

ARTIGO DE PESQUISA CIENTÍFICO

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

Environmental enrichment preferences for female LG/j mice

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

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

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

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

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

Resumo

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

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

Abstract

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

*Autor correspondente: peripato@ufscar.br

Conflito de interesse: Não há.

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



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

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

MODELO BIOLÓGICO

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

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição de conduta com os animais

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

Critérios de amostragem e formação de grupos

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

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

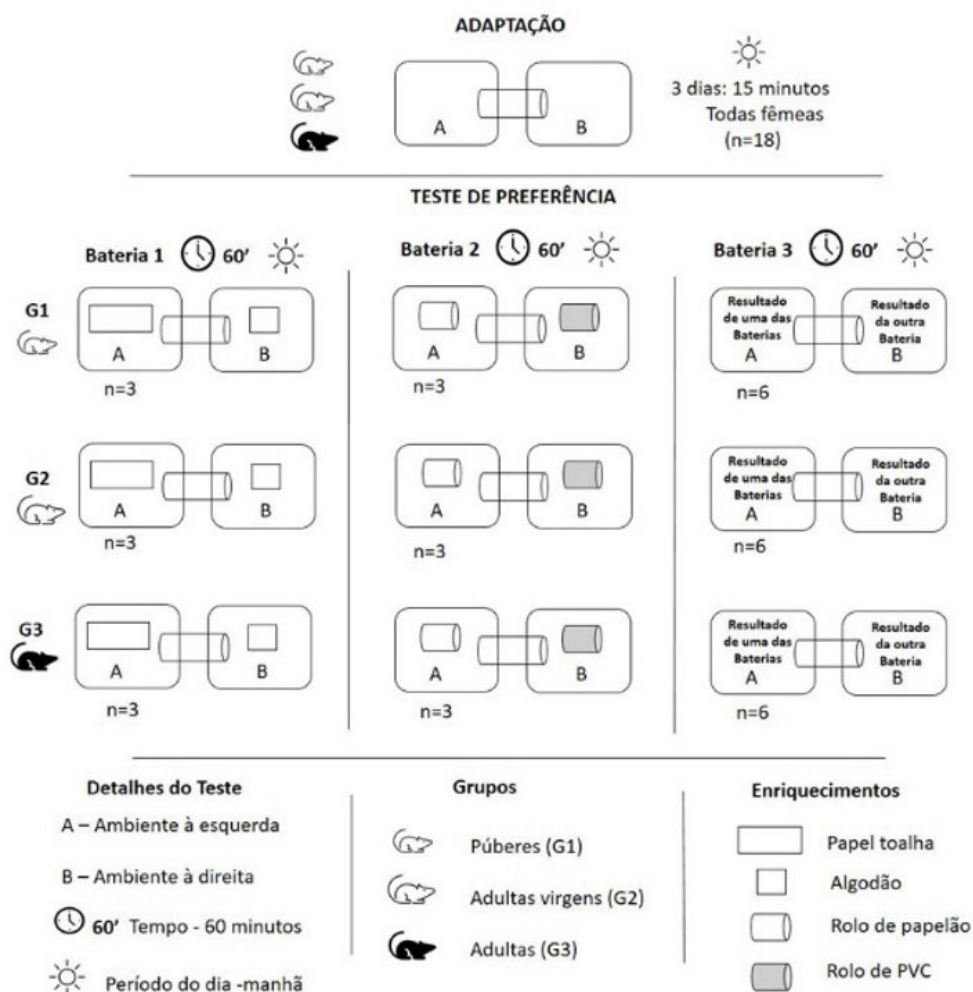


Figura 1. Delineamento experimental do teste de preferência para enriquecimento ambiental.

Teste de preferência pelo enriquecimento ambiental

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

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

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

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

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



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

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

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

ANÁLISE DOS DADOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESULTADOS

Teste de preferência pelo enriquecimento ambiental

Adaptação ao equipamento

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

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

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

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

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

Preferências pelo enriquecimento ambiental

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

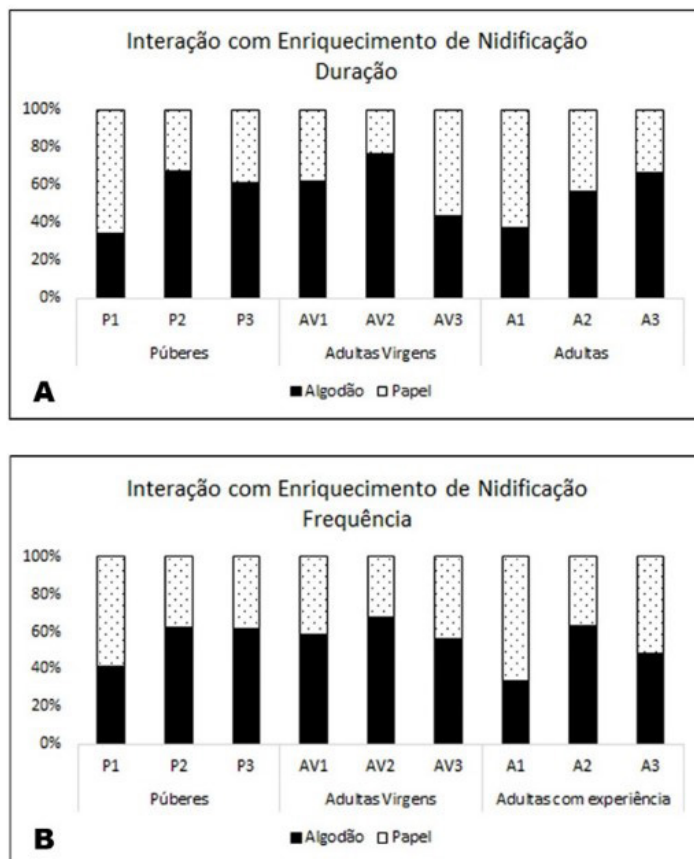


Figura 3. Interação das fêmeas das diferentes fases com os enriquecimentos relativos à nidificação: algodão e papel. Em (A) observamos os resultados relativos à duração de cada fêmea com os respectivos enriquecimentos; em (B) observamos a frequência relativa de cada fêmea com os enriquecimentos. P significa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

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

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

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

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

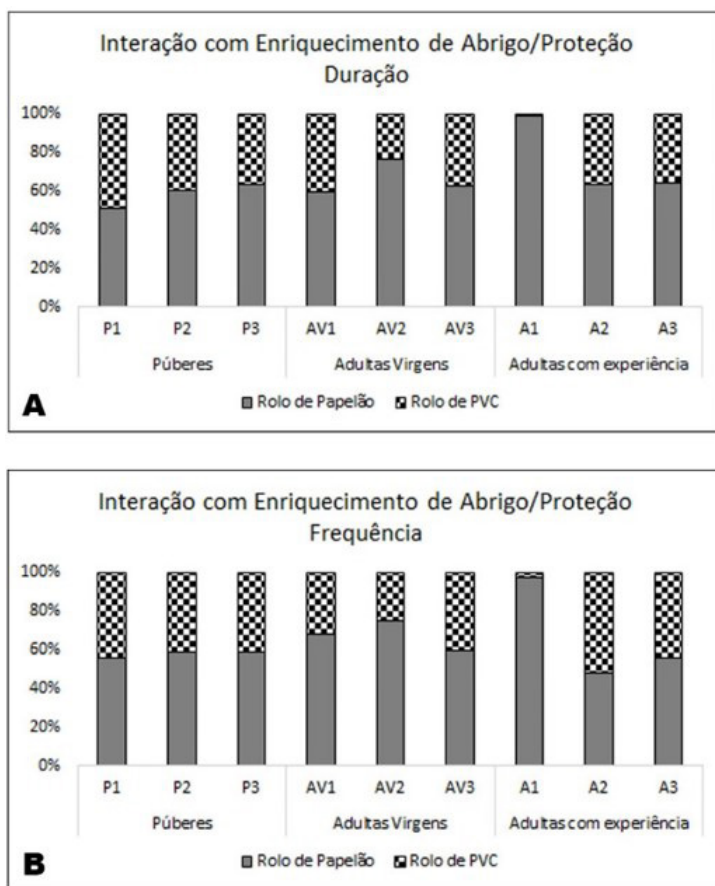


Figura 4. Interação das fêmeas das diferentes fases com os enriquecimentos relativos à abrigo/proteção: Rolo de papelão e Rolo de PVC. Em (A) observamos os resultados relativos à duração de cada fêmea com os respectivos enriquecimentos; em (B) observamos a frequência relativa de cada fêmea com os enriquecimentos.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

DISCUSSÃO

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

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

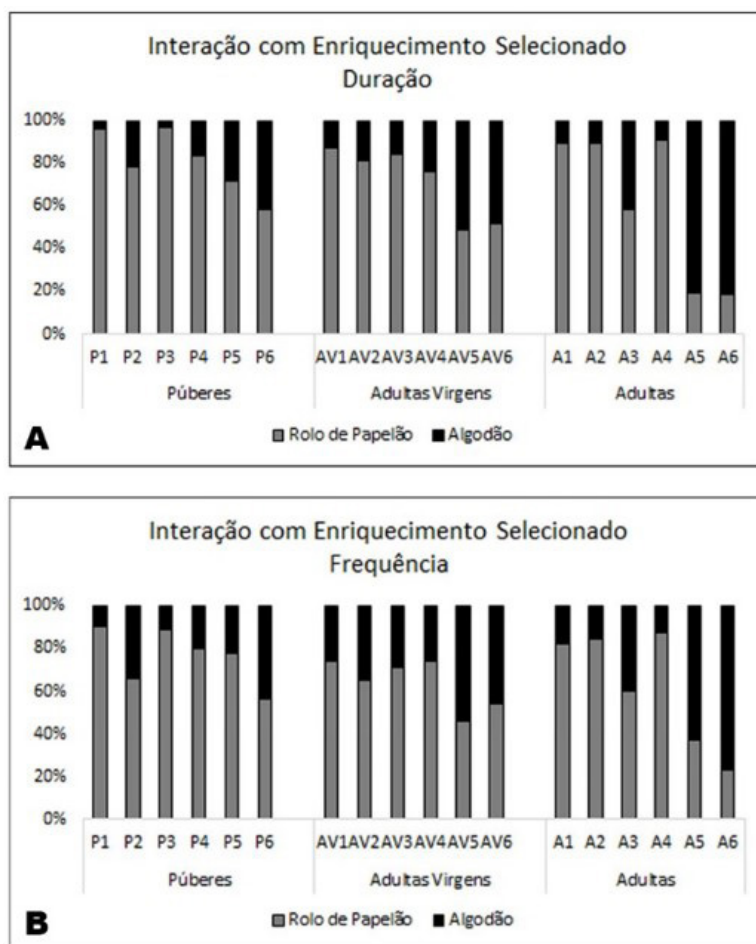


Figura 5. Interação das fêmeas das diferentes fases com os enriquecimentos selecionados nas Baterias 1 e 2: Rolo de papelão e Algodão. Em (A) observamos os resultados relativos à duração de cada fêmea com os respectivos enriquecimentos; em (B) observamos a frequência relativa de cada fêmea com os enriquecimentos.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

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

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

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



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

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

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



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

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

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

CONCLUSÃO

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

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

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



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