênicos e heterogênicos produzidos em ambiente modificado**. 2015. 106 f. Tese (Doutorado em zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, 2015.

MOSS, T. J.; WALLRATH, L. L. Connections Between Epigenetic Gene Silencing and Human Disease. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 618, p. 163-174, 2007.

MULLER, H. R.; PRADO, K. B. Epigenética: Um Novo Campo da Genética. **RUBS Curitiba**, v.1, n.3, p. 61-69, set. 2008.

MURRELL, A.; HEESON, S.; REIK, W. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. **Nature genetics**, v. 36, n. 8, p. 889, 2004.

NASCIMENTO, L. R.; SANTOS, M. S.; ALMEIDA, L. A. Importância do enriquecimento ambiental para o bem-estar dos animais no Zoológico Vale dos Bichos – Termas do Vale. In: XV Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, n. 2, 2011, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Editora, 2011.

NORO, G.; GON, M. C. C. Epigenética, Cuidados Maternais e Vulnerabilidade ao Estresse: Conceitos Básicos e Aplicabilidade. **Psicologia, Reflexão e Crítica**, v. 28, n. 4, p. 829-838, 2015.

- NUNES, J. E. C.; HALLAK, E. A. N. Modelos Animais em psiquiatria: avanços e desafios, **Revista Latinoam. Psicopat. Fund.**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 528-543, set. 2014.
- OLIVEIRA, C. L.; LIMA, T. C.; CAROBREZ, A. P. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. **Behavioural Brain Research**, v.158, n.2, p. 243-50, 2005.
- OLIVEIRA, G.; BRÜCK, M.; VERONEZ, T. **Enriquecimento ambiental**: Qual a melhor forma de utilização do enriquecimento ambiental para camundongos em biotério. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2018. 119 p.
- OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLA, A. C.; ANDIA, D. C.; PARDO, A. P. S. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010.
- OLSSON, A. S.; DAHLBORN, K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. **Laboratory Animals**. n, 36, p. 243-270, 2002.
- PAIXÃO, R. L.; SCHRAMM, F. R. Ethics and animal experimentation: What is debated?. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 99-110, 1999.
- PATRIOTA, M. R. S. **Conservação de fauna ex situ em zoológicos paranaenses**: uma revisão bibliográfica. 2018. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-Graduação em Gestão Ambiental) - Universidade Federal do Paraná, Londrina, 2018.
- PELLOW S., CHOPIN P., FILE S. E., BRILEY M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**. n, 14, p. 149-167, 1985.
- PERIPATO A. C., CHEVERUD J. M. Genetic influences on maternal care. **Am Nat**. n. 160, p.173-185, 2002.
- POOLE, T. B. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 6. ed. London: UFAW, Churchill Livingstone, 1987. 635 p.
- POOLE, T.; DAWKINS, M. S. Environmental enrichment for vertebrates. In: POOLE, T. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 7. ed. British: Blackwell Science, 2006. v. 1 p. 13-20.
- PORSOLT, R. D. et al. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977.
- PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. **The European Journal of Pharmacology**, v.51, n.3, p.291-4, 1978.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1, p. 3-33, 2003.
- QUARRIE, L. H.; ADDEY, C. V.; WILDE C. J. Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. **J Cell Physiol**, v. 168, p. 559-569, set. 1996.
- REZENDE, G. C. **Mico-Leão-Preto**: a história de sucesso na conservação de uma espécie ameaçada. 1. ed. São Paulo: Matrix, 2014. 176 p.

RIVERA, E. A. B. Bem-estar animal. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 59-69.

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.

ROSA, N. M. **Enriquecimento Ambiental e a modulação da emocionalidade, cuidado materno e metilação de genes em camundongos fêmeas LG/J**. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.

RUMBAUGH, D. M.; WASHBURN D.; SAVAGE-RUMBAUGH, E. S. On the care of captive chimpanzees: methods of enrichments. In: SEGAL, E. F. **Housing, care and psychological wellbeing of captive and laboratory primates**. NJ: Noyes Publ., 1989. p.357-375.

RUTTER M.; MOFFIT T. E.; CASPI A. Gene-environment interplay and psychopathology: multiple varieties but real effects. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 47, p. 226-261, 2006.

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

SAUGSTAD, L. F. From genetics to epigenetics. **Nutr Health**, v. 18, n. 3, p. 285-300, 2006.

SHEPHERDSON, D. J. The role of environmental enrichment in captive breeding and reintroduction of endangered species. In: MACE, G.; OLNEY, P; FEISTNER, A. **Creative conservation: interactive management of wild and captive animals**. London: Chapman and Hall, 1994. p.167-177.

SHOJI, H.; KATO, K. Maternal behavior of primiparous females in inbred strains of mice: A detailed descriptive analysis. **Physiology & Behavior**, v. 89, p. 320-328, 2006.

SMOLINKSY A., BERGNER C., LAPORTE J., KALUEFF A. Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, depression. **Mouse Models of Mood and Anxiety**, New York, ed. Humana Press, 2009.

SNOWDON, C. T.; SAVAGE, A. Psychological well-being of captive primates: general considerations and examples from callitrichids. In: SEGAL, E. **Housing, care and psychological wellbeing in captive and laboratory primates**. New York: Noyes Publications, 1989. p. 75-88.

SOCIEDADE MUNDIAL DE PROTEÇÃO ANIMAL. **Conceitos em bem-estar animal**. Rio de Janeiro, 2003. 1 CD-ROM.

STEIMER, T.; DRISCOLL, P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: Behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. **The International Journal on the Biology of Stress**, v. 6, p. 87–100, 2003.

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

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

TOLEDO, L. M. de. **Fatores intervenientes no comportamento de vacas e bezerros do parto até a primeira mamada**. 2005. 62 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2005.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry Behavioral**, v. 44, p. 463-469, p. 1993.

TUCKER, H. A. Lactation and its hormonal control. In: KNOBILE E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p.1064-1098.

VAN DE WEERD, H. A.; VAN LOO, P. L. P.; VAN ZUTPHEN, L. F. M.; KOOLHAAS, J. M.; BAUMANS, V. Preferences for nesting material as environmental for laboratory mice. **Laboratory Animals**. v. 31, n. 2, p. 133-143, abr. 1997.

VAN DE WEERD, H. A.; BAUMANS V. Environmental enrichment in rodents. In: SMITH, C. P.; TAYLOR V. **Environmental enrichment information resources for laboratory animals: birds, cats, dogs, farm animals, ferrets, rabbits, and rodents**. England: AWIC Resource Series, 1995. v. 2. p.145-149.

VEEDER, C. L.; TAYLOR, D. K. Injury related environmental enrichment in a dog (Canis familiaris): gastric foreign body. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 48, p. 76-78, 2009.

VELOSO, A. C. G. **Enriquecimento ambiental em animais de cativeiro**. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Ambiente) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2017.

WAGGONER, D. Mechanisms of disease: epigenesis. **Seminars in Pediatric Neurology**, Philadelphia, v. 14, p. 7-14, 2007.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.

WATANABE, I. M.; MONTE, B. G.; PERIPATO, A. C. Índícios de depressão pós-parto e suas relações genéticas em camundongos das linhagens SM/J, LG/J e intercruzamento F₂. In: **XXVIII Encontro Anual de Etologia e II Simpósio Latino-Americano de Etologia da UNIFAL-MG**, 2010, Alfenas. Alfenas: Sociedade Brasileira de Etologia.

WAZA, WORLD ASSOCIATION OF ZOOS AND AQUARIUMS. **Construindo um futuro para a vida selvagem – Estratégia Mundial dos Zoológicos e Aquários para a Conservação**. 2005. Disponível em: <http://www.waza.org/files/webcontent/1.public_site/5.conservation/conservation_strategies/building_a_future_for_wildlife/WZACS_Portuguese.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2022.

- WEBER, E. M.; ANNA, I.; OLSSON, S. Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: An ethological review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, p. 1-22, 2008.
- WEIDMAN, J. R.; DOLINOY, D. C.; MURPHY, S. K.; JIRTLE, R. L. Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. **The Cancer Journal**, Philadelphia, v. 13, n. 1, p. 9-16, 2007.
- WELLS, D. L. Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: A review. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 118, p. 1-11, 2009.
- Würbel H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. **Trends in Neurosciences**. v. 24, p. 207-211, abr. 2001.
- YERKES, R. M. **Almost human**. London: Jonathan Cope, 1925. 229 p.
- Young, R. J. Environmental Enrichment for Captive Animals. **Blackwell Science Ltd**, a Blackwell Publishing Company, 2003.
- YOUNG, E. A.; ABELSON, J.; LIGHTMAN, S. L. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. **Front Neuroendocrinol**, v. 25, n. 2, p. 69-76, 2004.
- YOUNGSON, N. A.; WHITELAW, E. Transgenerational epigenetic Effects. **Genom. Human Genet.**, v. 9, p. 233-257, 2008.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais

Pró Reitoria
Pesquisa

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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA TRANSGERACIONAL DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NOS ASPECTOS FENOTÍPICOS E EPIGENÉTICOS EM FÊMEAS DE CAMUNDONGO DA LINHAGEM LG/J", protocolada sob o CEUA nº 4178180719 (ID 001279), sob a responsabilidade de **Andréa Cristina Peripato e equipe; Edgar de Lima Machado Junior; Natalia Marques Rosa; Nathália Sayuri Servulo Masuki** - 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 19/08/2019.

We certify that the proposal "TRANSGERATIONAL INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL ENRICHMENT IN THE PHENOTYPIC AND EPIGENETIC FEATURES IN FEMALES LG/J ", utilizing 100 Isogenics mice (100 females), protocol number CEUA 4178180719 (ID 001279), under the responsibility of **Andréa Cristina Peripato and team; Edgar de Lima Machado Junior; Natalia Marques Rosa; Nathália Sayuri Servulo Masuki** - 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 08/19/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [09/2019](#) a [03/2021](#) Área: [Genética E Evolução](#)

Origem: [Biotério Externo](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [3 a 12 semanas](#)

N: [100](#)

Linhagem: [LG/J](#)

Peso: [6 a 40 g](#)

Local do experimento: [Biotério do Laboratório de Genética de Comportamento](#)

São Carlos, 19 de agosto 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