

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

NATHALIA SAYURI SERVULO MASUKI

**Enriquecimento ambiental na puberdade: o efeito no cuidado materno e na metilação
de genes em fêmeas murinas**

SÃO CARLOS

2023

NATHALIA SAYURI SERVULO MASUKI

Enriquecimento ambiental na puberdade: o efeito no cuidado materno e na metilação de genes em fêmeas murinas

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de bacharelado em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para obtenção do título de bacharel em biotecnologia.

Orientadora: Andréa Cristina Peripato

SÃO CARLOS

2023

NATHALIA SAYURI SERVULO MASUKI

Enriquecimento ambiental na puberdade: o efeito no cuidado materno e na metilação de genes em fêmeas murinas

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de bacharelado em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Local: Sala 10 – DGE

Horário: 09:00 h

Data: 30/03/2023

Prof. Dr. Iderval da Silva Júnior Sobrinho

Dra. Samira Chahad-Ehlers

SÃO CARLOS

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe pelo apoio incondicional, e a todos os meus familiares que me motivam a continuar nesta jornada.

Às Tricoteiras Karina, Larissa, Marisa e Vinicius, minhas colegas de curso e amigas, por compartilharem suas próprias trajetórias e aprendizados comigo e por todos os dias felizes, desabafos, broncas e ensinamentos passados com muito bom humor e risadas, tornando todos os dias mais leves.

A todos os professores com quem já pude aprender.

À agência de fomento CNPq pelo suporte durante minha Iniciação Científica.

À minha orientadora Andréa Cristina Peripato, por me auxiliar, me acompanhar desde o início e por sempre acreditar em mim e me dar suporte.

À Natália, minha colega de laboratório por toda sua paciência, todo o conhecimento que me passou e especialmente pela amizade.

Aos meus colegas de laboratório Edgar e Lindomar pela amizade.

Às minhas amigas Amanda, Marília, Olívia e Sarah por estarem presentes em minha vida desde quando nem eu sabia o que faria com ela.

Ao Matheus, pelo suporte emocional e por me entender quando ninguém mais consegue.

À Meg, minha amiga de quatro patas que me acalma e traz paz nos momentos mais difíceis.

Obrigada a todos!

“Never be so clever, you forget to be kind”

RESUMO

O enriquecimento ambiental (EA) é um procedimento utilizado para melhorar as condições de vida de animais confinados em ambientes limitados. Ele pode impactar no bem-estar desses animais diminuindo o estresse, ansiedade e comportamentos tipo-depressivos, aumentando a qualidade de vida devido às alterações sensoriais ocasionadas por esse ambiente enriquecido. Sua administração em diferentes fases de vida do animal pode resultar em alterações comportamentais que poderão repercutir em alterações na expressão de vários genes, isto é, alterações epigenéticas. O presente projeto pretendeu verificar o efeito que o EA na puberdade tem na emocionalidade e cuidado materno de fêmeas murinas da linhagem LG/J. Para tanto, 40 fêmeas LG/J foram utilizadas (Grupo Controle-GC; n=20 e Grupo Experimental expostas ao EA na puberdade-GE; n=20). O EA foi realizado pela exposição de rolo de papelão. O resultado de emocionalidade, investigado pelos testes de Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado, nas fases Púbere, Adultas e Materna e Pós Desmame (PD) sugerem que as fêmeas LG/J possuem comportamentos tipo ansioso e depressivo de forma intrínseca a elas e que a fase de vida pode alterar o comportamento, sendo que a fase PD essas fêmeas são mais ansiosas e apresentam comportamento tipo-depressivo, independente dos grupos avaliados. Não houve diferença significativa para a emocionalidade entre GC e GE. Alguns aspectos do cuidado materno tiveram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos estudados. A placentofagia foi menos realizada pelo GE, porém seus filhotes foram mais pesados na primeira semana de vida e tinham menos gordura depositada na região mesentérica, na idade adulta. GE também tiveram maior interação com seus filhotes realizando o *licking*, que é uma importante postura para o desenvolvimento inicial dos filhotes. O efeito positivo verificado em algumas posturas maternas indica o potencial efeito do EA, mesmo em fases iniciais de vida do animal. Para verificar as alterações epigenéticas da região do hipotálamo, foi feita uma pesquisa de genes candidatos, sendo selecionado o gene *Bdnf*. Na região do promotor IV desse gene foram desenhados *primers* para detecção de metilação, ou não, dessa região, por meio do *Methylation-Specific PCR*. Esses *primers* deverão ser padronizados e utilizados na genotipagem das fêmeas para investigar diferença de metilação entre elas, com o potencial desse gene ser um marcador epigenético para bem-estar animal.

Palavras-Chave: Bem-estar animal; Emocionalidade; Epigenética.

ABSTRACT

Environmental enrichment (EE) is a procedure used to improve the living conditions of confined animals. It can impact the welfare of these animals by reducing stress, anxiety, and depressive-like behaviors, increasing the quality of life due to the sensory changes. EE administration at different stages of the life could result in behavioral changes that may impact in changes in the expression of several genes, that is, epigenetic changes. The present project aimed to verify the effect that EE at puberty has on the emotionality and maternal care of LG/J females' mice. For this purpose, 40 LG/J females were used (Control Group-CG; n=20, and Experimental Group exposed to AE at puberty-EG; n=2). The EE was performed by exposing the females to the cardboard roll. The result of emotionality, investigated by the Open Field, Elevated Cross Maze, and Forced Swimming tests, in the Pubertal, Adult and Maternal and Post-Weaning (PW) phases, suggest that LG/J females have anxious and depressive behaviors intrinsically to them, and that the life stage can change behavior, and in the PD stage these females are more anxious and show depressive-like behavior, regardless of the evaluated groups. There was no significant difference for emotionality between CG and EG. Some aspects of maternal care had a significant difference ($p < 0.05$) between the studied groups. Placentophagy was less performed by the EG, but their offspring were heavier in the first week of life and had less fat deposited in the mesenteric region, in adulthood. EG also had more interaction with their pups performing licking, which is an important posture for the initial development of pups. The positive effect verified in some maternal postures indicates the potential effect of EE, even in the early stages of the animal's life. To verify the epigenetic changes in the hypothalamic region, a search for candidate genes was carried out, selecting the *Bdnf* gene. In the promoter IV region of this gene, primers were designed to detect methylation, or not, in this region, by performing Methylation-Specific PCR. These primers should be standardized and used in the genotyping of females to investigate methylation differences between them, with the potential of this gene to be an epigenetic marker for animal welfare.

Keywords: Animal welfare; Emotionality; Epigenetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

- Figura 1.** Esquema para aplicação do EA e dos testes Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado de acordo com os grupos e fases de desenvolvimento dos animais.....23
- Figura 2.** Diferença entre as fases de desenvolvimento (Púberes, Reprodutiva, Materna e Pós-Desmame) na duração **(a)** e frequência **(b)** relativa de ambulação na região aberta do teste de Campo Aberto.....29
- Figura 3.** Diferença entre as fases de desenvolvimento (Púberes, Reprodutiva, Materna e Pós-Desmame) na duração **(a)** e frequência **(b)** relativa de ambulação nos braços abertos do teste de Labirinto em Cruz Elevado..31
- Figura 4.** Diferença entre as fases de desenvolvimento na duração **(a)** e frequência **(b)** relativa de imobilidade no teste de Nado Forçado.....33
- Figura 5.** Comportamentos de ingestão de placenta ao nascimento (placentofagia), sobrevivência de, pelo menos, um dos filhotes na primeira semana de vida (sucesso), indicação de amamentação da mãe aos filhotes (presença de leite) e postura de proteção aos filhotes (agressividade) dos grupos controle e experimental (com enriquecimento ambiental).....35
- Figura 6.** Pesos semanais dos filhotes da primeira à sétima semana, e no dia da necrópsia dos animais dos Grupos Controle e com Enriquecimento Ambiental.....36
- Figura 7.** Peso de órgão e gorduras obtidos das fêmeas dos grupos controle e enriquecido.....37
- Figura 8.** Postura de autocuidado em que a mãe realiza, na presença dos filhotes, nos testes de resgate 1 (D3 pós-parto) e 2 (D7 pós-parto).38
- Figura 9.** Postura das mães com os filhotes, no primeiro (D3-pós-parto) e segundo (D7-pós-parto) teste de resgates, nas fêmeas que foram enriquecidas ou não.....39

Capítulo II

- Figura 1.** Técnica MSP. Modificação por bissulfito de sódio52
- Figura 2.** Predição da localização dos *primers* desenhados a partir das sequências de promotores e identificação de ilhas CpG53

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Duração e frequência relativa de fêmeas LG/J, em diferentes fases da vida, na região central e periférica do teste de Campo Aberto26

Tabela 2. Duração e frequência relativa de fêmeas LG/J, em diferentes fases da vida, nos braços abertos e fechados do teste de Labirinto e Cruz Elevado.....27

Tabela 3. Duração e frequência relativa de fêmeas LG/J, em diferentes fases da vida, quanto a mobilidade e imobilidade no teste de Nado Forçado.....32

Capítulo II

Tabela 1. Sequências de *primers* desenhados e suas respectivas Temperaturas de *melting* e porcentagem G/C. 54

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	12
-----------------------	----

Capítulo I- Como o enriquecimento ambiental na puberdade pode impactar a emocionalidade e cuidado materno de fêmeas murinas LG/J?.....	14
---	-----------

1. INTRODUÇÃO.....	14
--------------------	----

1.1 Bem-estar animal	14
----------------------------	----

1.2 Enriquecimento Ambiental (EA).....	15
--	----

1.3 Emocionalidade	17
--------------------------	----

1.4 Cuidado Materno.....	19
--------------------------	----

2. OBJETIVOS.....	20
-------------------	----

2.1. Objetivos específicos.....	21
---------------------------------	----

3. MATERIAIS E METODOLOGIA.....	21
---------------------------------	----

3.1. Animais.....	21
-------------------	----

3.2. Teste piloto e Enriquecimento Ambiental.....	22
---	----

3.3. Campo Aberto (CA).....	23
-----------------------------	----

3.4. Labirinto em Cruz Elevada (LCE).....	23
---	----

3.5. Nado Forçado (NF).....	24
-----------------------------	----

3.6. Cuidado Materno.....	24
---------------------------	----

3.6.1. Testes de Resgate (TR).....	25
------------------------------------	----

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
--------------------------------	----

4.1 Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevada	25
--	----

4.2 Nado Forçado	32
------------------------	----

4.3 Cuidado Materno.....	34
--------------------------	----

4.4 Testes de Resgate.....	38
----------------------------	----

5. Conclusão.....	41
-------------------	----

6. Referências Bibliográficas.....	42
------------------------------------	----

Capítulo II - Desenho e amplificação <i>in silico</i> de primers para detectar metilação do gene <i>Bdnf</i> por <i>Methylation-specific PCR</i>.....	47
--	-----------

1. INTRODUÇÃO.....	47
--------------------	----

1.1 Epigenética e Metilação de genes.....	47
---	----

1.2 Técnicas para amplificação de genes.....	49
1.2.1 <i>Methylation Specific PCR (MSP)</i>	51
2. OBJETIVOS.....	52
2.1 Objetivos Específicos.....	52
3. MATERIAIS E METODOLOGIA.....	52
3.1 Desenho de <i>primers</i> para metilação do gene <i>Bdnf</i>	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
Considerações Finais	58

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de estímulos, por meio do enriquecimento ambiental, pode induzir comportamentos benéficos às espécies e, portanto, impactar no seu bem-estar. A ciência de animais de laboratório trouxe um ganho significativo nas pesquisas científicas (Franco, 2013) e conseqüentemente, a busca pela melhoria do ambiente cativo dos biotérios vem de encontro a expectativa da sociedade em termos cada vez menos sofrimento desses animais. Vale ressaltar que, até o momento temos alcançado ganhos significativos na utilização de animais em pesquisa, porém a cada dia estamos mais próximo de alternativas a sua utilização, mas enquanto não seja possível alcançar esse patamar, procuramos cada vez mais as melhores condições para sua utilização. O presente trabalho investigou possíveis alternativas de melhoria do bem-estar animal, utilizando enriquecimento ambiental. O impacto do enriquecimento ambiental em fêmeas e camundongo LG/J, na fase púbere, foi observado quanto a alterações da emocionalidade nessas fêmeas em diferentes fase de seu desenvolvimento e em seu cuidado materno. Estes dados foram apresentados no capítulo 1, intitulado **“Como o enriquecimento ambiental na puberdade pode impactar a emocionalidade e cuidado materno de fêmeas murinas LG/J?”**

Como mudanças no ambiente podem direcionar a alterações comportamentais (Andrews e File, 1993; Carola *et al.*, 2008; Pizzutto *et. al.*, 2009), estas podem também modular alterações epigenéticas (Van Hasselt *et al.*, 2012; Zocher *et al.* 2020), ou seja, na modificação de expressões gênicas, independente de alterações em sua sequência (Russo, *et al.* 1996). Como muito dessas alterações epigenéticas são direcionadas por mecanismo como a metilação de DNA, o Capítulo II deste trabalho intitula-se **“Desenho de primers para detectar metilação do gene *Bdnf* por Methylation- specific PCR”** Ele baseia-se em uma breve introdução sobre metilação de genes e como identificá-la, por meio metodologias para a amplificação de genes e propõe o desenho de *primers* de um gene candidato a metilação devido a exposição a enriquecimento ambiental (Zhu *et al.*, 2009), o gene *Bdnf* (*Brain-derived neurotrophic fator*). A detecção de metilação desse gene no hipotálamo teria sido desenvolvida laboratorialmente no presente trabalho, se não tivéssemos passado pelos desafios encontrados pela pandemia de Covid-19 e todo os procedimentos sanitários necessários para seu controle. O objetivo primeiro dessa abordagem teria sido a investigação de marcadores epigenéticos associados ao bem-estar animal de animais cativos.

Referências Bibliográficas

1. ANDREWS, N. & FILE, S.E. Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. *European Journal of Pharmacology*, v. 235, p. 109-112, 1993
2. CAROLA, V., SCALERA, E., BRUNAMONTI, E., GROSS, C., D'AMATO, F. Mating-related interactions share common features with anxiety in the mouse. *Behavioural brain research*, v. 186, n. 2, p. 185-190, 2008.
3. FRANCO, NH. Animal experiments in biomedical research: a historical perspective. *Animals*. 2013;3(1):238-73.
4. PIZZUTTO, C.S, SGAI, M.G.F.G., GUIMARÃES, M.A.B.V. O enriquecimento ambiental como ferramenta para melhorar a reprodução e o bem-estar de animais cativos. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.129-138, jul./set. 2009.
5. RUSSO, V. E. A., MARTTIENSSEN, R. A. & RIGGS, A. D. *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, 1986.
6. VAN HASSELT, F.N. Adult hippocampal glucocorticoid receptor expression and dentate synaptic plasticity correlate with maternal care received by individuals early in life. *Hippocampus*, v. 22, p. 255-266, 2012.
7. ZHU, S.W., CODITA, A., BOGDANOVIC, N., HJERLING-LEFFLER, J., ERNFORS, P., WINBLAD, B., DICKINS, D.W., MOHAMMED, A.H. Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice, *Behavioural Brain Research*, vol. 197, Issue 2.2009
8. ZOCHER, S., SCHILLING, S., GRZYB, A.N., ADUSUMILLI, V.S., BOGADO LOPES, J., GÜNTHER, S., OVERALL, R.W., WINTER, Y., e KEMPERMANN, G. Early-life environmental enrichment generates persistent individualized behavior in mice. *Sci Adv*. 2020 Aug 26;6(35)

CAPÍTULO I.

Como o enriquecimento ambiental na puberdade pode impactar a emocionalidade e cuidado materno de fêmeas murinas LG/J?

1.INTRODUÇÃO

1.1. Bem-estar animal

O bem-estar animal é considerado um tópico de grande complexidade devido a amplitude de dimensões contidas neste tema, podendo ser estudado em relação aos seus aspectos científicos, éticos ou econômicos (Maekivi, 2018). Entretanto, a experimentação animal foi e ainda é, em alguns casos, essencial para que haja avanços científicos (Franco, 2013). Sendo assim, ao longo da história, alguns conceitos foram definidos na tentativa de regularizar e conscientizar as pessoas sobre o uso de animais, tais como os 3Rs: *Reduce* (Redução), *Refine* (Refinamento) e *Replace* (Substituição) (Russel, 1959), sugerindo primeiramente a redução do número de animais por experimento, em seguida o refinamento de técnicas e procedimentos de modo que sejam realizadas todas as modificações que possam ser feitas em protocolos de pesquisa para reduzir a incidência ou a gravidade do medo, dor ou desconforto dos animais de laboratório em protocolos experimentais, e por fim, a substituição dos animais por modelos de experimentação não sensíveis (Neves, 2013). O Refinamento das técnicas foi posteriormente alterado pelo *Found for the Replacement of Animals in Medical Experiments*–FRAME e passou a ser a ser mais abrangente, considerando refinamento toda e qualquer alteração em procedimentos que visem minimizar a dor ou sofrimento do animal desde o nascimento até sua morte, visando a promoção do seu bem-estar (Assis, 2020).

Com o progresso das pesquisas com animais, surgiram novas abordagens e conceitos passaram a ser aprimorados. Dentre eles, o bem-estar passou a ser definido como condição de menor estresse e maior redução de danos possíveis, composto por aspectos físicos, mentais e comportamentais (Clark, 2020), e construído a partir do conceito das Cinco Liberdades, proposto em 1965 pelo Comitê Brambell e aperfeiçoado pelo Conselho de Bem-Estar de Animais de Produção (*Farm Animal Welfare Council* - FAWAC) da Inglaterra, são elas: I) liberdade de desnutrição; II) liberdade de desconforto; III) liberdade de dores e lesões; IV) liberdade de expressão do comportamento natural e V) Liberdade do medo e ansiedade (Massari, 2018).

O bem-estar animal, portanto, passou a ser visto como um termo que inclui aspectos fisiológicos e psicológicos de um animal, sendo assim, testes científicos relacionados aos sentimentos dos animais devem comportar em sua análise aspectos fisiológicos, biológicos e os comportamentos do animal em questão (Ruiz, 2019).

De acordo com Ruiz *et. al.* (2019), existem alguns fatores os quais podem afetar o bem-estar de animais de laboratório, são eles: nutrição, salubridade do ambiente, realização do manejo, e habitação dos animais, entre outros. Entretanto, cada espécie possui maneiras diferentes de expressar quando um desses fatores está influenciando seu comportamento regular, sendo necessária a aplicação de avaliações específicas que incluem indicadores de bem-estar animal, os quais permitem a quantificação e avaliação destes fatores. Estes indicadores podem ser divididos entre biológicos, zootécnicos e fisiológicos. Os indicadores biológicos e fisiológicos devem ser baseados em conhecimento científico e ter uma margem de erro muito baixa para que sejam relevantes, além disso, devem ser apresentar repetitividade para que não difiram nos resultados, permitindo a observação das mudanças ao longo do tempo. Já os indicadores zootécnicos são baseados nas condições ambientais de instalação e nutrição.

1.2. Enriquecimento Ambiental (EA)

Enriquecimento Ambiental (EA) é uma técnica utilizada no manejo de animais em cativeiro que possibilitem que eles tenham condições de habitação mais similares às condições selvagens. Ambientes em que esses animais possuem uma rotina mais similar a vida selvagem pode reduzir o estresse e ansiedade além de aumentar seus desempenhos, e consequentemente exercer menor interferência em pesquisas que utilizam esses animais como modelo (Garbin, Faleiros e Lago, 2012). Portanto, a redução do estresse pode trazer resultados de pesquisa mais confiáveis.

O Enriquecimento Ambiental (EA) é a prática de utilizar estímulos sensoriais ou oferta de escolhas em um dado ambiente, visando o aumento de oportunidades comportamentais para beneficiar os que o utilizam (de Azevedo *et. al.*, 2007). A definição padrão de um ambiente enriquecido é a combinação de um complexo inanimado e estimulação social (Praag *et. al.*, 2000) em prol do benefício de seus usuários. Através desses elementos, o EA pode levar a uma melhoria significativa no desempenho a longo prazo em diversas funções cognitivas tanto em humanos como em outros animais (Shaw *et. al.*, 2020). O bem-estar animal pelo EA tem sido demonstrado em estudos de diversas áreas, como: a melhoria substancial dos resultados metabólicos em camundongos fêmeas de meia idade (Ali

et. al., 2020); a promoção da saúde sináptica e cognitiva no envelhecimento e aumento da capacidade sináptica no envelhecimento patológico (Stuart *et. al.*, 2017); a melhora da saúde metabólica e comportamental em camundongos de modelo semelhante ao Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) (Queen *et. al.*, 2020); a promoção da formação de uma memória de reconhecimento de objetos mais duradoura (Melani *et. al.*, 2017) e muitas outras.

Entretanto, imposições ambientais podem influenciar em aspectos reguladores que garantem a homeostase do organismo (Pizzutto *et. al.*, 2009). Tais imposições podem ser nocivas, intensas ou prolongadas, fazendo com que o animal responda a esses estímulos apresentando efeitos emocionais adversos positivos ou negativos (Borges *et. al.*, 2011). Para animais de laboratório, o EA consiste no melhoramento das condições de habitação desses animais (Piquero e Begega, 2017). As alterações fisiológicas e emocionais causadas pelo EA permitem a investigação de fatores que podem direcionar a aplicação de melhores condições de criação desses animais (Oliveira, Bruck e Veronez, 2018). O EA pode ser aplicado de diferentes formas. De acordo com Oliveira *et. al.*, (2018), em geral são divididos entre: físico, cognitivo, alimentar, sensorial e social. O tipo de enriquecimento a ser utilizado varia dependendo de uma série de condições, como a estrutura do alojamento, idade, sexo, histórico dos animais, a rotina do laboratório e o propósito da intervenção (Oliveira *et. al.*, 2018). Neste estudo será feito uso do EA do tipo físico. Os enriquecimentos físicos podem ser aplicados por meio de materiais, entre outros, como aqueles utilizados para construção de ninhos. A adição desses objetos relaciona-se com o cuidado materno e já demonstrou melhoramento do convívio entre os animais alocados em maternidade de biotérios, diminuindo comportamentos agonísticos e favorecendo o comportamento natural de nidificação (Molento *et. al.*, 2015); a mobilidade aumentada proporcionada pelo EA também demonstrou melhora do desempenho cognitivo (Alwis e Rajan, 2014) e redução da ansiedade (Kimura, 2019). Além disso, a utilização de materiais nidificantes como EA pode prevenir a mortalidade prematura de filhotes no pré-desmame e melhorar o desenvolvimento dos filhotes (Leidinger *et al.*, 2018).

No presente trabalho, o EA físico foi exposto aos animais de idade púbere. O enriquecimento ambiental realizado durante esse período já demonstrou efeitos como mudança na morfologia e comportamento do cérebro ao longo da vida e reversão de efeitos prévios de desenvolvimento ao nível do mecanismo molecular subjacente (Bredy *et. al.*, 2004). A técnica de enriquecimento ambiental também exibiu melhora na aprendizagem e memória em várias tarefas (Bredy *et. al.*, 2004). Além disso, a inserção desses diferentes estímulos pode impactar no bem-estar dos animais, diminuindo o estresse e aumentando a

qualidade de vida devido às alterações sensoriais ocasionadas pelo ambiente enriquecido (Fisch, 2016).

1.3. Emocionalidade

O bem-estar animal é garantido quando suas necessidades de saúde física e mental são atendidas (Borges *et. al.*, 2011). A inserção de objetos que modifiquem o ambiente físico ou social dos animais, melhorando a qualidade de vida, proporciona condições mais próximas das necessidades etológicas, tornando o ambiente mais rico e, portanto, melhorando a qualidade de vida e bem-estar dos animais (Dela Ricci *et. al.*, 2018).

A aplicação do EA iniciada na adolescência, em ratos, já demonstrou minimizar os efeitos negativos na aprendizagem e emocionalidade dos animais, causados pelo estresse crônico (Dandi, 2022). Segundo Hall e Ballachey (1932), o termo emocionalidade é definido como um conceito conveniente para descrever um complexo grupo de reações orgânicas, experienciais e expressivas. A etologia, por sua vez, é o campo da ciência que estuda o comportamento animal. Essa ciência reconhece a existência do comportamento motivado dos animais e de suas emoções. A emocionalidade, portanto, trata-se de um fenômeno complexo coordenado pelo sistema límbico, cuja atividade tem como resultado a ampla variedade de respostas autônomas e os movimentos que constituem o comportamento (Esperidião, 2008).

O tratamento farmacológico para ansiedade e depressão em humanos ainda é considerado insatisfatório, necessitando do apoio de e um tratamento complementar não farmacológico. Pesquisas feitas com animais indicam que os benefícios do EA no tratamento desses transtornos advêm da vivência de diferentes desafios, exposição à novidade, desenvolvimento de atividades de prazer e acesso a atividades físicas, podendo melhorar os tratamentos atuais e a recuperação tanto de animais como pacientes humanos (Kimura,2021). Sendo assim, o EA, se utilizado de forma estimuladora aos animais, pode permitir a redução de ansiedade (Kimura, 2019) e melhorar a qualidade de vida e bem-estar dos animais (Dela Ricci *et al.*, 2018).

O estresse e a ansiedade são respostas fisiológicas e comportamentais do animal a fatores do ambiente (Snowdon, 1999). Normalmente, o animal tenta adaptar-se às condições adversas, mas quando o estímulo é de grande intensidade ou de duração prolongada, pode causar alterações nos animais (Rivera, 2002). Os transtornos de ansiedade são desencadeados por estímulos considerados como ameaçadores e que geram medo excessivo e desbalanceado como resposta. Estudos indicam que fatores genéticos e ambientais são relevantes na

etiologia dos transtornos de ansiedade, com níveis de agregação familiar e herdabilidade de 30% a 50% (Meier, 2019).

Na literatura, o termo comportamento “tipo-depressivo” é utilizado para descrever os animais utilizados em laboratório que apresentam certos parâmetros comportamentais frequentemente observados após a exposição a estresse crônico. Esses comportamentos incluem diminuição da interação/preferência social, aumento da imobilidade, diminuição do consumo/preferência de sacarose e diminuição da qualidade do ninho no caso de fêmeas. Já os comportamentos de “tipo-ansioso” referem-se a parâmetros comportamentais como a diminuição do tempo gasto no centro de um Campo Aberto e a diminuição do tempo gasto nos braços abertos de um Labirinto em Cruz Elevado, os quais são testes comumente utilizados para mensurar esse tipo de comportamento e serão descritos a seguir.

A análise da emocionalidade geralmente é mensurada por meio de testes de comportamento que visam a observação de determinados traços comportamentais de forma a caracterizar os animais com base na emocionalidade. Entre eles citamos o Campo Aberto e o Labirinto em Cruz Elevado. O modelo de atividade geral em campo aberto foi proposto por Calvin Hall (1934) para avaliação da emocionalidade em ratos frente a um ambiente novo. O Campo Aberto (CA) baseia-se na presença de uma área aberta e com boa luminosidade que permite avaliar diferentes reações comportamentais que refletem a emocionalidade do animal, por exemplo, ansiedade e locomoção. Espera-se que animais menos ansiosos explorem mais o ambiente e conseqüentemente estejam presentes em áreas mais expostas. O teste do Labirinto em Cruz Elevada (LCE) tem sido amplamente aplicado em pesquisas de comportamento animal na avaliação da ansiedade (Manes, 2017). O teste foi originalmente descrito por Pellow *et. al.* (1985) e consiste em um aparato em forma de cruz montado a uma distância do chão, com dois braços sem paredes laterais, denominado braços abertos, e com dois braços fechados, os quais contêm paredes laterais. Se o animal evitar os braços abertos, os quais provocam mais aversão, ele poderá ser descrito como ansioso pois os roedores têm preferência natural por lugares próximos a superfícies verticais, provavelmente por ficarem menos expostos (Manes, 2017).

O Nado Forçado (NF) é também um teste de avaliação da emocionalidade que se baseia na exposição do animal a um ambiente completamente diferente do seu habitual, causando estresse descontrolado e possibilitando inúmeras investigações sobre as formas de reação de cada indivíduo (Rosa, 2018). O teste foi elaborado por Porsolt *et. al.* (1977) visando analisar a ocorrência de indícios de depressão nos animais. Segundo Porsolt, os

animais que apresentam imobilidade podem ser considerados como indivíduos com indícios de depressão.

Para manifestação de um comportamento, diferentes áreas do cérebro estarão envolvidas, por exemplo, o hipotálamo tem papel crítico na integração de estímulos ambientais e sinais endógenos, sendo assim, coordena uma ampla gama de sistemas fisiológicos e mantém um ambiente interno relativamente constante (Schneeberger *et al.*, 2013). O eixo Hipotalâmico Pituitária Adrenal (HPA) ou eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal (HHA) corresponde a interação entre o hipotálamo, a hipófise e as glândulas adrenais. O hipotálamo e a hipófise estão localizados logo acima do tronco cerebral, enquanto as glândulas adrenais são encontradas no topo dos rins (Chrousos, 1995). Os principais estudos envolvendo o HPA são relacionados à resposta neuroendócrina ao estresse. Destacado por exercer papel fundamental na resposta aos estímulos externos e internos, incluindo os estressores psicológicos, as anormalidades na função do eixo HPA são descritas em pessoas que experimentam transtornos psiquiátricos, especialmente a depressão (Jurueña, 2004). Muitos sinais ambientais e internos induzem a transcrição ou inibição genética que leva a alterações adaptativas na função neuroendócrina (Stevenson, 2017). Como a emocionalidade pode ser modulada por diversos fatores, um que não pode ser descartado é a fase de desenvolvimento do organismo. Estudos já mostraram que ratos machos adultos expostos ao estresse durante fase púbere demonstraram atividade locomotora reduzida, aumento de comportamentos do tipo ansiedade, memória de medo contextual aprimorada e resposta irregular do HPA, enquanto o EA normalizou o comportamento e não apresentou alterações no HPA (Fan, 2021).

1.4. Cuidado Materno

O cuidado materno é observado em muitos mamíferos e abrange diversos comportamentos tidos pela fêmea entre o período gestacional e o desmame (Garland e Svare, 1988; McLean e Speakman, 1997). Após a concepção, as fêmeas murinas adotam uma postura necessária para garantir a viabilidade de sua prole. Essa postura geralmente é composta por comportamentos como a construção de ninho, a fim de manter os filhotes aquecidos e protegidos contra predadores; fornecimento de leite logo após o parto para garantir a sobrevivência da prole; placentofagia, *grooming* e agressão, como uma postura protetora contra intrusos (Peripato e Cheverud, 2002). O cuidado materno é essencial em mamíferos e as variações no ambiente introduzidas pelas mães podem influenciar diretamente a viabilidade de recém-nascidos e comportamento emocional da prole (Chiavegatto *et al.*,

2012). A variação no cuidado materno pode ter interferência hormonal, em que hormônios podem estimular a atividade neural e assim modular o comportamento materno (Rosenblatt, 1967; Kinsley, 1999). Os mecanismos neuroquímicos envolvidos com o cuidado materno envolvem interações entre áreas cerebrais críticas, tais como hipocampo, área pré-óptica medial (MPO) e outras regiões do hipotálamo (Numan *et al.*, 1998; Lee e Brown, 2002).

O cuidado materno possui bases genéticas complexas (Peripato e Cheverud 2002), mas também pode ser flexível devido à influência do ambiente. A emocionalidade da mãe é um fator importante, em que esse ambiente materno pode influenciar na viabilidade e no desenvolvimento emocional dos filhotes (Hansen e Ferreira, 1986; Francis *et al.*, 1999). A separação da mãe de seus filhotes e o desmame precoce podem gerar um aumento na ansiedade e agressividade dos filhotes (Nakamura *et al.*, 2003; Kikusui *et al.*, 2006) e a ausência do simples ato da mãe de acariciar e limpar os filhotes após o parto pode resultar em alto nível de ansiedade nesses na idade adulta (Caldji *et al.*, 1998).

A plasticidade fenotípica pode ser dependente do ambiente materno devido a diversos fatores, entre eles, mudanças estruturais permanentes (número de células, morfologia do órgão), disfunções mitocondriais, estresse no retículo endoplasmático ou modificações epigenéticas (Warner e Ozanne, 2010; Rinaudo e Wang, 2012). Vale ressaltar que, o termo epigenética, cunhado em 1956 por Conrad Waddington, refere-se às alterações hereditárias na expressão dos genes que não pode ser explicada por mudanças na sequência de DNA (Russo *et al.* 1996). O cuidado materno é um comportamento complexo e alterações ambientais podem direcionar alterações epigenéticas que poderão culminar com variação no comportamento da mãe com seus filhotes, e que poderá ser continuado transgeracionalmente às suas filhas, quando elas se tornarem mães (Jiménez-Chillarón *et al.*, 2012). Assim, se o EA possibilitar uma melhor qualidade de vida e bem-estar nas fêmeas, ele pode direcionar em um melhor cuidado materno da mãe e trazer consequências emocionais favoráveis à sua progênie. O ideal seria também monitorar não só fenotipicamente, mas com o acompanhamento das modificações epigenéticas, que poderá culminar na identificação de marcadores epigenéticos associados ao bem-estar animal.

2.OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a investigação do efeito do enriquecimento ambiental em fases específicas do desenvolvimento, no caso a idade púber, na emocionalidade e no cuidado materno, de fêmeas murinas da linhagem LG/J

2.1.Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo consistiram em:

- Investigação do enriquecimento ambiental preferido pelas fêmeas, realizada por meio de teste piloto.
- Investigação da emocionalidade dos animais por meio dos testes de Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Nado Forçado (NF), em quatro fases do desenvolvimento, púbere, reprodutiva, materna e pós-desmame, nas fêmeas do grupo controle (sem enriquecimento) e do grupo experimental (expostas ao enriquecimento na fase púbere).
- Investigação da emocionalidade e contraste entre as quatro fases de desenvolvimento de cada grupo (controle e experimental) por meio dos testes de Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Nado Forçado (NF).
- Investigação e contraste dos cuidados maternos de placentofagia, presença de leite, agressividade contra intrusos e peso semanal dos filhotes até a sétima semana, e no dia da necrópsia, das fêmeas LG/J expostas ou não ao enriquecimento ambiental e também entre fases.
- Investigação da postura da fêmea com ela mesma na fase materna, ou interagindo com os filhotes, por meio do teste de resgate, nas mães do grupo controle (sem enriquecimento) e do grupo experimental (expostas ao enriquecimento na fase púbere).

3.MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1.Animais

Para o presente estudo foram utilizados 40 camundongos isogênicos da linhagem LG/J provenientes do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, EUA), mantidos em nosso Biotério no Laboratório de Genética do Comportamento do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, campus São Carlos, por diversas gerações através de cruzamentos contínuos.

Todos os indivíduos foram acompanhados a partir do nascimento. Inicialmente, é realizada uma marcação nos dedos para identificação individual dos animais. Ao completarem três semanas de vida, cada indivíduo é separado de suas respectivas mães, e é destinado a caixas sexo específicas de até quatro animais. No presente estudo, assim que as fêmeas atingiram a idade do desmame, elas foram alocadas em caixas com a presença de EA durante a terceira e quarta semanas de vida. Além disso, o peso de todos os indivíduos foi monitorado até completarem a maturidade sexual, com aproximadamente sete semanas. Assim que adquiriram a maturidade sexual, vinte cruzamentos foram preparados e cada casal

de machos e fêmeas foi isolado em caixas específicas para o cruzamento, até a identificação da prenhez. Após a confirmação da prenhez, as fêmeas foram isoladas até o parto e permaneceram com seus filhotes até estes completarem três semanas e serem desmamados. As fêmeas, por sua vez, foram eutanasiadas por deslocamento cervical, seguida por necrópsia, durante a qual foram retirados, mensurados e armazenados, o cérebro, rins, fígado, intestinos, baço e coração, e também as gorduras reprodutivas, renal e mesentérica. As amostras coletadas após a necrópsia dos animais foram armazenadas em tubos *ependorf* 1,5ml a -80°C em Ultra freezer -86°C Série V.I.P.TM, Sanyo, com exceção do cérebro, o qual foi armazenado em solução com DNA holder*.

Os animais tiveram acesso à alimentação *ad libitum* com ração (Nuvilab, Colombo/PR) e água filtrada, ambos autoclavados. Foram mantidos em caixas de acrílico vinculadas a uma rack ventilada (ALESCO, Atibaia-SP) e higienizados uma vez por semana, com substituição da maravalha e desinfecção das caixas. Os animais foram verificados diariamente e mantidos no ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas 6:00h). Todos os procedimentos no manuseio e na experimentação com os animais foram avaliados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA no. 7124070519, ANEXO A).

3.2. Teste piloto e Enriquecimento Ambiental

O enriquecimento ambiental utilizado foi escolhido previamente por meio de um Teste Piloto, em que os resultados indicaram o rolo de papelão como o EA preferido pelas fêmeas (Rosa, Masuki e Peripato, 2022 - APÊNDICE A)

Para a aplicação do EA, as quarenta fêmeas foram divididas em dois grupos com vinte animais cada, são eles: Grupo Controle (sem enriquecimento) e Grupo Experimental (EA na fase púbera – 3 a 4 semanas de idade). As fêmeas púberas foram expostas ao EA durante 2 semanas. O enriquecimento foi oferecido e deixado dentro da caixa dos animais livremente. Após esse período, os animais não tiveram mais contato com o EA em nenhuma outra fase de vida, após o enriquecimento, os animais foram contrastados entre os grupos criados e também dentro de seus grupos foi realizado um contraste entre as fases. A Figura 1 representa o delineamento do trabalho realizado.

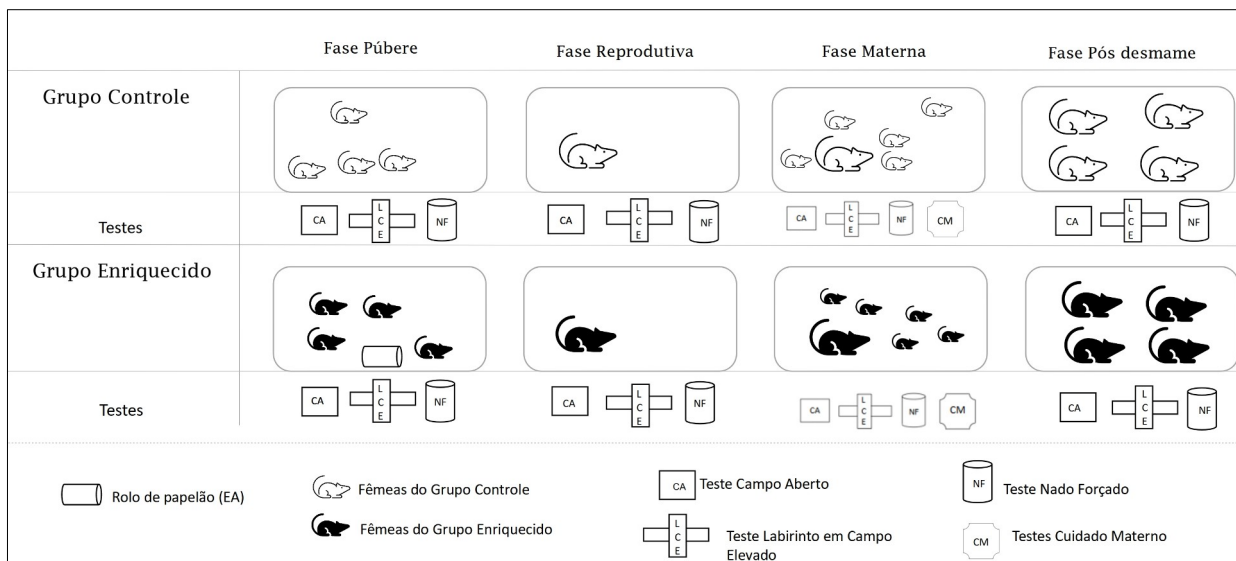


Figura 1. Esquema para aplicação do EA e dos testes Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Nado Forçado e Cuidado Materno, de acordo com os grupos e fases de desenvolvimento dos animais.

3.3.Campo Aberto (CA)

O teste do Campo Aberto consistiu na utilização de uma arena de área de 1600 cm² a qual cada animal foi submetido individualmente por cinco minutos. A superfície da arena apresenta dezesseis quadrantes de 10 cm x 10 cm cada, em que o animal é colocado no quadrante central e circula livremente na arena enquanto é filmado. A cada troca de animal o aparato foi higienizado com HerbalVet (Ouro fino) e álcool 70%. A análise dos 800 minutos (Grupo Controle n=20; Grupo Experimental n=20; cinco minutos; quatro fases: púbere, reprodutiva, fase materna e pós desmame) de vídeos gerados nessa etapa foi feita por meio do programa *X-plo-Rat 2005* (<http://www.oocities.org/xplorat/>). Foram computados o tempo e frequência em que as fêmeas percorrem as regiões centrais ou periféricas da arena. Os dados gerados foram importados em planilha *Excel* e utilizados na análise dos resultados. Para a investigação de diferença significativa entre os grupos foi utilizado o Teste *T* de *Student* para os dados que apresentaram normalidade.

3.4.Labirinto em Cruz Elevada (LCE)

O Labirinto em Cruz Elevada é composto por um uma superfície em formato de cruz, elevado a 40 cm do chão, com dois braços abertos e dois braços fechados. Os braços abertos possuem 30 cm de comprimento e 6 cm de largura, enquanto os braços fechados possuem as mesmas dimensões, porém com paredes de 15 cm de altura. Os animais foram colocados no centro da cruz, gravados por cinco minutos e analisados quanto à frequência e permanência

em cada braço. A cada troca de animal o aparato foi higienizado com HerbalVet e álcool 70%.

Os vídeos gerados totalizaram 800 minutos de análise, os quais foram avaliados utilizando o programa X-plo-Rat 2005. Os dados gerados foram importados em planilha Excel e depois utilizados na análise estatística. Para a investigação de diferença significativa entre os grupos foi utilizado o Teste T de *Student* para os dados que apresentaram normalidade.

3.5.Nado Forçado (NF)

O teste do Nado Forçado foi realizado em um recipiente de vidro de 40 cm de profundidade, 20 cm de diâmetro e preenchido com 19,5 cm de água à 24-25° C. Cada teste foi realizado em recipiente específico, com trocas de água, e esterilizado em luz ultravioleta. Para a análise do teste, os animais foram colocados no recipiente por seis minutos e gravados. Na análise dos vídeos apenas foram considerados os quatro minutos finais do teste, devido à habituação ao ambiente. Essa avaliação será analisada no programa X-plo Rat 2005 em que foram avaliados o tempo e frequência de imobilidade dos animais. Os dados gerados foram importados em planilhas e a análise estatística foi realizada. Para a investigação de diferença significativa entre os grupos foi utilizado o Teste T de *Student* para os dados que apresentaram normalidade.

3.6.Cuidado Materno

O cuidado materno foi analisado nas fêmeas dos dois grupos, Grupo Controle e Grupo Experimental na fase materna. Foram observados: o Tamanho de Ninhada ao Nascimento (TNN) e Tamanho de Ninhada Viável (TNV), relativo aos filhotes sobreviventes na primeira semana de vida; a ocorrência de placentofagia, de acordo com a presença de resquícios de placenta/sangue na maravalha; a presença de leite na cavidade estomacal, indicando que os filhotes estavam sendo amamentados; e a agressividade contra intrusos, postura materna na qual algumas fêmeas apresentam um comportamento agressivo/ protetivo em relação a sua prole. Cada fêmea foi categorizada se tiveram sucesso na reprodução, ou seja, se, pelo menos, um dos filhotes sobreviveu na primeira semana de vida (geralmente as perdas ocorrem até o terceiro dia de nascimento) ou não. Os filhotes foram pesados semanalmente até a idade adulta (7 semanas) e após a eutanásia foi realizada pesagem dos órgãos e gorduras: coração, rim esquerdo e direito, baço, fígado, gordura reprodutiva, gordura renal e gordura mesentérica.

3.6.1. Testes de Resgate (TR)

Foram realizados dois Testes de Resgate durante os primeiros sete dias de vida dos filhotes, o primeiro no terceiro dia pós-parto e o segundo no sétimo dia após o nascimento dos filhotes. Os testes de Resgate foram realizados em fluxo laminar dentro das caixas de habitação dos animais. Primeiramente, os filhotes foram removidos do ninho e pesados, e então distribuídos de volta na caixa, entretanto, de forma randomizada. Após a redistribuição dos filhotes na caixa, os primeiros seis minutos (determinado em teste piloto do grupo) foram filmados a fim de registrar o comportamento da mãe. Posteriormente foram analisados os comportamentos relacionados à mãe (*self grooming* – postura de autocuidado da fêmea) e comportamentos de interação entre mãe-filhotes: *nursing* (fêmea posicionada sobre os filhotes com postura curvada), *licking* (limpeza do corpo e região anogenital dos filhotes) e tempo de resgate da ninhada (tempo que a fêmea demora para pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho).

Os filhotes ficaram em contato com a mãe por até três semanas e após o desmame as mães foram eutanasiadas por deslocamento cervical. A região total do hipotálamo (controle das emoções) foi dissecada e estocada para utilização nos procedimentos moleculares. Os filhotes desmamados foram mantidos no Biotério e utilizados para estudo transgeracional do efeito do enriquecimento ambiental nessa geração. O presente trabalho compôs uma etapa da dissertação de mestrado de uma integrante do grupo (Rosa, N.M., 2022).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A emocionalidade pode ser afetada por diversos fatores, e no presente trabalho foram investigados se as fases da vida dos animais (púbere, reprodutiva, materna e pós-desmame) e o e se o enriquecimento ambiental com rolo de papelão (Rosa, Masuki & Peripato, 2022), na fase púbere, influenciou a emocionalidade das fêmeas LG/J.

4.1. Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevada

A exposição de animais em espaços abertos (aversivos) pode induzi-los ao comportamento tipo-ansioso (Lecorps, 2016). As fêmeas LG/J do grupo controle e experimental foram observadas quanto a sua postura em áreas aversivas, sendo elas as áreas centrais do teste de Campo Aberto (CA), e os braços abertos do teste de Labirinto em Cruz

Elevado (LCE). A Tabela 1 apresenta a duração e frequência relativa das fêmeas no Campo Aberto, de ambos os grupos estudados, em diferentes fases do desenvolvimento.

Tabela 1. Duração e frequência relativa de fêmeas LG/J, em diferentes fases da vida, na região central e periférica do teste de Campo Aberto

	Grupo Controle				Grupo Experimental			
	Pub	Rep	Mat	PD	Pub	Rep	Mat	PD
Duração Relativa no Centro	0.12± 0,014	0.02± 0,009	0.01± 0,007	0.02± 0,009	0.14± 0,007	0.02± 0,01	0.01± 0,004	0.004± 0,004
Duração Relativa na Periferia	*0,88± 0,014	*0,98± 0,01	*0,97± 0,007	0,98± 0,009	*0,86± 0,007	*0,98± 0,01	*0,99± 0,004	*0,99± 0,004
Frequência Relativa no Centro	0,23± 0,018	0,09± 0,021	0,07± 0,022	0,05± 0,018	0,24± 0,007	0,07± 0,02	0,06± 0,012	0,02± 0,008
Frequência Relativa na Periferia	*0,77± 0,018	*0,91± 0,02	*0,89± 0,023	0,95± 0,018	*0,76± 0,008	*0,93± 0,02	*0,94± 0,013	*0,98± 0,008

As abreviaturas são referentes às fases: Pub, Púbere; Rep, Reprodutiva; Mat, Materna; PD, Pós-Desmame. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) para as comparações entre duração e frequência no centro em relação a duração e frequência na periferia do equipamento.

De maneira geral, quando contrastado o tempo (duração) e o número de vezes (frequência) que dispenderam no centro do campo aberto em relação à perifeira, as fêmeas dos dois grupos permanecem mais tempo ($p < 0,05$) e em frequência ($p < 0,05$) nos espaços menos aversivos, indicando um comportamento típico de camundongos, ou seja, são ansiosos por natureza (Cryan & Holmes 2005), principalmente quando apresentados a um ambiente novo e estressor (Clément, 1997).

O desempenho das fêmeas no teste LCE, tanto em duração e frequência nos braços abertos, em relação aos braços fechados podem ser verificados na Tabela 2.

Tabela 2. Duração e frequência relativa de fêmeas LG/J, em diferentes fases da vida, nos braços abertos e fechados do teste de Labirinto e Cruz Elevado.

	Grupo Controle				Grupo Experimental			
	Pub	Rep	Mat	PD	Pub	Rep	Mat	PD
Duração Relativa nos braços Abertos	0.21± 0,07	0.01± 0,02	0.01± 0,007	0.01± 0,007	0.19± 0,037	0.02± 0,012	0.01± 0,01	0.01± 0,004
Duração Relativa nos braços Fechados	0.32± 0,07	*0,78± 0,045	*0,87± 0,03	*0,82± 0,04	*0,62± 0,05	*0,88± 0,037	*0,94± 0,025	*0,91± 0,02
Frequência Relativa nos braços Abertos	0.19± 0,06	0.02± 0,02	0.01± 0,01	0.01± 0,007	0.16± 0,035	0.01± 0,01	0.01± 0,014	0.01± 0,005
Frequência Relativa nos braços Fechados	0.57± 0,06	*0,85± 0,031	*0,84± 0,035	*0,83± 0,01	*0,70± 0,04	*0,89± 0,021	*0,90± 0,02	*0,89± 0,01

As abreviaturas são referentes às fases: Pub, Púbere; Rep, Reprodutiva; Mat, Materna; PD, Pós-Desmame. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) para as comparações entre duração e frequência nos braços abertos com duração e frequência nos braços fechados.

Da mesma forma, como os dados observados no Campo Aberto, a ambulação das fêmeas no Labirinto em Cruz Elevado indicou que permanecem significativamente mais tempo ($p < 0,05$) e o maior número de vezes ($p < 0,05$) nas áreas mais aversivas do labirinto (braços fechados), mostrando o comportamento ansioso desses animais.

O CA é um dos testes mais utilizados como instrumento de análise da emocionalidade. O comportamento demonstrado pelos animais nos resultados relatados neste trabalho é comum e supõe-se que seja relacionado à tigmotaxia ou “comportamento de abraçar a parede”, observado em muitas espécies de roedores. É provável que esteja ligado à propensão subjacente dos animais de evitar áreas abertas (Seibenhener 2015). Entretanto, essa característica pode também ser ligada ao comportamento do tipo ansioso, independentemente da causa subjacente, pois as baixas frequências e durações no centro do aparato podem ser interpretadas como ansiedade, com base em estudos farmacológicos e genéticos (Clément, 1997; Ennaceur, 2006). É mais provável que um camundongo ansioso hesite mais antes de entrar no centro da arena do que um camundongo não ansioso (Lipkind, 2004).

Juntamente com o CA, o Labirinto em Cruz Elevada é também um dos testes de emocionalidade mais utilizados na fenotipagem comportamental. A análise do teste é baseada

em avaliar o tempo e frequência relativos que os animais permaneceram nos braços fechados do teste e contrastar com o tempo e frequência nos braços abertos. A partir dessa razão, é possível correlacionar níveis de ansiedade e traçar hipóteses a respeito do perfil comportamental dos animais em cada grupo (Holmes, 2000). Encontramos a partir dos resultados dos testes de LCE que todos os animais testados permanecem por mais tempo e frequentam mais vezes as regiões dos braços fechados do aparato, a qual representa uma região mais segura e menos aversiva, demonstrando o comportamento normal de roedores (Rodgers, 1997; Holmes, 2000). Considerando a importância dos traços tigmotáticos para os padrões de exploração de camundongos também no LCE, os braços fechados são designados como áreas protegidas, enquanto os braços abertos são designados como áreas desprotegidas. A interpretação dos resultados baseia-se na aversão natural dos roedores a locais abertos e elevados (Cipriano, 2016). Entretanto, quando avaliamos apenas os dados relacionados as áreas dos braços abertos e os contrastamos entre fases em seus respectivos grupos ou entre os grupos é possível hipotetizar classificações fenotípicas de ansiedade.

O teste de Campo Aberto foi concebido por Calvin Hall (1934) com o objetivo de fornecer medidas objetivas e quantificáveis da emocionalidade de ratos. Embora não seja possível oferecer medidas puras e indiscutíveis da reatividade emocional dos animais testados, pois os testes avaliam apenas pequenas frações do perfil emocional (Ramos, 2008), é possível fazer uso da aversão natural dos animais por espaços abertos e induzir o comportamento do tipo ansioso (Lecorps, 2016). Relacionando o tempo gasto nas áreas periféricas e centrais do teste, espera-se que animais menos ansiosos explorem mais o ambiente e conseqüentemente estejam mais presentes em áreas centrais. Assim, na Figura 2 é possível verificar que, ao comparar essa exposição dos animais ao Campo Aberto, e sua ambulação nas áreas aversivas foi possível revelar o desempenho emocional dessas fêmeas por fases de desenvolvimento.

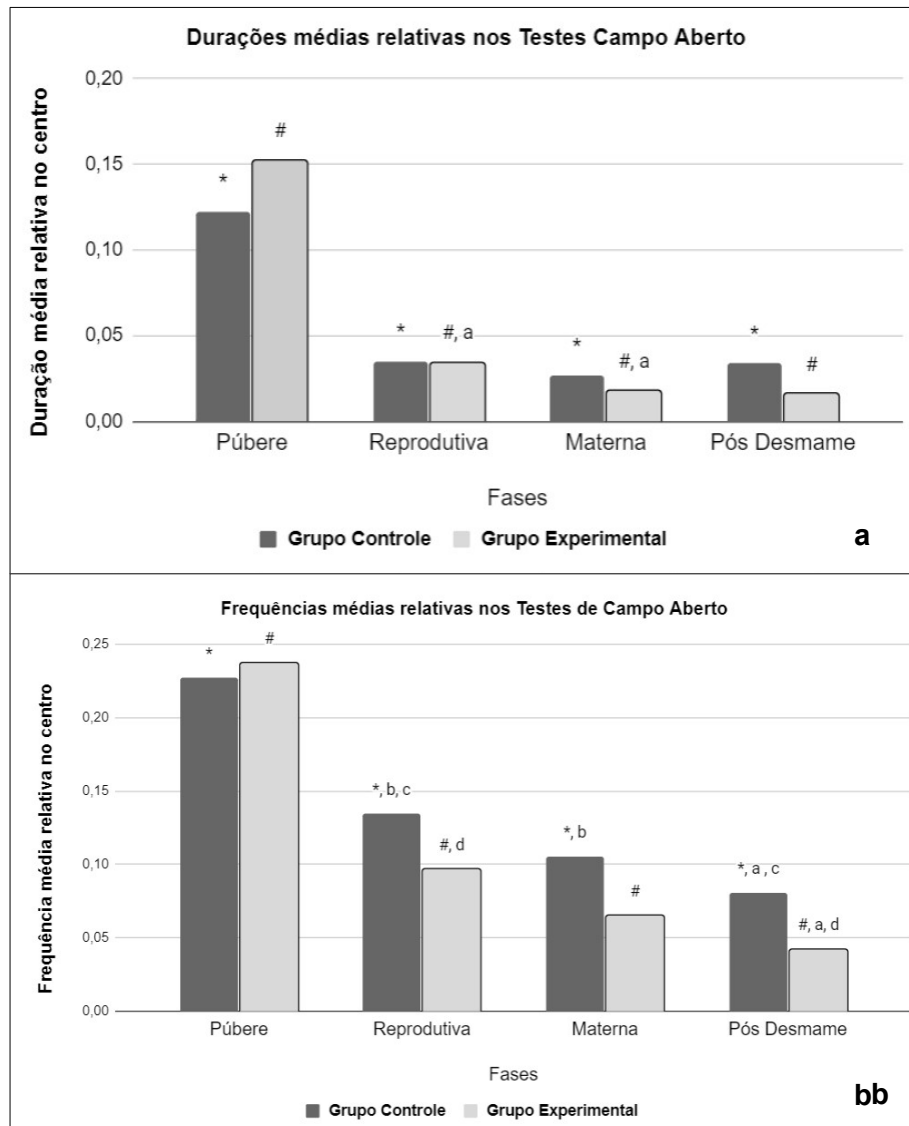


Figura 2. Diferença entre as fases de desenvolvimento (Púberes, Reprodutiva, Materna e Pós-Desmame) na duração **(a)** e frequência **(b)** relativa de ambulação na região aberta do teste de Campo Aberto. *, # e a apresentam diferenças significativas com $p < 0,05$ entre si (mesmo sinais, diferença entre eles).

Os resultados indicam que todos os animais da fase púber (P), independente dos grupos estudados, apresentaram significativamente maior duração ($p < 0,05$) e frequência ($p < 0,05$) nas áreas consideradas mais aversivas do teste de campo aberto, do que as outras fases de vida: Reprodutiva (R) Materna (M) e Pós Desmame (PD). Esse comportamento pode ser justificado pela idade púber ser supostamente mais ativa e menos experiente do que as outras devido à influência de sua composição hormonal. A puberdade é uma etapa de desenvolvimento em que os níveis de hormônios sexuais aumentam drasticamente e ocorrem mudanças de emocionalidade e comportamento (McDermott, 2012). De acordo com estudos

de Boivin *et. al.* (2017), não houve mudanças na emocionalidade de fêmeas após ovariectomia ou injeção de hormônios ovarianos em fase púbere. Porém, a diferença no comportamento ansioso de fêmeas por ação de andrógenos não foi descartada, pois pode ser que os hormônios ainda influenciem o comportamento, mas a fonte desses andrógenos nas fêmeas pode ser adrenal em vez de gonadal, como foi proposto pelo grupo.

Além disso, encontramos também que o comportamento ansioso aumentou gradativamente ao longo das fases de vida das fêmeas em ambos os grupos. Pode-se considerar também que este seja um fenômeno fisiológico do envelhecimento (Frick, 1999) independente do fator EA adicionado. A fase PD foi, portanto, a que apresentou maior ansiedade, e sugere-se que além do efeito fisiológico, o estresse gerado pela recente separação dos filhotes tenha culminado também no aumento de ansiedade (Huang, 2017). Ao contrastar os grupos de animais não colocados com EA (Grupo Controle - GC) com os animais colocados com EA (Grupo Experimental-GE) na ambulação no CA, não houve resultados significativos no contraste entre as fases púberes dos dois grupos. Esse resultado também demonstra que a adição do EA não teve influências no aumento do estresse. Verificamos que não houve diferença significativa no tempo que os animais da fase Pós Desmame permaneceram no centro do aparato de Campo Aberto enriquecidos ou não enriquecidos, porém observa-se que os animais do GC apresentaram uma maior duração significativa ($p < 0,05$) nessas condições. A fase Pós Desmame do GE foi a mais ansiosa entre todas as outras fases, esse resultado pode ter sido alcançado devido ao estresse pós separação dos filhotes (Huang, 2017), além disso, para os animais do GE, essa foi a primeira fase que não houve nenhum tipo de Enriquecimento social (acasalamento e filhotes) ou físico, em adição à ausência de hormônios da fase de púbere e reprodutora. Todos esses fatores podem ser indicados como possíveis responsáveis pelo comportamento mais ansioso encontrado nessa fase do grupo enriquecido previamente.

Os dados de Labirinto em Cruz Elevado, quanto a duração e frequência relativas das fêmeas, por fase de desenvolvimento, nas áreas dos braços abertos podem ser verificados na Figura 3.

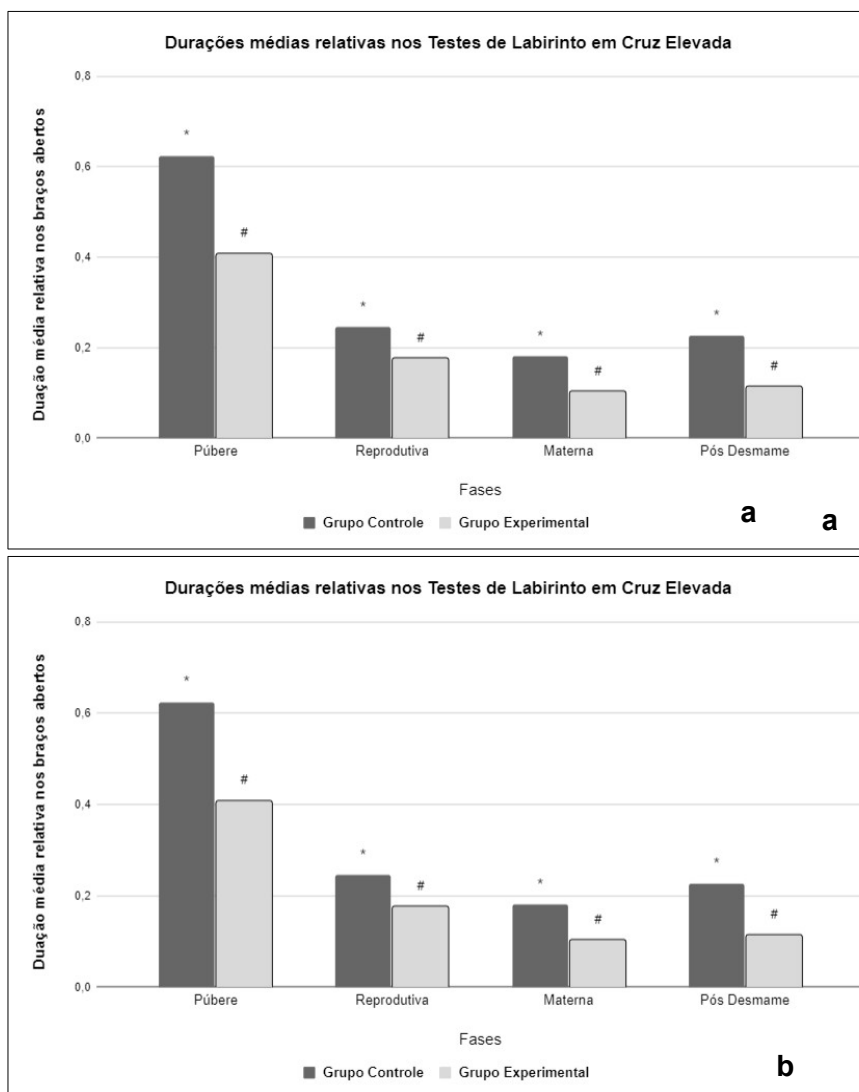


Figura 3. Diferença entre as fases de desenvolvimento (Púberes, Reprodutiva, Materna e Pós-Desmame) na duração **(a)** e frequência **(b)** relativa de ambulação nos braços abertos do teste de Labirinto em Cruz Elevado. *, # e a apresentam diferenças significativas com $p < 0,05$ entre si (mesmo sinais, diferença entre eles).

Como encontrado no teste de Campo Aberto, o desempenho das fêmeas púberes foi similar no teste de Labirinto em Cruz Elevado, em que as púberes tiveram significativamente maior duração ($p < 0,05$) e frequência ($p < 0,05$) nos braços abertos, ou seja, revelaram comportamento menos ansiosos do que as demais fases de desenvolvimento. Assim, a fase P, quando contrastada com ambos os grupos, demonstra aumento significativo ($p < 0,05$) quanto à duração e frequência nas áreas aversivas, em relação às outras fases de seus respectivos grupos. Esse resultado corrobora na hipótese indicada pelos resultados do CA de que esta fase tende a ser menos ansiosa fenotipicamente (Sobin, 2018; Moore, 2019). Pode-se,

portanto, sugerir-se com mais assertividade que esse comportamento é fisiológico e possivelmente hormonal (Lee, 2017), além disso, esse resultado também indica que o acréscimo de EA demonstrou não ter sido um estressor por não afetar negativamente o comportamento.

O aumento da ansiedade, avaliada nas fêmeas LG/J enriquecidas ou não, parece ser um comportamento dependente da fase de desenvolvimento, de forma que as experiências ao longo da vida, e enriquecimentos sociais, como presença do macho, e depois dos filhotes, e isolamento das fêmeas pós-desmame, podem afetar a emocionalidade em camundongos fêmeas da linhagem LG/J.

4.2. Nado Forçado (NF)

O teste de NF, descrito por Porsolt *et al.* (1977), envolve a reação adotada pelos animais expostos ao estresse, cujo resultado pode ter uma relação com comportamento tipo-depressivo (Yankelevitch-Yahav, 2015). Segundo Commons *et al.* (2017), a análise do teste é baseada na observação dos roedores que ao se depararem com uma situação aversiva inevitável, podem escolher diferentes estratégias, ativas (mobilidade) ou passivas (imobilidade). A Tabela 3 apresenta o desempenho das fêmeas dos grupos Controle e Experimental, a longo de suas fases de desenvolvimento, no teste de NF.

Tabela 3. Duração e frequência relativa de fêmeas LG/J, em diferentes fases da vida, quanto a mobilidade e imobilidade no teste de Nado Forçado.

	Grupo Controle				Grupo Experimental			
	Pub	Rep	Mat	PD	Pub	Rep	Mat	PD
Duração Relativa Mobilidade	*0,775± 0,033	0,421± 0,045	0,443± 0,058	0,397± 0,062	*0,872± 0,026	0,411± 0,041	0,351± 0,055	0,216± 0,044
Duração Relativa Imobilidade	0,225± 0,033	0,574± 0,047	0,557± 0,058	0,619± 0,067	0,128± 0,026	*0,589 ± 0,041	*0,649 ± 0,055	*0,784 ± 0,044
Frequência Relativa Mobilidade	*0,545± 0,008	0,517± 0,011	0,499± 0,012	0,49± 0,015	*0,606± 0,033	0,507± 0,013	0,487± 0,014	0,445± 0,016
Frequência Relativa Imobilidade	0,463± 0,008	0,483± 0,01	0,501± 0,012	0,510± 0,015	0,394± 0,033	0,493± 0,013	0,513± 0,014	*0,555 ± 0,016

As abreviaturas são referentes às fases: Pub, Púbere; Rep, Reprodutiva; Mat, Materna; PD, Pós-Desmame. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) para as comparações entre duração e frequência de mobilidade e imobilidade no teste de nado forçado

Os dados apresentados demonstram que apenas a fase P, em ambos os grupos, apresentou o comportamento de mobilidade mais durável e mais frequente significativamente ($p < 0,05$) em relação à todas as outras fases. Esses dados corroboram o comportamento observado no teste de CA e LCE, em que as fêmeas púberes foram menos ansiosas. No entanto, quanto ao desempenho típico de camundongos, naqueles testes essas fêmeas também apresentavam o comportamento típico de maior ambulação na área menos aversiva, proporcionalmente. Apesar de estar relacionado com a emocionalidade do animal, o comportamento tipo-depressivo possui mecanismos diferentes dos de ansiedade (Ionescu, 2013). Aqui, pelo desempenho das fêmeas LG/J na puberdade, verifica-se que elas têm maior mobilidade, apresentando movimentos que favoreçam seu escape da situação, tendo um sentido oposto ao comportamento tipo-depressivo. Os contrastes entre fases de desenvolvimento e grupos testados podem ser observados na Figura 4.

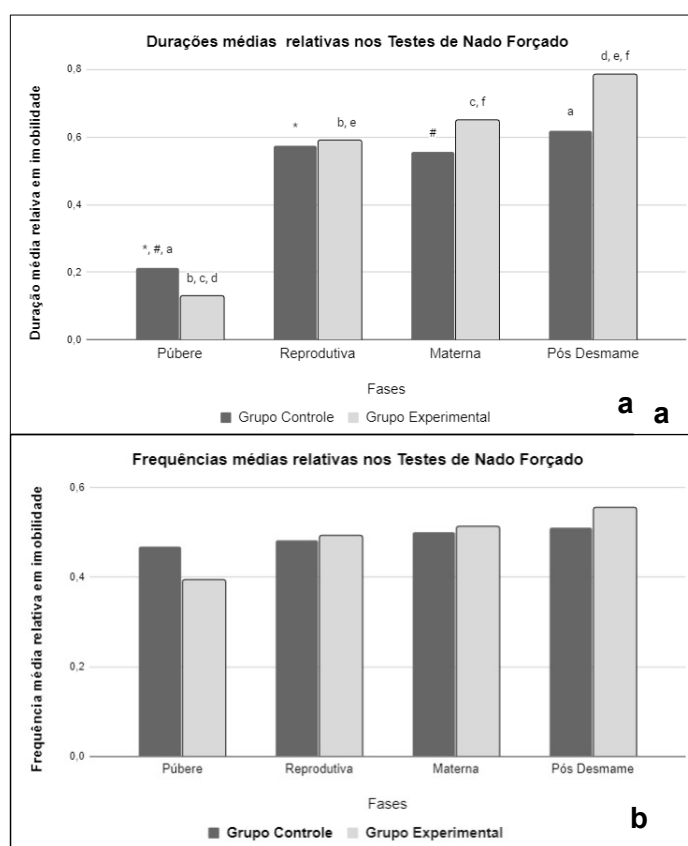


Figura 4. Diferença entre as fases de desenvolvimento na duração (a) e frequência (b) relativa de imobilidade no teste de Nado Forçado. *, # e letras a, b, c, d, e e f apresentam diferenças significativas com $p < 0,05$ entre si (mesmo sinais e letras, significa diferença entre eles).

Os resultados encontrados na fase púbere deste teste correlacionam-se com o que foi demonstrado nos testes CA e LC, em que essas fêmeas, com maior mobilidade teriam comportamento não tipo-depressivos. A imobilidade dos animais pode ser interpretada como uma indicação da compreensão de que a fuga era impossível, sendo assim, adotaram uma posição de conservação de energia. Sugere-se, portanto, que a imobilidade seja um “desespero comportamental” (Castagné, 2011). Dando maior ênfase à hipótese de que essa fase púbere não obteve malefícios do EA, sugere-se que a postura menos depressiva adotada pelos animais desta fase sejam decorrentes de sua fisiologia, como é relatado o aumento gradual do comportamento depressivo ao longo das fases de vida desse animais (Boivin, 2017).

Encontramos novamente que a fase “mais afetada” emocionalmente (com maior indícios de comportamento tipo-depressivo) foi a fase pós-desmame do Grupo Experimental. Supõe-se que alguns fatores possam ter levado os animais a esses resultados, são eles a recente separação de seus filhotes, pois isolamento social pós-desmame de animais de laboratório já foi descrito como indutor de muitas anormalidades comportamentais e neuroquímicas, como depressão e ansiedade (Matsumoto, 2019). Além disso, esse efeito pode ter sido amplificado no grupo que recebeu EA devido à sua repentina abstenção de qualquer tipo de enriquecimento, após ter sido condicionado a esse costume durante suas fases prévias.

O comportamento tipo-depressivo apresentou uma escala progressiva ao longo das fases de desenvolvimento das fêmeas LG/J, em que as fêmeas púberes foram as menos afetadas, enquanto as fêmeas Pós-desmame seriam as que mais apresentam tal comportamento. No entanto, não parecem ser afetados pelo EA na fase púbere.

4.3 Cuidado Materno

O cuidado materno é essencial em mamíferos, uma vez que variações no ambiente introduzidas pelas mães podem influenciar diretamente a viabilidade de recém-nascidos e comportamento da prole (Chiavegatto, *et al*, 2012). O contraste entre a postura materna investigada das fêmeas que não tiveram enriquecimento ambiental com as fêmeas que foram expostas ao enriquecimento ambiental, na fase púbere, pode ser observado na Figura 5. Nela são apresentados os dados categóricos de placentofagia, sucesso (pelo menos um filhote sobreviveu), presença de leite (indicação de amamentação) e agressividade (postura de proteção dos filhotes).

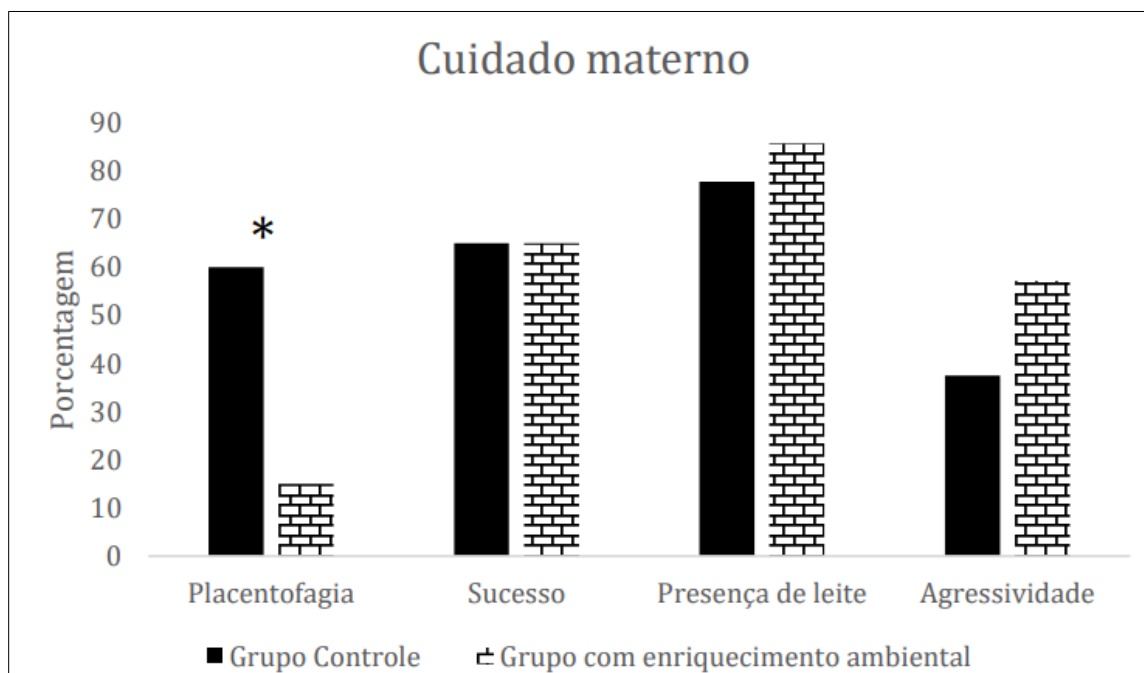


Figura 5. Comportamentos de ingestão de placenta ao nascimento (placentofagia), sobrevivência de, pelo menos, um dos filhotes na primeira semana de vida (sucesso), indicação de amamentação da mãe aos filhotes (presença de leite) e postura de proteção aos filhotes (agressividade) dos grupos controle e experimental (com enriquecimento ambiental). *significa resultado significativo ($p < 0,05$).

A análise dos comportamentos de Sucesso (viabilidade de, pelo menos, um filhote), Presença de Leite e Agressividade não diferiram significativamente entre os grupos controle e com enriquecimento ambiental na puberdade. Entretanto, as fêmeas do grupo controle realizaram a placentofagia significativamente ($p < 0,05$) mais vezes que as fêmeas do grupo enriquecido. Esses dados são intrigantes e podem revelar que no momento da observação do nascimento dos filhotes, as fêmeas do grupo enriquecido demoram mais para realizar o consumo de sua placenta. Como a investigação é feita logo pela manhã, e os animais geralmente parem no período noturno, os dados podem indicar que as fêmeas enriquecidas pariram mais tardiamente que o controle, motivo pelo qual não haviam ainda consumido a placenta até o momento da visualização da mesma. A observação desse evento indica um potencial cronobiológico e pode abrir hipóteses para pesquisas futuras.

O ato de consumir a placenta é geralmente performado por fêmeas de mamíferos, exceto algumas exceções, e não possui um significado funcional completamente elucidado, entretanto, sugere-se que seja relacionado a nutrição geral, pois muitas parturientes tornam-se afálicas antes do parto e são motivadas a comer a placenta devido ao seu alto fator nutritivo; outras teorias sugerem que esse ato pode ser realizado por fatores de nutrição específica ou seja, a placenta conteria um hormônio específico ou fator biologicamente ativo do qual as mães carecem e reabastecem por meio da placentofagia. Outra sugestão ser a evitação de

predadores e patógenos na prole (Perea-Rodriguez, 2018). De qualquer maneira, o fato de fêmeas enriquecidas não desempenharem melhor nesse comportamento ainda teria que ser melhor investigado.

Após o nascimento, nem todos os filhotes sobrevivem a primeira semana de vida. Assim, o tamanho de ninhada ao nascimento (TNN) do grupo controle foi de $6,5 \pm 0,8$ e do grupo experimental foi de $6,0 \pm 0,7$. O tamanho de ninhada viável (TNV) que sobreviveram após o parto é de $5,5 \pm 0,8$ no grupo controle e $4,0 \pm 0,7$ do grupo enriquecido. O contraste entre TNN e TNV revelou que não houve diferença significativa entre essas variáveis e os grupos estudados. Dessa forma, o tamanho de ninhada manteve-se estável, de forma que a grande maioria manteve o número de filhotes nascidos e que sobreviveram a primeira semana.

Os filhotes foram monitorados quanto ao peso semanalmente até a sétima semana. Na Figura 6 está representado o peso semanal médio dos filhotes da primeira a sétima semana e no dia da necrópsia.

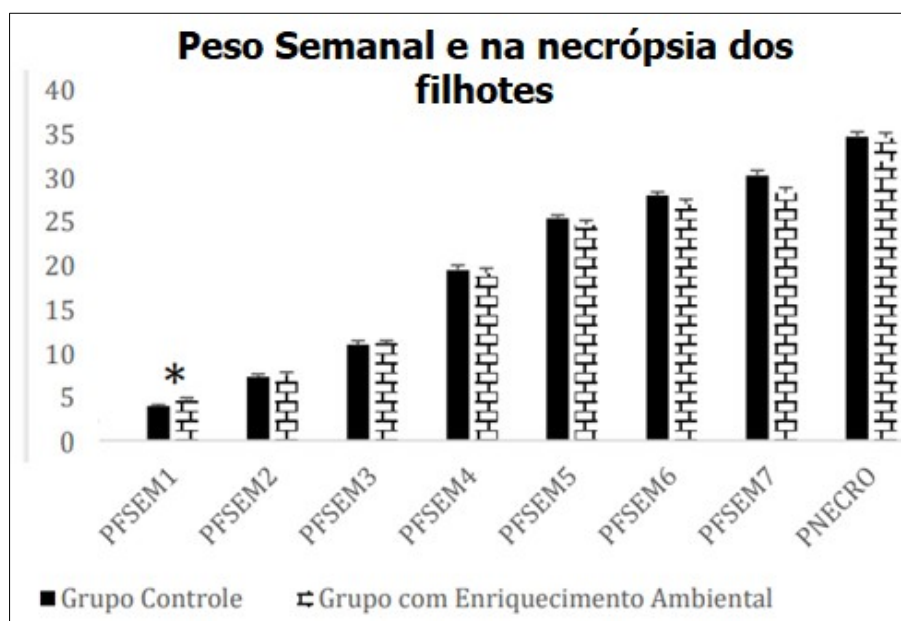


Figura 6. Pesos semanais dos filhotes da primeira à sétima semana, e no dia da necrópsia dos animais dos Grupos Controle e com Enriquecimento Ambiental. Os pesos dos filhotes estão representados por PFSEM, e os números indicam a semana de idade (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente); PNECRO significa Peso na necrópsia. * quer dizer que o resultado é significativo ($p < 0,05$).

Ao contrastar o peso médio semanal dos filhotes, ao longo das sete semanas de vida e no dia da necrópsia, somente o peso dos filhotes das fêmeas enriquecidas, na primeira semana, foi maior significativamente ($p < 0,05$) do que dos filhotes das fêmeas controle. Os demais apresentaram pouca diferença, e nenhuma foi significativa. Efeitos maternos e epigenéticos, diferentemente de efeitos genéticos, atuam na expressão de característica de

forma a levar uma mudança no valor, alterando assim a taxa prevista de evolução dessa característica (Gyekis, 2011). Os filhotes mais pesados podem ser resultado de efeito materno, em que as fêmeas enriquecidas parecem proporcionar o nascimento de filhotes mais pesados. A diferença em peso começa a reduzir ao longo das semanas, sugerindo que o efeito materno não persiste após o desmame. Após o desmame (terceira semana de vida) as fêmeas dos dois grupos foram desmamadas e mesmo diante da ração sólida, o ganho em peso dos animais foram semelhantes nos dois grupos. Sugerindo pouco efeito do enriquecimento ambiental na mãe no ganho em peso bruto dos animais. No intuito de verificar não somente o peso bruto dos animais, os pesos de órgão e gorduras das fêmeas LG/J foram mensurados após a necrópsia e estão apresentados, em gramas, na Figura 7.

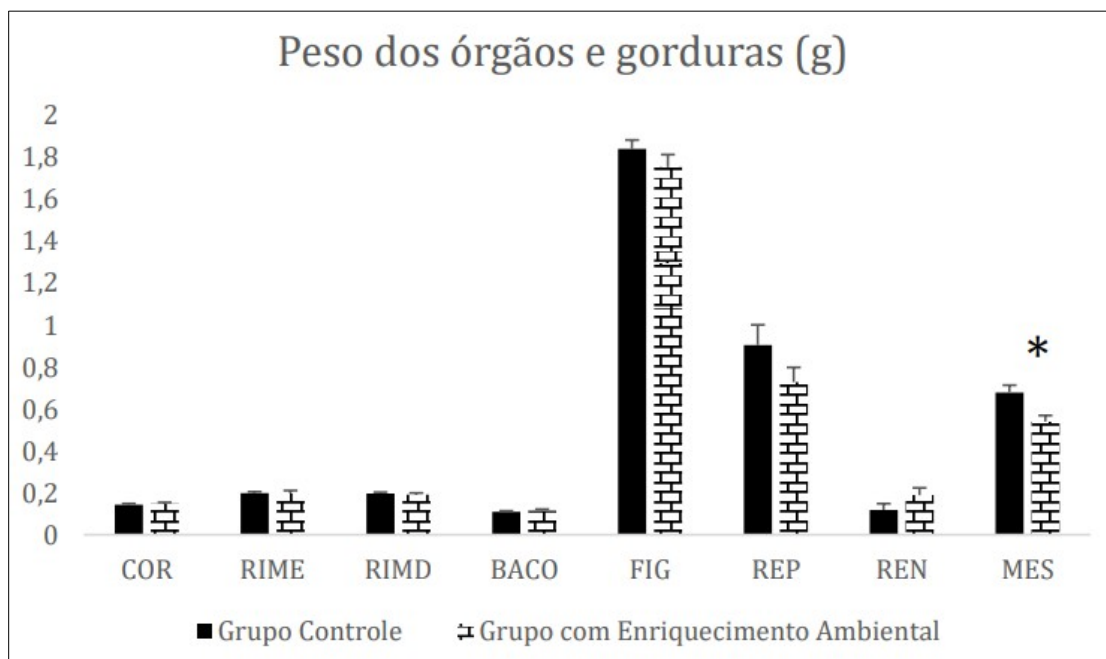


Figura 7. Peso de órgão e gorduras obtidos das fêmeas dos grupos controle e enriquecido. COR significa peso do coração; RIME e RIMD quer dizer peso do rim Esquerdo e peso do rim direito, respectivamente; BACO significa peso do baco; FIG é o peso do fígado; As gorduras estão reunidas em REP (peso da gordura reprodutiva), REN (peso da gordura renal) e MES (Peso da gordura mesentérica). * significa que o resultado é significativo ($p < 0,05$).

De maneira geral, os pesos dos órgãos das fêmeas dos dois grupos não apresentaram diferença significativa. No entanto, verificou-se que as fêmeas do grupo controle apresentam maior deposição de gordura reprodutiva, renal e mesentérica, sendo somente a última diferindo significativamente ($p < 0,05$) entre os grupos. Ao verificarmos a Figura 6, o peso à necrópsia dessas fêmeas não diferiu entre os grupos, mas de certa forma, o grupo controle acumulou mais gordura entre os órgãos abdominais, a chamada gordura mesentérica. No

presente trabalho o enriquecimento foi adicionado na fase púber, mas há relato na literatura de que a exposição de animais em fases tardias de desenvolvimento ao enriquecimento ambiental pode direcionar a alterações fisiológicas, que estariam relacionadas com a redução de deposição de gordura, e a melhoria do controle da glicemia, gerando animais mais saudáveis na velhice (McMurphy *et al.*, 2018). Apesar de não ter sido verificada a taxa de açúcar no sangue desses animais, os dados de menor acúmulo de gordura mesentérica no grupo enriquecido pode estar associado a modificações fisiológicas ocorridas na puberdade, pela exposição ao EA.

4.4. Teste de Resgate (TR)

Um aspecto importante a ser considerado, ao investigar o cuidado materno, é a postura materna no momento de interação com os filhotes. O teste de recuperação de filhotes teve esse intuito, e o resultado da análise da postura da mãe se autoacariciando/*self grooming*, nos dias 3 (TR1) e 7 (TR2) pós-parto pode ser verificada na Figura 8.

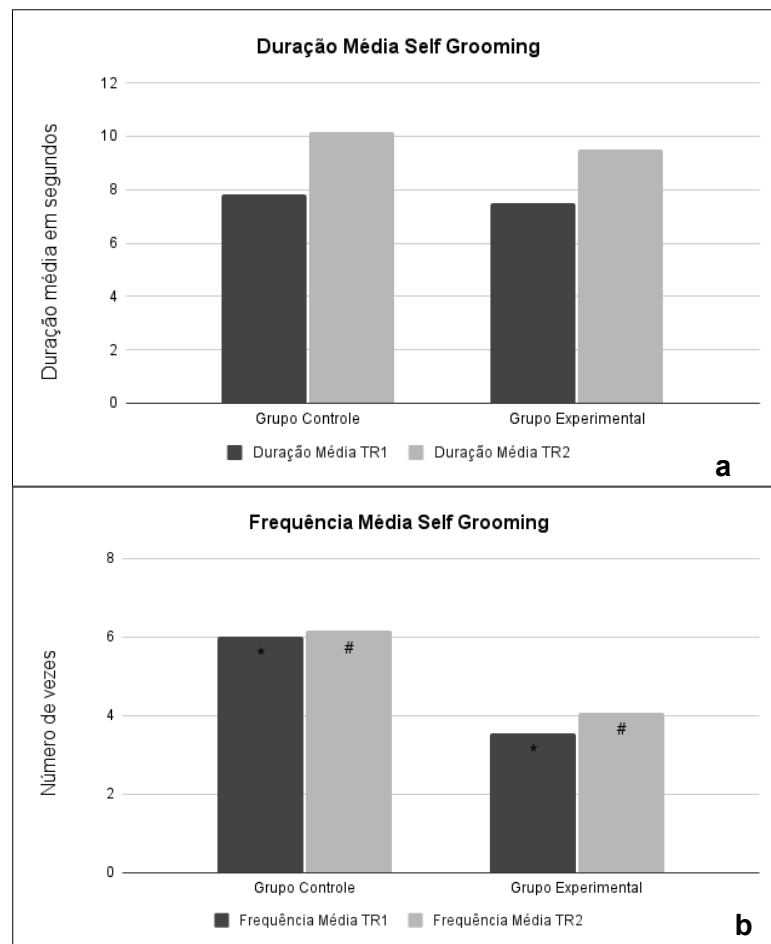


Figura 8. Postura de autocuidado em que a mãe realiza, na presença dos filhotes, nos testes de resgate 1 (D3 pós-parto) e 2 (D7 pós-parto). Em a. verifica-se a duração (em segundos) de autolimpeza e em b. frequência

(número de vezes) do autocuidado. * e # indicam a significância estatística de $p < 0,05$ entre os grupos com símbolos iguais.

Nos dois grupos estudados, é possível verificar que as fêmeas não tiveram diferença significativa quando a duração do ato de se acariciar, em ambos os testes, mas que quanto ao número de vezes, a mães, em geral, realizaram esse ato mais frequentemente ($p < 0,05$) no primeiro teste (D3 pós-parto) do que no segundo teste (D7 pós-parto). O *self-grooming* é um ato que pode estar associado com o nível de estresse do animal (Kalueff & Tuohimaa, 2004), mas como em ambos os grupos os resultados são semelhantes, apenas pode-se inferir que quanto mais recente do pós-parto, pode indicar uma maior nível de estresse materno, revelado pela elevada frequência de *self-grooming*.

A postura materna, dada pela interação entre mãe-filhotes, dos diferentes grupos pode ser verificada na Figuras 9.

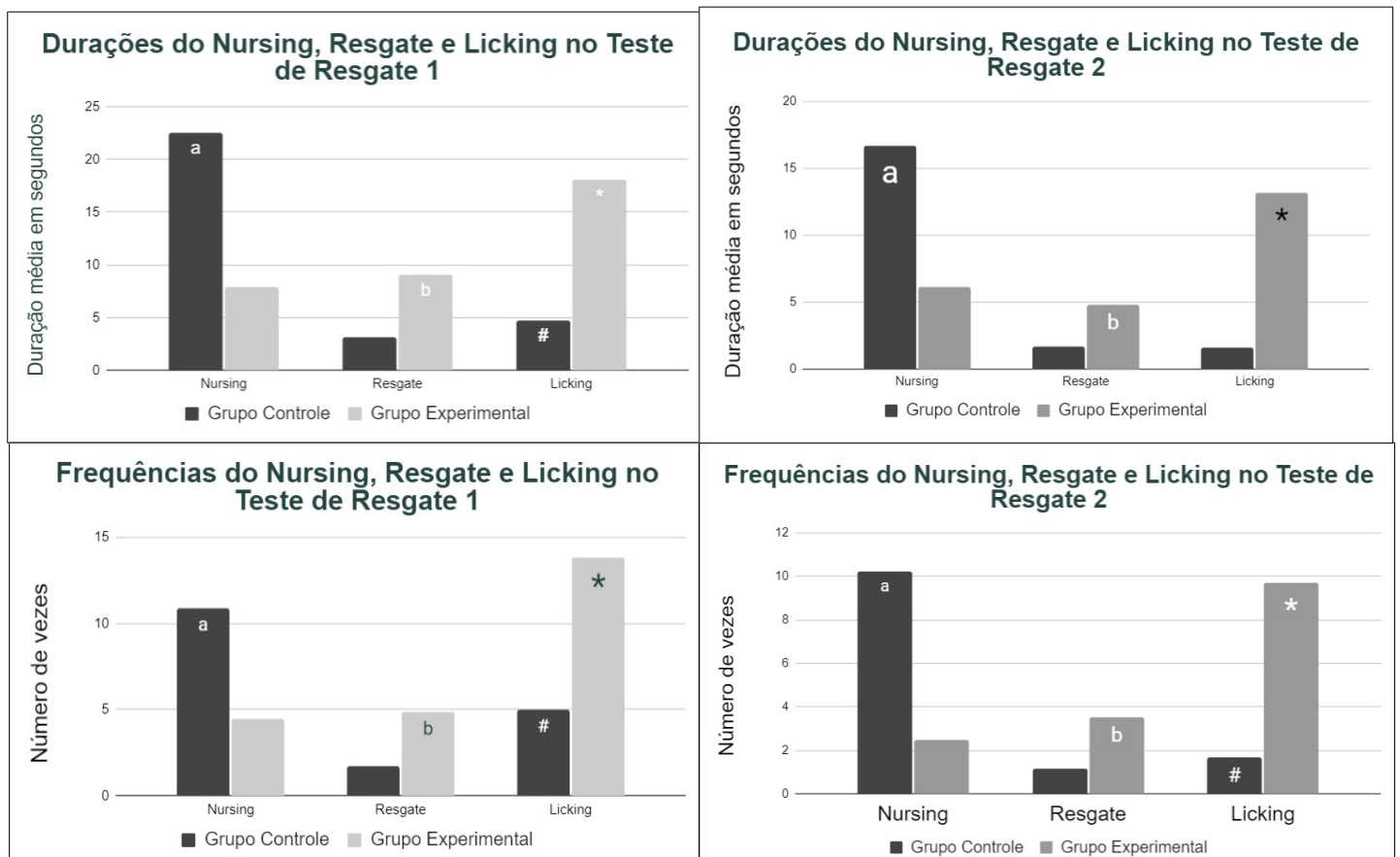


Figura 9. Postura das mães com os filhotes, no primeiro (D3-pós-parto) e segundo (D7-pós-parto) teste de resgates, nas fêmeas que foram enriquecidas ou não. *Nursing* significa a fêmea posicionada sobre os filhotes, *Licking* indica a limpeza do corpo e região anogenital dos filhotes pela mãe, e *Resgate* é o tempo que a fêmea leva para pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho). *, #, a e b indicam a significância estatística de $p < 0,05$ para os contrastes entre grupos.

Observamos que em ambos os testes desenvolvidos, o Grupo Experimental apresentou maior frequência e duração significativas de *licking* dos filhotes. A prática do *licking* é a realização da lambedura de seus filhotes, essa ação se inicia a partir do ato da placentofagia dos recém-nascidos. A lambedura é importante para o estímulo da micção dos filhotes que geralmente não urinam até completarem uma semana de vida (Peripato, 2002), além de ser importante para a nutrição da mãe, assim como a placentofagia (Perea-Rodriguez, 2018). Além disso, foi registrado uma maior duração e frequência significativas da realização dessa prática durante o primeiro teste realizado (D3 – pós-parto) para os indivíduos do Grupo Controle, ou seja, as fêmeas diminuíram significativamente a realização dessa prática de cuidado materno. Sugerimos que as fêmeas enriquecidas puderam elaborar mais ativamente as práticas de cuidado com seus filhotes durante seus primeiros dias de vida, como o *licking* e a amamentação, dado o maior peso da prole dos animais enriquecidos na primeira semana de vida. Além dos processos fisiológicos citados, esse comportamento também está associado ao desenvolvimento comportamental individual dos filhotes e de suas respostas ao estresse (Fish., 2004). Foi observada uma diminuição deste comportamento entre os testes, mesmo que não significativa, entretanto, mostra que as fêmeas tendem a diminuir a prática conforme o desenvolvimento da prole. Encontramos também que o Grupo Controle apresentou maior duração e frequência significativas em ambos os testes para a prática de *Nursing*, que seria posição da fêmea sobre os filhotes com postura curvada, como ato de proteção a intrusos ou durante amamentação dos mesmos.

Por fim, relatamos que o Grupo Experimental permaneceu mais tempo e executou mais vezes o ato de resgate do que o Grupo Controle. O resgate consiste no ato da fêmea pegar os filhotes e deslocá-los com os incisivos, geralmente pela região do pescoço, e depositá-los no ninho ou outro local (Stern, 1990). Sugere-se que as fêmeas enriquecidas tenham demonstrado uma melhor postura protetora como mãe, pois este comportamento está associado ao maior tempo em que ela passa resgatando seus filhotes (Forti, 2012).

A interação da fêmea em seu autoacariciamento/*self grooming* não diferiu entre grupos, somente entre os testes, mas a interação com os filhotes revelam que o enriquecimento ambiente na fase púbere pode favorecer a relação mãe-filhotes, que poder efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento da prole. A investigação de como essa prole se comportaria quando se tornasse mãe poderia revelar se esse efeito pode ser transgeracional. Futuros estudos do grupo pretende avaliar esse efeito.

5. Conclusão

Conclui-se que a introdução do EA aos animais na fase púbere foi, de forma geral, positiva. Considerando a ampla gama de diferentes tipos e técnicas para enriquecimento, o teste de preferência desenvolvido para o trabalho pôde identificar a preferência das fêmeas murinas LG/J pelo rolo de papelão, tornando a técnica mais eficiente e específica para os indivíduos utilizados.

A exposição dos animais em fase púbere ao rolo de papelão, e o contraste com aqueles nunca expostos, permitiu investigar o impacto desse enriquecimento sobre a emocionalidade das fêmeas. Os resultados sugeriram que as fêmeas LG/J possuem comportamentos tipo ansioso e depressivo de forma intrínseca a elas. Entretanto, esse comportamento apresenta plasticidade e pode sofrer alterações a partir de fatores ambientais.

O enriquecimento ambiental pode modular a emocionalidade das fêmeas, porém, fatores biológicos dependentes da fase de vida e de outras mudanças ambientais, como a separação dos filhotes das fêmeas também são capazes de interferir na complexidade da emocionalidade. Isso ocorreu com as de fêmeas pós desmame deste trabalho, as quais foram caracterizadas por apresentarem maiores índices de comportamentos tipo-depressivo, esses dados trazem importantes informações relativas essa fase.

O cuidado materno também mostrou, de maneira geral, algumas melhorias na postura de mães enriquecidas com seus filhotes, e mesmo na fase púbere, teve efeito positivo no cuidado materno.

De modo geral, os resultados obtidos são relevantes para o crescente cenário do EA para animais cativos de laboratório. Os resultados contribuem gerando pautas para discussões além de também desencadear em mais questões as quais poderão ser elucidadas em próximos trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa na busca de marcadores epigenéticos associados ao bem-estar animal.

6. Referências Bibliográficas

1. ALI, S., *et al.* CSF1R inhibitor PLX5622 and environmental enrichment additively improve metabolic outcomes in middle-aged female mice. *Aging*. vol.12, issue 3. p.2101-2122, 2020.
2. ALWIS, DS; RAJAN, R. Environmental enrichment and the sensory brain: the role of enrichment in remediating brain injury. *Frontiers In Systems Neuroscience*, v. 8, 2014.
3. ARRUDA JÚNIOR, R, G. de. Temperatura de *Melting*: um estudo comparativo, 2010, 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciência da Computação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.
4. LECORPS, B; RODEL, H, FERON, C., Assessment of anxiety in open field and elevated plus maze using infrared thermography, *Physiology & Behavior*, Volume 157, 2016, Pages 209-216, ISSN 0031-9384.
5. BOIVIN, J.R.; PIEKARSKI, D.J.; WAHLBERG, J.K.; WILBRECHT, L. Age, sex, and gonadal hormones differently influence anxiety- and depression-related behavior during puberty in mice, *Psychoneuroendocrinology*, vol. 85, p. 78-87, 2017.
6. BORGES, MP; BYK, J; DEL-CLARO, K. Influência de técnicas de enriquecimento ambiental no aumento do bem-estar de *Callithrix penicillata* (E. Geoffroy, 1812) (Primates: Callitrichidae). *Biotemas*, v. 24, n. 1, p.83-94, 2011.
7. BRAZ, J. *Anim. Environ. Res.*, Curitiba, v. 3, n. 2, p.391-396, abr./jun. 2020ISSN 2595-573X ASSIS 2020
8. BREDY, TW. *et al.* Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *European Journal Of Neuroscience*, v. 20, n. 5, p.1355-1362, 2004.
9. CALDJI C, TANNENBAUM B, SHARMA S, FRANCIS D, PLOTSKY PM, MEANEY MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of behavioral fearfulness in adulthood in the rat. *Proc Natl Acad Sci* 95:5335–5340, 1998.
10. HERRERA, C R. *et al.*. BIOLOGICAL INDICATORS OF ANIMAL WELFARE IN RODENTS IN THE BIOLOGICAL ESSAY LABORATORY OF THE UNIVERSITY OF COSTA RICA: EVALUATION PROTOCOLS. *RESBCAL*, São Paulo, v.7 n.1, pg. 24-32, 2019
11. CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOLT, R.D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2011
12. CHEN, K.W.; CHEN, L. Epigenetic Regulation of BDNF Gene during Development and Diseases. *Int J Mol Sci.*; 18(3):571, 2017.
13. CHIAVEGATTO S.; SAUCE, B.; AMBAR G.; PERIPATO A.C. Hypothalamic expression on Peg3 gene is associated with maternal care differences between SM/J and LG/J mouse strain. *Brain and Behavior*: p. 365-376, 2012.
14. CHROUSOS, GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995 May 18;332(20):1351-62. PMID: 7715646.
15. CIPRIANO, A.C.; GOMES, K.S.;NUNES-DE-SOUZA, S.L. CRF receptor type 1 (but not type 2) located within the amygdala plays a role in the modulation of anxiety in mice exposed to the elevated plus maze, *Hormones and Behavior*, vol.81, p.59-67, 2016
16. CLARK, J. A.; SUN, D. Guidelines for the ethical review of laboratory animal welfare People’s Republic of China National Standard GB/T 35892-2018. *Animal Model Exp Med*. 3: 103– 113, 2020.
17. CLÉMENT, Y. *et al.* Genetic factors regulate processes related to anxiety in mice. *Brain Research*, vol. 752, p. 127-135. 1997.
18. COMMONS, K.G.; CHOLANIANS A.B.; BABB, J.A.; EHLINGER, D.G. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci*. p.955-960, 2017.

19. CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature reviews Drug discovery*, v. 4, n. 9, p. 775-790, 2005.
20. DANDI, E. *et al.* "Investigating the Role of Environmental Enrichment Initiated in Adolescence against the Detrimental Effects of Chronic Unpredictable Stress in Adulthood: Sex-Specific Differences in Behavioral and Neuroendocrinological Findings." *Behavioural Processes*, vol. 200, 2022, p. 104707.
21. DE AZEVEDO, CS; CIPESTRE, CF; YOUNG, RJ. Environmental enrichment: A GAP analysis. *Applied Animal Behaviour Science* 102, 329–343, 2007.
22. DELA RICCI, G. *et al.* EFEITO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM CATIVEIRO DE ONÇAS SUÇUARANAS (*Puma concolor*). *Cienc. Anim. bras.*, Goiânia, v.19, 1-10, e-47693, 2018.
23. ENNACEUR, A.; MICHALIKOVA, S.; CHAZOT, P.L. Models of anxiety: Responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space, *Behavioural Brain Research*, vol. 171, Issue 1. p. 26-49, 2006.
24. ESPERIDIÃO, V. A. *et al.* *Neurobiologia das emoções*. *Rev. Psiq. Clín* 35 (2); 55-65, 2008.
25. FAN, Z. *et al.* "Environmental Enrichment Modulates HPA Axis Reprogramming in Adult Male Rats Exposed to Early Adolescent Stress." *Neuroscience Research*, vol. 172, 2021, pp. 63–72.
26. FISCH, J. Efeitos do enriquecimento ambiental no desempenho reprodutivo e na quantidade e morfologia de Complexos Cumulus-Oócito de *Rattus norvegicus*. 2016. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2016
27. FORTI, I., R., N. Bases genéticas do comportamento materno agressivo de proteção contra intrusos em camundongos. 2012. Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. São Carlos, 2012.
28. FRANCIS D, DIORIO J, LIU, D, MEANEY MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 286: 1155–1158, 1999.
29. FRANCO, NH. *Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective*. *Animals (Basel)*. 2013, 3:238-273.
30. FREELAND, J. R. The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA, *Genome*, [S.L.], v. 60, n. 4, p. 358-374, abr, 2017.
31. FRICK, M; BURLINGAME, L.A.; ARTERS, J.A.; BERGER-SWEENEY, J.. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience*. vol.95. p.293-307, 2000.
32. GARBIN, L. C.; FALEIROS, R. R; LAGO, L. A. "Environmental enrichment of rodents utilized for animal experimentation: literature review." *Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais* 10.2 (2012): 153-161.
33. GARLAND M, SVARE B Suckling stimulation modulates the maintenance of postpartum aggression in mice. *Physiol Behav* 44: 301–305, 1988.
34. GOMES, S. O.; MENDES, R. F. de M.; LIMA, P. S. da C. Determinação da temperatura de anelamento com marcadores ISSR em acessos de Pinhão Manso. CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2, 2012, Belém, Anais, Belém: [S,E,], 2012, p. 1-5,
35. HALL C.; BALLACHEY, EL. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*, 6, 1-12, 1932.
36. HALL, CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385-403, 1934
37. HANSEN S, FERREIRA A. Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rat: control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. *Behavioral Neuroscience* 100(1): 64-70, 1986.
38. HOLMES, A.; PARMIGIANI, S.; FERRARI, P.F; PALANZA, P.; RODGERS, R.J. Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety, *Physiology & Behavior*, vol.71, Issue 5, p.509-516, 2000.

39. HUANG, Q.; ZHOU, Y.; LIU, L.-Y. Effect of post-weaning isolation on anxiety- and depressive-like behaviors of C57BL/6J mice. *Experimental brain research*, [s. l.], v. 235, n. 9, p. 2893–2899, 2017.
40. HUNG, J.; WENG, Z. Designing Polymerase Chain Reaction Primers Using Primer3Plus, *Cold Spring Harbor Protocols*, [S.L.], 2016, n. 9, p. 821-826, 29 ago, 2016.
41. IONESCU, D. F., *et al.* *NEUROBIOLOGY OF ANXIOUS DEPRESSION: A REVIEW. Depression and Anxiety*, 30(4), 374–385, 2013.
42. JIMÉNEZ-CHILLARÓN J.C., DÍAZ R., MARTÍNEZ D., PENTINAT, T., RAMÓN-KRAUEL, M., RIBÓ, S., PLÖSCH, T. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie*. 2012
43. JURUENA, M F, *et al.* “O Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, a Função Dos Receptores De Glicocorticóides e Sua Importância Na Depressão.” *Revista Brasileira De Psiquiatria*, vol. 26, no. 3, 2004, pp. 189–201.
44. KALUEFF, A.V.; TUOHIMAA, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*. v. 13, n. 3, p. 151- 158, 2004
45. KIKUSUI T, NAKAMURA K, KAKUMA Y, YUJI M. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. *Behav Brain Res* 175: 96–103, 2006.
46. KIKUSUI T, NAKAMURA K, KAKUMA Y, YUJI M. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. *Behav Brain Res* 175: 96–103, 2006.
47. KIMURA, L; MATTARAIÁ, VGM; PICCOLO, G. Distinct environmental enrichment protocols reduce anxiety but differentially modulate pain sensitivity in rats. *Behaviors in rats*", *Physiology & Behavior*, vol 178, p.179-186, 2017.
48. KIMURA, L. F., NOVAES, L. S., PICCOLO, G., MUNHOZ, C. D., CHEUNG, C. W., & CAMARINI, R. (2021). How environmental enrichment balances out neuroinflammation on chronic pain and comorbid depression and anxiety disorders. *British Journal of Pharmacology*. doi:10.1111/bph.15584
49. KINSLEY C H, *et al.* Motherhood improves learning and memory. *Nature* 402:137–138, 1999
50. LEE A, BROWN R. Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*). *Behavioral Neuroscience*, 116:968975, 2002.
51. LEE, T.J.; KINZIG, K.P. Reprint of "Repeated adolescent activity-based anorexia influences central estrogen signaling and adulthood anxiety-like behaviors in rats". *Physiol Behav*. 178. P.179-186, 2017.
52. LEIDINGER, C. S., *et al.* Environmental enrichment prevents pup mortality in laboratory mice. *Lab Anim*.(1) p.53-62, 2018.
53. LIPKIND, D.; GOLANI, I. New replicable anxiety-related measures of wall vs. center behavior of mice in the open field. *J Appl Physiol* 97: 347–359, 2004.
54. MAEKIVI, N. Freedom in Captivity: Managing Zoo Animals According to the ‘Five Freedoms’. *Biosemiotics* 11, 7–25 (2018).
55. MANES, M. Caracterização fenotípica e análise do sistema nervoso central dos camundongos mutantes equilíbrio e mergulhador induzidos pelo agente mutagênico NETHYL-N-NITROSOUREA. Dissertação - Pós graduação em Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
56. MASSARI, C. H. de A. L.; MARTINS, N. O.; JOZALA, A. F.; GROTTTO, D.; GERENUTTI, M. Laboratory animal welfare: environmental enrichment shows positive effect on
57. MATSUMOTO, K. FUJIWARA, H.; ARAKI, R.; YABE, T. Post-weaning social isolation of mice: A putative animal model of developmental disorders. *J Pharmacol Sci*. p. 111-118, 2019.
58. MATTERN, Felix, *et al.* “Prenatal and Postnatal Experiences Associated with Epigenetic Changes in the Adult Mouse Brain.” *Behavioural Brain Research*, vol. 359, 2019, pp. 143–148.
59. MCLEAN JA E JR. SPEAKMAN. Non–nutritional maternal support in the brown longeared bat. *Animal Behaviour* 54:1193-1204, 1997.
60. MCDERMOTT, CM, LIU D, SCHRADER, LA. Role of gonadal hormones in anxiety and fear memory formation and inhibition in male mice. *Physiol Behav*. 2012 Mar 20;105(5):1168-74. PMID: 22226989.

61. MCMURPHY, T.; HUANG, W.; QUEEN, N. J.; ALI, S., Widstrom, K.J., Liu, X., Xiao, R., Siu, J.J.; Cao, L.. Implementation of environmental enrichment after middle age promotes healthy aging. *Aging*, vol.10, pp. 1698, 2018.
62. MEIER, S.M. *et al.* (2019) “Genetic Variants Associated With Anxiety and Stress-Related Disorders: A Genome-Wide Association Study and Mouse-Model Study,” *Archives of general psychiatry*, 76(9), pp. 924–932.
63. MELANI, R.; CHELINI, G.;CENNI, M.C.; BERARDI, N.; Enriched environment effects on remote object recognition memory, *Neuroscience*, vol. 352, p. 296-305, 2017.
64. MOLENTO, C. F. M.; *et al.* Effects of environmental enrichment on motherhood on the welfare of mice bred in vivarium. *Archives Of Veterinary Science*, v. 20, n. 2, p.139-148, ago. 2015.
65. MOORE, C.F.; CHENG, J.E.; SABINO; V.,COTTONE, P. Modeling and testing compulsive eating behaviors in animals. *Compulsive Eating Behavior and Food Addiction*, p.359-388, 2019.
66. NEVES, SMP, MANCINI FILHO, J; MENEZES, EW. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. 2São Paulo: Universidade de São Paulo - FCF-IQ/USP; 2013. 216p.
67. NUMAN M, NUMAN MJ, MARZELLA SR, PALUMBO A. Expression of c-fos, fos B, and egr-1 in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis during maternal behavior in rats. *Brain Research* 792: 348–352, 1998.
68. OLIVEIRA, G; BRUCK,M; VERONEZ, T. Qual a melhor forma de utilização do Enriquecimento ambiental para camundongos em biotério?. *Enriquecimento Ambiental FioCruz*, 119p, 2018. Rio de Janeiro
69. OLIVEIRA, RS. (Org.). *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. p. 263-272.
70. PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, E. S., BRILEY, S. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1985. V 14, P 149-167.
71. PEREA-RODRIGUEZ, JP, *et. al.* Behavioral and endocrine consequences of placentophagia in male California mice (*Peromyscus californicus*). *Physiol Behav.* 2018 May 1;188:283-290. PMID: 29452152.
72. PERIPATO AC, BRITO RA, VAUGHIN TT, PLETSCHER LS, MATIOLI SR, CHEVERUD JM. Quantitative trait loci for maternal performance for offspring survival in mice. *Genetics* 162: 1341-1362, 2002.
73. PERIPATO, A. C.; CHEVERUD, J. M. Genetic influences on Maternal Care. *The American Naturalist*: v. 160S, p. S173-S185, dez. 2002.
74. PIZUTTO *et.al.* O enriquecimento ambiental como ferramenta para melhorar a reprodução e o bem-estar de animais cativos. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.129-138, jul./set. 2009
75. PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 229(2): 327-336, 1977.
76. PRAAG, V.; KEMPERMANN, H.; GAGE, G.; & Gage, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), p.191–198, 2000.
77. QUEEN, N.J.; Boardman BOARDMAN, A.A.; PATEL, R.S.; SIU, J.J; MO, X.; CAO, L. Environmental enrichment improves metabolic and behavioral health in the BTBR mouse model of autism. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 111, 2020.
78. RAMOS, A., PEREIRA, E., MARTINS, G. C., Wehrmeister, T. D., & Izídio, G. S. (2008). Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behavioural Brain Research*, 193(2), 277–288.
79. RINAUDO P, WANG E. Fetal Programming and Metabolic Syndrome. *Annu Rev Physiol* 74:107-130, 2012.
80. RIVERA, E. A. B. Estresse em Animais de Laboratório. In: ANDRADE, A.; PINTO, SC.;
81. RODGERS, RJ. Animal models of ‘anxiety’: where next? *Behav Pharmacol*, 8, p. 477-496, 1997.

82. ROSA, M. N. Análise de parâmetros emocionais e reprodutivos de murinos machos LG/J e SM/J e suas associações com o cuidado materno. 2018. Monografia - Bacharelado em Ciências Biológicas, Centro Universitário Central Paulista, São Carlos, 2018.
83. ROSA, M. N., MASUKI, N.S.S & PERIPATO, A.C. Teste de preferência entre enriquecimentos ambientais para promoção do bem-estar de fêmeas LG/J. *Bio M Res Tech.* 2022;2:e00072022.
84. ROSENBLATT, JS Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science* 156: 1512–1514.1967.
85. RUSSEL, W; BURCH, R. The principles of humane experimental technique. London, Methuen; 1959. 238p.
86. RUSSO, V. E. A., MARTIENSSSEN, R. A. & RIGGS, A. D. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, 1986.
87. SAMPEDRO-PIQUERO, P; BEGEGA, A. “Environmental Enrichment as a Positive Behavioral Intervention Across the Lifespan.” *Current Neuropharmacology*, vol. 15, no. 4, 2017, pp. 459–470.
88. SCHNEEBERGER, M., GOMIS, R., & CLARET, M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *Journal of Endocrinology*, 220(2), T25–T46, 2013.
89. SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J. Vis. Exp.* (96). 2015
90. SHAW, A.; *et. al.* A proteomic signature for CNS adaptations to the valence of environmental stimulation, *Behavioural Brain Research* (2020).
91. SNOWDON, CHARLES T. O significado da pesquisa em Comportamento Animal. *Pesquisa em comportamento animal Estudos de Psicologia*, 4(2), 365-373, 1999.
92. SOBIN, C.;GOLUB, M. Behavioral Outcome as a Primary Organizing Principle for Mechanistic Data in Developmental Neurotoxicity, *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, ed. 2, p.337-347, 2018.
93. STEVENSON, T.J. Environmental and hormonal regulation of epigenetic enzymes in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2017 May;29(5).
94. STERN, J. M.; JOHNSON, S. K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiology & behavior*, v. 47, n. 5, p. 993-1011, 1990.
95. STUART, K.E.; *et. al.* Mid-life environmental enrichment increases synaptic density in CA1 in a mouse model of A β -associated pathology and positively influences synaptic and cognitive health in healthy ageing. *J Comp Neurol.* 525: p.1797– 1810, 2017.
96. WARNER, MJ; OZANNE, SE Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J* 427, 333-347, 2010.
97. YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 303-314, 28 mar, 2012.
98. YANKELEVITCH-YAHAV, R.; FRANKO, M.; HULY, A.; DORON, R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp.* 2015.
99. YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *Bmc Bioinformatics*, [S.L.], v. 13, n, 1, p. 1-11, 18 jun, 2012.

CAPÍTULO II.

Desenho de *primers* para detectar metilação do gene *Bdnf* por *Methylation-specific PCR*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epigenética e Metilação de genes

O termo “epigenética” foi concebido por Conrad Waddington, o qual demonstrou em 1956 a hereditariedade de uma característica adquirida em resposta a um estímulo ambiental. O estudo da epigenética consiste na análise das mudanças reversíveis e herdáveis no genoma que não alteram mudanças na sequência de DNA (Russo *et. al.*, 1996), assim como o estudo da transmissão desses padrões de expressão, ou seja, os fatores epigenéticos são aqueles que modulam a expressão de genes sem influenciar no genótipo do organismo (Salvato e Labate, 2007).

Os mecanismos que direcionam as alterações epigenéticas podem ser por meio das modificações de histonas, por RNA não codificantes e por meio da metilação de DNA (Watson, 2006). Essa última envolve uma alteração em que ocorre a ligação covalente de um grupamento metil, o qual é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina (5-MeC), que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferase (DNMT) (Oliveira, 2010). A partir do estabelecimento desse estado metilado, o gene estará silenciado e esses “marcadores” epigenéticos no DNA podem ser copiados após a síntese do DNA, resultando em alterações hereditárias (Jones, 2001).

Os fatores que regulam mecanismo de metilação do DNA têm sido associados a diversas doenças (Ramalho-Carvalho, 2017). A metilação do DNA altera o estado funcional das regiões reguladoras, entretanto não afeta no pareamento das bases. Além disso, a marca metil é propagada através da divisão celular. Este potencial de herança em conjunto a plasticidade dos padrões de metilação do DNA durante o desenvolvimento tornam esse mecanismo uma oportunidade para pesquisa de novos e mais eficientes biomarcadores que podem auxiliar na prática clínica (Ramalho-Carvalho, 2017).

De acordo com Salvato e Labate (2007), a metilação ocorre em 70 a 80% nas ilhas CpG, as quais são associadas aos promotores gênicos. A metilação de promotores ricos em CpG é utilizada pelos mamíferos para impedir a transcrição e facilitar o silenciamento de genes no cromossomo X inativo, genes impressos (que apresentam *imprinting*) e DNA

parasitário, pois o alto grau de condensação impede o acesso de maquinaria proteica e assim o silenciamento gênico. Há evidências de que na expressão gênica específica de tecido ou na regulação de promotores deficientes em CpG, a estrutura cromossômica normal pode ser afetada pela metilação e as doenças humanas, incluindo o câncer, são causadas e impactadas por uma metilação anormal (Jones, 2001).

A programação epigenética pode ser alterada em regiões específicas do genoma de acordo com vários fatores, entre eles fatores ambientais. A plasticidade fenotípica apresenta uma base genética sólida e resulta de interações complexas entre genes, desenvolvimento e epigenética. De acordo com Martins (2020), a plasticidade fenotípica como resposta à variação ambiental pode ser favorável (adaptativa), prejudicial ou neutra. Um exemplo de plasticidade adaptativa são respostas imunológicas a parasitas e o comportamento de evitar predadores; já entre os exemplos de plasticidade não-adaptativa estão os fenótipos que não trazem benefícios para os organismos, os quais são decorrentes de problemas de desenvolvimento causados por limitações de recursos.

A partir do conhecimento da alteração fenotípica a partir de estímulos ambientais, pode-se inferir que a exposição a enriquecimentos ambientais pode exercitar modulações em fatores epigenéticos. O cuidado materno, sendo um enriquecimento ambiental social, é um comportamento complexo e alterações ambientais podem direcionar alterações epigenéticas que poderão culminar com variação no comportamento da mãe com seus filhotes, e que poderá ser continuado transgeracionalmente às suas filhas, quando elas se tornarem mães (Champagne *et. al.*, 2006; Jiménez-Chillarón *et. al.*, 2012), por meio de metilação de diversos genes.

Dentre a miríade de genes que estão sujeitas a alterações epigenéticas pela metilação do DNA temos o gene *Bdnf* (*Brain-derived neurotrophic factor*). *Bdnf* desempenha um papel importante no desenvolvimento e na plasticidade do cérebro (Dennis, 2005), além de ter sido relacionado ao desenvolvimento de depressão e mecanismos de ação antidepressiva (Renoir, 2013). Fatores ambientais, tais como o enriquecimento ambiental, mostraram afetar os níveis de tal gene (Zhu *et. al.*, 2009). Além disso, regiões do cérebro, como o hipotálamo, pode responder às condições ambientais alteradas pelo aumento de níveis de *Bdnf*, tanto proteicos como de mRNA (Chourbaji, 2012). Portanto, a alteração da expressão de *Bdnf* neste tecido pode possivelmente ocorrer por metilação do DNA (Chen, 2017).

O gene *Bdnf* possui 9 regiões promotoras distintas com expressão diferencial relatada de acordo com a natureza do estímulo e o tecido de expressão, assim como o bloqueio da expressão de determinado promotor pode ser compensado por outro (Maynard,

2016). Dentre as regiões promotoras, o promotor IV desse gene, apresentou modulação de acordo com exposição do animal ao enriquecimento ambiental. Camundongos sem transcrição de *Bdnf* impulsionada pelo promotor IV mostram comportamentos depressivos sob condições estressantes, sugerindo um envolvimento específico do promotor de *Bdnf* na resposta ao estresse (Pinilla, 2011; Jha, 2016). A sua análise de metilação sugere que ele seja metilado de uma maneira semelhante ao promotor I do mesmo gene (Stenz, 2015). Esses dados sugerem que esse gene/região promotora como potenciais candidatos a estudo de metilação a animais expostos a enriquecimentos ambientais. Como alterações ambientais podem promover efeitos comportamentais importantes em animais e como a expressão de certos genes também pode ser modulada por essas alterações ambientais, é possível que a fase de desenvolvimento do animal também seja um fator importante na resposta a esses fatores. Assim, no presente trabalho, foi utilizado o enriquecimento ambiental em fase precoce, para verificar seus efeitos na emocionalidade de fêmeas, de forma que ao se tornarem mães, essa experiência teria um impacto em seu comportamento materno, assegurando o cuidado necessário para sobrevivência da sua descendência. Além disso, é esperado que esses efeitos possam também ser efeitos de alterações epigenéticas, como a em metilação de genes específicos, associados ao bem-estar animal (Mattern *et. al.*, 2019).

1.2. Técnicas para amplificação de genes

Para que uma região específica do genoma possa ser estudada, é necessário amplificá-la, ou seja, replicá-la milhões de vezes para obter grande quantidade dessa região específica do DNA (Lorenz, 2012). A técnica mais utilizada para este objetivo é a Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Desenvolvida na década de 1980 por Kary Mullis, que recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1994 pela técnica, a PCR provocou uma grande revolução nas pesquisas biológicas. A técnica permite a síntese de fragmentos específicos de DNA por meio da enzima DNA-polimerase, que participa da replicação do material genético celular. Essa enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, pois um pequeno fragmento, denominado *primer*, é ligado a uma das fitas de DNA no sítio específico escolhido para iniciar a síntese. Os *primers* limitam a sequência a ser replicada e o resultado é a amplificação de uma determinada sequência de DNA com bilhões de cópias (Valones, 2009).

Em 1986, David Gelfand, descobre a enzima *Taq* polimerase, isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, encontrada em águas quentes, sendo assim, capaz de resistir as altas

temperaturas necessárias para a PCR, possibilitando o aperfeiçoamento da mesma. Depois de várias adaptações, atualmente, de acordo com Rajalakshmi (2017), os componentes essenciais para a reação são:

1. Termocicladores: Equipamento que aquece e esfria a reação para atingir a temperatura necessária. Alguns possuem tampas de aquecimento para impedir a condensação no topo do tubo.
2. DNA alvo
3. Par de *Primers*: Os iniciadores limitam a sequência de DNA a ser replicada e resulta na amplificação de uma sequência específica de DNA.
4. Enzima *Taq* polimerase
5. Tampão: Consiste em cloreto de magnésio que fornece cátions divalentes de Magnésio exigidos como cofator. É necessário na concentração de 1-5 mM para unir-se aos nucleotídeos a serem reconhecidos pela enzima polimerase. Também atua como co-fator da enzima.
6. dNTP's: São os nucleotídeos livres fornecidos à enzima para formação da nova fita de DNA.

A PCR ocorre em ciclos com três etapas principais: desnaturação (separação das fitas), hibridização (dos *primers* à sequência alvo) e extensão (síntese das novas fitas). A amplificação pela PCR depende da presença e eficiência de *primers* – pequenos fragmentos de DNA (também chamados oligonucleotídeos) que delimitam a região-alvo de amplificação e são complementares à fita de DNA que servirá de molde. A polimerização da nova fita ocorre em função da ação nucleofílica da hidroxila da pentose (3'-OH) fornecida pelo *primer* sobre o fosfato α ligado ao carbono 5' da pentose (5'-PO₄) do nucleotídeo que será incorporado. A grande efetividade da PCR culminou na criação de diversas variações específicas além da técnica convencional, entre elas a RT-PCR (*Reverse transcription PCR*); *Multiplex PCR*; *Nested PCR* e a *MSP (Methylation-specific PCR)* (Pereira, 2018).

A eficiência da PCR pode ser influenciada por diversos fatores, entretanto, o desenho dos *primers* é considerado um fator crítico. Alguns dos fatores de grande importância são a especificidade, eficiência, temperatura de *melting*, e porcentagem de G/C (Hung, 2016). A especificidade dos *primers* é essencial para a ligação ao DNA alvo, então, devem ser longos o suficiente para que sejam específicos, e além disso, deve-se atentar para que não ocorra a formação de estruturas de autocomplementariedade entre os próprios *primers*. Quanto à eficiência, quanto mais curtos os *primers*, mais eficientes. Pares com *primers* de 16 a 28

nucleotídeos (nt), sem que a diferença de comprimento entre um e outro seja maior que 3 nt, são considerados ideais, pois os mais curtos que isto podem perder a especificidade. A temperatura de *melting* é definida como a temperatura em que 50% dos pares de bases de uma molécula de DNA dupla fita estão desnaturados em fita simples, os pares de *primers* devem possuir temperaturas próximas para a determinação das condições de reação. A porcentagem G/C indicam a proporção das bases nitrogenadas guanina e citosina, a proporção entre elas deve ser entre 40% e 60% (YE, 2012).

1.2.1 Methylation- Specific PCR (MSP)

O MSP é uma variação da PCR convencional utilizada para a detecção da hipermetilação de promotores nas ilhas CpG. A capacidade do MSP de diferenciar citosina metilada de não metilada depende do tratamento com bissulfato de sódio do DNA, que retém as marcas de metilação das citosinas, acompanhado da amplificação específica desse DNA modificado usando *primers* complementares apenas aos alelos anteriormente metilados ou não metilados (Licchesi, 2009). Essa técnica pode detectar rapidamente o estado de metilação de ilhas CpG, não requerendo enzimas de restrição sensíveis à metilação. Outras vantagens são o requerimento de quantidades mínimas de DNA, pois funciona com a amplificação do material e a alta sensibilidade da técnica, pois pode detectar <0,1% de alelos metilados em um locus específico e pode ser usado em diferentes tipos de amostras (Ramalho-Carvalho, 2017).

Para realizar o ensaio de MSP, a amostra de DNA é purificada e modificada pelo uso de bissulfato de sódio, em um processo de sulfonação que converte todos os resíduos de citosina não metilada em uracila. A citosina metilada, na qual um grupo metil está ligado ao carbono 5, não pode ser convertida, pois a reação de sulfonação não pode ocorrer (Ku, 2011). Para a técnica, são necessários dois pares de *primers*. Um par é específico para DNA metilado (M) e o outro é específico para DNA não metilado (NM). Para discriminação de DNA metilado e não metilado as reações de amplificação são realizadas usando cada par de *primers*. A amplificação bem-sucedida do par de *primers* M é indicativa de DNA metilado e o produto de PCR pelo par de *primers* NM é reflexo de DNA não metilado (Ku, 2011), a reação pode ser observada na Figura 1.

A utilização de MSP no estudo de metilação de genes tem potencial de ser um procedimento rápido, prático e eficaz, uma vez que se tenha genes potenciais para verificar a modificação epigenética, de acordo com estudos específico. No presente trabalho, ao verificar comportamentos diferenciados entre fêmeas expostas ou não ao enriquecimento ambiental, a

utilização de MSP em amostras de tecidos hipotalâmicos pode trazer informações importantes acerca de alterações epigenéticas, de forma que possamos buscar associações entre alterações comportamentais e na metilação de genes candidatos.

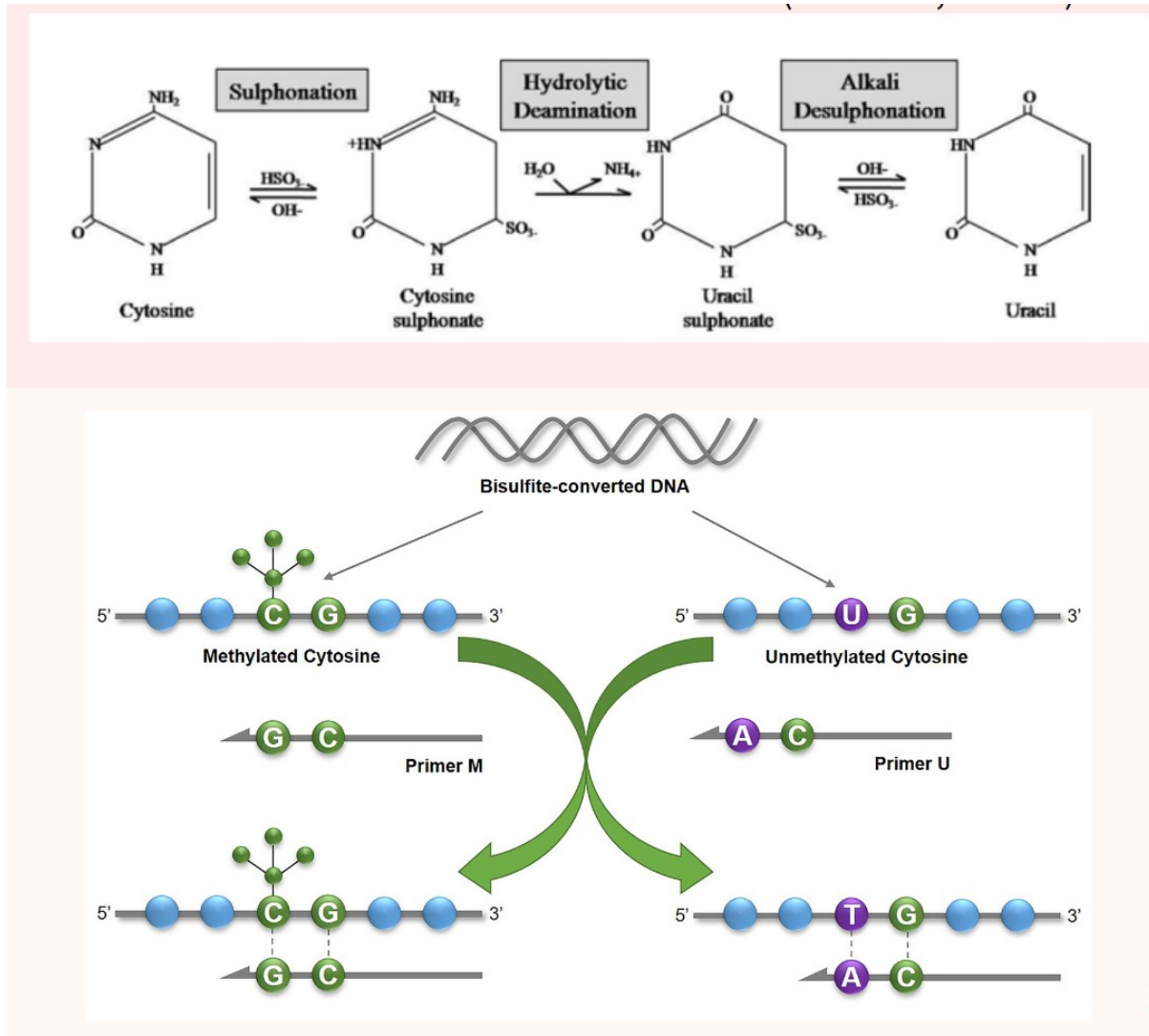


Figura 1. Técnica MSP. Modificação por bissulfito de sódio. Fonte: Herman, 2996 - modificado

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral o desenho de *primers* para gene candidato a marcador epigenético associado a alterações comportamentais devido a exposição de camundongos fêmeas ao enriquecimento ambiental na fase púbere.

2.1 Objetivo específico

O objetivo específico do presente estudo consistiu no desenho de *primers* da região promotora IV do gene *Bdnf*.

3. MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 Desenho de *primers* para metilação do gene *Bdnf*

Para o desenho de *primers* de MSP, as ilhas CpG devem ser previstas com a sequência do promotor do gene alvo. A ilha CpG é uma sequência de pelo menos 200 pb de comprimento no promotor, que possui um conteúdo de CG superior a 50% e uma relação CpG/CpG esperada superior a 0,6. Para obtenção da sequência do promotor do gene *Bdnf* a ser analisada (ou seja, geralmente 1.000–2.000 pb de sequência genômica a montante do local de início da transcrição) foi utilizada a plataforma *UCSC Genome* (<http://www.genome.ucsc.edu>). Foi incluído no mínimo 200 pb de sequência após o local de início da transcrição, pois as ilhas CpG geralmente continuam além do local de início da transcrição. O design de *primers* foi realizado utilizando a ferramenta *MethPrimer* (<https://www.urogene.org/methprimer/>).

3.2. Testagem dos *primers* e genotipagem das fêmeas expostas ou não ao enriquecimento ambiental

A padronização dos *primers* e investigação de metilação do gene *Bdnf* iria ser realizada de maneira efetiva, mas frente ao enfrentamento da pandemia de Covid-19, essa etapa não pode ser realizada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas 11 regiões de início de transcrição (TSS-*Transcription Start Site*) para o gene *Bdnf*. Foram selecionadas 6 sequências dentre elas, a partir da predição de ilhas CpG. Os resultados podem ser visualizados na Figura 2.

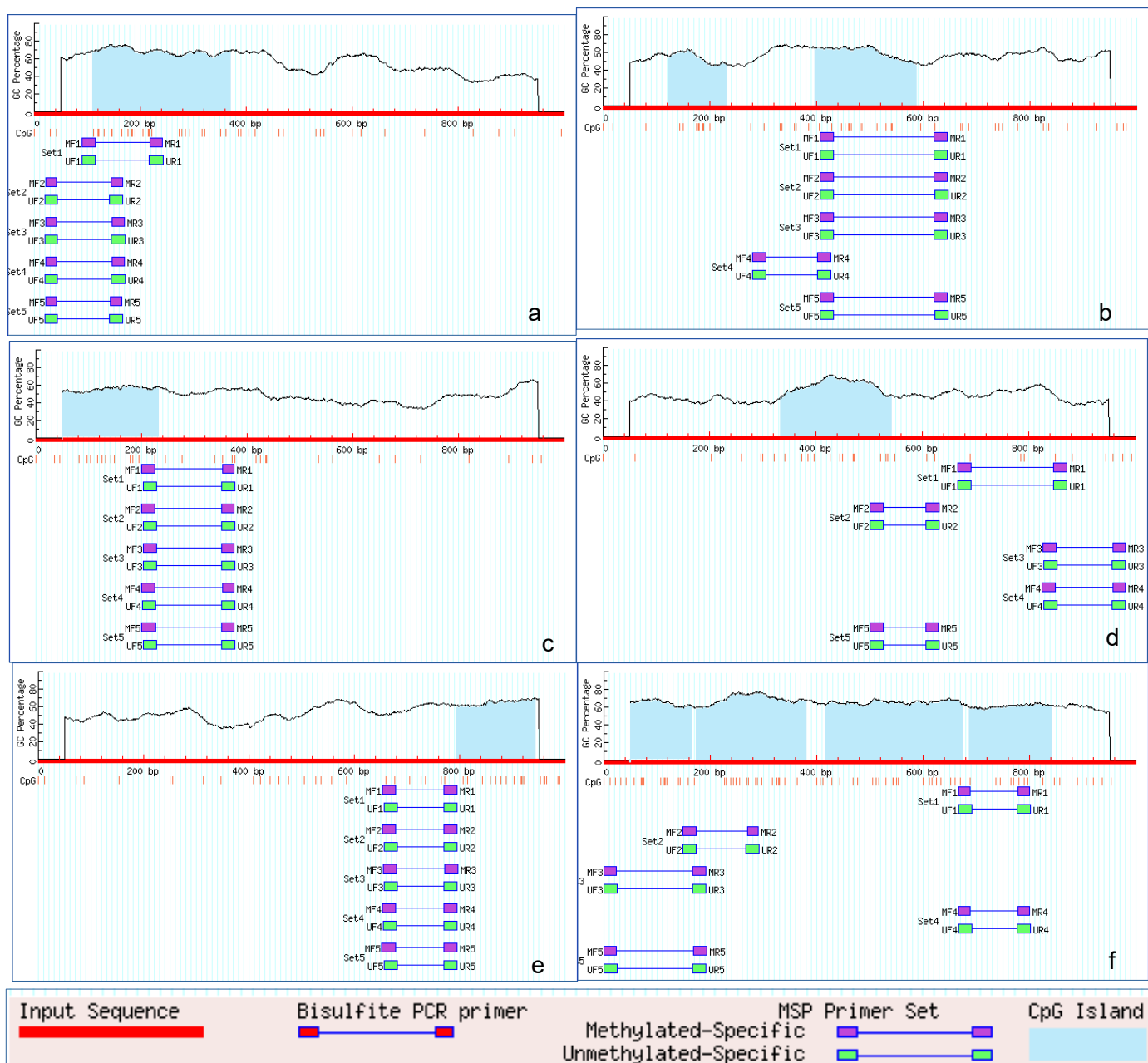


Figura 2. Predição da localização dos *primers* desenhados a partir das seqüências de promotores e identificação de ilhas CpG (Fonte: <https://www.urogene.org/methprimer/>)

Foram encontrados 5 pares de *primers* para cada uma das 6 regiões promotoras escolhidas. Entretanto, foram descartados aqueles que não atendiam as condições ideais de

PCR em relação à porcentagem de G/C e Temperatura de *melting*. Os pares de *primers* que atendiam os requisitos foram selecionados e podem ser observados na Tabela 1. 7

Tabela 1. Sequências de *primers* desenhados e suas respectivas Temperaturas de *melting* e porcentagem G/C

Região Promotora	Pares de <i>Primers</i> (5'→3')	Tm°	GC%
A	Par 1 M: TATTAGGTTATTTAGGTAGTGGCGG AAAAAACACTCCTAACTCCGTACG	59.02 59.99	68.00 58.33
	Par 1 NM: TATTAGGTTATTTAGGTAGTGGTGG AAAAAAAACACTCCTAACTCCATACAA	55.12 59.80	68.00 59.26
	Par 2 M: GGAAGTATTTAAAATAGGGTAGCGA TATACAAACCAAACCTCTCAAACGAC	58.39 58.73	56.00 60.00
	Par 2 NM: GGAAGTATTTAAAATAGGGTAGTGA GGAAGTATTTAAAATAGGGTAGTGA	54.47 56.67	56.00 60.00
B	Par 3 M: GGAAGTATTTAAAATAGGGTAGCG TATACAAACCAAACCTCTCAAACGAC	59.73 58.73	60.00 60.00
	Par 3 NM: GGAAGTATTTAAAATAGGGTAGTGA TATACAAACCAAACCTCTCAAACAAC	54.47 56.67	56.00 60.00
	Par 4 M: GTAAGAGTTTAGAATTTTGGGGATC CACCAAATTACTACTTCTAACCGAA	57.86 58.01	52.00 56.00
	Par 4 NM: TAAGAGTTTAGAATTTTGGGGATTG CACCAAATTACTACTTCTAACCAAA	59.05 56.02	52.00 56.00
D	Par 5 M: AGGTTTGTTATTGTTTAGGTTTTTC ACATCGACTTAACCAAATTTACG	56.37 58.62	52.00 50.00
	Par 5 NM: GTTTGTTATTGTTTAGGTTTTTTGG CATCAACTTAACCAAATTTACACC	57.44 58.09	56.00 56.00
	Par 6 M: GAGGTTTGTTATTGTTTAGGTTTTTC ACATCGACTTAACCAAATTTACG	57.91 58.62	53.85 50.00
	Par 6 NM: GTTTGTTATTGTTTAGGTTTTTTGG CATCAACTTAACCAAATTTACACC	57.44 58.09	56.00 56.00

A padronização dos *primers* com posterior genotipagem das fêmeas para detectar diferença de metilação no gene *Bdnf*, nas fêmeas que foram exposta ou não ao enriquecimento ambiental na fase púbere, deverá ser investigada pelo grupo de pesquisa (Laboratório de Genética do Comportamento – Departamento de Genética e Evolução da UFSCar).

5. CONCLUSÕES

Os *primers* desenhados para a região promotora IV do gene *Bdnf* estão dentro do padrão esperado para amplificação de DNA convertido por bissulfito e detecção de regiões metiladas ou não, pelo MSP. A próxima etapa será a padronização dos mesmos e a testagem dos animais. Se verificada a alteração epigenética associada a exposição ao enriquecimento ambiental, poderemos utilizar esse gene como um marcador epigenético para bem-estar animal, principalmente associado ao cuidado materno de camundongos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. CHAMPAGNE, FA, et. al. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology*. 2006 Jun;147(6):2909-15 PMID: 16513834.
2. CHEN, K.W.; CHEN, L. Epigenetic Regulation of BDNF Gene during Development and Diseases. *Int J Mol Sci.*; 18(3):571, 2017.
3. CHOURBAJI, H.; HORTNAGL, R.; MOLTENI, M.A.; RIVA, P. GASS, HELLWEG, R. The impact of environmental enrichment on sex-specific neurochemical circuitries Effects on brain-derived neurotrophic factor and the serotonergic system, *Neuroscience*, vol.220, p. 267-276, 2012.
4. DENNIS, K.E.; LEVITT, P., Regional expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) is correlated with dynamic patterns of promoter methylation in the developing mouse forebrain, *Molecular Brain Research*. vol.140, Issues 1–2, p.1-9, 2005.
5. HUNG, J.; WENG, Z. Designing Polymerase Chain Reaction Primers Using Primer3Plus, *Cold Spring Harbor Protocols*, [S.L.], 2016, n, 9, p. 821-826, 29 ago, 2016
6. JHA, S.; et al. Antidepressive and BDNF effects of enriched environment treatment across ages in mice lacking BDNF expression through promoter IV. *Transl Psychiatry* 6, e896 (2016).
7. JIMENEZ-CHILLARON, JC. et. al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie*. 2012 Nov;94(11):2242-63. PMID: 22771843.
8. JONES, P. A. The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*, 293(5532), 1068–1070, 2001.
9. KU, J.-L.; JEON, Y.-K., & PARK, J.-G. (2011). *Methylation-Specific PCR*. *Epigenetics Protocols*, 23–32.
10. LICCHESI, J. D. F., & HERMAN, J. G. (2009). Methylation-Specific PCR. *DNA Methylation*, 305–323.
11. LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies, *Journal Of Visualized Experiments*, [S.L.], n, 63, p. 1-14, 22 maio 2012.
12. MATTERN, F, et al. “Prenatal and Postnatal Experiences Associated with Epigenetic Changes in the Adult Mouse Brain.” *Behavioural Brain Research*, vol. 359, 2019, pp. 143–148.
13. MAYNARD, K., et al. Functional Role of BDNF Production from Unique Promoters in Aggression and Serotonin Signaling. *Neuropsychopharmacol* 41, p.1943–1955, 2016.
14. MethPrimer: Li LC and Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002 Nov;18(11):1427-31. PMID: 12424112
15. PEIRSON, SN, et. al. Fisk AS. Light and the laboratory mouse. *J Neurosci Methods*. 2018 Apr 15;300:26-36. PMID: 28414048; PMCID: PMC5909038.

16. PEREIRA, C T, *et al.* Introdução às Técnicas de PCR Convencional em Tempo Real e Digital. 1a ed. SBG, 2018.
17. PINILLA, FG.; ZHUANG, Y.; FENG, J.; YING, Z.; FAN, G. Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. *European Journal of Neuroscience*, vol. 33 p.383-390, 2011.
18. MARTINS, R. P; MASSARA, R. L. A ECOLOGIA EVOLUTIVA DA PLASTICIDADE FENOTÍPICA EM TÁXONS DE ORGANISMOS: UMA BREVE REVISÃO. *Rev. Helius Sobral* v. 3 n. 2 fasc. 3 pp. 1333-1373 jul./dez. 2020
19. RAKALAKSHMI, S. (2017) Different Types of PCR Techniques and Its Applications. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 7, 285-292.
20. RAMALHO-CARVALHO, J., HENRIQUE, R., & JERONIMO, C. (2017). *Methylation-Specific PCR. DNA Methylation Protocols*, 447–472.
21. RENOIR, T.; PANG, T.Y.; MO, C.; CHAN, G.; CHEVARIN, C.; LANFUMEY, L. Differential effects of early environmental enrichment on emotionality related behaviours in Huntington's disease transgenic mice. *The Journal of Physiology*, 591, p.41-55, 2013.
22. SALVATO F., LABATE C. A. Seminários em genética e melhoramento de plantas Epigenética. Programa de pós-graduação em genética e melhoramento de plantas, LGN 5799. Piracicaba - SP. 2007.
23. SHUN-WEI, Z.; *et. al.* Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice, *Behavioural Brain Research*, vol. 197, Issue 2.2009.
24. STENZ, L.; *et. al.* BDNF promoter I methylation correlates between post-mortem human peripheral and brain tissues, *Neuroscience Research*, vol.91, p. 1-7, 2015.
25. VALONES, M.A.A. *et al.* PRINCIPLES AND APPLICATIONS OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN MEDICAL DIAGNOSTIC FIELDS: A REVIEW. *Brazilian Journal of Microbiology* (2009) 40:1-11
26. WATSON, J. D. *et al.* *Biologia Molecular do Gene*, 5a ed. Artmed, 2006.
27. YE, J., *et al* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *Bmc Bioinformatics*, [S.L.], v. 13, n, 1, p. 1-11, 18 jun, 2012
28. ZHU, S.W., CODITA, A., BOGDANOVIC, N., HJERLING-LEFFLER, J., ERNFORS, P., WINBLAD, B., DICKINS, D.W., MOHAMMED, A.H. Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice, *Behavioural Brain Research*, vol. 197, Issue 2.2009

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No capítulo 1, intitulado “**Como o enriquecimento ambiental na puberdade pode impactar a emocionalidade e cuidado materno de fêmeas murinas LG/J?**” verificou-se que o Enriquecimento Ambiental com o rolo de papelão trouxe algumas contribuições para o bem-estar animal, verificadas na melhoria de aspectos no cuidado materno, mas não diretamente associadas com a emocionalidade das fêmeas. Investigações posteriores poderão verificar a associação entre as modificações comportamentais com alterações epigenéticas, no hipotálamo das fêmeas expostas ou não ao Enriquecimento Ambiental. Para isso, foram desenhados *primers* do gene candidato *Bdnf*, para serem padronizados e testados nessas fêmeas (Capítulo II - “**Desenho de *primers* para detectar metilação do gene *Bdnf* por *Methylation-specific PCR***”). A busca pela melhoria de bem-estar em animais cativos é algo que vem sendo almejado dentro da ciência de animais de laboratório, e esse trabalho traz contribuições importantíssimas para a área.

8. APÊNDICE A

Rosa, NM ; MASUKI, N. S. S. ; PERIPATO, A. C. . Teste de preferência entre enriquecimentos ambientais para promoção do bem-estar de fêmeas LG/J. *Biological Models Research and Technology*, v. 2, p. e00072022, 2022.

<https://doi.org/10.4322/2675-9225.00072022>

ARTIGO DE PESQUISA CIENTÍFICO

Teste de preferência entre enriquecimentos ambientais para promoção do bem-estar de fêmeas LG/J

Environmental enrichment preferences for female LG/j mice

Natalia Marques Rosa¹, Nathália Sayuri Servulo Masuki², Andréa Cristina Peripato^{3*}

¹ Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.

² Graduação em Biotecnologia, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.

³ Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

Como citar: Rosa NM, Masuki NSS, Peripato AC. Teste de preferência entre enriquecimentos ambientais para promoção do bem-estar de fêmeas LG/J. *Bio M Res Tech.* 2022;2:e00072022. <https://doi.org/10.4322/2675-9225.00072022>

Resumo

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

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

Abstract

Animal experimentation allows advanced studies in basic and applied research in the most different areas. The use of animals is still necessary to obtain unknown biological responses, especially using animal model such as mice. However, for the research to be carried out satisfactorily, it is necessary to follow ethical procedures, principally by using the humanitarian principle (Reduce, Refine and Replace) and looking for animal welfare. This paper investigated, by using preference test, the environmental enrichment selected by female LG/J mice. Thus, females (n=18) in different stages of development (Pubescent, Virgins Adults, and Adults) were exposed

*Autor correspondente: peripato@ufscar.br

Conflito de interesse: Não há.

Recebido: Abril 29, 2022. **Aceito:** Agosto 16, 2022.



Este é um artigo publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Attribution, que permite uso, distribuição e reprodução em qualquer meio, sem restrições desde que o trabalho original seja corretamente citado.

to two different types of environmental enrichment: 1. Nesting-kind (paper towel and cotton); 2. Shelter/Protection-kind (cardboard roll and PVC roll). In the first contrast, the preference for females, of all phases, was for the cotton. In the second contrast, there was a consensus among the females of all stages for choosing the cardboard roll. In the final contrast, the preference of females for the enrichment chosen in the previous batteries, cotton, and cardboard rolls, was tested. The environmental enrichment chosen by most Pubescent, Virgin Adults, and Adults females, was the cardboard roll. This enrichment seems appropriate, as it may allow shelter/protection, especially for pubescent females, but it may also be used, when ripped, as nesting material, important source for thermoregulation and maternity. In addition, it is not only versatile, and easy to adapt for use in animal facilities, but also is low-cost and can provide the well-being of laboratory animals.

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

INTRODUÇÃO

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

Um questionamento importante, no que tange a utilização de animais em pesquisa, seria suas barreiras éticas, ao utilizar animais sencientes. Apesar de diversas posições referentes ao termo, desde atribuições a capacidade de sentir dor, baseada na analogia com a estruturas humanas³, à capacidade do organismo em perceber e responder aos estímulos externos, possuindo algum grau de consciência⁴, essa inquietação ética delineou novas posturas na condução de experimentação animal. Vale ressaltar que, ao utilizar a vivisseção (“cortar vivo”) de um animal com finalidade de observar fenômenos fisiológicos ou anatômicos, surgiram movimentos de oposição a atividades envolvendo experimentação animal⁵. Um grande marco na reflexão sobre utilização de animais na pesquisa, foi o estabelecimento do princípio dos 3Rs: *Reduce* (Redução), *Refine* (Refinamento) e *Replace* (Substituição)⁶, em que sugere a redução do número de animais por experimento, o refinamento de técnicas e procedimentos e a substituição dos animais por modelos de experimentação não sensíveis⁷. No Brasil, em 1979 foi implementada a Lei da Vivisseção (Lei 6.638/79) que autorizava a vivisseção apenas com o uso de anestesia e em centros de pesquisa com supervisão especializada⁵. Revogando essa lei, foi elaborado um novo conjunto de regras para criação e utilização de vertebrados em atividades de ensino e pesquisa em 1995, sancionado em 2008, na Lei 1.153/2008, conhecido como “Lei Arouca”, em referência a seu proponente, o sanitarista e deputado Sérgio Arouca. Sob a vigência dessa lei, foram institucionalizadas Comitês de Ética no Uso de Animais (CEUAs) em cada centro de pesquisa, assim como o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), o órgão responsável por assuntos referentes ao uso e experimentação com animais na pesquisa científica⁸.

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

Adequando-se ao bem-estar, a oferta de enriquecimentos que possam ser utilizados não somente como desafios para desestressar os animais de laboratório, mas que os possibilite explorá-los para seu conforto ou enfrentamento de situações de risco, podemos categorizar dois tipos de Enriquecimento Ambiental: relacionados a nidificação e a abrigo/proteção. No primeiro caso, a construção de ninho é um comportamento de termorregulação usual em roedores adultos¹⁴, mesmo sendo típico na fase materna¹⁵ e, materiais para sua construção permitem edificar construções elaboradas que trarão melhor conforto ao animal^{16,17}. Para abrigo/proteção, enriquecimentos que possam contribuir nesse sentido podem auxiliar na divisão de recintos, comportamento comum em roedores, em que tendem a designar diferentes áreas em seu ambiente, como por exemplo espaço para alimentação e excreção¹⁸. Portanto, uma das estratégias para designar o melhor enriquecimento ambiental atribuído a uma linhagem/espécie animal, seria a apresentação de diferentes enriquecimentos em um teste de preferência¹⁹. Essa exposição pode permitir identificar objetos de EA que realmente funcionarão como estímulos para o bem-estar e que não serão possíveis fatores de estresse. Assim, o presente trabalho investigou, por meio de teste de preferência, o enriquecimento ambiental selecionado por fêmeas de camundongos da linhagem LG/J, para definir o melhor enriquecimento a ser utilizado em nosso grupo de pesquisa em experimentos subsequentes. O estudo verificou a preferência das fêmeas, em diferentes fases da vida (puberdade, adultas virgens e adultas com experiência sexual/materna), quanto a dois diferentes tipos de enriquecimentos ambientais: nidificação e abrigo/proteção.

MODELO BIOLÓGICO

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

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição de conduta com os animais

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

Critérios de amostragem e formação de grupos

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

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

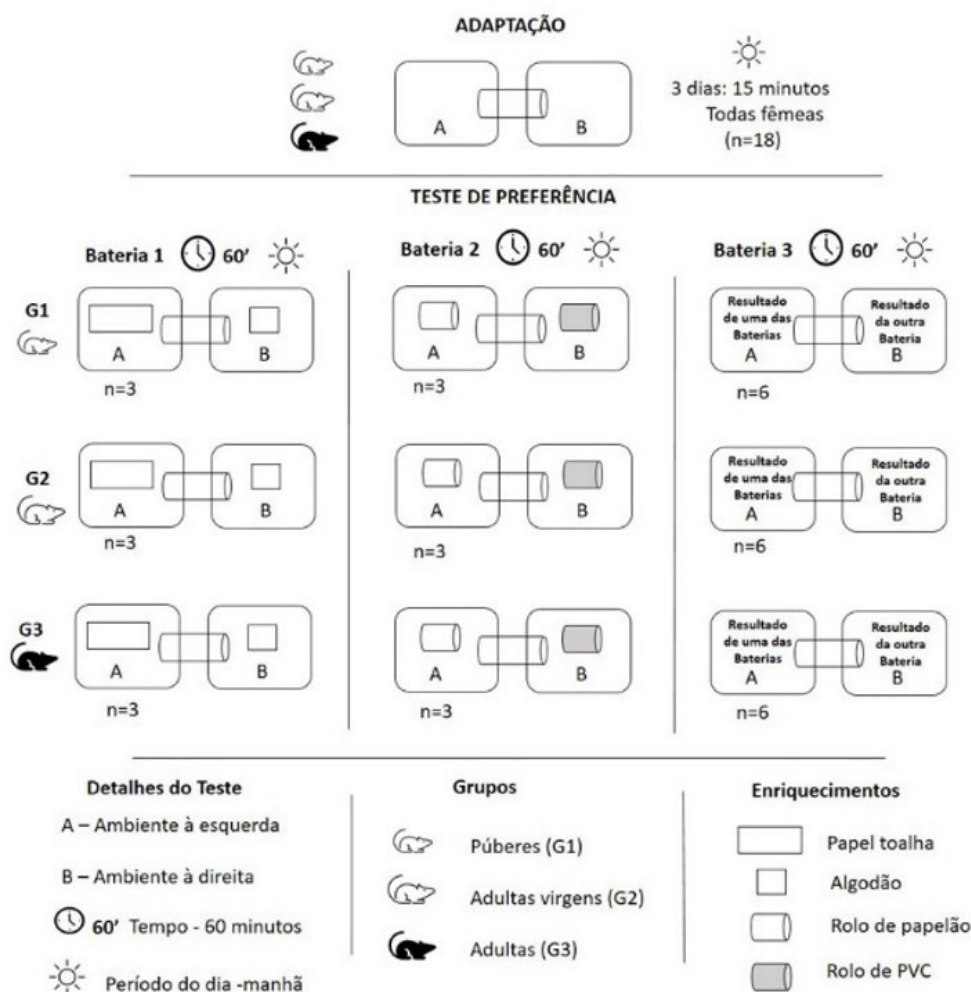


Figura 1. Delineamento experimental do teste de preferência para enriquecimento ambiental.

Teste de preferência pelo enriquecimento ambiental

A avaliação da preferência dos animais aos enriquecimentos ambientais fez-se com a utilização do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI), baseado em Oliveira et al.²¹. O equipamento foi construído artesanalmente, e consistiu em duas gaiolas/ambientes (30cm (comprimento)x19cm (largura), Alesco, Atibaia/SP) interligados por um tubo de PVC (4 polegadas) que permitia a passagem livre do animal entre os dois ambientes. O equipamento foi higienizado com solução à base de Cloreto de Benzalcônio (HerbalVet, Ourofino) e etanol 70% e a base das gaiolas foi coberta por maravalha autoclavada (*pinus* – JR Maravalha, Paulínia/SP), higienizada e substituída a cada uso.

A adaptação ao equipamento e os testes foram realizados na área de experimentação do biotério, no período da manhã (das 07:00h às 11:00). Previamente, os animais foram apresentados ao equipamento sem os objetos de enriquecimento, somente com maravalha, por três dias consecutivos, durante 15 minutos, para adaptação. Os animais sempre foram colocados no ambiente à esquerda

(ambiente A), para início da adaptação. No dia do teste definitivo, o animal foi apresentado ao equipamento, nas mesmas condições que no período da adaptação, porém, com os enriquecimentos posicionados em cada ambiente, e a conduta da fêmea foi filmada por 60 minutos. Ao final, os animais foram devolvidos às respectivas gaiolas.

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

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



Figura 2. Disposição da bateria de testes. (A) Enriquecimento Ambiental do tipo nidificação. Em todos os testes da bateria o papel toalha estava disposto no ambiente à esquerda e o algodão à direita; (B) Enriquecimento Ambiental do tipo abrigo/proteção. Em todos os testes da bateria o rolo de papelão estava disposto no ambiente à esquerda e o rolo de PVC à direita; (C) Enriquecimento Ambiental do tipo abrigo/proteção preferido pela maioria das fêmeas da Bateria 2 (rolo de papelão) disposto no ambiente à esquerda e o EA do tipo nidificação preferido pela maioria das fêmeas da Bateria 1 (algodão) à direita. Os enriquecimentos foram mantidos no ambiente que estavam nas baterias prévias.

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

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

ANÁLISE DOS DADOS

As gravações do teste de preferência foram analisadas por meio do Programa de Registro Comportamental *X-Plo-Rat*²². As preferências pelo ambiente e pelo enriquecimento ambiental foram calculadas baseadas em Zinck e Lima²³. Resumidamente:

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

$$\text{Preferência Ambiente} = \frac{\text{Frequência ambiente A ou B}}{\text{Soma da Frequência nos ambientes A e B}} \quad (1)$$

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

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

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

$$\text{Preferência EA} = \frac{\text{Tempo ou Frequência interação EA / ambiente A ou EA / ambiente B}}{\text{Soma Tempo ou Frequência de interação de ambos os objetos}} \quad (2)$$

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

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

RESULTADOS

Teste de preferência pelo enriquecimento ambiental

Adaptação ao equipamento

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

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

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

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

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

Preferências pelo enriquecimento ambiental

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

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

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

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

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

Como pode ser observado na Figura 3, pelo menos duas em cada três das fêmeas de cada grupo apresentaram interação maior ou igual a 60% em tempo (duração) e número de vezes (frequência) com o algodão, enriquecimento de nidificação.

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

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

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

No contraste final entre os enriquecimentos escolhidos, rolo de papelão e algodão, verificamos a preferências das fêmeas, em todas as fases, para um único enriquecimento, conforme pode ser verificado na Tabela 3 e Figura 5.

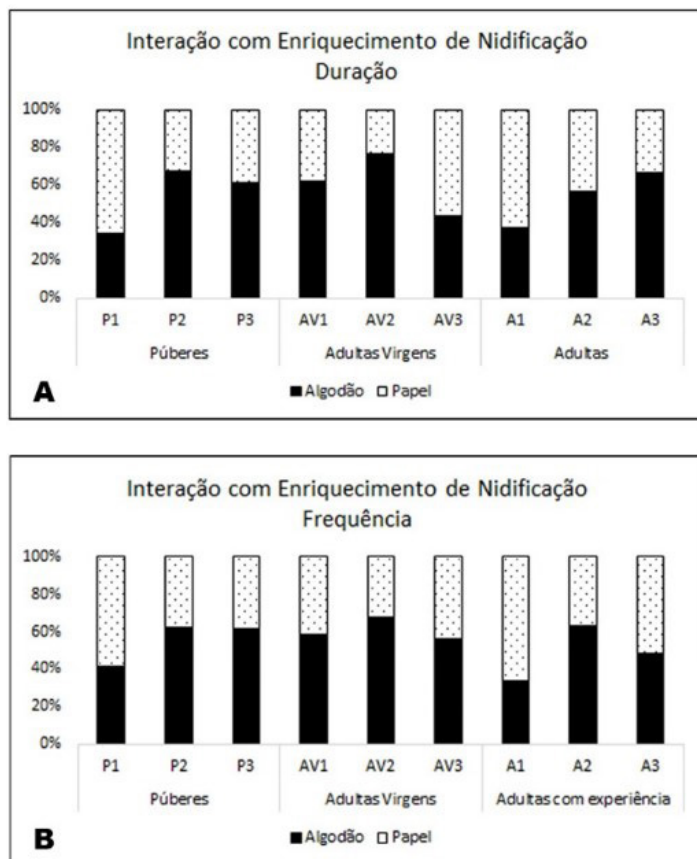


Figura 3. Interação das fêmeas das diferentes fases com os enriquecimentos relativos à nidificação: algodão e papel. Em (A) observamos os resultados relativos à duração de cada fêmea com os respectivos enriquecimentos; em (B) observamos a frequência relativa de cada fêmea com os enriquecimentos. P significa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

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

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

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

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

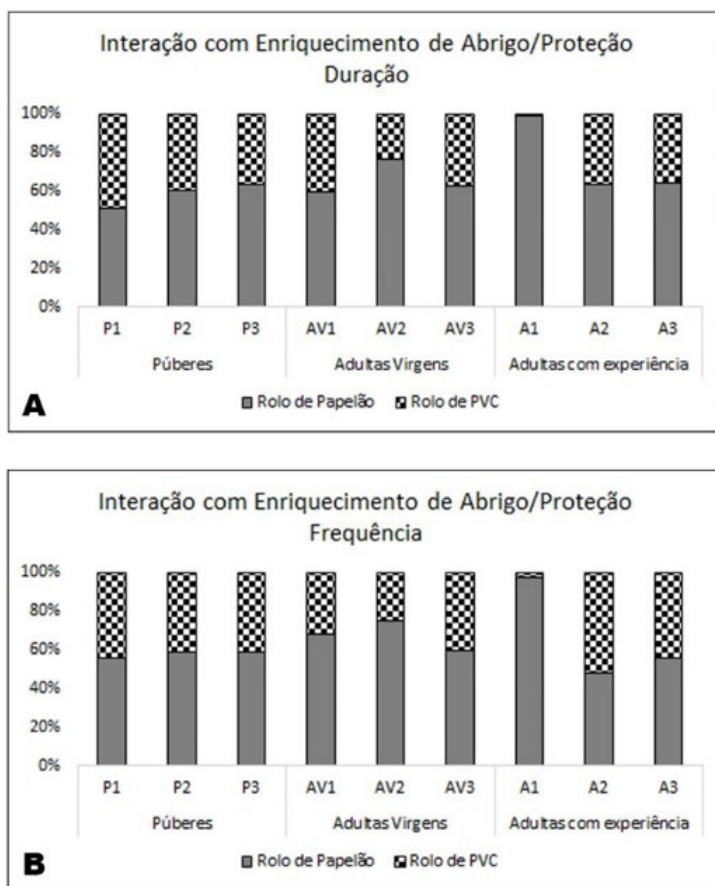


Figura 4. Interação das fêmeas das diferentes fases com os enriquecimentos relativos à abrigo/proteção: Rolo de papelão e Rolo de PVC. Em (A) observamos os resultados relativos à duração de cada fêmea com os respectivos enriquecimentos; em (B) observamos a frequência relativa de cada fêmea com os enriquecimentos.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

DISCUSSÃO

A experimentação animal requer critérios rígidos para que possa ser conduzida e mesmo replicada por diferentes grupos de pesquisa. Ambientes novos tendem a gerar alterações emocionais em animais, e para que os resultados possam ser confiáveis, todos os elementos que não são esperados precisam ser controlados. A habituação indica que a experiência passiva e recorrente de novos estímulos promove um processo psicológico de redução da resposta a esses estímulos²⁴, sendo essencial em avaliações cognitivas²⁵. No presente trabalho, as fêmeas foram expostas ao Sistema de Gaiolas Interligadas para adaptação ao equipamento. A redução de respostas à novidade do ambiente por aclimatação de no mínimo três dias já é suficiente para que os animais retornem as suas condições fisiológicas²⁶. Aqui, nas baterias de testes de preferência 1, 2 e 3, verificamos que as visitas entre os dois ambientes foram equivalentes, sugerindo que as fêmeas estavam adaptadas, e que somente a interação com os enriquecimentos seria o elemento destoante para avaliar a preferência.

A exposição aos diferentes enriquecimentos em ambientes já conhecidos permitiu avaliar a preferência das fêmeas por vários materiais. O EA tipo nidificação permitem aos camundongos construir seus ninhos como se estivessem em seu ambiente natural. Os materiais, algodão e papel toalha, escolhidos para avaliar a preferência dos animais na Bateria 1, além de serem baratos e de fácil manipulação e troca durante a higienização das caixas, são absorventes, podem ser autoclavados e não oferecem risco aos neonatos. A oferta de material para construção de ninho é algo desejável em camundongos pois permite a criação de microambientes, nos quais podem construir e manipular seus ninhos para aconchegar-se, controlar sua temperatura corporal, umidade e condições de luminosidade^{16,17}. Ambos

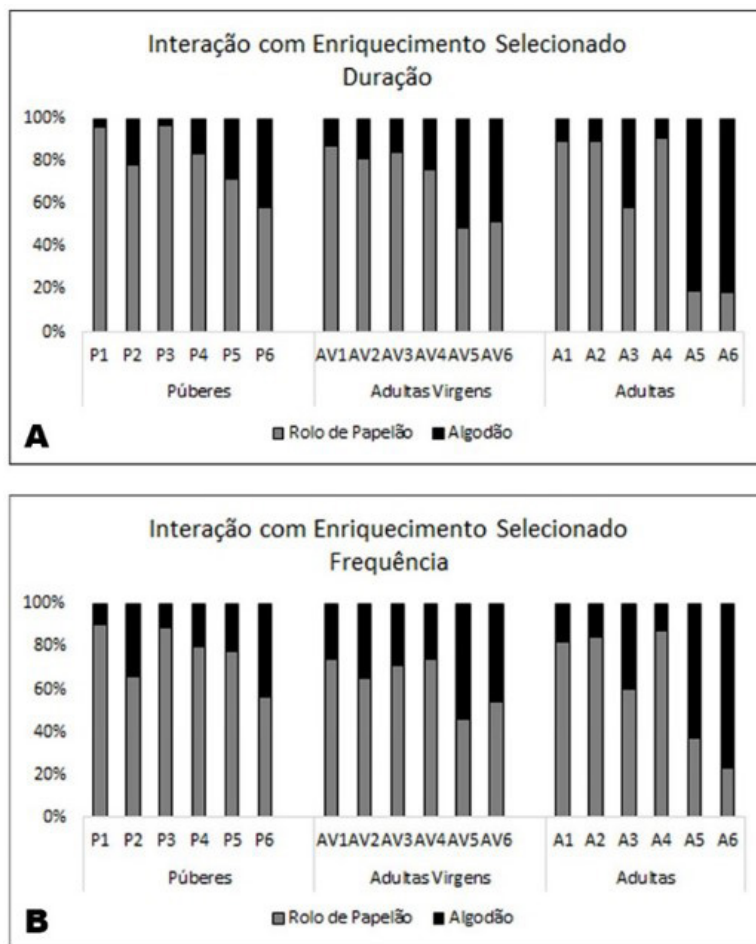


Figura 5. Interação das fêmeas das diferentes fases com os enriquecimentos selecionados nas Baterias 1 e 2: Rolo de papelão e Algodão. Em (A) observamos os resultados relativos à duração de cada fêmea com os respectivos enriquecimentos; em (B) observamos a frequência relativa de cada fêmea com os enriquecimentos.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

os materiais oferecidos permitiam que fossem desfiados/rasgados e usados para a criação de ninhos e, dessa forma, que os animais estruturassem seus microambientes. No contraste entre o algodão e o papel toalha, a grande vantagem do algodão (material de nidificação preferido pelas fêmeas em todas as fases) frente ao papel, parece ser a capacidade de moldar o ninho da forma desejada. Isto porque, a natureza do material de nidificação oferecido não é tão importante quanto a sua estrutura, que determina a *nestability*, ou seja, a capacidade de encaixe e manipulação do material²⁷.

Os tubos de papelão e PVC fazem jus a sua categoria, proporcionando sua utilização como abrigo e permitindo proteção, principalmente, às condições de luminosidade do ambiente. A oferta de enriquecimentos como tubos pré-fabricados podem não melhorar o bem-estar animal se eles não forem motivados a realizar atividades espécies-específicas²⁸, principalmente a construção de ninhos, não sendo o caso deste trabalho, pois havia a presença de maravalha, material também usado para o preparo do ninho. Contudo, os tubos poderiam servir para outros fins como por exemplo, refúgio ou separar o microambiente destinado à excreção¹⁸. Mesmo assim, o EA preferido pelos animais foi o rolo de papelão. É possível que a vantagem do rolo de papelão sobre o de PVC tenha sido devido à sua *nestability*²⁷, pois poderia ser rasgado e utilizado também para moldar seus ninhos. O rolo de papelão também possui a vantagem de, como no caso do algodão e papel toalha, serem de fácil manipulação e troca durante a higienização das caixas. Embora ambos os objetos oferecem a possibilidade de exploração como escalar e passar através, é possível que a versatilidade do rolo de papelão, como um material que também pode ser manipulado, tenha influenciado na escolha das fêmeas.

As vantagens relativas ao rolo de papelão parecem prevalecer às do algodão. Como verificado na Bateria 3, entre o enriquecimento que possibilite abrigo/proteção (rolo de papelão), mas que também permita a utilização como material de construção de ninho, comparado ao que disponibiliza somente material para a construção de ninho (algodão), as fêmeas escolheram o primeiro. Como os enriquecimentos ambientais são medidas utilizadas para prevenção de estresse e doenças correlatas, eles têm uma das funções essenciais, que é motivar os animais a desempenhar padrões comportamentais espécie-específicos, e assim, em conjunto podem alcançar o bem-estar animal²⁹. O rolo de papelão parece alcançar esses objetivos, pois, além de ser material de abrigo e ninho, permite oportunidades para exploração e locomoção (como subir no tubo, por exemplo). Apesar de ter a disponibilidade de apenas uma escolha, a combinação de materiais é um dos comportamentos observados em animais, para construção de ninhos mais estruturados e complexos²⁷. No presente estudo, uma das fêmeas (adultas) inicia a transferência de algodão para o ambiente com o rolo de papelão (Figura 6), indicando uma possível preferência para a combinação de materiais. Estudos adicionais seriam necessários para corroborar essa observação. Mas o fato é que todas as fêmeas também dispunham de maravalha para combinar com o material do rolo de papelão.



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

O contraste entre as fases de vida das fêmeas e a preferência entre os enriquecimentos ambientais ofertados revelaram que todas as fases tiveram a mesma preferência para o tipo de enriquecimento. Impreterivelmente, as fêmeas púberes, adultas virgens e adultas, tiveram como resultado no teste de preferência o rolo de papelão. Sabe-se que o envelhecimento apresenta efeitos em diversos aspectos biológicos, incluindo alterações no desempenho cognitivo³⁰, e na emocionalidade^{31,32}. À vista disso, era esperado que as fêmeas apresentassem diferenças na preferência com relação as diferenças de idade e experiências de vida, como a maternidade. Sabe-se muito sobre os impactos do enriquecimento em diferentes fases de vida e a influência em diversos aspectos biológicos, incluindo fisiológicos e

comportamentais^{33,34}, mas a escolha frente a diferentes fases e experiências de vida ainda não foi bem documentada. Em nosso grupo de pesquisa, verificamos diferenças entre a utilização do rolo de papelão nas diferentes fases de desenvolvimento das fêmeas (dados não publicados). Os exemplos podem ser visualizados na Figura 7, em que as fêmeas púberes utilizam o enriquecimento como abrigo/proteção e atividades exploratórias (Figura 7a), as adultas virgens utilizam parcialmente como abrigo/proteção e como ninhos (Figura 7b), e a mães o utilizam para construção de ninho (Figura 7c).



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

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

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

CONCLUSÃO

A implementação de enriquecimentos ambientais pode trazer grande contribuição ao bem-estar animal. Diversos modelos de enriquecimento podem ser utilizados para esse fim, no entanto, antes da exposição definitiva, é recomendado o uso de testes de preferência para verificar a real escolha dos animais. Neste trabalho, o algodão foi o objeto de nidificação preferido entre as fêmeas LG/J possivelmente devido a sua capacidade de estruturação de ninhos (*nestability*). E o objeto de abrigo/proteção preferido foi o rolo de papelão, que quando contrastado com o algodão, também foi o preferido para todas as fêmeas nas diferentes fases analisadas (Púbere, Adultas virgens e Adultas). Como visto em trabalhos do nosso grupo de pesquisa, o rolo de papelão permite ser utilizado de diferentes formas conforme a necessidade dos animais e a fase de vida em que estão, por exemplo, podem utilizar para estruturar o recinto, ou também, seus ninhos. Dessa forma, além da versatilidade ser uma das principais características do rolo de papelão, pois pode ser usado como abrigo/proteção tanto como material para construção de ninhos, também é um objeto de fácil acesso, permite autoclavagem, é atóxico e de baixo custo. Os resultados deste trabalho também permitiram o desenvolvimento de novas pesquisas do grupo utilizando o rolo de papelão como enriquecimento ambiental, e principalmente embasar a investigação das diferenças de preferência e utilização de enriquecimentos em diferentes fases de vida.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

1. Franco NH. Animal experiments in biomedical research: a historical perspective. *Animals*. 2013;3(1):238-73. <http://dx.doi.org/10.3390/ani3010238>. PMID:26487317.
2. Lyon M, Rastan S, Brown SDM. Genetic variants and strains of the laboratory mouse. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 1996. 1840 p.
3. Luna SPL. Dor, sensibilidade e bem-estar em animais. *Ciênc Vet Tróp*. 2008;11(1):17-21.
4. Broom DM. Welfare assessment and relevant ethical decisions: key concepts. *Annu Rev Biomed Sci*. 2008;10(0):79-90. <http://dx.doi.org/10.5016/1806-8774.2008.v10pT79>.
5. Salles MR. Visão: legislação acerca do tema e direito à objeção de consciência. *RVS*. 2017;5(1):27.
6. Russel W, Burch R. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959. 238 p.
7. Neves SMP, Mancini J Fo, Menezes EW. Manual de cuidados e procedimentos com animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: FCF-IQ, Universidade de São Paulo; 2013. 216 p.
8. Guimarães MV, Freire JECM, Bezerra LM. Utilização de animais em pesquisa: breve revisão da legislação no Brasil. *Rev Bioet*. 2016;24(2):217-24. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-80422016242121>.
9. Fraser D. Understanding animal welfare: the science in its cultural context. Oxford: Wiley-Blackwell; 2008. 324 p.
10. Medina MP. Efeitos do enriquecimento ambiental no comportamento e bem-estar de animais de laboratório

- convencionais [trabalho de conclusão de curso]. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
11. Yerkes RM. Almost human. New York: Century Company; 1925. 278 p.
 12. Fischer ML, Rodrigues GS, Aguero WP, Zotz R, Simão-Silva DP. Refinement as ethics principle in animal research: is it necessary to standardize the Environmental enrichment in laboratory animals? *An Acad Bras Cienc.* 2021;93(1):e20191526. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765202120191526>. PMID:33787753.
 13. André V, Gau C, Scheideler A, et al. Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. *PLoS Biol.* 2018;16(4):e2005019. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.2005019>. PMID:29659570.
 14. Weber EM, Olsson AIS. Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: an ethological review. *Appl Anim Behav Sci.* 2008;114(1-2):1-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2008.06.006>.
 15. Lynch CB. Evolutionary inferences from genetic analyses of cold adaptation in laboratory and wild populations of the house. In: Boake CRB, editor. *Quantitative genetic studies of behavioral evolution*. Chicago: The University of Chicago Press; 1994. p. 278-301.
 16. Baumans V. The laboratory mouse. In: Poole T, editor. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*. 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. p. 282-312. (vol. 1).
 17. Koolhaas JM. The laboratory rat. In: Poole T, editor. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*. 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. p. 313-30. (vol. 1).
 18. Baumans V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR J.* 2005;46(2):162-70. <http://dx.doi.org/10.1093/ilar.46.2.162>. PMID:15775025.
 19. Kuzel MAA, Oliveira FS, Demarque KC, et al. Estudo da hierarquia de camundongos Swiss Webster através do uso de Sistemas com Gaiolas Interligadas (SGI). *RESBCAL.* 2013;2(1):49-60.
 20. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays J Med Sci.* 2017;24(5):101-5. <http://dx.doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.11>. PMID:29386977.
 21. Oliveira G, Brück M, Veronez T. Enriquecimento ambiental: qual a melhor forma do enriquecimento ambiental para camundongos em biotério? 1ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2018. 120 p.
 22. X-Plo-Rat [site na Internet]. 2005 [citado 2022 abr 22]. <http://www.oocities.org/xplorat/>
 23. Zinck L, Lima SQ. Mate choice in *Mus musculus* is relative and dependent on the estrous state. *PLoS One.* 2013;8(6):e66064. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066064>. PMID:23762466.
 24. Sanderson DJ, Bannerman DM. The role of habituation in hippocampus-dependent spatial working memory tasks: evidence from GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice. *Hippocampus.* 2012;22(5):981-94. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20896>. PMID:21125585.
 25. Longordo F, Fan J, Steimer T, Kopp C, Lüthi A. Do mice habituate to “gentle handling?” A comparison of resting behavior, corticosterone levels and synaptic function in handled and undisturbed C57BL/6J mice. *Sleep.* 2011;34(5):679-81. <http://dx.doi.org/10.1093/sleep/34.5.679>. PMID:21532962.
 26. Lapchik VBV, Mattaraia VGM, KO GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. 708p.
 27. Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Lab Anim.* 1997;31(2):133-43. <http://dx.doi.org/10.1258/002367797780600152>. PMID:9175010.
 28. Sherwin CM. The influence of standard laboratory cages on rodents and the validity of research data. *Anim Welf.* 2004;13(1):9-15.
 29. Olsson IAS, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of ‘environmental enrichment’. *Lab Anim.* 2002;36(3):243-70. <http://dx.doi.org/10.1258/002367702320162379>. PMID:12144738.
 30. Mora-Gallegos A, Rojas-Carvajal M, Salas S, Saborío-Arce A, Fornaguera-Trías J, Brenes J. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem.* 2015;118:96-104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2014.11.012>. PMID:25434818.
 31. Meyza KZ, Boguszewski PM, Nikolaev E, Zagrodzka J. Age increases anxiety and reactivity of the fear/anxiety circuit in Lewis rats. *Behav Brain Res.* 2011;225(1):192-200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.011>. PMID:21782853.
 32. Inta D, Vogt MA, Luoni A, et al. Significant increase in anxiety during aging in mGlu5 receptor knockout mice. *Behav Brain Res.* 2013;241:27-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.11.042>. PMID:23228523.



33. Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci.* 2004;20(5):1341-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x>. PMID:15341605.
34. Kempermann G. Activity dependency and aging in the regulation of adult neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(11):a018929. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a018929>. PMID:26525149.

9. ANEXO A

Pró Reitoria
Pesquisa

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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Enriquecimento ambiental na puberdade: o efeito no cuidado materno e metilação de gen no hipotálamo de fêmeas murinas LG/J", protocolada sob o CEUA nº 7124070519 (ID 001245), sob a responsabilidade de **Andréa Cristina Peripato e equipe; Nathália Sayuri Servulo Masuki ; Natália Marques Rosa; Edgar de Lima Machado Junior** - que envolve produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins 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 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião 17/06/2019.

We certify that the proposal "Environmental enrichment at puberty: the effect on maternal care and gene methylation in t murine female LG/J hypothalamus", utilizing 40 Isogenics mice (40 females), protocol number CEUA 7124070519 (ID 001245), un the responsibility of **Andréa Cristina Peripato and team; Nathália Sayuri Servulo Masuki ; Natália Marques Rosa; Edgar de Lir Machado Junior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylt Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentati (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in t meeting of 06/17/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 06/2019 a 06/2021

Área: [Genética E Evolução](#)

Origem: [Biotério Externo](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [3 a 12 semanas](#)

N: [40](#)

Linhagem: [LG/J](#)

Peso: [6 a 19 g](#)

Local do experimento: Biotério do Laboratório de Genética de Comportamento

São Carlos, 17 de junho de 2019

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

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

10. ANEXO B

Pró Reitoria
Pesquisa

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



CERTIFICADO

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

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

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

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

Origem: **Biotério Externo**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **3 a 16 semanas**

N: **100**

Linhagem: **LG/J**

Peso: **6 a 40 g**

Local do experimento: **Biotério do Laboratório de Genética de Comportamento**

São Carlos, 29 de maio de 2019

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

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