

# ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

*QUAL A MELHOR FORMA DE UTILIZAÇÃO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PARA CAMUNDONGOS EM BIOTÉRIO?*



**Gabriel Oliveira**

**Miguel Brück**

**Thais Veronez**

## **Enriquecimento Ambiental**

*Qual a melhor forma de utilização do  
Enriquecimento Ambiental para camundongos  
em biotério?*

## AUTORES

- **Gabriel Oliveira:** Médico Veterinário formado pela Universidade Federal Fluminense em 2001. Doutor em Ciências Biológicas pelo Instituto Oswaldo Cruz e realizou Pós-Doutorado na área de Nefrologia Clínica na Escola Paulista de Medicina (UNIFESP). Pesquisador Produtividade em Inovação e Desenvolvimento Tecnológico pelo CNPq. Responsável Técnico do Biotério de Experimentação Animal dos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos do Instituto Oswaldo Cruz. Desde 2005 atua como colaborador com a Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).
- **Miguel Brück:** Técnico em Agropecuária pela Universidade Federal Fluminense CANP-UFF 1989. Possui graduação em Ciências Biológicas em 1999, pós-graduação em Docência do Ensino Superior em 2008, ambos pela Universidade Veiga de Almeida e pós-graduação em Docência para Atuação em Educação à Distância em 2017, pela Escola Superior Aberta do Brasil. Tecnologista Pleno em Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz onde atuou profissionalmente por 14 anos no Serviço de Criação de Primatas Não Humanos do Centro de Criação de Animais de Laboratório, responsável pelo Programa de Enriquecimento Ambiental. Atuou como Gestor do Departamento de Gestão Ambiental da Fundação Oswaldo Cruz, tendo sido responsável pela implantação do projeto de Gestão de Resíduos do Grupo A2. Atualmente está lotado no Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz (CEA/IOC), onde atua como coordenador do Programa de Enriquecimento Ambiental dos animais albergados na estrutura do CEA-IOC.
- **Thais Veronez:** Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Santo Amaro-UNISA em 1999. Especialista em Meio Ambiente pela Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ em 2006. Mestre em Ciência em Animais de Laboratório pela Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ em 2017. Técnica em Saúde Pública, com experiência na área de Animais de Laboratório, ênfase na Criação e Manejo de Camundongos geneticamente modificados, homozigotos e heterozigotos, atuando principalmente na obtenção de linhagens de camundongos certificados, através da técnica de derivação cesariana. Coordenadora Técnica das colônias de fundação e produção de roedores. Membro do Comitê da Qualidade e Presidente da Comissão Interna de Biossegurança, no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos-ICTB, de 2006 a 2015. Técnica em Saúde Pública, no Serviço de Animais de Laboratório-SAL, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ desde 2016.

## **Enriquecimento Ambiental**

*Qual a melhor forma de utilização do Enriquecimento Ambiental  
para camundongos em biotério?*

Rio de Janeiro

2018

## Catálogo-na-Publicação

Enriquecimento Ambiental: *Qual a melhor forma de utilização do Enriquecimento Ambiental para camundongos em biotério?* / Gabriel Melo de Oliveira, Miguel Ângelo Brück e Thais Veronez de Andrade Martins, autores. – 1ª ed. Rio de Janeiro – RJ : Fiocruz, 2018.

119p. : l1.

ISBN: 978-85-5522-322-8

1. Enriquecimento Ambiental. 2. Comportamento Animal. 3. Animais de laboratório. 4. Camundongos. I. Oliveira, Gabriel Melo de. II. Brück, Miguel Ângelo. III. Martins, Thais Veronez de Andrade

CDD 570

## APRESENTAÇÃO

Historicamente, podemos observar uma íntima relação entre as pesquisas desenvolvidas pela Fundação Oswaldo Cruz (denominado de Instituto Soroterápico Federal em 1900) e o uso de animais de laboratório. Num cenário que remete ao século passado, o Instituto Oswaldo Cruz (IOC) desenvolveu inúmeras pesquisas através do uso de animais de laboratório. Essa atividade foi de suma relevância no desenvolvimento das pesquisas biomédicas desta instituição centenária, que através de pesquisadores como Dr. Oswaldo Cruz e Dr. Carlos Chagas dentre outros, demonstraram a importância do uso destes animais para elucidar diversas características patológicas das doenças estudadas no contexto nacional e mundial.

Mediante a condição intrínseca ao IOC, como instituição de pesquisa biomédica e para que fosse possível a adequação a legislação nacional vigente, normas de biossegurança e os princípios de bioética e bem-estar animal, foi criado no final da década de 1990, o Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz - CEA/IOC. Este setor possui como objetivo principal, viabilizar e facilitar o desenvolvimento de ensaios através do uso de animais de laboratório (em condições adequadas de qualidade, boas práticas laboratoriais, biossegurança e gestão ambiental) para os estudantes, técnicos e pesquisadores do IOC e seus colaboradores.

O CEA/IOC é diretamente ligado a Vice Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação do Instituto Oswaldo Cruz

(VDPDTI/IOC) e sua missão é a manutenção e oferta das instalações condominiais multiusuários para experimentação animal no IOC, sendo coordenado seu uso e acesso. O uso de animais de laboratório no CEA/IOC ocorre somente nos casos em que não existam métodos alternativos validados e a substituição do uso de animais para comprovação de hipóteses científicas em elaboração e/ou em ensaios pré-clínicos de abordagens básica ou aplicada, cumprindo as legislações e normas pertinentes em projetos previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA).

Atualmente, com o crescimento do número de pesquisadores e de novas linhas de pesquisas, observou-se uma grande variabilidade na utilização de modelos animais e abordagens científicas durante experimentação biomédica no IOC. Mundialmente e no Brasil o uso de animais de laboratório foi baseado em princípios éticos que fundamentam as hipóteses científicas, como, por exemplo, o conceito dos 3R's. Pois, conforme Russel & Burch (1959), descreveram, esses princípios são baseados na redução do número de animais usados em experimentos até um número mínimo necessário, sob do ponto de vista estatístico para que se alcance os objetivos do estudo; substituição dos animais por outros tipos de estudos em que os resultados científicos possam ser alcançados sem a sua utilização; e o refinamento do modo de condução dos experimentos, assegurando o mínimo de sofrimento ou estresse para os animais envolvidos na pesquisa, conceito pelo qual o Enriquecimento Ambiental (EA), está inserido.

De forma robusta na área de Ciência e Tecnologia, o Brasil tem desenvolvido uma importante plataforma de sustentação às pesquisas biomédicas, que é a Experimentação Animal. Em 2008, essa relevante atividade, passou a ter marcos legais específicos a área, quando foi sancionada a Lei nº 11.794, mais conhecida como *Lei Arouca*, que regulamentou a criação e a utilização de animais em atividade de ensino e pesquisa científica em todo o território nacional.

A partir dela, foi criado tanto para a pesquisa e ensino, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) ligado ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC). O CONCEA elaborou e criou o sistema de Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA) com a finalidade de gerenciar as instituições e determinar normatizações para funcionamento das Comissões de Ética em Uso Animal (CEUA) e os procedimentos para os diversos modelos animais utilizados na atividade didática e científica. Por fim, seu objetivo é garantir o atendimento ético e humanitário do uso de animais para fins científicos.

Embora existam diversas orientações internacionais nas quais o Brasil é signatário ou as de âmbito nacional, os trabalhos na área de Etologia e a concepção do uso de animais de laboratório como uma específica área científica e de desenvolvimento tecnológico denominada de “Ciência em Animais de Laboratório” (antigamente conhecida como bioterismo), corroboram novas perspectivas e consciência quanto ao uso dos animais pelos pesquisadores e os profissionais que atuam diretamente com esta área.

Neste sentido, o termo *senciência* nos depara com uma realidade, conforme citado no artigo 26 contido nos Princípios Éticos na Experimentação Animal, da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), no qual determina: “Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere à dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvaguardar das manobras experimentais e da dor que possam causar, devendo-se utilizar de todos os meios possíveis para minimizar a dor e o sofrimento do animal.”

Considerando o fato dos animais de laboratórios serem seres sencientes, os pesquisadores buscam definir o que é o bem-estar animal. Broom em 2009 descreveu o conceito bem-estar animal sendo como: “o estado físico e emocional de um indivíduo do ponto de vista de suas tentativas de adaptação ao ambiente”. Sendo assim, podemos observar que o autor relaciona a avaliação do bem-estar através da observação e estudo do comportamento animal e a quantificação e a qualificação desse comportamento (individual e social) durante as suas tentativas de se ajustar com o seu meio ambiente e o grau de sucesso com que isso ocorre.

Portanto, há na pesquisa biomédica a premissa básica de se utilizar animais sadios nos aspectos morfológico, fisiológico e, também, psicológico. Entretanto, esse último aspecto muitas vezes é preterido. Na situação de restrição de espaço, os animais têm suas necessidades nutricionais básicas supridas, porém, geralmente eles ocupam um ambiente reduzido e empobrecido, resultando em comportamentos indesejáveis (estereotipados)

como, por exemplo, o aumento do estresse, automutilação e da exacerbação da agressividade.

Em 2005, Lutz afirmou que o uso de animais pelos pesquisadores nas pesquisas biomédicas e comportamentais possuem a obrigação de não somente conduzir uma pesquisa de alta qualidade, mas também de promover saúde e bem-estar dos animais que estão sob sua responsabilidade.

A necessidade e a significância do EA foi reconhecida, desde 1925, primeiramente por Yerkes e depois por Hediger (1950, 1969), os quais identificaram a importância do ambiente físico e social de animais cativos bem como seu impacto no bem-estar dos animais. Para Yerkes (1925), se o animal cativo não puder ter a oportunidade de exercitar-se para sobreviver, ele deve ao menos ter a possibilidade de exercer seu comportamento natural e suas diferentes reações, estimulados por materiais e equipamentos elaborados e inseridos em seu ambiente de cativeiro.

Dessa forma, então, são sugeridas técnicas de EA a fim de permitir que animais confinados demonstrem as preferências por objetos peculiares a cada espécie, objetivando tornar o seu dia-a-dia menos monótono, mais criativo, tornando sua atividade mais próxima possível do seu *habitat* e principalmente, proporcionando melhoria da sua qualidade de vida e de seu bem-estar, enquanto estes são mantidos em biotérios de criação, manutenção ou experimentação.

A Resolução Normativa Nº 30 (02/02/2016) pertencente a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) padroniza os procedimentos quanto a experimentação animal no Brasil pelo CONCEA. Em seu parágrafo 7.3.4.2. descrito no item *h*: “Os recintos primários devem: possuir enriquecimento ambiental de acordo com as necessidades comportamentais da espécie, sempre que possível”. Desde 2013, o CEA/IOC e sua equipe iniciaram a inserção de equipamentos para EA nas gaiolas das áreas de manutenção de camundongos em experimentação. Essa inserção ocorreu pelo entendimento de que o bem-estar animal possui influência direta nas condições de higiene dos animais e na qualidade, confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos durante o uso de animais nas pesquisas biomédicas, conseqüentemente no desenvolvimento científico e tecnológico institucional. Gostaríamos de ressaltar que, a elaboração, desenvolvimento do “Programa de Enriquecimento Ambiental” (PEA) do CEA/IOC” pois baseia-se desde 2013, em ensaios etológicos de preferência para cada espécie utilizado nos biotérios de experimentação do CEA/IOC e a avaliação do custo/benefício de cada equipamento/material na qualidade de vida dos animais, principalmente mensurado pela elevação do bem-estar animal.

Usualmente, a experimentação animal em biotérios utiliza animais criados e mantidos em restrição de espaço, com mínimas oportunidades de expressarem comportamentos intrínsecos a respectiva espécie e ambientes empobrecidos estruturalmente. Essa prática se justifica tanto pela necessidade da padronização ambiental, facilitação na rotina de manejo e manutenção dos

animais, mas principalmente pela reprodutibilidade dos resultados científicos obtidos pelo uso de animais de laboratório.

O PEA – CEA/IOC mantém por princípio o atendimento às necessidades etológicas e psicológicas dos animais mantidos nos biotérios do CEA/IOC, na busca de uma melhor adaptação do animal ao ambiente através de propiciar ao animal a execução do seu repertório comportamental espécie-específico, utilizando-se de novas técnicas de EA que biomimetizam pelo uso de equipamentos/materiais físicos e/ou sensoriais, o estímulo de comportamentos mais próximos aos naturais e que desencadeiem e elevem, os níveis de interação social, com melhor aproveitamento espacial do ambiente físico em que se encontrem.

Desde 2013, o projeto do PEA – CEA/IOC estruturou-se a partir da demanda de necessidades referentes aos comportamentos das espécies albergadas na infraestrutura que compõe a rede de biotérios de experimentação do CEA/IOC.

Em relação a estrutura que compõe o CEA/IOC e albergam o quantitativo de animais descrito, resumidamente é composta de sete biotérios:

**1) Biotério do Pavilhão Leônidas Deane.** Espécie que são mantidas nesse biotério: camundongo (*Mus musculus*); **2) Biotério do Pavilhão Lauro Travassos:** camundongo, rato Wistar (*Rattus norvegicus*) e *Sigmodon hispidus*; **3) Biotério do Pavilhão Carlos Chagas:** coelho (*Oryctolagus cuniculus*), camundongo e hamster (*Mesocricetus auratus*); **4) Biotério do**

**Pavilhão Ozório de Almeida:** camundongo, rato e cobaia (*Cavia porcellus*); **5) Biotério do Pavilhão Arthur Neiva:** camundongo, rato e hamster; **6) Biotério do Pavilhão Cardoso Fontes:** camundongo; **7) Biotério do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira:** camundongo.

A partir dos respectivos dados, foi possível estimar o quantitativo de espécie/animal e a demanda relacionada aos equipamentos/materiais de EA que seriam selecionados e que atendessem a dois principais critérios, para a execução dos testes iniciais com os grupos piloto: i) Análise dos efeitos dos equipamentos/materiais de EA (tipo/estímulo) ofertados aos animais sobre os comportamentos descritos nos etogramas elaborados para cada espécie, considerando-se a aceitação/preferência e uso em razão de seus repertórios comportamentais (Tabela 1) e ii) A relação custo/benefício quanto a aquisição e/ou produção, dos equipamentos/materiais de EA que constituiriam o PEA – CEA/IOC e a viabilidade na manutenção quanto ao tempo de execução e aquisição da matéria-prima de qualidade para a fabricação dos respectivos equipamentos/materiais.

**Tabela 1: Especificação dos dispositivos de EA e sua distribuição no período 2014-2017.**

Dispositivos de EA	Quantitativo distribuído				Tipo de EA/ modalidade de estímulo
	2014	2015	2016	2017	
Igloo®	24118	17935	22667	11600	Tipo físico/tátil (abrigo).
Trapézio	S/D	S/D	S/D	1600	Tipo físico/tátil (propriocepção).
Folha absorvente	S/D	S/D	S/D	29000	Tipo físico/tátil (nidificação).
Bloco de madeira	624	3721	3567	2348	Tipo físico/tátil, gustativo e olfativo.
Tube de Forrageamento	624	2868	3308	3000	Tipo físico/gustativo, olfativo e auditivo.
Pet Ball®	99	391	594	626	Tipo físico/gustativo e olfativo.
Túnel de PVC	27	177	98	116	Tipo físico/tátil (abrigo).
Semente de Girassol*	2 Kg	6 Kg	6 Kg	4,5 Kg	Tipo alimentar/gustativo e olfativo.
Feno*	12 Kg	36 Kg	36 Kg	32 Kg	Tipo alimentar/gustativo e olfativo.
<b>Total</b>	<b>25492</b>	<b>25092</b>	<b>30234</b>	<b>48290</b>	

S/D: Sem dados no período. \* Dados não somados por serem apresentados em unidade de peso.

Dessa forma partimos para a seleção específica de equipamentos e materiais que poderiam ser efetivos na implantação do PEA - CEA/IOC. Mensuramos em colaboração com o Laboratório de Biologia Celular do IOC (LBC/IOC), através da aplicação do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI) a relação entre o comportamento individual e social dos animais e o uso de diferentes tipos de equipamentos para EA. Através do nosso desenho experimental, esclarecemos a preferência, ou a escolha, de camundongos (aproximadamente 90% dos animais mantidos no CEA/IOC), nas idades infante, jovem e adulto, em relação ao tipo de EA, e conseqüentemente, demonstramos a sua influência no bem-estar na rotina de manutenção desses animais em biotério.

Nesse livro pretendemos descrever detalhadamente cada etapa da estruturação do PEA – CEA/IOC e esperamos que os nossos resultados possam servir de consulta e discussão de como melhor aplicar as técnicas de enriquecimento ambiental em diversos biotérios, com suas rotinas de manejo específicas, mas que mantenham o bem-estar e a eficácia no uso do enriquecimento ambiental, neste caso, para camundongos em biotério.

Miguel Ângelo Brück

## **AGRADECIMENTOS**

À Dr<sup>a</sup> Maria de Nazaré Correia Soeiro, em nome de todos os colaboradores do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ

À Dr<sup>a</sup> Tânia C. de Araújo-Jorge, em nome de todos os colaboradores do Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ

Ao Téc. Jerônimo Diego de Souza Campos e ao Biotério de Experimentação Animal dos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ

Ao Dr. Sérgio Leme da Silva, Docente da Universidade de Brasília, pela contribuição na revisão do texto e sugestões sobre a abordagem ao tema.

Os autores gostariam de ressaltar que a realização desse trabalho foi obtida através do apoio logístico e financeiro das respectivas entidades:

- Instituto Oswaldo Cruz;
- Laboratório de Biologia Celular/IOC;
- Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ;
- Biotério de Experimentação Animal dos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos (IOC/FIOCRUZ);

Além disso, os direitos autorais referentes a essa obra foram totalmente transferidos pelos autores ao Instituto Oswaldo Cruz.

## SUMÁRIO

Introdução.....	21
1. Breve histórico do uso de enriquecimento ambiental.....	22
1.2. Princípios Éticos, Legislação e o uso do enriquecimento ambiental.....	22
1.3. O comportamento individual e social de SW-M em biotério.....	27
1.4. Utilização do SGI e a determinação da preferência do animal.....	31
1.5. A importância e o uso do EA para camundongos em biotério.....	33
1.5.1. Os tipos de EA.....	36
Desenho Experimental.....	42
1. Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI).....	44
2. Esquema de comparação entre os tipos de EA.....	45
3. Parâmetros para determinação da preferência do EA pelo SGI.....	49
3.1. Filmagem.....	49
3.2. Cálculo da preferência pelo EA.....	50
4. Etograma.....	56
5. Análises Estatísticas.....	58
Resultados.....	59
Discussão.....	93
Conclusões.....	101
Referências Bibliográficas.....	106

## Índice de Figuras

Figura 1	Sistema de Gaiolas Interligadas.....	45
Figura 2	Esquema de filmagem do SGI.....	49
Figura 3	Representação da interação dos camundongos ao tipo de EA.....	50
Figura 4	Tipos diferentes de metodologias para o uso de EA.....	55
Figura 5	Ilustração da metodologia de quantificação da incidência de atividades do etograma.....	57
Figura 6	Avaliação individual da interação com o EA de Abrigo.....	62
Figura 7	Determinação da preferência pelo EA na categoria Abrigo.....	63
Figura 8	Avaliação individual da interação com o EA de Nidificação.....	65
Figura 9	Determinação da preferência pelo EA na categoria Nidificação.....	66
Figura 10	Avaliação individual da interação com o EA de Atividade Lúdica.....	68
Figura 11	Determinação da preferência pelo EA na categoria Atividade Lúdica.....	69
Figura 12	Determinação do objeto/material preferido pelos animais para uso como EA.....	72
Figura 13	Definição da preferência pelo tipo de EA utilizado por camundongos Swiss Webster <i>Outbred Stock</i> .....	73
Figura 14	Etograma dos camundongos Swiss Webster através da utilização do SGI contendo dois tipos de EA preferidos ( <i>Igloo</i> <sup>®</sup> e Papel Absorvente)..	75
Figura 15	Ilustração de situações peculiares observadas durante o uso dos diversos tipos de EA.....	77
Figura 16	Avaliação do percentual de ganho de peso.....	80

Figura 17	Relação entre a conversão da ingestão de ração e o ganho de peso corporal.....	82
Figura 18	Quantificação do consumo hídrico.....	83
Figura 19	Utilização do objeto/material de EA pelos camundongos nas diversas metodologias aplicadas.....	85
Figura 20	Avaliação emocional dos camundongos pelo TSC.....	86
Figura 21	Etograma dos camundongos Swiss Webster através da aplicação do método Contínuo de uso do EA.....	88
Figura 22	Etograma dos camundongos Swiss Webster através da aplicação do método Intervalado de uso do EA.....	89
Figura 23	Etograma dos camundongos Swiss Webster através da aplicação do método Alternado de uso do EA.....	90

## Índice de Esquemas

Esquema 1	Planejamento de combinações entre os tipos de EA.....	47
Esquema 2	Estruturação para o estudo da preferência.....	48
Esquema 3	Estrutura de avaliação para metodologia de uso do EA.....	53

## Índice de Tabelas

Tabela 1	Metodologia para determinação da preferência pelo EA.....	51
Tabela 2	Peso médio dos principais órgãos nas diversas categorias.....	92
Tabela 3	Tipos preferidos e resumo das suas vantagens e desvantagens em relação as faixas etárias.....	103
Tabela 4	Sugestão de aplicação de um Programa de EA através do uso dos tipos preferidos de EA para camundongos.....	105

# **INTRODUÇÃO**

## **1. Breve histórico do uso de enriquecimento ambiental:**

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

O tipo de enriquecimento depende de uma série de fatores dentre eles a estrutura do alojamento, idade, sexo, histórico dos animais, a rotina do laboratório e o propósito da intervenção. Ele pode ser fornecido com o objetivo de aproximar os comportamentos dos animais em cativeiro com os animais de vida livre, aumentar o desempenho de comportamentos positivos pra espécies ou diminuir no caso de comportamentos indesejáveis (Boere, 2001; Meehan & Mench, 2007). Portanto um programa de enriquecimento deve, antes de tudo, estabelecer uma meta para ser atingida (por exemplo, o aumento de um comportamento desejável ou a redução de um comportamento indesejável ou anormal) com a implementação deste manejo a fim de determinar qual tipo de enriquecimento irá aplicar, caso contrário, a aplicação do enriquecimento por si só sem direcionamento pode apresentar resultados pouco satisfatórios.

### **1.2. Princípios Éticos, Legislação e o uso de enriquecimento ambiental:**

As primeiras contribuições para a ciência foram fundamentadas na curiosidade e no empirismo. Ao longo do tempo, a evolução da ciência tornou-se mais detalhada, fazendo-se necessário entender os mecanismos envolvidos

em processos fisiológicos e principalmente responder hipóteses através do “Método Científico”. O uso de animais, ou a experimentação animal, tornou-se um importante “ferramenta” na metodologia científica. Contudo, paralelamente, os animais também foram considerados como seres sencientes (capacidade dos seres vivos de sentir sensações e sentimentos de forma consciente). Sendo assim, como por exemplo em 1876 no Reino Unido surgiram as primeiras regulamentações de proteção aos animais como o *Cruelty to Animals Act* (Braga, 2009)

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

Em 1959, durante a reunião anual da Associação Americana para Ciência de Animais de Laboratório, foi dado um importante passo em relação ao bem-estar animal, com a apresentação do trabalho denominado “*The Principles of Humane Experimental Technique*”, descrito pelo zoologista William M. S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch, no qual buscaram trazer mais “humanismo” às técnicas de experimentação. O princípio dos 3 R`s como ficou conhecido, por sua grafia em inglês das palavras *Replacement*, *Reduction* e *Refinement* (Substituir, Reduzir e Refinar). Em resumo, esses princípios propõem a adoção de medidas para o uso de animais em experimentação, tais como, a busca e aplicação de métodos alternativos que, por fim, substitua os testes *in vivo*, a redução do número de animais utilizados nos ensaios e o

refinamento de técnicas, minimizando a dor ou sofrimento do animal, visando a melhora do seu bem-estar (Braga, 2009; Cazarin; Corrêa; Zambrone, 2004; Petroianu, 1996).

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

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

No Brasil, a primeira norma legal a fazer referência ao uso de animais com interesse para a ciência foi o Decreto nº 24.645 de 1934 (Brasil, 1934), que determinava a tutela pelo Estado de todos os animais existentes no país e

definia como condutas de maus-tratos os atos de crueldade, violência e trabalhos excessivos, a manutenção do animal em condições anti-higiênicas e o abandono (Guimarães; Freire; Menezes, 2016; Rezende; Peluzio; Sabarense, 2008). Em 1941, grande avanço foi dado com o Decreto-Lei 3.688, Lei das Contravenções Penais, (Brasil, 1941), que previa pena para a prática da crueldade animal, independentemente da finalidade didática ou científica (Cardoso, 2009; Guimarães; Freire; Menezes, 2016). Posteriormente outras legislações foram aprovadas, como a Lei nº 5.197 de 1967, Lei de Proteção à Fauna, (Brasil, 1967a), e o Decreto-Lei nº 221/1967, Código de Pesca, Brasil, 1967b), mas nenhuma tratou especificamente do tema “experimentação animal com finalidade didática ou científica” (Guimarães; Freire; Menezes, 2016).

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

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

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

Em 29 de setembro de 2015 a Resolução Normativa (RN) nº 25 que descreve o capítulo “Introdução Geral” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (BRASIL, 2015; CONCEA, 2016) e a RN nº 30, de 02 de fevereiro de 2016, que determina a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), na qual apresenta os princípios e as condutas que permitem garantir o cuidado e o manejo eticamente correto de animais produzidos, mantidos ou utilizados em

atividades de ensino ou de pesquisa científica no Brasil (Brasil, 2016<sup>a</sup>; CONCEA, 2016). Por fim, a RN nº 33, de 18 de novembro de 2016, que propõe o capítulo "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, no qual descreve e orienta sobre estratégias de EA em biotérios, tais como cuidados a serem considerados para o EA e sugestões de EA para roedores e lagomorfos (Brasil, 2016b).

### **1.3. O comportamento individual e social de SW-M em biotério:**

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

alojamento em tocas (Alcock, 1993; Graeff, 1999; Ko; DeLuca, 2009; Suckow; Danneman; Brayton, 2001).

O SW é originária do estoque de camundongos do Dr. Leslie Webster, em 1926, no Instituto Rockfeller. O seu desenvolvimento se deu pela redução para um único par e progênie não isogênica pela Carworth Farm tendo como denominação genotípica CFW (SW). Em todos os nossos estudos utilizamos camundongos machos SW provenientes do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB-FIOCRUZ)<sup>1</sup>, na qual as matrizes foram adquiridas da Taconic Biosciences (genótipo SW-M, machos e SW-F, fêmeas) originária do Instituto Rockfeller através da Rockland Farms que criavam esses animais desde 1940 (Campos et. al., 2016) Geneticamente, o camundongo SW, pode ser citado como um grande exemplo de heterogenia, onde a adoção do manejo reprodutivo visa manter a variabilidade genética sem alterar o perfil genético da colônia, com alta porcentagem de heterozigose entre seus alelos. Os heterogênicos são animais distintos entre si e são os que melhor mimetizam a variabilidade genética da população humana típica (Nomura, 2000). Para que sejam mantidos corretamente, não se deve ultrapassar 1% de consangüinidade por geração, utilizando-se sempre o cruzamento de animais sem parentesco entre si (Benavides; Guenét, 2003). Dessa forma, a variabilidade genética será diretamente relacionada à variação do comportamento individual e social desses camundongos, os quais não podem ser chamados de linhagem, pelo fato de não serem geneticamente definidos (Massironi; Godard, 2017).

---

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

Durante 4 anos de estudo do nosso grupo de trabalho no estudo do comportamento de camundongos SW-M no Biotério de Experimentação Animal dos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos (LBC/LITEB – IOC) nossos resultados nos possibilitaram afirmar que esses animais demonstram um complexo repertório de comportamento individual e social (Ko; DeLuca, 2009; Oliveira et al., 2015). Suas principais atividades num biotério foram a busca por alimento, exploração do ambiente, repouso, auto higienização e a procura pelo contato físico entre os indivíduos, respectivamente. A incidência destas atividades foi diferente entre as idades (infantes, jovens e adultos) e entre os mesmos grupos em diferentes idades (Chumbinho et al., 2012; Defensor et al., 2012; Hamilton et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Rodrigues et al., 2013). Desde o agrupamento ao desmame (3ª semana de vida) até a 8ª semana de vida (sdv), de forma geral, não observamos claramente uma estrutura hierárquica definida, sugerindo uma relação fraternal entre os indivíduos (Campos et al., 2016; Kuzel et al., 2013), com baixo ou ausente padrões de comportamento agressivo (PCA) (Oliveira et al., 2015). Apesar de serem relativamente tranquilos à manipulação, esses animais, podem ser altamente agressivos, principalmente no reagrupamento de machos adultos. A incidência e a intensidade desta agressividade foram variáveis. Observamos que em 10% dos reagrupamentos de machos em idade adulta não houve nenhum tipo de PCA, 60% apresentaram intensidade baixa a moderada e que em 30% dos reagrupamentos ocorreram alta agressividade. Em relação a faixa de animais que apresentam alta agressividade (30%), apenas 4 a 6% dos indivíduos reagrupados exerceram sua dominância através

de lutas e mordidas, conseqüentemente ferindo a população de subordinados (70%) (Batista et al., 2012; Oliveira et al., 2015).

Através do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI) foi possível detalhar um pouco mais esta estrutura. Observamos que há a presença de dominantes e subordinados, porém, dentre estes subordinados, há indivíduos que são disputantes a dominância e envolvem-se em eventos agressivos e indivíduos, que chamamos de “neutros”, que se subordinam, não disputam a dominância e buscam não se envolver nos eventos agressivos. Outra categoria nos chama a atenção que é o “subordinado alvo” que sofre 20 a 30% do total de agressões pelo dominante e demonstra lesões corporais significativas. Tendemos a acreditar que este animal ocupa a posição mais inferior da escala social, pelos nossos resultados, por sua presença ser uma ameaça permanente ao dominante (Campos et al., 2016; Kuzel et al., 2013). Acreditamos que o objetivo do dominante está relacionado ao seu instinto primitivo, obedecendo principalmente a seleção sexual. Através do SGI, observamos que o dominante busca uma área exclusiva para sua permanência e isolando o restante do grupo para outra área. Comparando outros animais sociais, sugerimos que esta atitude está relacionada ao acesso a alimentação e também a reprodução, pois estabelecendo seu território sem oponentes facilitaria seu acasalamento, no caso do surgimento de alguma fêmea. Este territorialismo torna-se evidente quando há o estabelecimento definido de um indivíduo dominante e ausência (observável) de disputantes agressivos (Buss, 1982; Oliveira, 2012; Winston, 2006). É relevante também discutir que durante o processo de disputa e troca de dominantes, há a preferência do indivíduo pela área de passagem, pois possibilita a observação de todos os indivíduos e encontrar mais facilmente o

“subordinado alvo”. Além disso, apesar da exclusividade da área para o acesso a alimentação, o estabelecimento da dominância é uma situação estressante para todo o grupo, principalmente para o dominante. Em todos os casos, observamos que o dominante e o disputante (mais ativo) demonstram perda de peso, assim como em fases de maior agressividade dentro do grupo. Por exemplo, quando não há uma aceitação completa do dominante. Quando há esta aceitação, tanto o dominante quanto os demais componentes do grupo apresentam ganho de peso (Kuzel et al., 2013; Oliveira et al., 2015).

Ressaltamos que dentro do percentual da população de subordinados, observamos que aproximadamente 30% dos indivíduos são possíveis disputantes a dominância e que 40% não se envolvem não agredem nem são agredidos, denominamos essa categoria de neutra. Então, através das nossas observações, sugerimos uma estrutura hierárquica dinâmica (em relação ao tempo de agrupamento) e composta de: 1) *Dominante*: apenas um animal, com diferentes níveis de agressividade; 2) *Subordinados disputantes*: número variável de animais agressores/agredidos que buscam a dominância do grupo; 3) *Subordinados neutros*: animais que não se envolvem nos episódios agressivos e 4) *Subordinados alvos*: que sofrem 20 a 30% do total de agressões do dominante (Campos et al., 2016).

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

Atualmente, a preocupação com o bem-estar animal demonstra-se de alta relevância, principalmente em relação ao uso de animais na

experimentação científica (Clark; Rager; Calpin, 1997). Tornar o ambiente físico e social de animais em biotério mais complexo ou mais próximo do natural é um meio amplamente reconhecido para aumentar o bem-estar. Com relação aos animais de laboratório, é importante que o ambiente de alojamento seja estudado e melhorado, não apenas para aumentar o conforto desses animais, mas também para assegurar que resultados científicos confiáveis e de boa qualidade sejam obtidos (Sherwin, 2004).

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

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

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

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

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

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

O psicólogo canadense Donald O. Hebb, na década de 1940, observou que animais criados em ambientes ricos, ou seja, com variedade de elementos e configurações espaciais, posteriormente, apresentavam claramente habilidade superior de aprendizagem, comparativamente a outros animais criados em ambientes menores e não enriquecidos (Mattaraia, 2009). Marian Diamond e seus colaboradores, em 1964, retomaram as observações de Donald O. Hebb e demonstraram anatomicamente algumas diferenças cerebrais entre os roedores criados com ou sem enriquecimento (Mattaraia; Oliveira, 2012).

O EA é uma abordagem para melhorar as condições de alojamento e que tem sido o foco de diversos estudos (Medina, 2011), o qual é um dos principais fatores que influencia o bem-estar animal e pode ser conseguido por meio de dispositivos artificiais ou de controle de ambiente (Rivera; Rodrigues, 2009). Na década de 70 a proposta de enriquecimento de ambientes para animais em restrição de espaço, foi empregada nos zoológicos e aos poucos foi sendo levada aos laboratórios, como um meio de aumentar o bem-estar dos animais de experimentação. O principal objetivo do EA é proporcionar aos animais em restrição de espaço um ambiente rico em estimulação sensorial, que pode ser criado de diversas formas (Mattaraia, 2009), permitindo a expressão dos comportamentos naturais e típicos da espécie (Mattaraia; Oliveira, 2012). De acordo com Newberry (1995), o EA deve promover a melhoria da qualidade do ambiente em restrição de espaço, para que o animal tenha opções de escolha de atividade e certo controle sobre seu contexto social e do ambiente espacial. Young (2003) considerou que o enriquecimento deve propiciar aos animais a estimulação sensorial e motora, promovendo

bem-estar psicológico por meio de exercícios físicos, atividades cognitivas e desafios, considerando as características da espécie.

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

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

definido, comportamentos anormais podem ser identificados e sua relevância considerada. Um comportamento normal ou anormal pode ser definido como qualquer comportamento aprendido com função de promoção da saúde, sobrevivência e reprodução de um animal em um determinado ambiente (Keeling; Jensen, 2002)

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

#### **1.5.1. Os tipos de enriquecimento ambiental:**

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

novidade, conseqüentemente decrescendo gradativamente a taxa de interação, até o animal acostumar-se com a presença do estímulo (Gonçalves et al., 2010).

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

O EA pode ser dividido em cinco categorias: i) O enriquecimento físico tem como objetivo reduzir, na medida do possível, as condições deficitárias da restrição de espaço, por meio de mudanças nos elementos que compõem o ambiente físico, com a introdução de objetos de distração, ou na sua estrutura; ii) Cognitivo tem como objetivo proporcionar situações motivadoras por meio de desafios ou jogos com conseqüências recompensadoras (Gonçalves et al., 2010); iii) Alimentar consiste na manipulação da forma com que é oferecido o alimento, bem como alterações da dieta, dos horários e da frequência de alimentação (Hones; Marin, 2006); iv) Sensorial e pode abranger qualquer um dos cinco sentidos. Estímulos visuais, auditivos e olfativos externos, são eficientes na melhoria do bem-estar animal (Gonçalves et al., 2010) e v) O enriquecimento social inclui a socialização dos animais, com contato intra-

específico, o qual consiste no alojamento, de espécies gregárias, em grupos ou pares, de maneira harmoniosa, temporariamente ou permanentemente (Baumans, 2005), pois se alojadas individualmente serão privadas de expressar seus comportamentos sociais típicos (Steward, 2004) ou interespecífico (humano, não-humano) (Baumans, 2005).

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

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

Através da busca por referências relativas ao uso dos camundongos e o EA no sítio de publicações indexadas *PubMed*, podemos observar que a palavra chave *mice* apresenta 1.479.919 artigos publicados. No entanto, quando relacionamos as palavras chaves: *mice and environmental enrichment*,

apenas 1.057 publicações estão relacionadas a esse assunto específico (Outubro de 2017). Acreditamos que esses dados são importantes para podermos ilustrar o quanto a área de comportamento e EA em camundongos pode ser explorada pelos pesquisadores da área de ciência de animais de laboratório.

Estamos convictos em afirmar que além de possuímos uma pequena fonte de conhecimento sobre o EA para camundongos, os estudos sobre o comportamento individual e social, os hábitos alimentares, alojamento, acasalamento e em nosso caso específico não realizam o que viemos a apresentar como consideramos a linha de raciocínio inédita do nosso trabalho. Não inferimos ou sugerimos conceitos, nem tanto induzimos ou adaptamos conhecimentos e equipamentos para o enriquecimento do ambiente no qual são mantidos os camundongos. O eixo principal do nosso desenho experimental foi baseado em “perguntar” ao camundongo qual tipo de EA preferido. Então essa pergunta se tornou a hipótese de trabalho e a “resposta” dos animais irão se tornar os resultados, que serão posteriormente analisados e discutidos, para somente então podermos concluir qual o melhor tipo, dentro das nossas condições operacionais e de rotina, sugerir a implantação em nossa rotina de qual o melhor tipo de EA que pode ser oferecido ao camundongo Swiss Webster.

Essa “pergunta” foi baseada no uso do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI). O uso desse sistema em associação com os parâmetros comportamentais, principalmente a filmagem do agrupamento e a estruturação de um detalhado etograma, consideramos que o nosso desenho experimental

possibilite aos animais demonstrar a sua preferência pelos tipos diferentes de EA oferecidos (Kuzel et al., 2013)

Então: “Qual o tipo de EA mais adequado ao manejo dos camundongos SW-M em biotério ?”

A ideia principal para a elaboração e execução desse trabalho foi a busca por novos conhecimentos relacionados ao comportamento, hábitos e atitudes individuais e sociais de camundongos mantidos em biotérios, que possam ser relacionados ao tipo de EA oferecido durante a rotina de manejo do animal. Nossa hipótese baseia-se no fato de que o uso de gaiolas convencionais para a manutenção de camundongos em biotério impossibilita o animal expressar diferentes repertórios do seu comportamento através da restrição do espaço. Além disso, não possibilita ao animal o comportamento de escolha ou preferência. Essa preferência, nesse trabalho está relacionada à determinação do melhor tipo de enriquecimento ambiental a ser oferecido para o animal. Esperamos que nessa abordagem seja possível esclarecer se o EA é uma importante forma de manejo para elevar o bem-estar dos animais usados em laboratório.

Esse fato pode ser comprovado em primatas não humanos, tanto em laboratório, como comumente utilizado em gaiolas de animais mantidos em restrição de espaço (zoológicos). Porém qual seria o enriquecimento ambiental mais adequado para camundongos machos de Swiss Webster? Haveria diferença entre a preferência do camundongo por certo tipo de EA para a idade de infantes e outro para adultos? Acreditamos que o uso do SGI possa esclarecer essas questões. Dessa forma esse trabalho justifica-se através da elaboração de um sistema (equipamento) que não interfere no manejo,

fisiologia ou bem-estar do animal e possibilita ao animal demonstrar sua escolha ou preferência na utilização de diversos tipos de materiais de EA. Concluindo, esperamos que com a utilização do SGI, possamos ao final sugerir, de forma técnico/científica, novos conhecimentos que poderão influenciar diretamente num melhor manejo de agrupamento e na utilização otimizada dos equipamentos e materiais disponíveis para o EA.

# **DESENHO EXPERIMENTAL**

Nosso desenho experimental foi dividido em duas partes: 1ª parte) Qual o tipo de EA mais adequado ao manejo dos camundongos SW-A em biotério? e 2ª parte) Qual seria a forma mais eficiente de oferta/utilização do tipo de EA preferido para os animais?

- **1ª parte:**

No intuito de esclarecer a nossa primeira questão utilizamos camundongos Swiss Webster requisitados entre 2016 e 2017 ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ), machos e em diferentes idades: a) infantos (3 semanas de vida); b) jovens (5 semanas de vida) e adultos (7 semanas de vida), perfazendo um total de 180 camundongos para todos os ensaios. Esses camundongos foram recebidos e mantidos no Biotério de Experimentação Animal dos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos do Instituto Oswaldo Cruz sob condições de temperatura (20 a 22 °C), umidade (45 a 55%), fotoperíodo (12/12h) e troca de ar (25 trocas/hora), controlados pela utilização de estantes ventiladas. Foram albergados no SGI (composto de gaiolas de polissulfona convencionais pequenas e com grade de aço inoxidável e piso de raspa de madeira, a maravalha de *pinus*). Além disso, os animais receberam água filtrada e ração específica para roedores de laboratório *ad libitum*.

Os camundongos foram individualmente identificados através da marcação temporária. Todos os procedimentos descritos nesse trabalho estão em conformidade com os princípios éticos, legislação nacional vigente e, aprovados pela Licença CEUA/IOC: L-004/16.

## 1. Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI):

Desenvolvemos no Laboratório de Biologia Celular o SGI através da ligação entre duas gaiolas pequenas de polissulfona autoclaváveis resistentes a ácidos e bases (15x30x15 cm) por conexões hidráulicas de policloreto de vinila (PVC) no tamanho a permitir a passagem de um camundongo adulto. Estas gaiolas foram divididas entre área A e área B. Em três diferentes SGIs, iremos testar a cada combinação de tipos de EA, concomitantemente em animais com três diferentes idades. De forma detalhada, por exemplo, na Combinação 1 (Abrigo), utilizaremos três SGIs, um para cada grupo: i) G1 – infantes; ii) G2 – jovens e iii) G3 – adultos. Na área A de cada SGI inserimos o *Igloo*<sup>®</sup> e na área B colocamos o Tubo de PVC em todos os Grupos (Figura 1). Nas outras Combinações utilizamos o esquema similar. A partir desse sistema foi possível avaliar, para cada Grupo de animais (idades), a preferência pelo uso do tipo de EA oferecido, pela sua interação com o material/equipamento na área A ou área B do SGI.



**Figura 1:** *Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI)*. Ilustração do SGI demonstrando a estruturação de duas áreas de preferência. Em relação a categoria Abrigo, na área A, nesse caso, inserimos o *Igloo*® e na Área B, inserimos o Tubo de PVC. A conexão de PVC possibilita ao camundongo a se deslocar entre as duas áreas e através do nosso desenho experimental, tornou possível a mensuração da preferência do equipamento/material de EA de preferência.

## 2. Esquema de comparação entre os tipos de EA:

A preferência dos animais pelos tipos de EA foi inicialmente estruturado através da seleção das seguintes categorias: i) **Abrigo:** uso do *Igloo*® vs Túnel de PVC; ii) **Nidificação:** uso de Papel Absorvente vs Touca Cirúrgica e iii) **Atividade Lúdica:** uso do Tubo com Guizo vs Bola com Guizo. Os equipamentos/materiais apresentaram as seguintes características detalhadas:

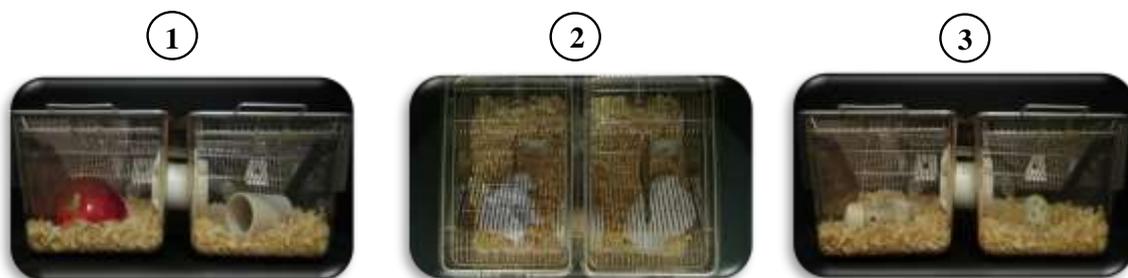
- 1) *Igloo*®: Confeccionado com policarbonato, medindo 10 cm de diâmetro interno e 5 cm de altura. Esse modelo possui 03 aberturas circulares, cor vermelha transparente, autoclavável e com peso total de 56 gramas (g).
- 2) Túnel de PVC: Consiste de uma secção de tubo PVC 1 ¼", medindo 10 cm de comprimento na cor branca, não autoclavável e pesando 90 g.

- 3) Papel Absorvente (Toalha de papel interfolhada): Utilizamos duas folhas, amassadas em forma de “bola” para cada grupo. Essas folhas são compostas de 100% de fibras naturais, medindo cada folha (20 x 21 cm).
- 4) Touca Cirúrgica: Touca utilizada como Equipamento de Proteção Individual (EPI), sanfonada e descartável, confeccionada em não-tecido (TNT) hidrofóbico e 100% polipropileno, com aplicação de elástico e inserida parcialmente aberta em cada grupo.
- 5) Tubo com Guizo: Elaborado com parte de Tubo PVC de 1/2” medindo 8 cm, com tampões (*cap* roscável) nas extremidades e perfurações de 0,3 cm ao longo do corpo, contendo um guizo metálico de 0,5 cm de diâmetro em seu interior.
- 6) Bola com Guizo: Confeccionado em termo plástico com aberturas em sua superfície, medindo 4 cm de diâmetro, com peso de 12 g e contendo guizo metálico de 0,5 cm de diâmetro no seu interior.

Posteriormente, para a avaliação do etograma, também utilizamos através do mesmo esquema um conjunto de Grupos (G1, G2 e G3) no qual não foi inserido nenhum tipo de EA no SGI (Controle Negativo). Então nosso desenho experimental foi estruturado da seguinte forma (Esquema 1):

**Esquema 1:** Planejamento de combinações entre os tipos de EA:

Etapa #1  
Combinações



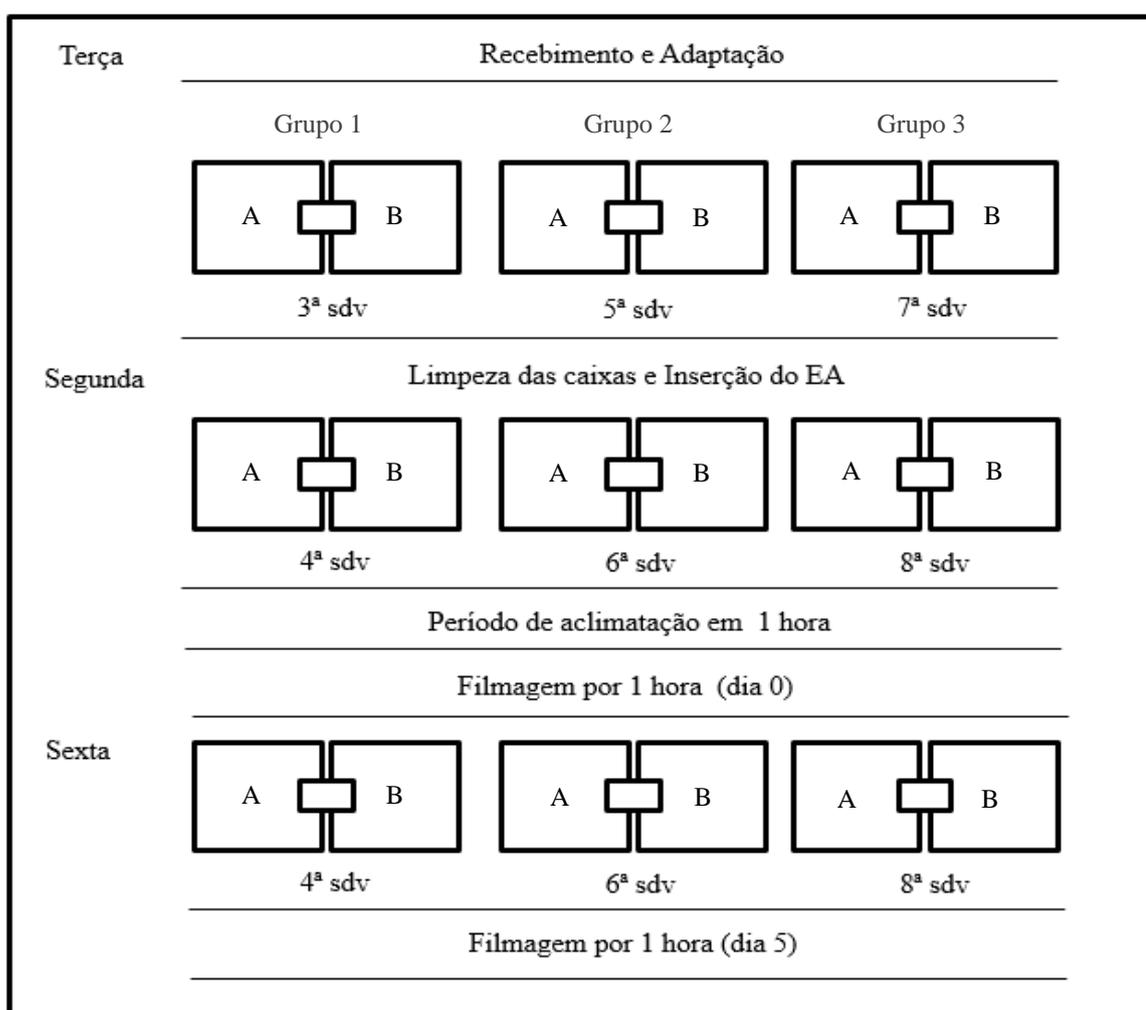
Combinação	Grupos	Área A	Área B
1	G1, G2 e G3	<i>Igloo</i> <sup>®</sup>	Túnel de PVC
2	G1, G2 e G3	Papel Absorvente	Touca Cirúrgica
3	G1, G2 e G3	Tubo com Guizo	Bola com Guizo

Etapa #2  
Combinações

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

Conforme o Esquema 2 recebemos os animais com 3, 5 e 7 sdv e os adaptamos por uma semana ao SGI (na ausência de equipamentos/materiais de EA) e na 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, e 8<sup>a</sup> sdv, formados três Grupos diferentes iniciaremos a metodologia de avaliação da preferência pelo tipo de EA para uma Combinação de cada vez.

**Esquema 2:** Estruturação para o estudo de preferência.



### 3. Parâmetros para Determinação da Preferência do EA pelo SGI:

#### 3.1. Filmagem:

Após o período semanal de adaptação dos animais ao SGI (6 dias), na segunda-feira seguinte incluímos nas respectivas Áreas do SGI dois tipos de cada categoria de EA, conforme descrito acima nas tabelas de Combinações dos respectivos Grupos. A obtenção dos dados foi realizada através da filmagem no interior da estante ventilada, por duas câmeras portáteis, em plano superior e plano frontal, utilizando-se câmeras digitais Sony HDR - PJ760<sup>®</sup> e Sony HDR - XR550<sup>®</sup>. Essas filmagens foram realizadas no momento da oferta do EA (Dia 0 – Período Inicial) e após 5 dias na sexta-feira (Dia 5 – Período Final). O objetivo desse esquema foi possibilitar a reação do animal no momento da apresentação inicial ao EA e a sua adaptação e uso do mesmo após 5 dias de interação. As filmagens de cada SGI foram realizadas num tempo (contínuo) total de 60 minutos, respeitando o mesmo horário (entre 8:00 a 12:00h) (Fig. 2).



**Figura 2:** *Esquema de filmagem dos SGIs:* Estruturamos um cenário onde para melhorar a visualização dos animais e a qualidade dos vídeos. Tornamos a base o fundo de filmagem na cor preto-fosco e colocamos para a realização do etograma a câmeras digitais Sony HDR - PJ760<sup>®</sup> adaptada em plano superior. Dessa forma para cada combinação inserida no SGI obtivemos uma filmagem de 60 minutos com possibilidade de identificação individual dos animais e a quantificação da utilização de cada animal em cada tipo de EA oferecido.

### 3.2. Cálculo da Preferência pelo EA:

A determinação da preferência pelos tipos de EA oferecidos foi constituída pela análise em cada filmagem, para cada Combinação, para cada Grupo e para cada animal, ou seja, avaliamos a interação dos animais cmdg1, cmdg2, cmdg3, cmdg4 e cmdg5, individualmente em 60 minutos de filmagem (plano superior). Além disso, esse procedimento foi realizado no Período Inicial (D0) e no Período Final (D5) (Fig. 3).



**Figura 3:** *Representação da interação dos camundongos ao tipo de EA:* Nesse caso utilizamos como exemplo a categoria *Abrigo*, onde podemos observar, principalmente na Área B um indivíduo utilizando o *Igloo*<sup>®</sup>.

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

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

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

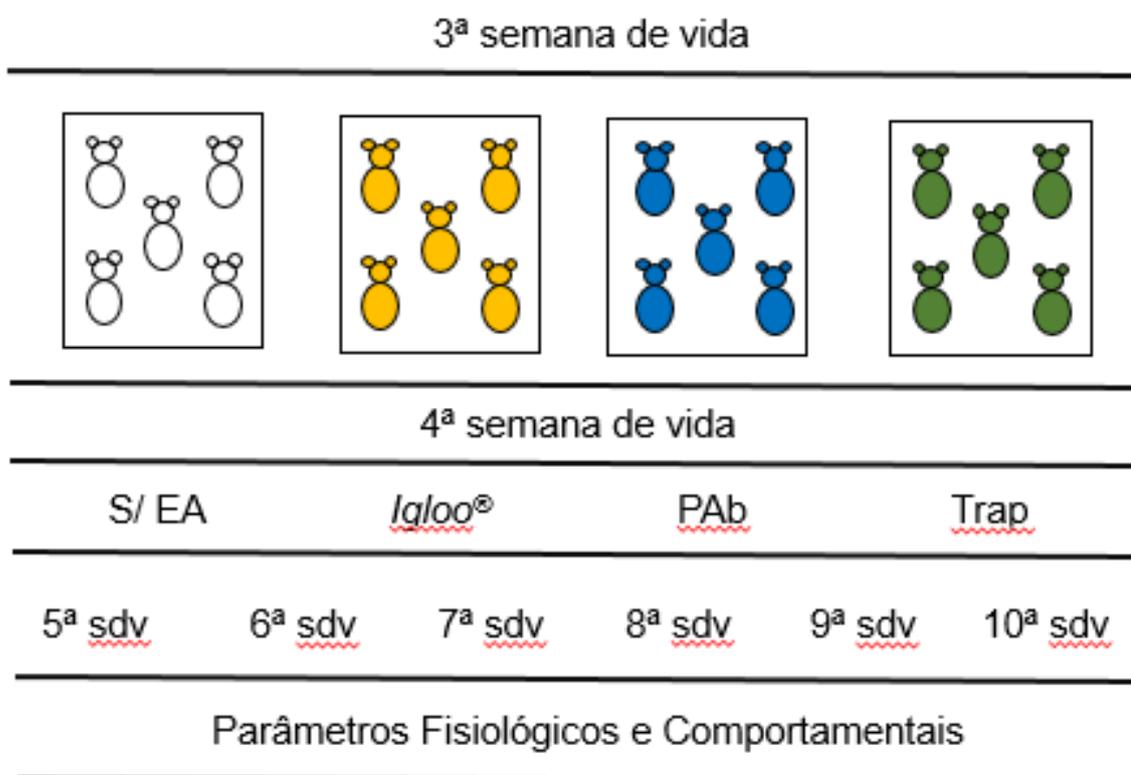
- **2ª parte:**

A segunda parte de nossa metodologia e do objetivo do nosso trabalho foi o de investigar qual seria a forma mais eficiente de uso em relação ao EA dos camundongos SW-M num biotério de experimentação.

Essa abordagem foi constituída da requisição de camundongos Swiss Webster ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ), machos e na idade de 3 semanas de vida. Esses camundongos foram recebidos e mantidos no Biotério de Experimentação Animal dos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos do Instituto Oswaldo Cruz sob condições de temperatura (20 a 22 °C), umidade (45 a 55%), fotoperíodo (12/12h) e troca de ar (25 trocas/hora), controlados pela utilização de estantes ventiladas. Previamente identificados por marcação temporária, em número de 5 indivíduos, foram albergados em gaiolas (composto de caixas de polissulfona convencionais pequenas e com grade de aço inoxidável e piso de raspa de madeira, a maravalha de *pinus*). Além disso, os animais receberam água filtrada e ração específica para roedores de laboratório *ad libitum*. Todos os procedimentos descritos nesse trabalho estão em conformidade com os princípios éticos, legislação nacional vigente e, aprovados pela Licença CEUA/IOC: L-004/16.

Diferentemente do uso do SGI, com o qual possibilitou a “escolha” do animal por dois equipamentos/materiais de cada categoria simultaneamente, nesse caso, nosso objetivo de estudo foi determinar, a partir do EA preferido a melhor forma de uso do EA pelo grupo de camundongos. Dessa forma, em resumo, realizamos o seguinte Esquema 3:

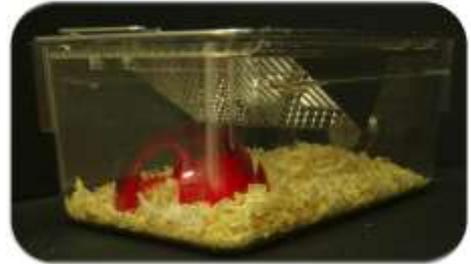
**Esquema 3:** Estrutura de avaliação para a metodologia de uso do EA:



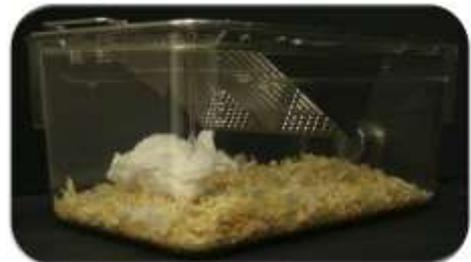
Conforme o esquema descrito acima, realizamos a comparação entre quatro grupos com diferentes tipos de EA desde a infância até a idade adulta:

**G1:** Ausente de Enriquecimento Ambiental (S/ EA);

**G2:** Inserção do *Igloo*<sup>®</sup>;



**G3:** Uso do Papel Absorvente (PAb);

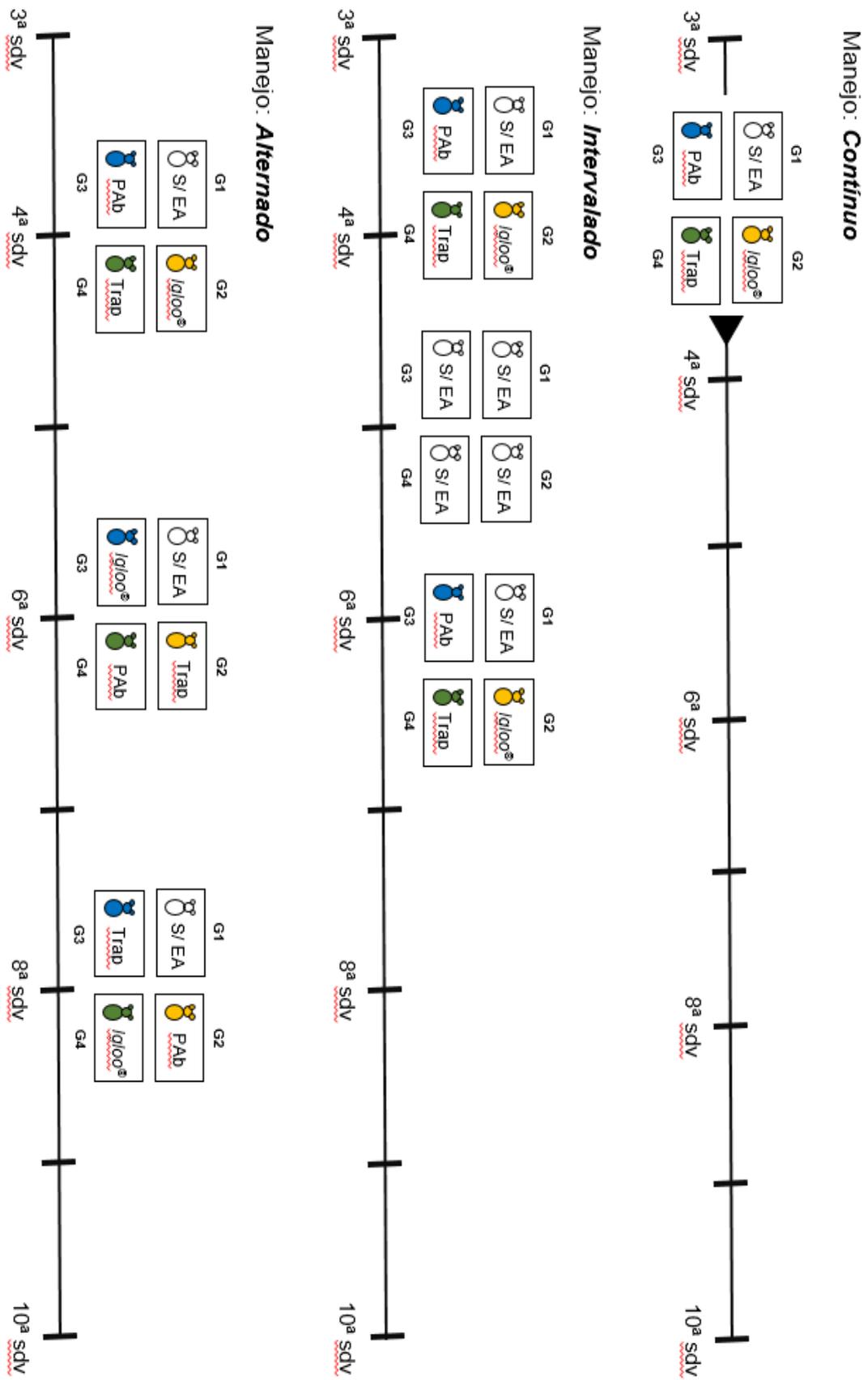


**G4:** Utilização do Trapézio;



Por fim, realizamos a comparação entre três tipos diferentes de metodologias através da inserção dos tipos preferidos de EA, nesse momento de forma a acompanhar o mesmo grupo, e conseqüentemente, os seus indivíduos, desde a idade de infante até a idade adulta (Fig. 4).

**Figura 4:** Tipos diferentes de metodologias para o uso de EA



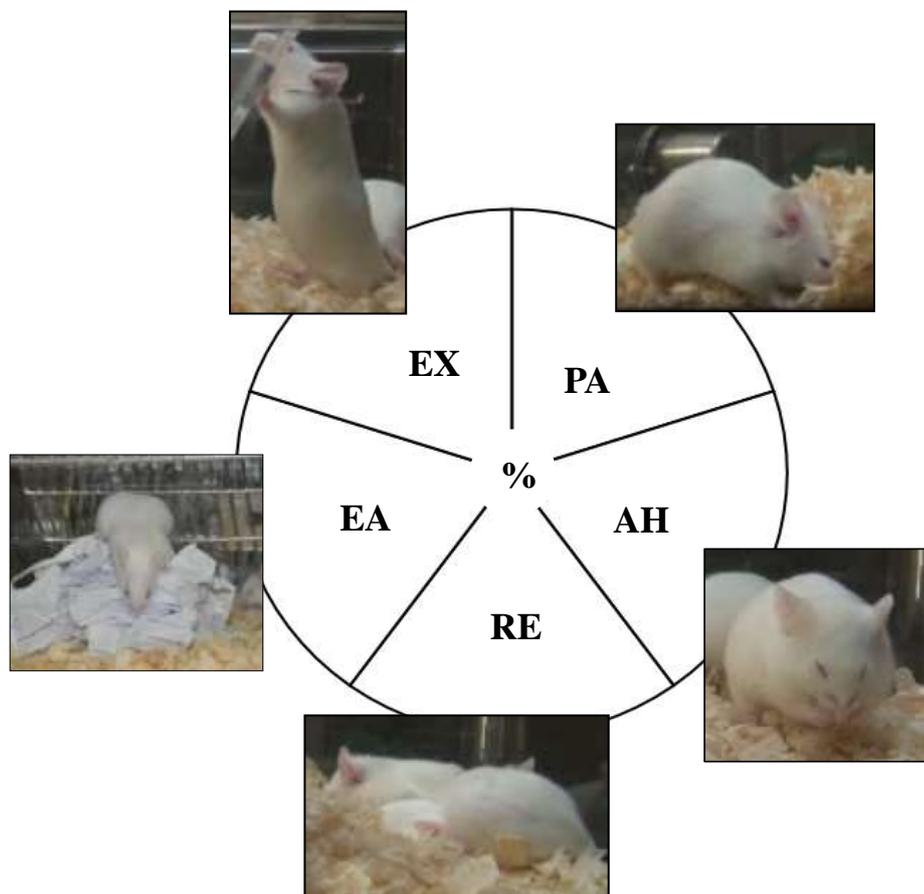
Complementando nosso desenho experimental, realizamos na 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup>, e 10<sup>a</sup> sdv a avaliação comparativa dos seguintes parâmetros fisiológicos e comportamentais entre os grupos em cada forma de manejo:

- a) Peso corporal (gramas) e ganho de peso entre as semanas (%);
- b) Consumo médio de alimentos: água (ml) e ração (gramas);
- c) Relação entre o consumo de alimentos e o ganho de peso;
- d) Quantificação do uso (número de eventos) e tempo de utilização (segundos) de cada tipo de EA;
- e) Etograma;
- f) Avaliação da reação emocional do animal frente aos diferentes tipos de manejo de uso de EA pelo Teste da Suspensão da Cauda (TSC);
- g) Pesagem dos principais órgãos dos animais: Cérebro, coração, fígado e intestino (gramas);

#### **4. Etograma:**

O etograma foi estruturado através da quantificação das principais atividades dos camundongos em biotério. Essa avaliação foi mensurada através das filmagens, determinando-se o percentual (%) de incidência das respectivas atividades: a) Exploração do ambiente (EX); b) Procura por alimento (PA); c) Auto-higienização (AH); d) Repouso (Re) e (e) uso do respectivo enriquecimento (EA) em 60 minutos de filmagem para a avaliação de preferência no SGI e na gaiola isolada e por 8h consecutivas na 10<sup>a</sup> sdv para a avaliação das diferentes metodologias (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> parte,

respectivamente). O objetivo da avaliação das atividades dos camundongos no SGI e na gaiola isolada (relacionada aos diferentes tipos de manejo) foi comparar se a presença do EA (Controle Negativo – ausente de EA) poderia interferir, ou comprometer a execução dos hábitos e o comportamento individual e social dos animais, o que seria indesejado conforme sugerido na RN N° 33 do CONCEA. Na figura 5, ilustramos as principais atividades quantificadas no etograma.



**Figura 5:** Ilustração da metodologia de quantificação da incidência de atividades do etograma: Através da análise da filmagem, num período total de 60 minutos, quantificamos a incidência, num total percentual de atividade, dos respectivos comportamentos que comporiam o etograma.

## 5. Análises Estatísticas:

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

## **RESULTADOS**

Nossas principais abordagens foram baseadas em descobrir qual o tipo de EA preferido pelos camundongos SW-M e qual a melhor forma de uso, ou melhor, como a forma mais eficiente de oferecer o EA durante a rotina de manejo dos animais num biotério de experimentação.

No Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz desenvolvemos um equipamento, com o qual denominamos de Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI). Além disso, estruturamos uma metodologia específica para possibilitar aos animais demonstrar a sua preferência a um par de EA, dividido em três categorias e em três diferentes idades. Mensuramos o período inicial de interação e ao final, através do uso por 5 dias de utilização.

Toda nossa avaliação foi registrada através de filmagens contínuas e regulares e a qualificação/quantificação de uso foi individualizada, através da identificação de cada animal que compôs o grupo em suas diferentes idades. Isso nos permitiu, além de determinar a preferência pelo tipo de EA utilizado pelo camundongo SW-M, em suas diferentes idades, também permitiu estruturar um etograma com o qual foi possível avaliar qual a influência do uso do EA no comportamento individual e social dos animais ao final da interação com o respectivo tipo preferido de EA.

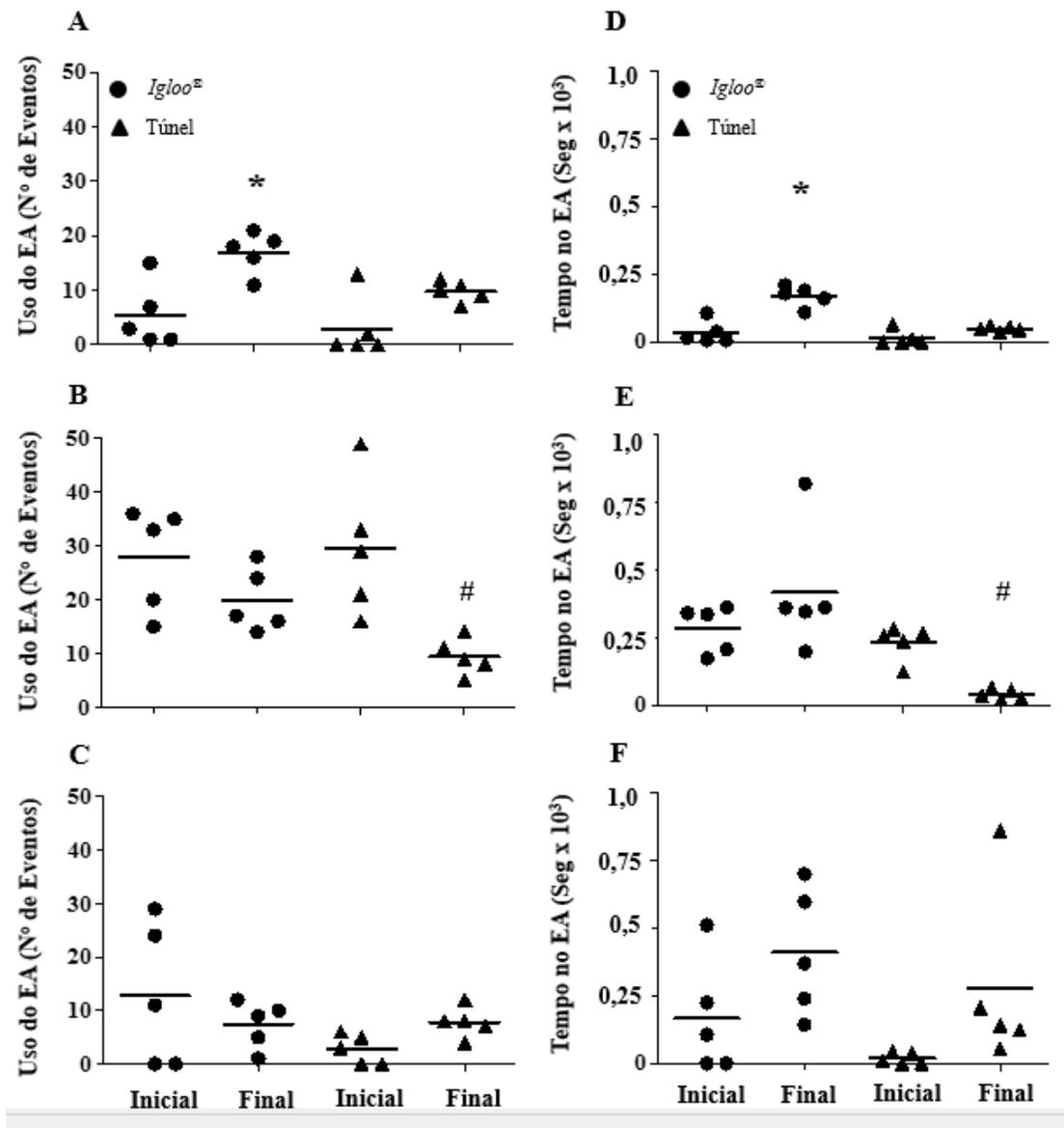
Após a determinação do tipo preferido de EA pelos animais, um importante ponto no uso de EA foi questionado pelo nosso grupo de pesquisa. Como o animal poderia utilizar de forma mais eficiente o EA durante a rotina de manejo dos camundongos em um biotério de experimentação. Definimos como um uso eficiente do EA, três diferentes modelos de utilização: a) Uso Contínuo, composto da permanência de três diferentes tipos preferidos de EA (um para cada grupo) desde a sua infância até a idade adulta; b) Uso com Intervalos (Intervalado), esse modo

baseou-se na inserção, também de três tipos de EA, por uma semana e a retirada do equipamento/material por uma semana entre a 4ª e a 10ª semana de vida e c) Uso Alternado, no qual promovemos a colocação dos tipos de EA desde a infância até a idade adulta, porém realizamos um rodízio entre os grupos, colocando a cada semana um tipo diferente de EA.

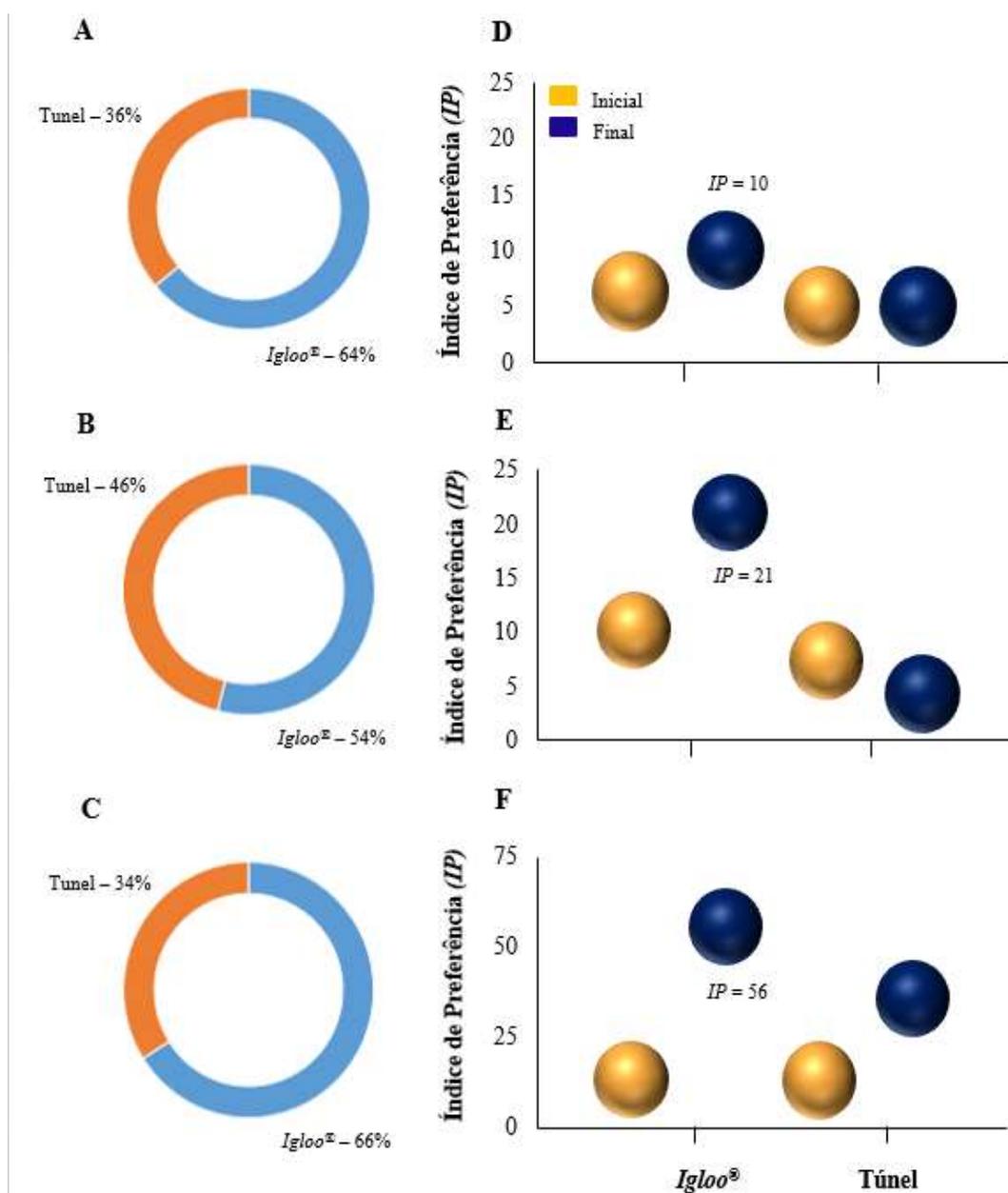
Nossos resultados demonstram que de forma geral os camundongos SW-M apresentam reduzido interesse ao uso de qualquer tipo de EA na idade de infante (4ª sdv), tendo como principal atividade comportamental o repouso (Re) observado durante o etograma. Na 6ª sdv há um expressivo aumento do interesse pelos tipos de EAs, porém de forma heterogênea, ou seja, a variação do interesse entre os indivíduos pela utilização do EA pode ser muito reduzida em alguns indivíduos e muito intenso em outros. Na idade adulta, esse interesse foi mantido, porém é visível que há uma estruturação hierárquica onde o dominante do grupo demonstra atitudes agressivas em relação aos outros indivíduos para o seu uso exclusivo do EA (principalmente do *Igloo*®), “permitindo” que alguns animais e em alguns momentos também possam utilizar o EA.

Durante a comparação entre o equipamento/material preferido pelos camundongos SW-M em biotério como EA durante sua dinâmica comportamental, iremos dividir nossos resultados por combinações.

Na categoria Abrigo, onde comparamos o *Igloo*® e o Túnel de PVC observamos os seguintes resultados:



**Figura 6:** Avaliação individual da interação com o EA na categoria de Abrigo. Na Combinação 1 (Igloo®, círculo vs Túnel de PVC, triângulo), pela análise das filmagens, mensuramos o uso de cada tipo do EA (A, B, C), através do número de eventos de interação entre cada animal e o material num tempo de 60 minutos. Também avaliamos o tempo dessa interação (em segundos) nos respectivos tipos de enriquecimento ambiental (D, E e F). Essas avaliações foram realizadas através da observação individual dos camundongos em suas diferentes idades: Grupo 1, na 4ª sdv (A e D); Grupo 2, na 6ª sdv (B e E) e Grupo 3, 8ª sdv (C e F). Demonstramos nessas figuras, os resultados da interação no Dia 0 (Inicial) e no Dia 5 (Final), onde cada símbolo correlaciona-se a um único indivíduo e o traço o valor médio do grupo. \* demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela maior preferência pelo Igloo do grupo de animais na 4ª sdv no final do tempo de interação em relação aos demais parâmetros estudados. # demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela menor preferência pelo Túnel de PVC do grupo de animais na 6ª sdv no final do tempo de interação em relação aos demais parâmetros estudados.



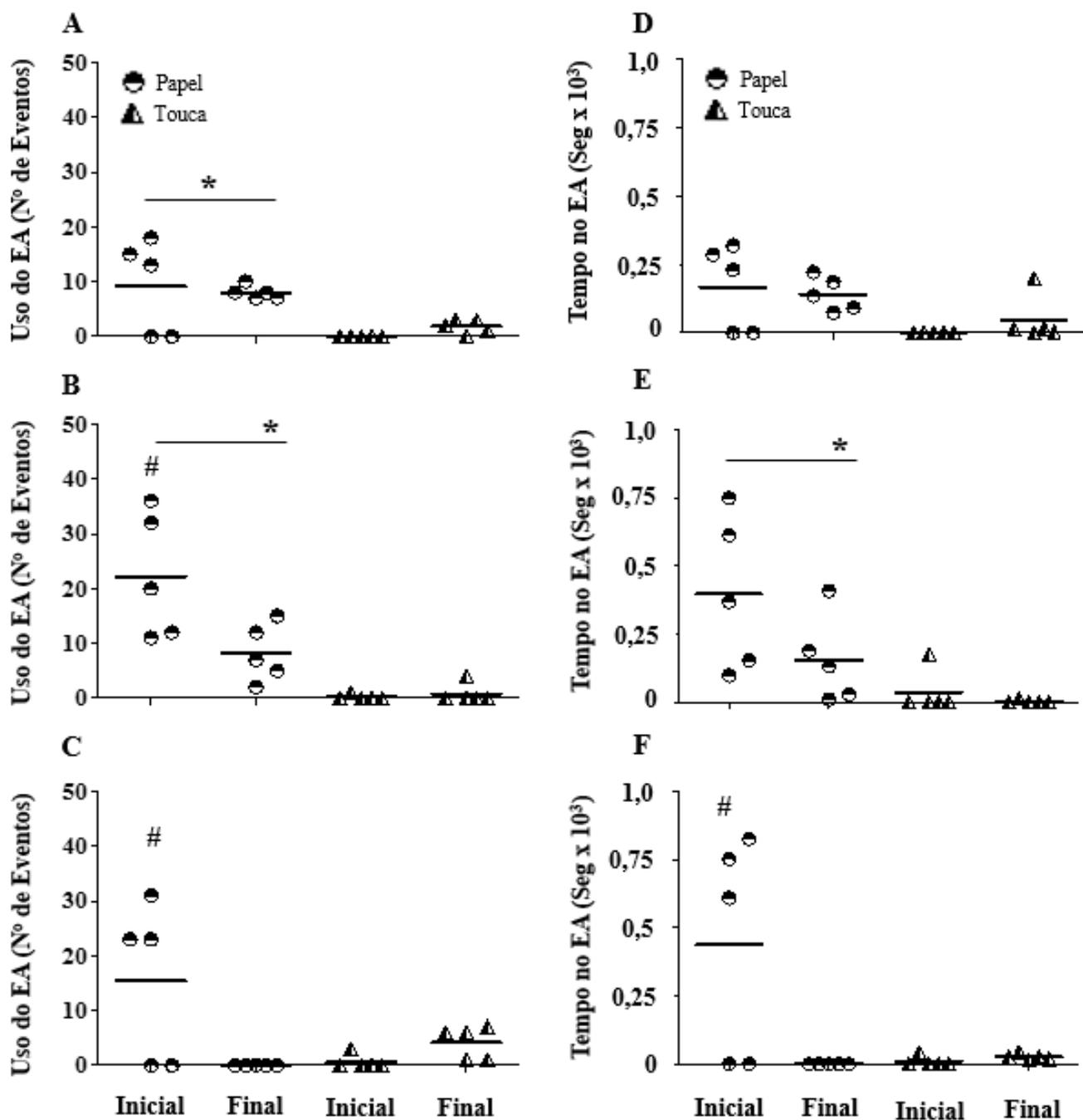
**Figura 7:** Determinação da preferência pelo EA na categoria Abrigo. Através da avaliação dos nossos resultados, buscamos ilustrar por duas formas a preferência dos camundongos Swiss Webster, nas idades de 4ª sdv (A e D), 6ª sdv (B e E) e 8ª sdv (C e F), pelo tipo de EA, na categoria Abrigo. Calculamos o valor médio em percentual (%) para a incidência de uso (A, B e C) dos animais em relação ao Igloo® (Faixa Azul) e o Túnel de PVC (Faixa Laranja). Calculamos o Índice de Preferência através da relação entre uso/tempo obtendo o índice que denominamos de IP (D, E e F), dessa forma determinamos a preferência de interação dos camundongos ao tipo de EA (Igloo® e Túnel de PVC) entre o momento Inicial (Círculo Amarelo) e Final (Círculo Azul Escuro). O valor maior de IP está descrito na figura demonstrando a maior preferência do grupo de animais pelo tipo de EA em nosso desenho experimental.

Na categoria Abrigo, comparando o *Igloo*<sup>®</sup> e o Túnel de PVC, houve uma preferência marcante, principalmente entre os camundongos jovens e adultos pelo equipamento *Igloo* quando comparado ao Túnel de PVC. Essa preferência foi evidenciada tanto no momento inicial de inserção do respectivo tipo de EA, quanto ao final de 5 dias de interação (Fig. 6). Além disso, a relação entre o uso e o tempo de uso demonstra claramente que o *Igloo*<sup>®</sup> é o equipamento do tipo abrigo que o camundongo SW-M em biotério mais utiliza e mais gasta o tempo utilizando-o (Fig. 7).

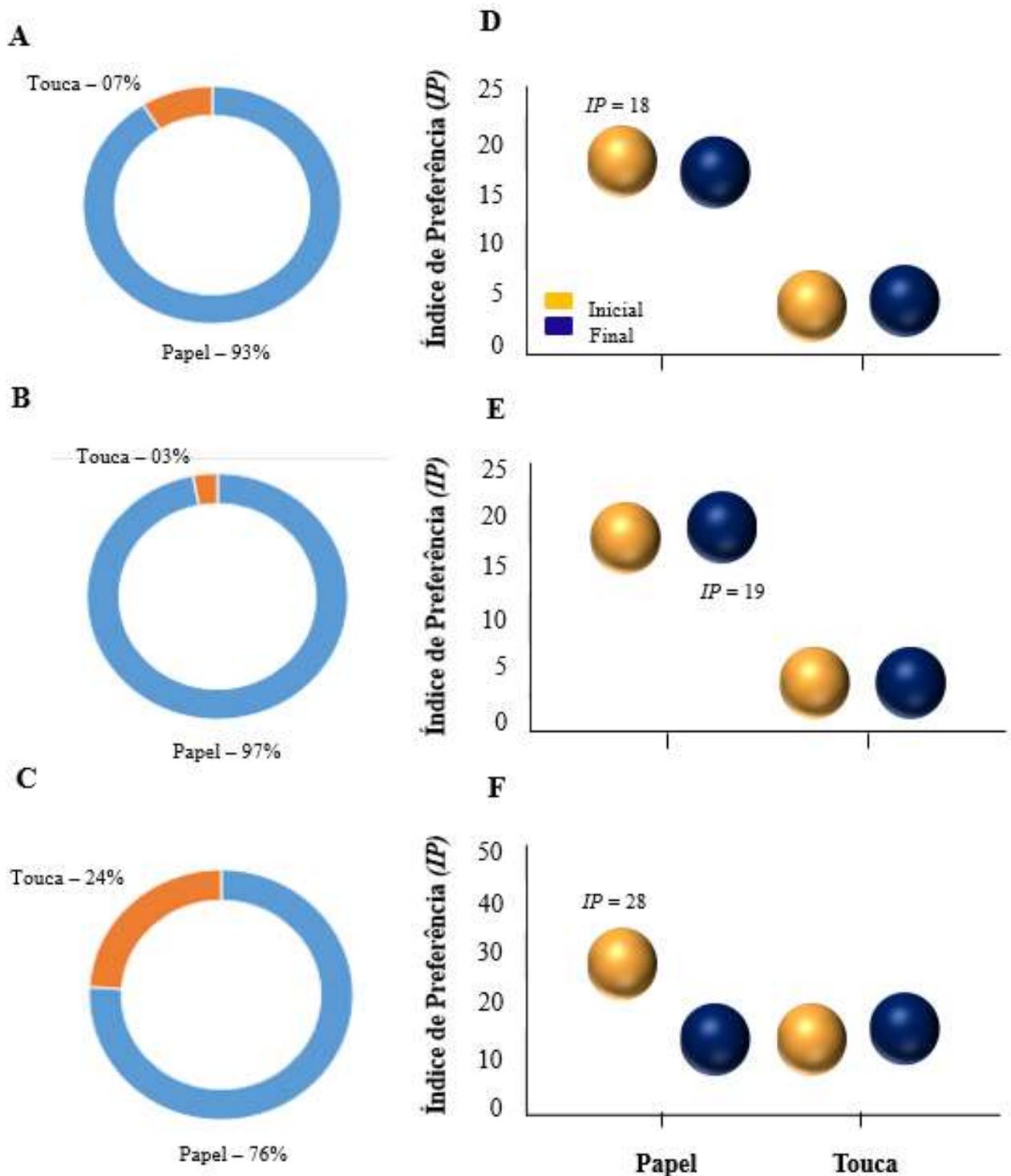
Em relação ao Túnel de PVC, ressaltamos que a sua utilização foi mais observada como apoio para subir em cima do EA e também quando alguns indivíduos entravam no Túnel de PVC e permaneciam por relativo tempo dentro, principalmente durante a ocorrência de episódios de agressividade no interior do grupo.

Dessa forma podemos afirmar que o Abrigo é uma categoria de EA altamente utilizada pelos camundongos SW-M em biotério e que o *Igloo*<sup>®</sup> é o tipo de abrigo preferido quando comparado com outros da mesma categoria, em nosso caso o Túnel de PVC.

Dando continuidade a avaliação de preferência entre os tipos de EA escolhidos pelo camundongo em biotério, confrontamos a comparação na categoria de nidificação o interesse entre o Papel Absorvente e a Touca Cirúrgica através do SGI. O Papel Absorvente foi utilizado a partir da separação do papel absorvente comum para enxugar as mãos e juntamos duas a três folhas e o amassamos até o formato de uma “bola de papel”, dessa forma inserimos na respectiva área do SGI. A Touca Cirúrgica foi colocada após ser “aberta”, também em sua respectiva área. Na figura 8, observamos que desde a sua apresentação e após 5 dias de interação o Papel Absorvente foi altamente utilizado. Destacamos que os camundongos na 8ª sdv, após 5 dias tornam o material como parte do piso da gaiola, diminuindo assim significativamente o seu uso.



**Figura 8:** Avaliação individual da interação com o EA na categoria de Nidificação. Na combinação 2 (Círculo PB Papel Absorvente vs Triângulo PB Touca Cirúrgica), pela análise das filmagens, mensuramos o uso de cada tipo do EA (A, B e C) através do número de eventos de interação entre cada animal e o material num tempo de 60 minutos. Também avaliamos o tempo dessa interação (em segundos) nos respectivos tipos de EA (D, E e F). Essas avaliações foram realizadas através da observação individual dos camundongos em suas diferentes idades: Grupo 1, na 4ª sdv (A e D); Grupo 2, na 6ª sdv (B e E) e Grupo 3, 8ª sdv (C e F). Demonstramos nessas figuras, os resultados da interação no Dia 0 (Inicial) e no Dia 5 (Final), onde cada símbolo correlaciona-se a um único indivíduo e o traço o valor médio do grupo. \* demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela maior preferência pelo Papel Absorvente dos grupos de animais na 4ª, 6ª e 8ª sdv, no início e no final do tempo de interação em relação aos outros parâmetros. # demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela maior preferência ao Papel Absorvente pelos grupos de animais na 6ª e 8ª sdv, somente ao período Inicial em relação aos demais parâmetros

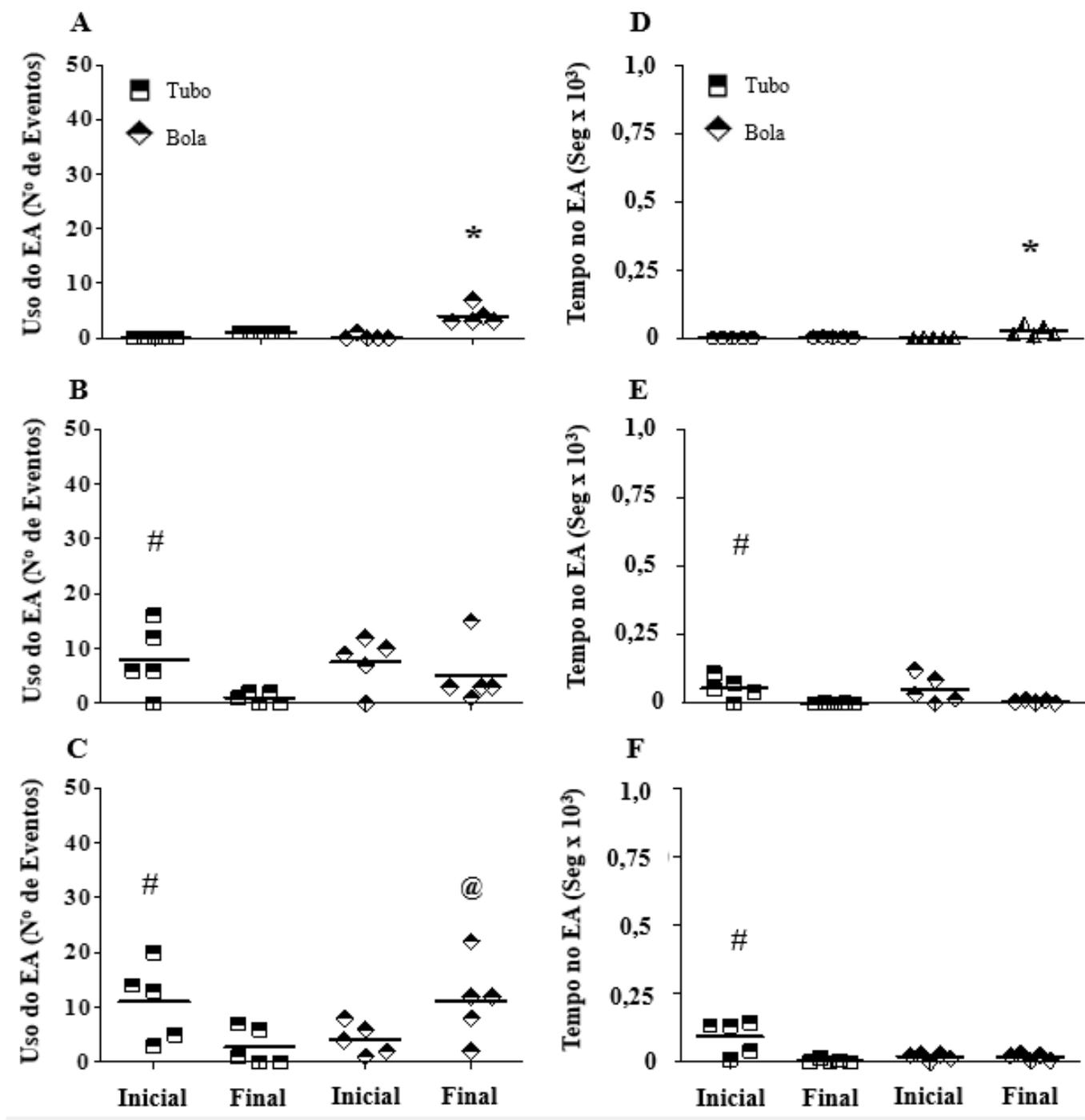


**Figura 9:** Determinação da preferência pelo EA na categoria Nidificação. Através da avaliação dos nossos resultados, buscamos ilustrar por duas formas a preferência dos camundongos Swiss Webster, nas idades de 4ª sdv (A e D), 6ª sdv (B e E) e 8ª sdv (C e F), pelo tipo de EA, na categoria Nidificação. Calculamos o valor médio em percentual (%) para a incidência de uso (A, B e C) dos animais em relação ao Papel Absorvente (Faixa Azul) e o Touca Cirúrgica (Faixa Laranja). Calculamos o Índice de Preferência através da relação entre uso/tempo obtendo o índice que denominamos de IP (D, E e F), dessa forma determinamos a preferência de interação dos camundongos ao tipo de enriquecimento ambiental (Papel Absorvente e Touca Cirúrgica) entre o momento Inicial (Círculo Amarelo) e Final (Círculo Azul Escuro). O valor maior de IP está descrito na figura demonstrando a maior preferência do grupo de animais pelo tipo de enriquecimento ambiental em nosso desenho experimental.

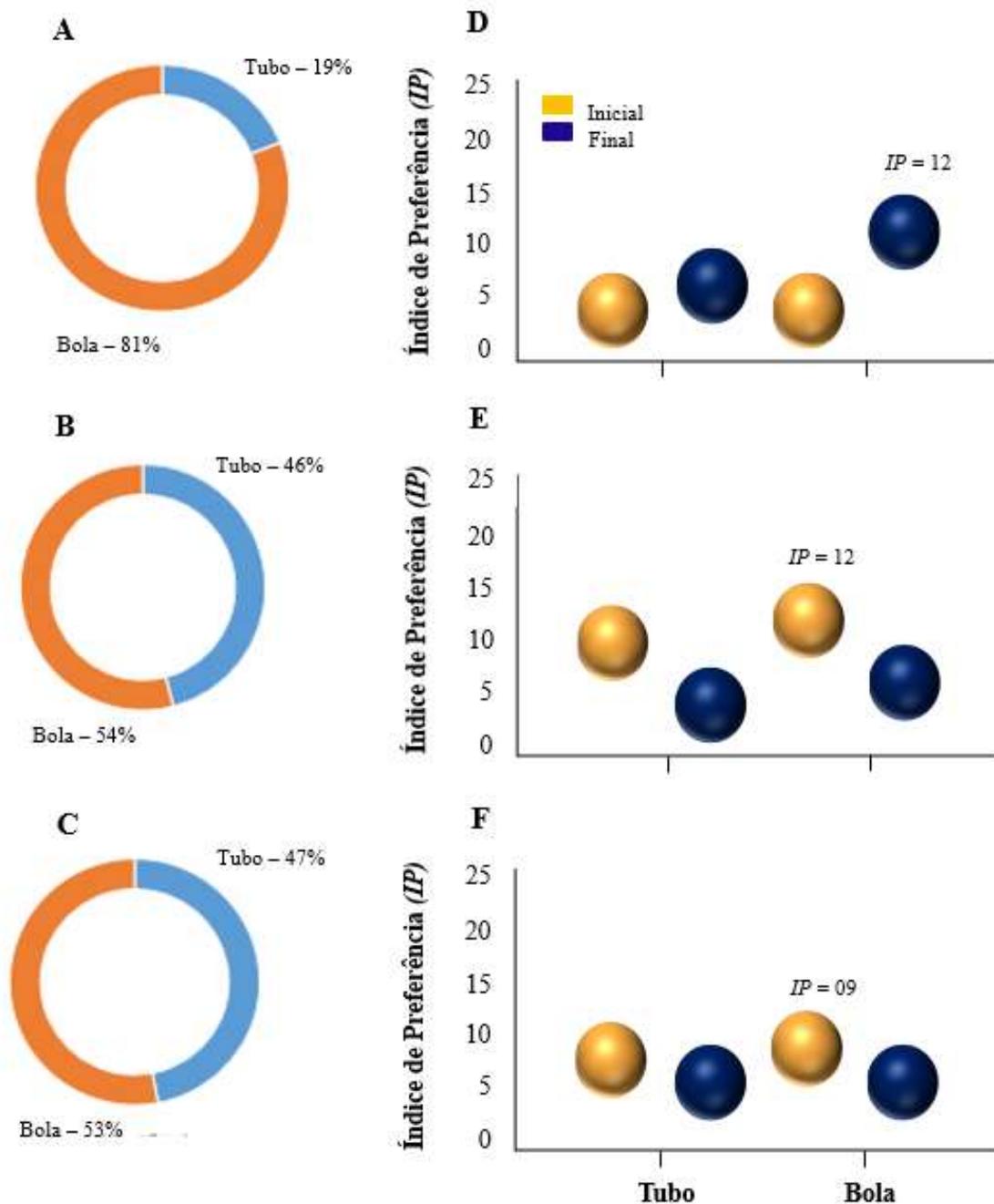
A Touca Cirúrgica promoveu pouco interesse aos animais, mesmo após 5 dias de interação quando comparado ao Papel Absorvente. Os camundongos SW-M em biotério utilizam intensamente o Papel Absorvente (Fig. 9). Esse fato pode ser descrito tanto no percentual de uso (70 a 90%) entre as idades a relação de uso/tempo ( $IP=28$ ), sendo maior nos indivíduos adultos no período inicial de interação. Devemos ressaltar que os camundongos na 8ª sdv demonstram um alto interesse quando foi inserido o material Papel Absorvente no seu ambiente, porém após 5 dias a utilização do Papel absorvente diminui significativamente. Durante a nossa observação, esse fato deveu-se a forma de manipulação do Papel Absorvente pelos indivíduos adultos. Esses animais rapidamente após a sua apresentação ao EA, realiza seu uso e com o passar do tempo torna a mesma parte do piso da gaiola, sendo assim, diminuindo as suas características de interação ( $IP = 10$ ).

Então, a partir dos nossos resultados podemos afirmar que o material da categoria Nidificação preferido como EA pelos camundongos SW-M em biotério foi o Papel Absorvente.

Finalizando essa primeira etapa, realizamos a avaliação da interação dos camundongos a objetos que pudessem estimular a Atividade Lúdica dos animais. Partimos do conceito de que alguns objetos que não tivessem uma função definida (fornecer abrigo ou a atividade de nidificação) pudesse estimular os camundongos a terem uma atividade comum encontrada em outros animais, como a de “brincar”.



**Figura 10:** Avaliação individual da interação com o EA na categoria de Atividade Lúdica. Na Combinação 3 (Quadrado PB Tubo com Guizo vs Losango PB Bola com Guizo), pela análise das filmagens, mensuramos o uso de cada tipo do EA (A, B e C) através do número de eventos de interação entre cada animal e o material num tempo de 60 minutos. Também avaliamos o tempo dessa interação (em segundos) nos respectivos tipos EA (D, E e F). Essas avaliações foram realizadas através da observação individual dos camundongos em suas diferentes idades: Grupo 1, na 4ª sdv (A e D); Grupo 2, na 6ª sdv (B e E) e Grupo 3, 8ª sdv (C e F). Demonstramos nessas figuras, os resultados da interação no Dia 0 (Inicial) e no Dia 5 (Final), onde cada símbolo correlaciona-se a um único indivíduo e o traço o valor médio do grupo. \* demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela maior preferência pela Bola com Guizo do grupo de animais na 4ª sdv no final do tempo de interação em relação aos outros parâmetros. # demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela maior preferência pelo Tubo com Guizo dos grupos de animais na 6ª e 8ª sdv somente ao período Inicial em relação aos demais parâmetros. @ demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela maior preferência pela Bola com Guizo do grupo de animais na 8ª sdv somente ao período Final em relação e os demais parâmetros.



**Figura 11:** Determinação da preferência pelo EA na categoria Atividade Lúdica. Através da avaliação dos nossos resultados, buscamos ilustrar por duas formas a preferência dos camundongos Swiss Webster, nas idades de 4ª sdv (A e D), 6ª sdv (B e E) e 8ª sdv (C e F), pelo tipo EA, na categoria Atividade Lúdica. Calculamos o valor médio em percentual (%) para a incidência de uso (A, B e C) dos animais em relação ao Tubo com Guizo (Faixa Azul) e a Bola com Guizo (Faixa Laranja). Calculamos o Índice de Preferência através da relação entre uso/tempo obtendo o índice que denominamos de *IP* (D, E e F), dessa forma determinamos a preferência de interação dos camundongos ao tipo de EA (Tubo com Guizo e Bola com Guizo) entre o momento Inicial (Círculo Amarelo) e Final (Círculo Azul Escuro). O valor maior de *IP* está descrito na figura demonstrando a maior preferência do grupo de animais pelo tipo de enriquecimento ambiental em nosso desenho experimental.

Realizamos então a comparação entre dois objetos, a Bola com Guizo e o Tubo com Guizo. A Bola com Guizo é comumente encontrada no mercado de animais domésticos (cães e gatos) e espera-se que o estímulo a sua interação ocorra através do seu formato e da sonoridade do guizo quando ela é movimentada. No caso do Tubo com Guizo, esse objeto foi confeccionado através da utilização de um pequeno tubo de PVC com pequenos furos e um guizo no seu interior. Após a colocação do guizo, realizamos o fechamento das pontas do tubo com duas conexões, também de PVC.

Interessantemente, em todas as idades estudadas, mesmo no período inicial quanto no período final os objetos (Bola com Guizo e Tubo com Guizo) não promoveu aos animais maior interesse no seu uso como EA (Fig. 10). Interessantemente, os camundongos adultos demonstraram um reduzido interesse pelo Tubo com Guizo quando foram apresentados ao objeto (Inicial) e também, de forma reduzida, utilizaram a Bola com Guizo após o período de 5 dias de interação. Contudo, em comparação as demais categorias (Abrigo e Nidificação) nossos resultados demonstram um nível de interesse muito inferior.

Quando realizamos a comparação entre esses dois objetos (Fig. 11) os resultados tentem a demonstrar um percentual maior de interação com a Bola com Guizo na idade de 4 sdv (81%), porém nas demais idades (jovem e adulto) a utilização é semelhante (aproximadamente 50% para cada objeto).

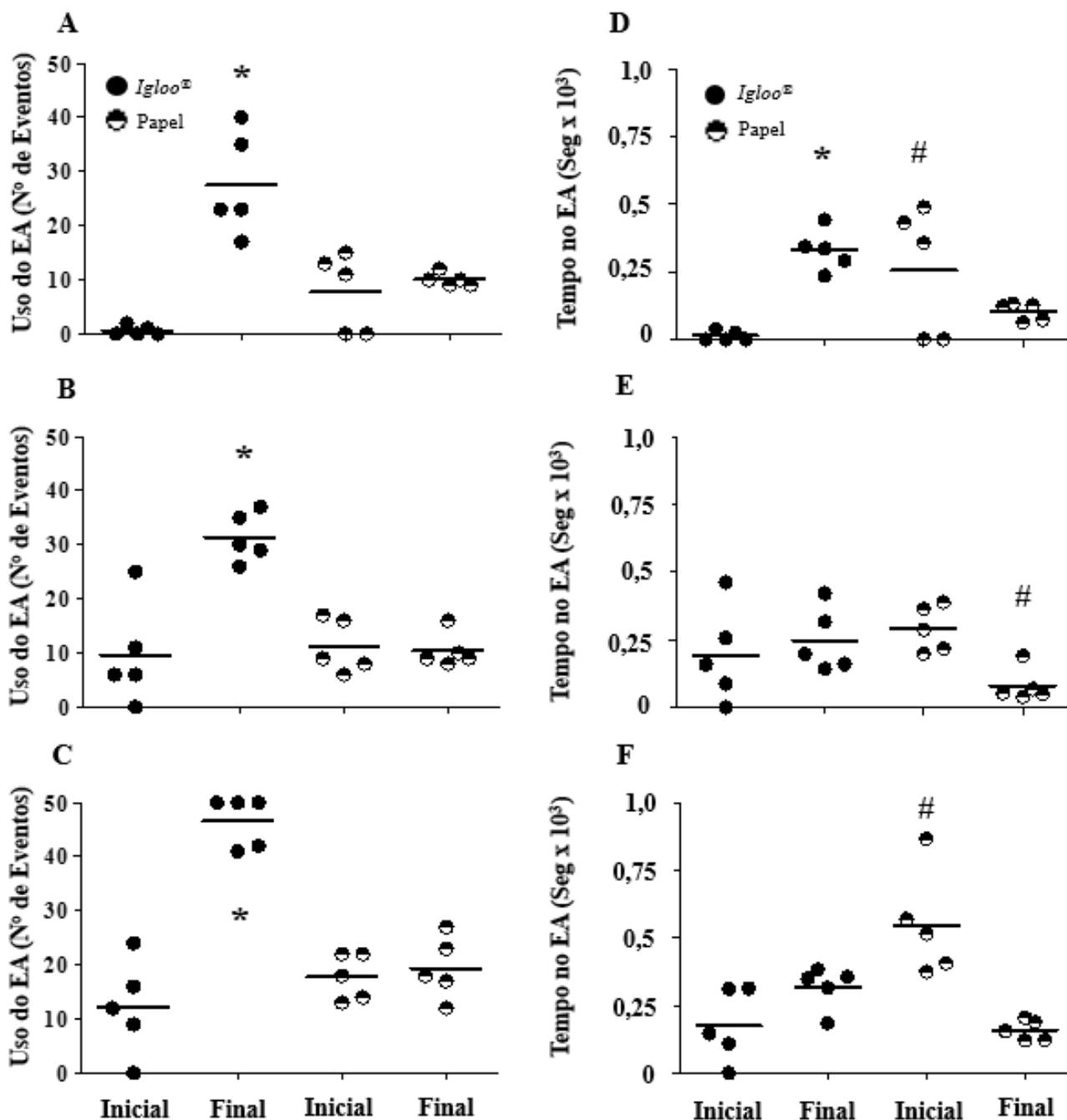
Além disso, a relação entre uso/tempo é muito baixa. Os camundongos SW-M em biotério demonstraram um resultado de *IP* entre 9 e 12 a depender da idade e do período inicial e final, somente com a Bola com Guizo. Isso demonstra que apesar da interação com o Tubo com Guizo, os animais passaram um pouco mais de tempo interagindo com a Bola com Guizo.

Então partimos para a segunda etapa de avaliação na qual comparamos os objetos/materiais preferidos de cada categoria (Abrigo, Nidificação e Atividade Lúdica) entre eles através do SGI.

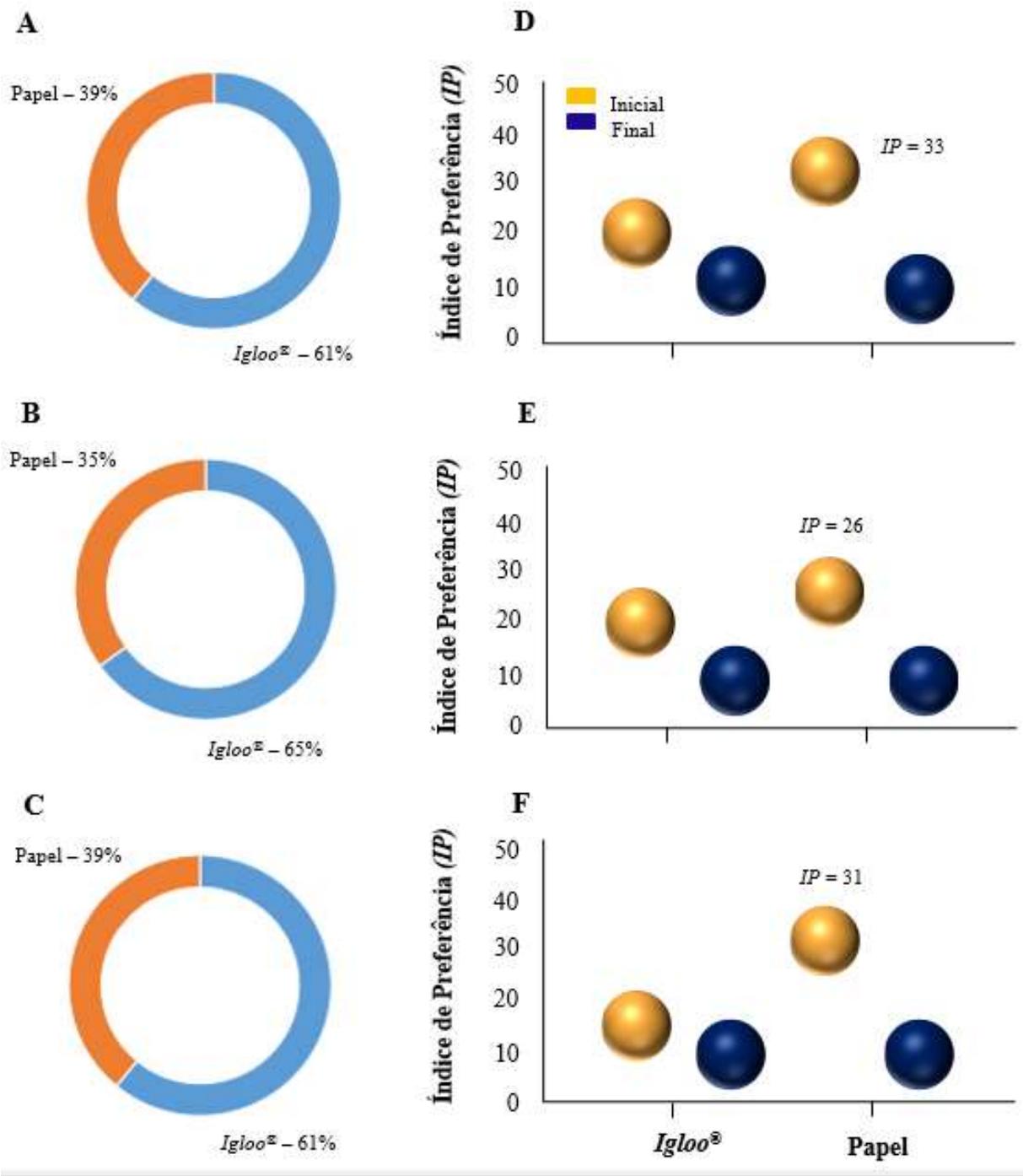
Primeiramente realizamos a comparação entre o *Igloo*<sup>®</sup> e o Papel Absorvente, que foram, respectivamente os dois objetos/materiais preferidos ao uso como EA pelos camundongos SW-M em biotério. Então dessa forma, confrontamos a seguinte questão: o camundongo em biotério prefere o EA que promova o Abrigo ou que estimule a Nidificação?

Nossos resultados demonstraram que tanto o *Igloo*<sup>®</sup> utilizado como Abrigo num EA, quanto o Papel Absorvente foram amplamente utilizados. Além disso, não foi possível definir uma clara preferência entre os objetos/materiais. Quando colocamos, um objeto em cada área do SGI, pudemos observar que, quando há a possibilidade de escolha os camundongos utilizam os dois, um pouco de cada, ou cada um num pouco de tempo. Podemos dizer através dos gráficos que o *Igloo*<sup>®</sup> após 5 dias de interação estimula um pouco mais o uso dos animais, principalmente de animais na idade adulta. No entanto, o tempo de uso do Papel Absorvente foi igual ou superior ao uso do *Igloo*<sup>®</sup>, principalmente quando levamos em conta que em 5 dias de uso a tendência de manipulação do Papel Absorvente é tornar-se parte do piso da gaiola (Fig. 12).

Esses dados tornam-se mais evidente quando observamos que o percentual de uso do *Igloo*<sup>®</sup> em todas as idades foi de aproximadamente 60% quando comparado com o Papel Absorvente. No entanto a relação uso/tempo descreve que quando esse material é colocado na gaiola os animais apresentam um *IP* por volta de 30, o que poderíamos interpretar que o Papel Absorvente quando inserido na gaiola desperta uma grande curiosidade, interesse de utilização pelo respectivo de EA, tanto pela sua manipulação quanto pelo gasto de tempo em que se usa o Papel Absorvente (Fig. 13).



**Figura 12:** Determinação do objeto/material preferido pelos animais para uso como EA: Através da seleção de categorias realizamos a comparação individual entre o objeto preferido da categoria Abrigo (Círculo Preto - *Igloo*<sup>®</sup>) e da categoria Nidificação (Círculo PB - Papel Absorvente). Mensuramos o uso de cada tipo do enriquecimento ambiental (A, B e C) através do número de eventos de interação entre cada animal e o material num tempo de 60 minutos. Também avaliamos o tempo dessa interação (em segundos) entre os respectivos tipos EA (D, E e F). Essas avaliações foram realizadas através da observação individual dos camundongos em suas diferentes idades da Combinação 4: Grupo 1, na 4<sup>a</sup> sdv (A e D); Grupo 2, na 6<sup>a</sup> sdv (B e E) e Grupo 3, 8<sup>a</sup> sdv (C e F). Demonstramos nessas figuras, os resultados da interação no Dia 0 (Inicial) e no Dia 5 (Final), onde cada símbolo correlaciona-se a um único indivíduo e o traço o valor médio do grupo. \* demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela maior preferência pelo *Igloo*<sup>®</sup> entre os grupos de animais na 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> sdv, no final do tempo de interação em relação aos outros parâmetros. # demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela maior preferência ao Papel Absorvente pelos grupos de animais na 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> sdv, nos períodos inicial e final em relação aos demais parâmetros.

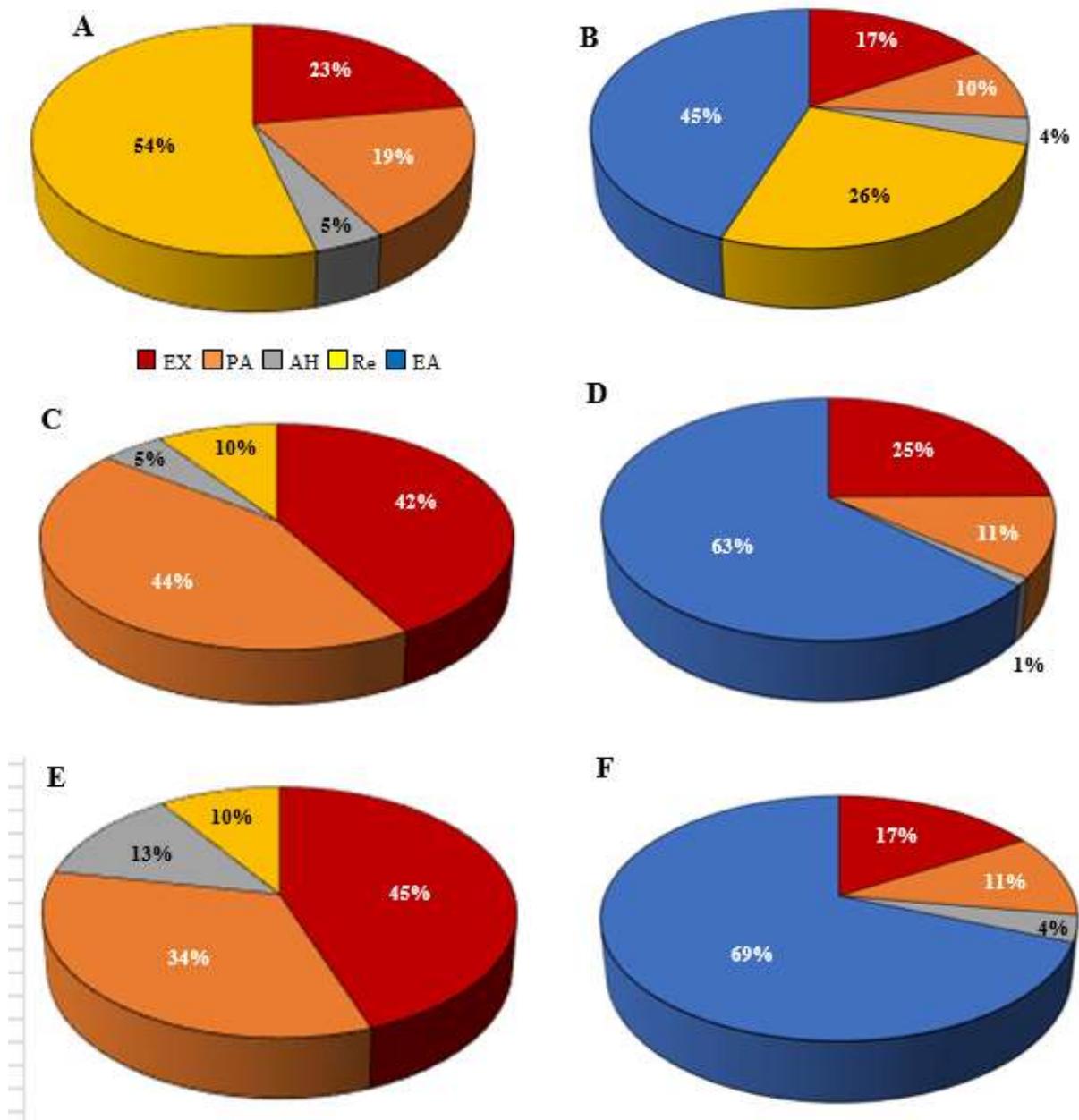


**Figura 13:** Definição da preferência pelo tipo de EA utilizado por camundongos da Swiss Webster Outbred stock. Através da avaliação dos nossos resultados, buscamos ilustrar por duas formas a preferência dos animais, nas idades de 4ª sdv (A e D), 6ª sdv (B e E) e 8ª sdv (C e F), pelo objeto/matéria de EA preferido pelos indivíduos. Calculamos o valor médio em percentual (%) para a incidência de uso (A, B e C) dos animais em relação ao *Igloo*® (Faixa Azul) e o Papel Absorvente (Faixa Laranja). Calculamos o Índice de Preferência através da relação entre uso/tempo obtendo o índice que denominamos de *IP* (D, E e F), dessa forma determinamos a preferência de interação dos camundongos ao tipo de enriquecimento ambiental (*Igloo*® vs Papel Absorvente) entre o momento Inicial (Círculo Amarelo) e Final (Círculo Azul Escuro). O valor maior de *IP* está descrito na figura demonstrando a maior preferência do grupo de animais pelo objeto/material de enriquecimento ambiental em nosso desenho experimental (Combinação 4).

Após a determinação da preferência do EA, foi feito um estudo de qual seria a influência desses equipamentos/materiais no ambiente e na dinâmica de interação individual e social do comportamento de camundongos Swiss Webster (Fig. 14). Na 4ª sdv, na ausência do EA a atividade de maior incidência entre os animais foi o Re (54%), seguido de EX (23%), PA (19%) e AH (5%).

Quando inserimos os EAs (*Igloo*<sup>®</sup> e Papel Absorvente) no SGI, o etograma demonstra que  $\frac{1}{4}$  da incidência de comportamentos relacionados a não utilização dos EAs foi relacionada ao repouso (26%). Contudo, 45% da frequência das atividades foram relacionadas ao uso de EA, diminuindo a EX (17%), PA (10%) e AH (4%). Os camundongos jovens, na ausência de EA apresentam maior incidência de atividades relacionadas à PA (44%) e EX (42%) e pouco descansam (Re – 10%). Porém na presença do *Igloo*<sup>®</sup> e do papel absorvente no SGI, promovem um grande interesse dos animais aos EAs (63%) e diminui a frequência de atividades como PA (11%) e EX (25%).

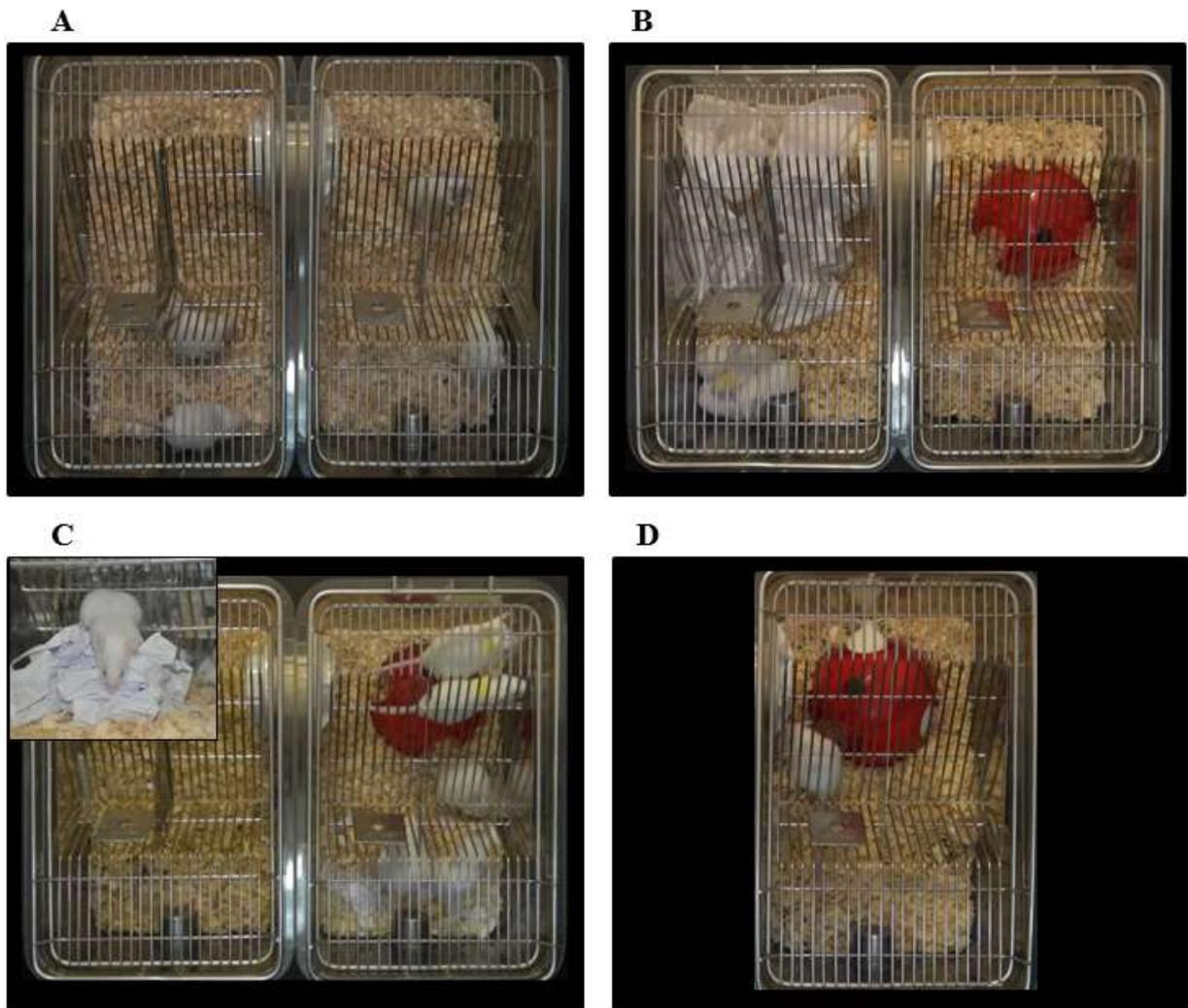
De forma similar, esses resultados, podem ser observados nos indivíduos adultos. Na ausência de EA, a EX (45%) é o comportamento com maior incidência, seguido da PA (34%). Os camundongos na 8ª sdv apresentam um alto interesse pelo EA, corroborando os dados descritos nessa dissertação. A utilização do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



**Figura 14:** Etograma dos camundongos Swiss Webster através da utilização do SGI contendo os dois tipos de EA preferidos (*Igloo*<sup>®</sup> e Papel Absorvente). Através das filmagens, foi determinado a incidência dos principais comportamentos individuais, calculado pelos valores totais e expressado em percentual. A Combinação 4, contendo o *Igloo*<sup>®</sup> e o Papel Absorvente foi avaliado na 4<sup>a</sup> sdv (A e B), 6<sup>a</sup> sdv (C e D) e 8<sup>a</sup> sdv (E e F). O Etograma foi definido pelas seguintes atividades comportamentais: Exploração do Ambiente (EX – Vermelho); Procura por Alimento (PA – Laranja); Auto-Higienização (AH – Cinza); Repouso (Re – Amarelo) e Uso do Enriquecimento Ambiental (EA – Azul Escuro). Calculamos a incidência em 60 minutos das respectivas atividades entre o período Inicial e Final e determinamos pelo valor percentual (%) sendo relacionadas a comparação entre a ausência de enriquecimento ambiental no SGI (A, C, E) e a presença do *Igloo*<sup>®</sup> e Papel Absorvente (B, D, F) no SGI nas respectivas idades.

A utilização do SGI e a estruturação do modelo experimental possibilitaram elucidar a proposta do projeto. Os resultados demonstram que o *Igloo*<sup>®</sup> e o papel absorvente foram os objetos/materiais mais preferidos pelos camundongos SW-M em biotério. No decorrer do estudo e na captação das imagens e análise de dados, atitudes peculiares dos camundongos foram observadas (Fig. 15). Por exemplo, na primeira foto (Fig. 15A) é possível correlacionar que na ausência do EA os camundongos apresentaram maior incidência de comportamentos como exploração do ambiente (*rearing*) e procura de alimento (PA). Na figura 15B, principalmente em camundongos infantos (4<sup>a</sup> sdv), apesar da oferta de 2 tipos diferentes de EA, inicialmente, os indivíduos preferiram repousar em conjunto e não utilizaram o EA.

O uso do papel absorvente demonstrou aspectos interessantes, o primeiro baseia-se de que no início, o camundongo gostou de interagir com o material (foto no detalhe), porém após o período de 5 dias de interação, os indivíduos transformam o material semelhante a cama. Além disso, são capazes de transportar as folhas de papel da área A para a área B e interagir com os dois tipos de EAs numa mesma área. Sendo que essa interação, conforme descrita pelo *Igloo*<sup>®</sup>, seu uso é primordialmente de abrigo, porém principalmente na 6<sup>a</sup> sdv, os indivíduos utilizaram muito esse tipo de EA para subirem e realizarem a exploração do ambiente (Fig. 15C). Na idade adulta, uma das desvantagens do *Igloo*<sup>®</sup> foi que quatro animais ocuparam o abrigo e excluíram um indivíduo (Fig. 15D).



**Figura 15:** *Ilustração de situações peculiares observadas durante o uso dos diversos tipos de EA:* Durante as filmagens, foi possível observar comportamentos peculiares e marcantes dos animais durante sua interação com o EA através do SGI. O comportamento do camundongo Swiss Webster foi avaliado na presença e na ausência de EA (A). Após a colocação do EA no microambiente do animal, animais infantos demoram para iniciar sua interação com o objeto/material e preferem dormir em conjunto diretamente na cama da gaiola (B). Animais jovens, interagem de forma dinâmica e rápida com os materiais. Podem subir nas folhas de papel ou no *Igloo*<sup>®</sup>, ou também transportar as folhas entre as áreas (C). Na idade adulta, na relação de peso corporal e tamanho do abrigo demonstra que o número ideal de camundongos para o tipo de *Igloo*<sup>®</sup> utilizado são de 4 animais, pois tende a um indivíduo ser excluído do EA (D).

Nesse momento, nossas conclusões parciais baseiam-se em:

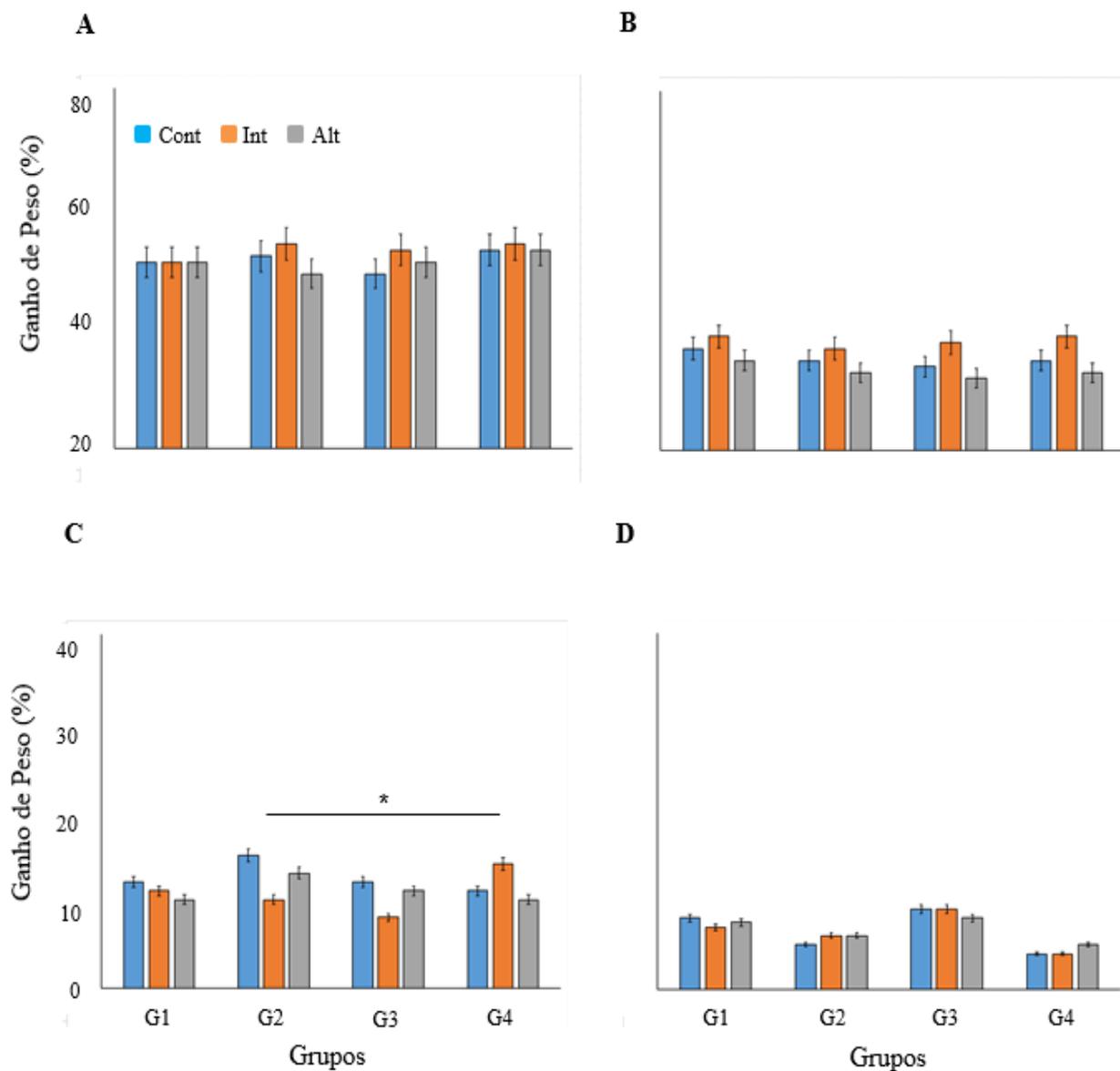
- A relação entre comportamento individual e social de camundongos em biotério, no que tange o Swiss Webster, e a utilização de equipamentos/materiais para o EA, objetos relacionados a categoria de Abrigo e Nidificação é melhor estimulada;
- A preferência de uso do EA dos camundongos na categoria de Abrigo está relacionada ao uso do *Igloo*<sup>®</sup> e na categoria de Nidificação direcionada ao Papel Absorvente. Na comparação de preferência pelos respectivos objetos/materiais de EA, tanto o *Igloo*<sup>®</sup> quanto o Papel Absorvente demonstram uma acentuada e dividida preferência pela sua utilização;
- A Bola com Guizo e o Tubo com Guizo, como objetos estimuladores de Atividade Lúdica não demonstraram ser eficientes na promoção de uso como tipos de EA. Esses resultados foram comprovados quando realizamos as demais Combinações da Etapa #2 (*Igloo*<sup>®</sup> vs Bola com Guizo e Papel Absorvente vs Bola com Guizo). Preferimos retirar esses dados da nossa publicação e substituir na próxima fase a Bola com Guizo pelo o objeto chamado de *Trapézio* que além de considerarmos como uma atividade lúdica promove um estímulo tátil e propriocepção;

A partir desse conjunto de dados nossa pergunta se tornou: Qual a melhor forma de manter os respectivos objetos/materiais preferidos (*Igloo*<sup>®</sup>, Papel Absorvente e o *Trapézio*) durante a rotina de manejo, manutenção e experimentação de camundongos SW-M em biotério?

Conforme descrito em nosso desenho experimental, acompanhamos 4 grupos de camundongos SW-M desde a sua 4ª sdv até a 10ª sdv. Sendo que, dividimos os animais em grupos de 5 indivíduos onde, a princípio, o primeiro grupo (G1) os camundongos não receberam nenhum tipo de EA, no Grupo 2 inserimos o *Igloo*®, o Papel Absorvente no Grupo 3 e o Trapézio no Grupo 4. Essa ordem foi mantida nos manejos Contínuo e Intervalado. No manejo Alternado, houve uma rotação entre G2, G3 e G4 nos quais cada grupo recebeu um EA diferente, não havendo interrupção da inclusão dos objetos/materiais de EA (*Igloo*®, Papel Absorvente e Trapézio).

Finalizamos cada ensaio na 10ª sdv e avaliamos parâmetros comportamentais/fisiológicos como o etograma, o Teste da Suspensão da Cauda e a pesagem dos principais órgãos dos animais (Cérebro, Coração, Fígado e Intestino) para podermos avaliar a possível influência do uso do EA e dos diferentes tipos de metodologias aplicadas na utilização de cada EA.

Nossos resultados demonstram que conforme o padrão do camundongo SW-M houve um maior percentual de ganho de peso na 4ª sdv e esse percentual se apresenta decrescente conforme o decorrer das semanas, ou seja, diminui gradativamente entre jovens e adultos. Em relação as diferentes metodologias e ao percentual semanal de ganho de peso não foi observado na 4ª, 6ª e 8ª sdv alterações significantes no ganho de peso dos animais nos diferentes tipos de manejo para o uso do EA aplicadas. No entanto, os camundongos adultos (8ª sdv) a utilização Intervalada de EA demonstrou uma significativa diminuição do percentual de ganho de peso quando comparado aos outros tipos de metodologias a Contínua e a Alternada (Fig. 16).



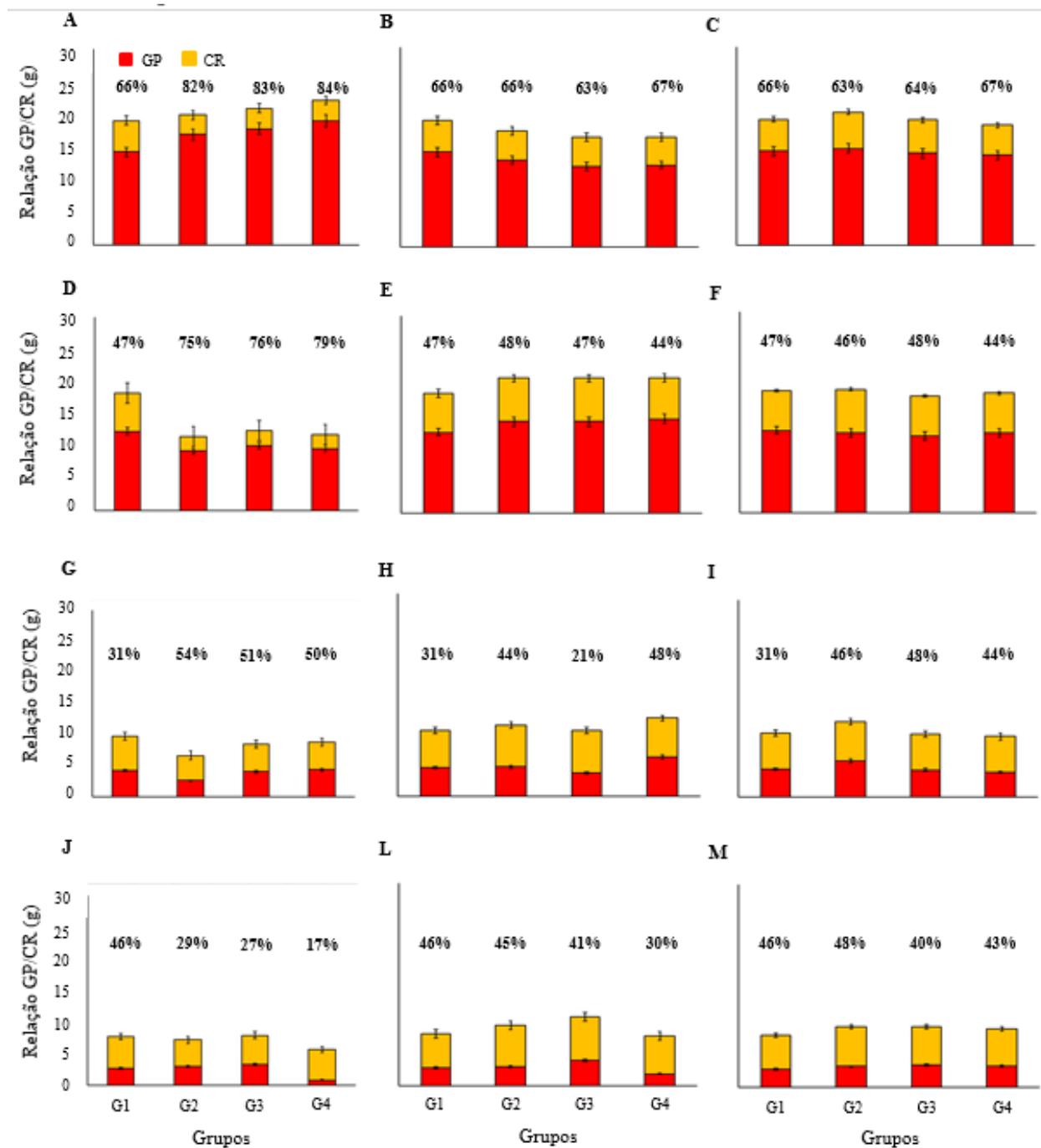
**Figura 16:** Avaliação do Percentual de Ganho de Peso: A partir do peso corporal individual e médio de cada grupo G1 (Sem EA), G2 (Igloo<sup>®</sup>), G3 (Papel Absorvente) e G4 (Trapézio), calculamos o percentual (%) de ganho de peso dos camundongos SW-M em biotério entre as idades estudadas: 4<sup>a</sup> sdv (A), 6<sup>a</sup> sdv (B), 8<sup>a</sup> sdv (C) e 10<sup>a</sup> sdv (D) para os diferentes métodos de manejo com o EA, ou seja, do tipo Contínuo (Barra Azul), Intervalado (Barra Laranja) e Alternado (Barra Cinza). \* demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela diferença do percentual de ganho de peso no método Intervalado quando comparado as outras categorias (Contínuo e Alternado) e entre os Grupos com EA (G2, G3 e G4).

Prosseguimos nossa avaliação nutricional através da relação estimada entre a quantidade individual de ração ingerida diariamente por cada animal e o seu ganho de peso. Nosso objetivo foi tentar avaliar a influência de cada objeto/material na eficiência da conversão de ingesta de alimento e aumento de peso dos animais.

A cada semana, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> sdv expressamos no mesmo gráfico duas barras para cada grupo. Uma barra (amarela) significa o valor médio da ingesta individual de ração e a barra vermelha está relacionada a ganho de peso corporal médio para o mesmo grupo na respectiva semana e comparando os diferentes tipos de metodologias de utilização de EA aplicadas. A estimativa dessa conversão foi expressa em percentual acima de cada conjunto de barras, ou de cada grupo (Fig. 17).

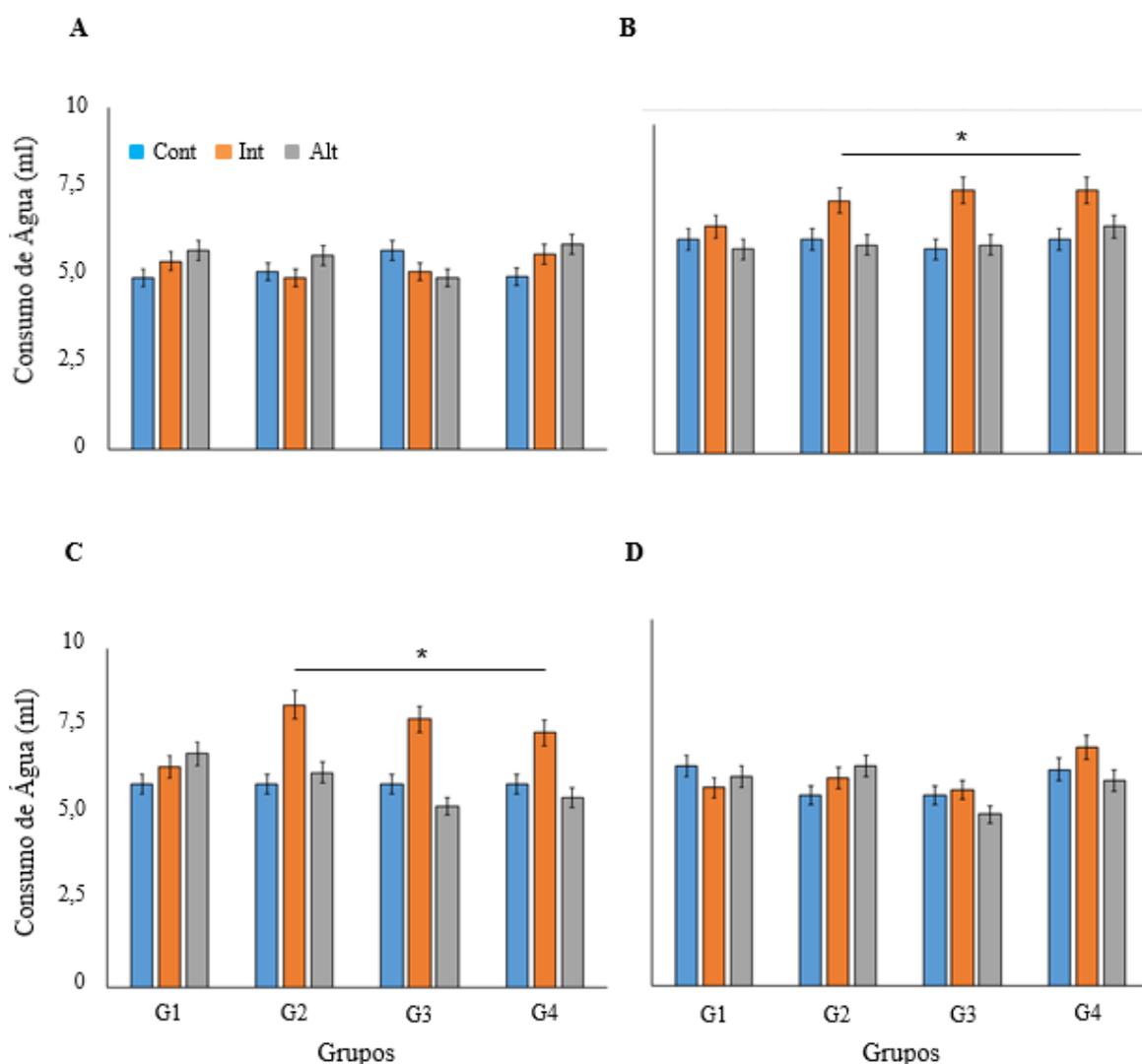
De forma geral, podemos observar que os camundongos SW-M em biotério na 4<sup>a</sup> sdv demonstra uma alta eficiência de conversão nutricional, pois com uma reduzida quantidade de ração ingerida demonstra um significativo aumento do seu peso corporal (60 a 80%). Essa relação vai sendo proporcionalmente invertida onde para um menor ganho de peso, houve a necessidade de uma ingesta maior de ração, principalmente evidenciada entre a 8<sup>a</sup> e a 10<sup>a</sup> sdv (20 a 50%).

Em relação ao tipo de metodologia utilizada, observamos que quando oferecemos de forma Contínua de EA o percentual de conversão nutricional é superior as outras metodologias, uma média aproximada de 60% conjunto de todas as idades, alcançando até 80% na 4<sup>a</sup> sdv, enquanto que os manejos Intervalado e Alternado foram semelhantes, apresentando uma média de 40% entre todas as idades, sendo que esse valor foi constante desde a 6<sup>a</sup> até a 10<sup>a</sup> sdv, sendo levemente superior na 4<sup>a</sup> sdv (60%).



**Figura 17:** Relação entre a conversão da ingestão de ração e o ganho de peso corporal: Através dos valores de ganho de peso médio (Barra Vermelha) e o consumo de alimento individual médio (Barra Amarela), estimamos em percentual (%), valores acima das barras) a conversão entre a ingestão de ração (gramas) entre as idades: 4<sup>a</sup> sdv (A, B e C), 6<sup>a</sup> sdv (D, E e F), 8<sup>a</sup> sdv (G, H e I) e 10<sup>a</sup> sdv (J, L e M) e o ganho de peso (gramas) comparando os métodos de manejo de EA: Contínuo (A, D, G e J), Intervalado (B, E, H e L) e Alternado (C, F, I e M).

Em relação a ingestão de água (Fig. 18), observamos que durante o manejo Intervalado na 6ª e 8ª sdv houve um aumento significativo da ingesta hídrica dos animais nos grupos nos quais foram inseridos/retirados os diferentes tipos de EA (G2 – Igloo®; G3 – Papel Absorvente; G4 – Trapézio).

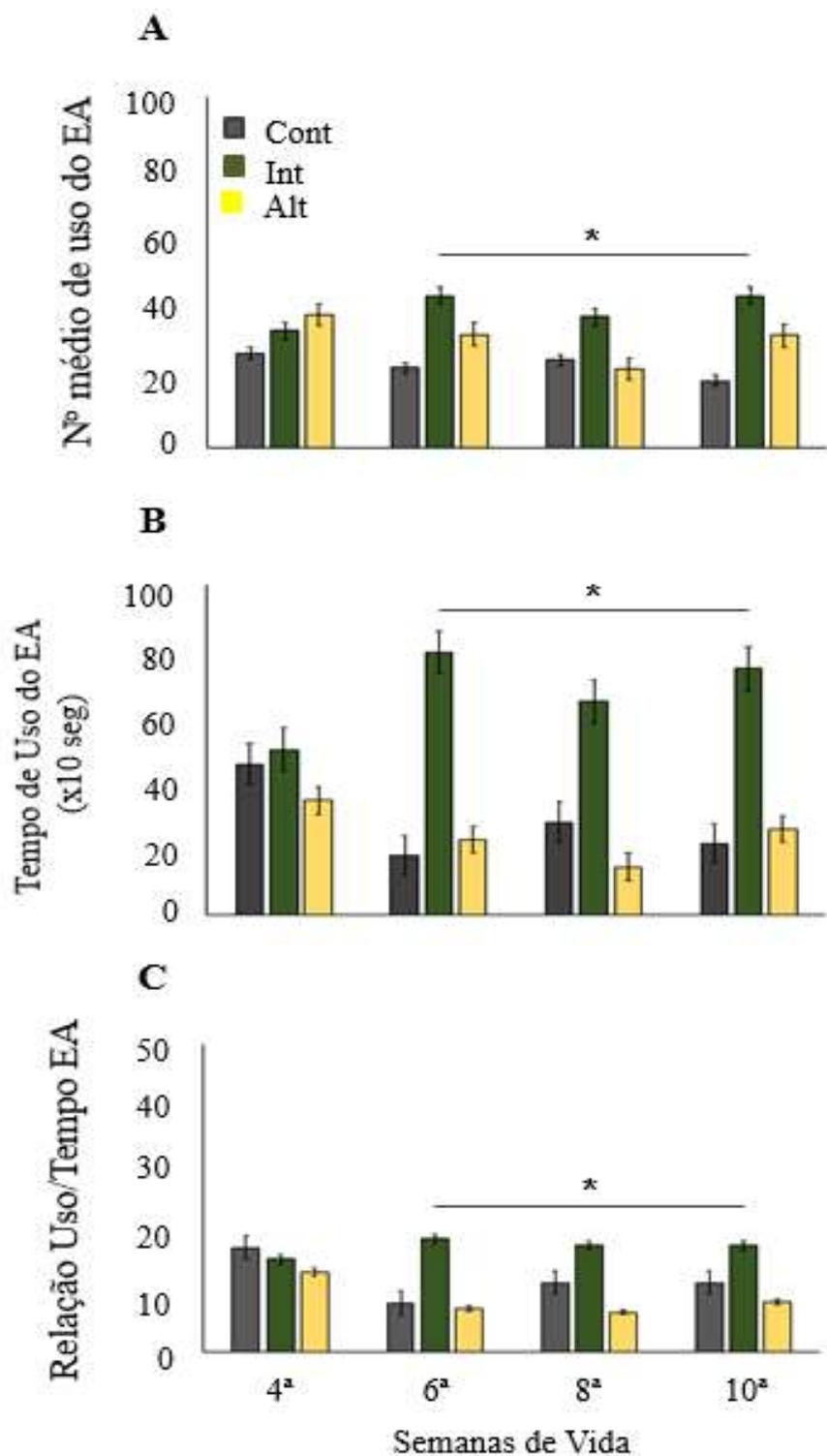


**Figura 18:** Quantificação do consumo hídrico: Realizamos o cálculo do consumo de água (mililitros) médio dos grupos: G1 (Sem EA); G2 (Igloo®); G3 (Papel Absorvente) e G4 (Trapézio) e estimamos o consumo individual (ml) da ingesta de água pelos camundongos SW-M em biotério nas diferentes idades: 4ª sdv (A), 6ª sdv (B), 8ª sdv (C) e 10ª sdv (D) e nos diferentes métodos de uso do EA: Contínuo (Barra Azul), Intervalado (Barra Laranja) e Alternado (Barra Cinza). \* demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo aumento da ingestão de água relacionada ao método Intervalado quando comparado as outras categorias (Contínuo e Alternado) e entre os Grupos com EA (G2, G3 e G4) e sem EA (G1).

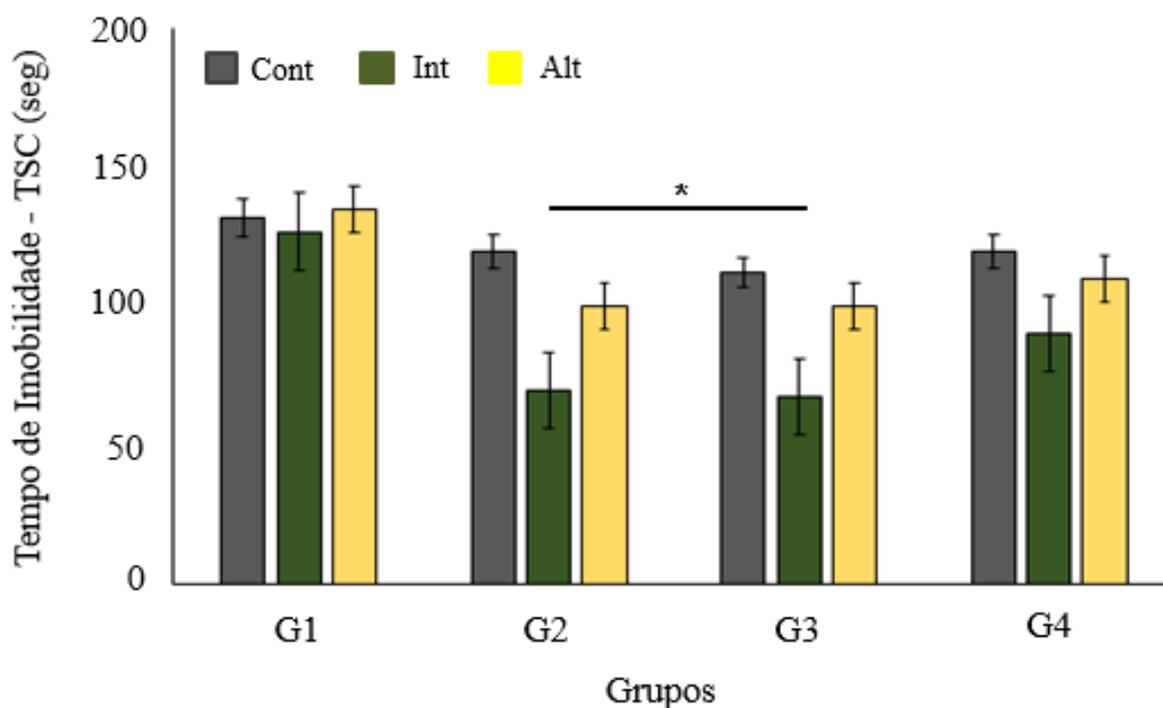
Em nossa abordagem comportamental o primeiro parâmetro avaliado foi a interação do respectivo EA inserido em cada grupo. Nossos resultados demonstraram que os camundongos SW-M em biotério quando submetidos a um manejo Intervalado apresenta uma quantidade de uso maior, a partir da 6<sup>a</sup> até a 10<sup>a</sup> sdv, dos objetos/materiais de EA oferecidos quando comparados com as outras categorias de manejo. Da mesma forma esse resultado é observado no aumento do tempo de utilização dos tipos de EA inseridos em cada grupo. Conseqüentemente, foi significativo o aumento da relação *Uso/Tempo* dos camundongos no período compreendido entre a idade de jovens e adultos do EA ofertado na aplicação da metodologia Intervalada (Fig. 19).

A princípio, a partir da avaliação da interação dos animais ao EA, poderíamos sugerir que o manejo Intervalado promove uma maior interação com os objetos/materiais inseridos nas gaiolas como EA. Contudo, na 10<sup>a</sup> sdv, quando avaliamos o aspecto emocional, ou a resposta comportamental do animal frente a uma leve situação de estresse, ou seja, na avaliação pelo TSC, essa respectiva interpretação merece uma discussão apropriada.

Durante a aplicação da metodologia Intervalada, os resultados do TSC indicam que os indivíduos que foram submetidos a esse tipo de manejo demonstraram um tempo de imobilidade significativamente menor quando comparado com as outras categorias. Esses resultados indicam que os respectivos animais demonstraram um perfil próximo a ansiedade, ou também chamado de *anxiety-like*, provavelmente relacionado a pela colocação e a retirada constante dos objetos/materiais de EA durante o período entre 4 e 10 semanas de vida. (Fig. 20).



**Figura 19:** Utilização do objeto/material de EA pelos camundongos nas diversas metodologias aplicadas: Durante as seguintes idades 4ª, 6ª, 8ª e 10ª semanas de vida (sdv) quantificamos o número médio de utilização de cada objeto/material de EA: *Igloo*<sup>®</sup>, Papel Absorvente, e o Trapézio durante 60 minutos/semana (A). Além disso, quantificamos o tempo com o qual o animal interagiu com cada tipo de EA (B) e calculamos a relação Uso/Tempo para cada Grupo (C) em nossas diferentes metodologias: Contínuo (Barra Cinza), Intervalado (Barra Verde) e Alternado (Barra Amarela). \* demonstra a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo aumento da interação dos animais ao EA durante a aplicação da metodologia *Intervalado* quando comparada aos outros métodos a partir da 6ª sdv.

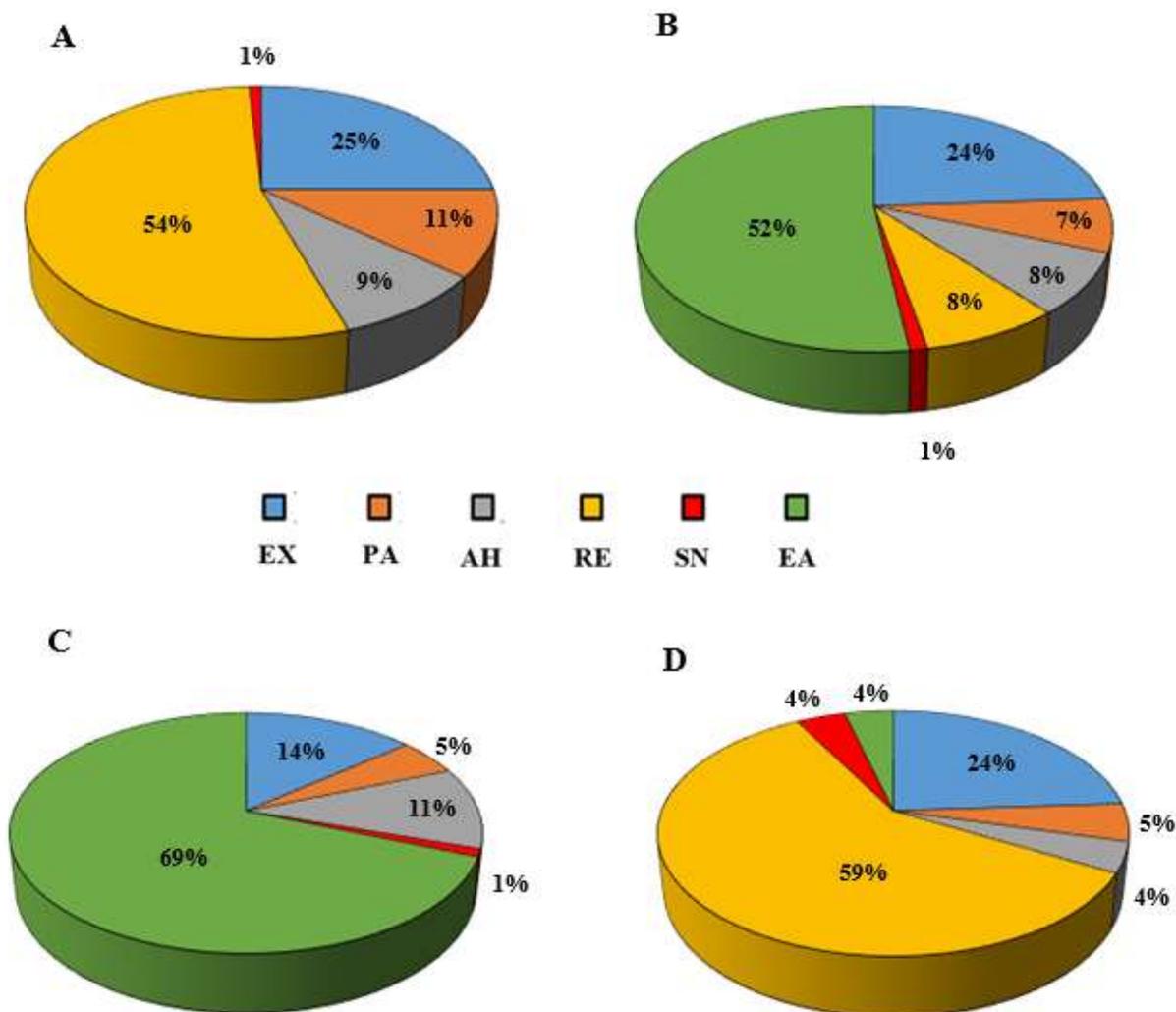


**Figura 20:** Avaliação da resposta emocional dos camundongos pelo TSC: Na 10ª sdv, realizamos em todos os camundongos SW-M em biotério a avaliação comportamental/emocional pelo Teste da Suspensão da Cauda (TSC). Através da aplicação das metodologias: Contínua (Barra Cinza), Intervalada (Barra Verde) e Alternada (Barra Amarela) avaliamos o tempo de imobilidade de cada animal ao TSC num período de segundos (seg) nos Grupos: G1, na ausência de EA; G2 pelo uso do *Igloo*<sup>®</sup>; G3 na presença do Papel Absorvente e na inclusão do Trapézio (G4). \* indica a significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) pela diminuição do tempo de imobilidade dos animais durante o TSC na aplicação da metodologia Intervalada nos Grupos G2 e G3 em relação as outras metodologias (Contínua e Alternada) e na ausência de EA (G1).

Nossa outra abordagem comportamental foi a realização na 10ª sdv do etograma para cada tipo de metodologia de inserção do EA.

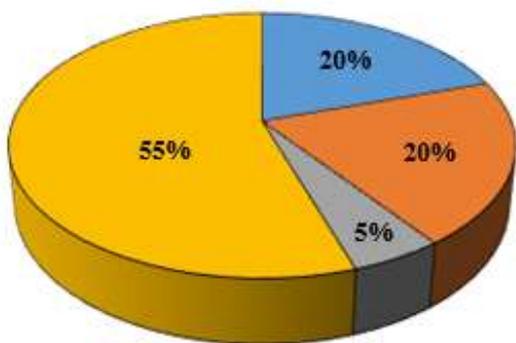
O manejo Contínuo demonstrou que após o período de utilização dos mesmos objetos/materiais de EA, na 10ª sdv, o grupo sem EA demonstrou maior incidência da atividade de repouso. Na oferta do *Igloo*<sup>®</sup> e do Papel Absorvente, houve uma mudança no seu padrão de comportamento havendo uma preponderância ao uso dos respectivos tipos de EA em relação as demais atividades. Ressaltamos que em relação ao Trapézio, apesar do seu comprovado uso, através do desenho experimental do nosso etograma a atividade no qual ficou mais evidente foi o repouso (Fig. 21). Em relação ao o manejo Intervalado, observamos um resultado similar, porém a intensidade da incidência de uso dos tipos de EA (*Igloo*<sup>®</sup> e Papel Absorvente) foi superior ao Contínuo (Fig. 22).

Por fim, na metodologia Alternada, um importante detalhe dever ser descrito. Após a rotação dos três tipos de EA (*Igloo*<sup>®</sup>, Papel Absorvente e Trapézio) em cada grupo (G2, G3 e G4), mantivemos conforme a sugestão do Programa de Enriquecimento ambiental do CEA/IOC, uma semana de ausência em todos os grupos de qualquer tipo de EA. Dessa forma, podemos observar que, apesar do uso e da interação pelos diversos tipos de EA por um período desde a sua infância até a sua idade adulta, quando há a retirada do objeto/material de EA os camundongos SW-M em biotério tendem a se comportar como se nunca tivessem tido contato com o EA, tendo o repouso como a atividade de maior incidência (Fig. 23).

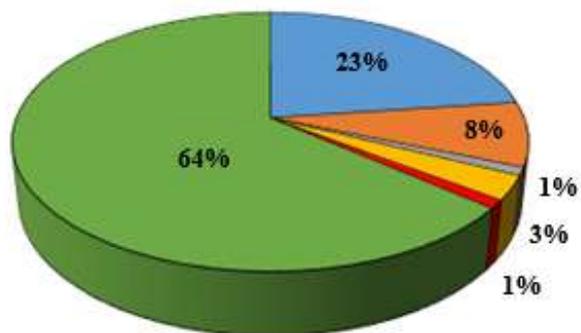


**Figura 21:** Etograma dos camundongos Swiss Webster através da aplicação do método *Contínuo de uso do EA*. Na 10ª semana de vida, através da filmagem de cada Grupo, foi determinado a incidência dos principais comportamentos individuais, calculado pelos valores totais e expressado em percentual (%). O Etograma foi definido pelas seguintes atividades comportamentais: Exploração do Ambiente (EX – Azul); Procura por Alimento (PA – Laranja); Auto-Higienização (AH – Cinza); Repouso (RE – Amarelo), *Sniffing* (SN - Vermelho) e Uso do Enriquecimento Ambiental (EA – Verde). Calculamos a incidência em 60 minutos das respectivas atividades durante a aplicação do manejo *Contínuo* no G1, sem EA (A); G2, na presença do *Igloo*® (B); G3, pelo uso do Papel Absorvente (C) e a inclusão do Trapézio (D).

A



B



EX



PA



AH



RE

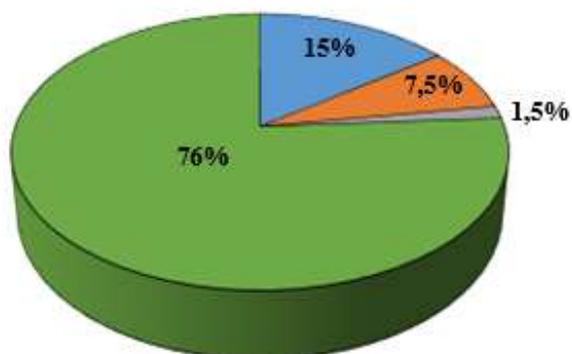


SN

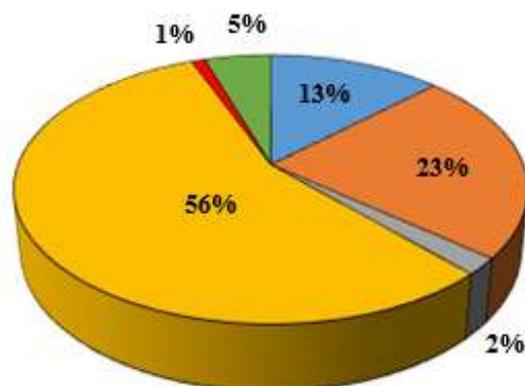


EA

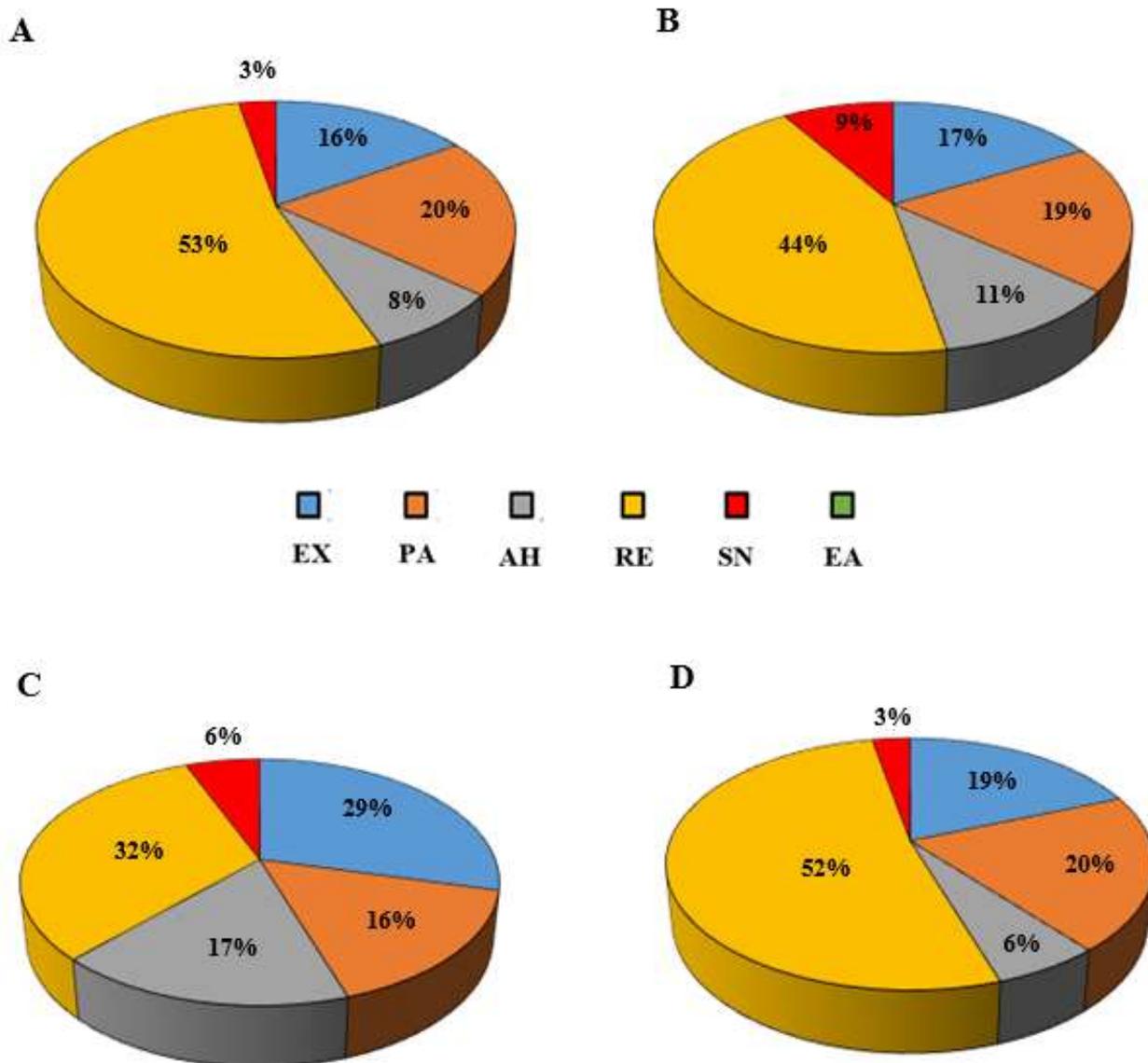
C



D



**Figura 22:** Etograma dos camundongos Swiss Webster através da aplicação do método Intervalado de uso do EA. Na 10ª semana de vida, através da filmagem de cada Grupo, foi determinado a incidência dos principais comportamentos individuais, calculado pelos valores totais e expressado em percentual (%). O Etograma foi definido pelas seguintes atividades comportamentais: Exploração do Ambiente (EX – Azul); Procura por Alimento (PA – Laranja); Auto-Higienização (AH – Cinza); Repouso (RE – Amarelo), Sniffing (SN - Vermelho) e Uso do Enriquecimento Ambiental (EA – Verde). Calculamos a incidência em 60 minutos das respectivas atividades durante a aplicação do manejo Intervalado no G1, sem EA (A); G2, na presença do Igloo® (B); G3, pelo uso do Papel Absorvente (C) e a inclusão do Trapézio (D).



**Figura 23:** Etograma dos camundongos Swiss Webster através da aplicação do método Alternado de uso do EA. Na 10ª semana de vida, através da filmagem de cada Grupo, foi determinado a incidência dos principais comportamentos individuais, calculado pelos valores totais e expressado em percentual (%). O Etograma foi definido pelas seguintes atividades comportamentais: Exploração do Ambiente (EX – Azul); Procura por Alimento (PA – Laranja); Auto-Higienização (AH – Cinza); Repouso (RE – Amarelo), *Sniffing* (SN - Vermelho) e Uso do Enriquecimento Ambiental (EA – Verde). Calculamos a incidência em 60 minutos das respectivas atividades durante a aplicação do manejo Alternado no G1, sem EA (A); G2, na presença do *Igloo*® (B); G3, pelo uso do Papel Absorvente (C) e a inclusão do Trapézio (D).

Finalizando nosso conjunto de resultados descrevemos através da Tabela 2 o peso dos principais órgãos vitais dos camundongos na 10ª sdv. Realizamos a pesagem do cérebro, coração, fígado e intestino de cada animal e os valores correspondem a média de cada grupo em comparação a cada tipo de metodologia de inserção de EA (Contínua, Intervalada e Alternada). Em resumo, não observamos diferenças significativas nos valores médios de cada órgão quando comparamos as diferentes categorias. Dessa forma, podemos concluir que apesar do tipo de manejo aplicado aos animais não ocorre uma evidente influência fisiológica que altere a morfologia ou a constituição dos respectivos órgãos dos animais.

**Tabela 2:** Peso médio dos principais órgãos nas diversas categorias:

	Cérebro			Coração			Fígado			Intestino		
	<i>Cont</i>	<i>Int</i>	<i>Alt</i>									
G1	0.42±0.02	0.43±0.02	0.44±0.03	0.32±0.03	0.25±0.03	0.22±0.03	2.46±0.28	2.17±0.62	2.26±0.26	5.74±0.77	5.76±1.76	5.41±0.84
G2	0.43±0.02	0.43±0.03	0.44±0.02	0.29±0.03	0.30±0.04	0.22±0.03	2.09±0.97	2.34±0.32	2.59±0.12	5.18±0.80	5.69±1.03	6.06±0.26
G3	0.45±0.02	0.41±0.01	0.43±0.02	0.30±0.04	0.26±0.04	0.24±0.03	2.79±0.26	2.19±0.20	2.39±0.28	6.72±0.75	5.88±0.59	5.05±0.99
G4	0.43±0.01	0.43±0.02	0.42±0.05	0.30±0.05	0.27±0.04	0.20±0.02	2.61±0.12	2.28±0.21	2.34±0.31	5.62±0.67	5.11±0.38	5.32±0.57

Peso Médio em gramas (g); ± referente ao DP

## **DISCUSSÃO**

A primeira contribuição teórica significativa para minimizar os aspectos éticos negativos da experimentação animal foi feita pelo zoologista William M. S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch, em 1959 (Rezende; Peluzio; Sabarense, 2008), com a apresentação do trabalho denominado “*The Principles of Humane Experimental Technique*”, no qual os autores propuseram o conceito dos 3 R’s, como ficou conhecido, por sua grafia em inglês das palavras *Replacement*, *Reduction* e *Refinement* (Substituir, Reduzir e Refinar) (Braga, 2017; Cazarin; Corrêa; Zambrone, 2004; Petroianu, 1996). O refinamento das técnicas de manipulação e experimentação é um dos princípios éticos utilizados na Ciência em Animais de Laboratório, o qual tem como objetivo, minimizar a dor ou sofrimento do animal desde seu nascimento até sua morte, visando a promoção do seu bem-estar (Braga, 2009).

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

De um modo geral, independentemente da idade dos animais, foi possível observar que a preferência dos camundongos em biotério, foi relacionada, principalmente, às categorias de abrigo e nidificação. Os objetos de atividade lúdica utilizados nesse estudo despertaram interesse, porém com nível de interação reduzido, quando comparados com as outras categorias, até mesmo nas idades infante e jovem (Martins et al., 2017). É provável que o comportamento individual do camundongo esteja relacionado a esses resultados, uma vez que o animal tende a

direcionar suas atividades, na busca por proteção contra possíveis predadores, companheiros ou outros estímulos, como a luz forte, fazendo uso dos abrigos, e na confecção de ninho para termorregulação, conforto e repouso (Brasil, 2016b; Mattaraia; Oliveira, 2012; Moreira, 2015; Rivera, 2017).

Os camundongos normalmente, durante sua rotina de manejo, demonstram atitudes e/ou comportamento de construção para tocas e ninhos, principalmente através da utilização do próprio material utilizado como piso. Dessa forma, a utilização de materiais para piso/cama que encorajem tal comportamento deve ser fornecido em abundância.

Gaskill e cols., (2003) relatam que os ninhos são usados por ratos selvagens para proteger os predadores, retirar-se das duras condições ambientais e proteger os jovens. Os comportamentos associados à construção de tocas e ninhos estão, portanto altamente ligados à sobrevivência dos animais. Os ratos em laboratório, embora removidos de condições selvagens, durante muitas gerações, também demonstram alta motivação para construir tocas e ninhos quando são fornecidos materiais adequados. Em relação aos camundongos, também observamos que a atitude de construção de tocas e ninhos são altamente incidentes em laboratório, principalmente quando motivados pela oferta de piso/cama que estimule a essas atitudes.

Apesar da discussão entre a possibilidade da diferença do repertório comportamental entre camundongos selvagens e em ambiente de laboratório, em ambas as situações todo o seu repertório genético foi mantido para possuir um metabolismo altamente acelerado, preparado para fugir imediatamente de seus predadores. No caso do camundongo, essa espécie é predada, praticamente por todos os animais, sendo componente da base da cadeia alimentar.

Esse detalhe torna-se muito importante e corrobora nossos resultados no estudo da preferência pelo tipo de enriquecimento ambiental. O uso do *Igloo*<sup>®</sup> e do Papel Absorvente, irão estimular, motivar o animal a construção de abrigos (tocas) e ninhos onde o objetivo principal é se sentirem mais protegidos e confortáveis. Além disso, também nos explica a baixa incidência ou interesse nos objetos relacionados a atividade lúdica.

Segundo Bekoff e Allen (1998), o ato de brincar é toda atividade motora que o indivíduo apresenta após o nascimento e que parece não ter um objetivo imediato, no qual padrões motores de outros contextos podem ser usados de forma modificada e alterada em termos de seqüência temporal. A brincadeira apresenta diversos níveis de complexidade, indo desde simples corridas e saltos até interações sociais complexas e prolongadas. Não sendo constituído de um comportamento simples e unitário, geralmente é dividida em três subcategorias: 1) com objetos; 2) envolvendo locomoção; e 3) através de interações sociais.

Estudos realizados com várias espécies mostraram que o tempo gasto em brincadeira não ultrapassa 10% do orçamento de atividades. No caso específico de roedores, Siviye Atrens (1992), constataram que, em ratos albinos, a brincadeira consome entre 2 e 3% do orçamento energético diário.

Com base nos dados apresentados acima pode-se sugerir que em função do tempo despendido em brincadeira e dos custos envolvidos nessa atividade, os efeitos seriam mínimos para que a brincadeira pudesse ser mantida pela seleção natural. Esses autores também argumentam que o comportamento lúdico pode ser adaptativo devido aos seus efeitos imediatos ou, em curto prazo, e pode não ter efeitos de longo prazo consistentes, importantes e previsíveis. Dessa forma, a atividade de brincar, além de despender alto gasto de energia, pode tornar o animal mais susceptível ao

ataque de predadores, o que explicaria a reduzida utilização de objetos relacionados a atividade lúdica (brincar) em nosso trabalho.

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

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

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

O *Igloo*<sup>®</sup>, sem dúvida, é o tipo de EA de maior preferência entre os camundongos adultos, uma vez que este propicia abrigo aos indivíduos e alguns passam mais tempo interagindo com esse objeto do que com qualquer outro tipo de EA testado. Entretanto, é interessante destacar que alguns animais dominam o *Igloo*<sup>®</sup>, demonstrando claramente que esse EA estimulou o comportamento individual e social de territorialismo (Batista et al., 2012). Essa dominação pelo objeto pode ser notada pela presença de ataques proferidos pelo camundongo dominante contra os outros animais que buscam fazer uso do *Igloo*<sup>®</sup>. Porém quando há tolerância do dominante ao uso do EA por outros indivíduos, o tamanho do *Igloo*<sup>®</sup> torna-se um fator limitante, restringindo seu uso para, no máximo 4, camundongos na idade adulta ao mesmo tempo.

Em relação ao etograma, dentre as atividades comportamentais mais frequentes observadas nestes animais, sem o uso do EA, foi à procura de alimento caracterizada pelo remexer da cama com as patas dianteiras (*digging*) e a exploração do ambiente (*rearing*) quando há o levantamento vertical, com ou sem apoio das patas dianteiras, na parede da gaiola.

Na ausência do EA no SGI, os camundongos Swiss Webster, demonstraram na 4ª sdv alta incidência na atividade de repouso, seguido de EX e PA. No entanto, quando foram inseridos os EAs de escolha, *Igloo*<sup>®</sup> e o papel absorvente em cada área do SGI, houve uma mudança no seu comportamento individual e social. O uso do EA

foi de grande proporção, sendo que, salienta-se, que esse uso, também foi direcionado a atividade de repouso, pois ambos EAs propiciam esse hábito natural da idade. Além disso, curiosamente, parte dos animais manteve a atividade de repouso, porém sem o uso do EA.

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

Em relação ao tipo de metodologia utilizada para a rotina de manejo do EA preferido pelos camundongos SW-M em biotério, avaliamos três categorias: a) *Contínuo*, onde os objetos/materiais preferidos (*Igloo*<sup>®</sup>, Papel Absorvente e Trapézio) forma permanentemente mantidos com os animais desde a 4<sup>a</sup> até a 10<sup>a</sup> sdv; b) *Intervalado*, caracterizado pela colocação e retirada dos diferentes tipos de EA e c)

*Alternado*, onde realizamos a rotatividade entre os Grupos dos tipos de EA entre a 4ª e a 9ª sdv.

Nossos resultados demonstraram que cada uma das categorias de manejo para inclusão/permanência do EA preferido na gaiola dos camundongos apresentou características peculiares e pontos positivos e negativos.

O uso *Contínuo* do objeto/material de EA, acreditamos promover ao animal maior conforto, principalmente no início de sua interação, refletido principalmente na sua relação de conversão de ingesta de alimento e conversão em ganho de peso e no tempo de imobilidade do TSC. Porém, conforme descrito nos resultados de número de interações e tempo de uso do EA, houve com o passar do tempo uma diminuição desses quesitos o que nos leva a sugerir que os animais ao longo do período de interação se adaptam ao EA tornando-o como parte integrante da gaiola e perdendo a característica de EA, como o piso ou a tampa.

O manejo *Intervalado*, promoveu maiores efeitos negativos. Os camundongos demonstraram em nossos resultados um estado similar a ansiedade, ou também denominada de *anxiety-like* o que foi comprovada pelo TSC, mas também pelo menor percentual de ganho de peso, maior ingestão de água e finalmente menor tempo de imobilidade quando colocado frente a uma situação de estresse ao final do período de interação.

O manejo *Alternado*, por sua vez demonstrou uma característica intermediária entre o *Contínuo* e o *Intervalado*. Não demonstrou efeitos positivos conforme eficiência na conversão de ingesta de ração e ganho de peso como o método *Contínuo*, mas também não promoveu um estado de ansiedade aos animais como o manejo *Intervalado*. Além disso, seu nível de interação Uso/Tempo de uso foi considerado bom e similar ao contínuo.

## **CONCLUSÕES**

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

Mediante a utilização do SGI, tornou-se possível a escolha do animal, em diferentes idades, entre os equipamentos/materiais de sua preferência, como EA em suas atividades individual e dinâmica social. Os tipos de EA relacionados a categoria abrigo e nidificação foram os de preferência. Sendo que dentro dessas categorias, o *Igloo*<sup>®</sup> e o papel absorvente foram os preferidos, respectivamente. É válido ressaltar que camundongos infantos demonstram menor interesse ao uso de EA quando comparado com as idades de jovens e adultos. Além disso, diversos objetos de atividade lúdica promovem reduzido interesse nas diferentes idades estudadas.

Concluimos na 1ª parte da nossa abordagem, através da Tabela 3, as vantagens e as desvantagens de cada objeto/material de maior preferência em relação a cada idade. Acredita-se que esses dados possam contribuir para a orientação e a execução de um processo ou implantação de um programa contínuo e eficiente de uso do EA em biotérios.

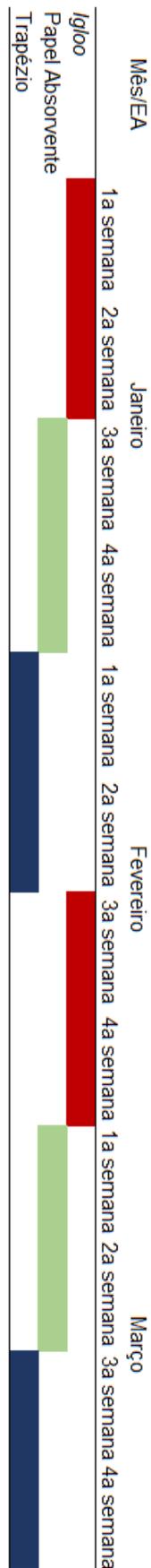
**Tabela 3:** Tipos de EA preferidos e resumo das suas vantagens e desvantagens em relação as faixas etárias:

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

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

Em relação a 2ª parte dos nossos resultados, podemos concluir que os camundongos SW-M em biotério apresentam um melhor conforto e bem-estar, físico, comportamental e emocional, através da utilização da combinação dos manejos *Contínuo* e *Alternado*. Essa afirmação baseia-se nos dados nos quais observamos que a colocação/retirada dos diferentes tipos de EA promovem aos animais um estado de ansiedade, porém quando inserimos continuamente o EA, após um período de tempo estimado de 2 a 3 semanas de vida, principalmente em animais jovens a adultos há uma gradativa perda de interesse pelo objeto/material de EA oferecido. Dessa forma podemos concluir o nosso trabalho sugerindo, conforme a Tabela 4, que um Programa de Enriquecimento Ambiental eficiente deve oferecer continuamente os tipos preferidos de EA (*Igloo*®, Papel Absorvente e Trapézio) porém alternando a troca dos mesmos a cada 2 a 3 semanas de utilização como períodos ideais.

**Tabela 4:** Sugestão de aplicação de um Programa de Enriquecimento Ambiental através do uso dos tipos preferidos de EA para camundongos:



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

BATISTA, W. S. et al. Estudo do comportamento agressivo de camundongos em biotério: aplicação do modelo espontâneo de agressividade (MEA). **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 1, n. 4, p. 322-335, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

BRASIL. Decreto nº 24.645/1934 de 10 de julho. Estabelece medidas de proteção aos animais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1930-1949/d24645.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/d24645.htm)>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto-Lei nº 3.688/1941 de 03 de outubro. Lei das contravenções penais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/Del3688.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del3688.htm)>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei nº 5.197/1967a de 03 de janeiro. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L5197.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L5197.htm) >. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto-Lei nº 221/1967b de 28 de fevereiro. Dispõe sobre a proteção e estímulos à pesca e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/Del0221.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del0221.htm) > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei nº 6.638/1979 de 08 de maio. Estabelece normas para a prática científica da vivissecação de animais e determina outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/1970-1979/L6638.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1970-1979/L6638.htm) > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Constituição 1988 de 05 de outubro. Constituição da República Federativa do Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/constituicao/constituicaocompilado.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicaocompilado.htm) > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei nº 9.605/1998 de 12 de fevereiro. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L9605.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9605.htm) > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto nº 3.179/1999 de 21 de setembro. Dispõe sobre a especificação das sanções aplicáveis às condutas e atividades lesivas ao meio ambiente e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/d3179.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d3179.htm) > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei nº 11.794/2008 de 08 de outubro. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm)>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto nº 6.899/2009 de 15 de julho. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais-CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm) > Acesso em 1 jul. 2016.

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

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

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

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

CAMPOS, J.D.S. et al. O comportamento do camundongo Swiss Webster em biotério de experimentação: Observações e reflexões. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 4. n. 1, p. 30-41, 2016.

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

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

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

CHUMBINHO, L. C. et al. Etograma de camundongos em biotério: Quais são as principais atividades deste animal dentro da gaiola? **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 25-31, 2012.

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

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

DEFENSOR, E. B. et al. Facial expressions of mice in aggressive and fearful contexts. **Physiology & Behavior**, v. 107, p. 680–685, 2012.

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

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

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

GASKILL, B. N.; KARAS, A. L. Z.; GARNER, J. P.; PRITCHETT-CORNING.; K. R. Nest Building as an Indicator of Health and Welfare in Laboratory Mice. **Journal of Visualized Experiments Exp.** (82), 2013.

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

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

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

HAMILTON, D. A. et al. Effects of moderate prenatal ethanol exposure and age on social behavior, spatial response perseveration errors and motor behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 269, p. 44–54, 2014.

HEDIGER H. **Wild animals in captivity**. London: Butterworths, 207p, 1950.

HEDIGER H. **Man and animal the zoo**. London: Routledge and Kegan, 303p,1969.

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

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

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

KUZEL, M. A. et al. Estudo da hierarquia de camundongos Swiss Webster através do uso de Sistemas com Gaiolas Interligadas (SGI). **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 49-60, 2013.

MARTINS, T. V. A. et al. Avaliação da preferência pelo tipo de enriquecimento ambiental utilizado por camundongos Swiss Webster em biotério através do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI). **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 17-34, 2017.

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

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

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

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

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

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

MOREIRA, V. B. **Eficiência reprodutiva e comportamento parental de camundongos isogênicos e heterogênicos produzidos em ambiente modificado.**

2015. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 2015. Disponível em: <  
<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/126631/000841528.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 7 jul. 2017.

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

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

OLIVEIRA, F. SILVA et al. Dosagem da concentração plasmática de corticosterona em camundongos altamente agressivos da linhagem Swiss Webster. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 85-94, 2015.

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

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

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

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

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

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

RODRIGUES, F. V. B. et al. Etograma de camundongos em biotério II: Quais são as principais diferenças no comportamento de Swiss Webster e BALB/c?. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v.2 n. 1, p. 20-30, 2013.

RUSSEL, W. M. S. & BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen, 1959.

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

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

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

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

VIEIRA, ML., SARTORIO, R. Análise motivacional, causal e funcional da brincadeira em duas espécies de roedores. **Estudos de Psicologia**, 7(1), p.189 196, 2002.

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

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



A realização desse material visa a atender a demanda pelo uso do enriquecimento ambiental para animais de laboratório conforme indicado pelos princípios éticos e as Resoluções Normativas do Conselho de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) vigentes no Brasil. Desde o início, nós os organizadores, tivemos como ideia principal tentar buscar o tipo e a forma de utilização de materiais e equipamentos de enriquecimento ambiental que atendesse aos animais a preservação dos seus hábitos naturais e estimular a atividades locomotoras e exploratórias quando estes estiverem em restrição de espaço, em nosso caso, especificamente no modelo camundongo em biotério. Dessa forma, buscamos estudar qual a preferência do camundongo pelos diversos tipos de materiais/equipamentos, em suas diversas idades, durante sua manutenção no biotério. Baseamos nossa hipótese em “perguntar” ao animal qual o tipo de enriquecimento ambiental preferido e sua “resposta” foi traduzida através da aplicação do Sistema de Gaiolas Interligadas e uma série de combinações e formas de inserção do enriquecimento ambiental. Finalizamos essa obra, demonstrando as vantagens e desvantagens dos materiais/equipamentos preferidos pelos camundongos em biotério e a sugerimos a forma ideal de inserção e manutenção de um Programa de Uso de Enriquecimento Ambiental. Esperamos que nossos resultados, discussões e conclusões possam auxiliar a todos os profissionais ligados a ciência de animais de laboratório, gerando reflexões, buscando em seus modelos o uso ideal para cada instituição, e por fim elevar o bem-estar dos animais mantidos em biotério.

**IOC**  
Instituto Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

**MINISTÉRIO  
DA SAÚDE**

**GOVERNO  
FEDERAL**

ISBN: 978-85-5522-322-8



9 788555 223228