

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Complexidade estrutural do ambiente e teste de preferência em três linhagens de camundongos (*Mus musculus*)

Bolsista: Flávia Cuadal Coimbra, CNPQ

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/ 0006/2013

Complexidade estrutural do ambiente e teste de preferência em três linhagens de camundongos (*Mus musculus*)

Bolsista: Flávia Cuadal Coimbra, CNPQ

Orientador: Prof^a Dr^a Thaís Billalba Carvalho

MANAUS

2014

Sumário

1. RESUMO.....	4
2. INTRODUÇÃO.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Delineamento Experimental	8
3.2 Análise do Comportamento	11
3.3 Análise de Dados.....	12
3.4 Nota Ética	13
4. RESULTADOS.....	13
5. DISCUSSÃO	24
6. REFERÊNCIAS	27

1. Resumo

A maioria dos indicadores disponíveis de elevado grau de bem-estar é obtida a partir de estudos que demonstraram preferências positivas dos animais. O objetivo do trabalho foi avaliar a escolha de camundongos das linhagens SWISS, C57BL/6 e BALB/C por diferentes ambientes em relação à sua complexidade estrutural e aos tipos de artefatos utilizados para o enriquecimento ambiental. Foi feita a quantificação da latência, da frequência e do tempo de permanência dos camundongos nas áreas sem e com enriquecimento ambiental nos períodos de claro e escuro. A latência para a locomoção durante a aclimatação foi semelhante entre as linhagens ($p= 0,34$) e menor no período noturno ($p= 0,002$). Houve diferença significativa entre as linhagens e os tratamentos durante o teste, sendo observada maior duração no corredor sem estrutura para o SWISS e BALB/C ($p= 0,01$) e maior tempo na gaiola sem estrutura para a linhagem C57BL ($p= 0,02$). A locomoção e a auto limpeza foram maiores no tratamento acrílico em relação ao grupo sem estrutura e com a cuia para todas as linhagens ($p < 0,000$). O tipo de estrutura física interferiu no comportamento de interação com o objeto, sendo maior no tratamento com a cuia ($p < 0,000$). Conclui-se que a presença e o tipo de estrutura interferem no comportamento e que a condição social modula a escolha pelo ambiente. A combinação do teste de preferência com as outras medidas de bem estar podem fornecer informações apropriadas para melhorias nas condições de manutenção dos animais em cativeiro.

Palavras-chave: enriquecimento ambiental; escolha; roedor

2. Introdução

A ação antrópica exerce influência significativa sobre o comportamento e a fisiologia dos animais, o que interfere nas suas experiências cognitivas, saúde física e reprodução (BOX, 2006). Em paralelo, esses organismos apresentam mecanismos neuro-endócrinos que permitem ajustes em resposta às mudanças nas condições do ambiente em que vivem (BROOM & MOLENTO, 2004). Dentro deste contexto, tem-se a necessidade de avaliação do bem estar dos animais que, segundo Broom e Johnson (1993) e Broom (1996), corresponde ao estado do indivíduo que enfrenta ou tenta enfrentar as dificuldades em seu ambiente – incluindo sua saúde e sentimentos. O bem estar é uma característica de um indivíduo, mas não é uma condição absoluta, pois varia com o tempo e em uma escala de muito ruim a muito bom (FRASER & BROOM, 1990; BOX, 1999; FORKMAN *et al.*, 2001).

Diversas espécies são utilizadas com objetivos científicos e, portanto, sujeitas a uma variedade de procedimentos laboratoriais estressantes, sendo importante considerar o estado de bem estar desses animais e, conseqüentemente, a confiabilidade dos resultados decorrentes da pesquisa. Para isso, é fundamental ter-se a consciência de que o animal, como ser vivo, possui hábitos de vida próprios da sua espécie, apresenta memória, preserva o instinto de sobrevivência e é sensível a situações aversivas, razões que preconizam posturas adequadas em todos os momentos do desenvolvimento dos estudos com animais de experimentação (CLOSE *et al.*, 1996). Dessa forma, a preocupação acerca do bem estar animal envolve questões científicas, éticas, legais e práticas (BOX, 2006).

Alguns roedores são amplamente utilizados em estudos biológicos e médicos (ex. HUGHES, 1998; PAIXÃO, 2001; ANDRADE *et al.*, 2002; CHORILLI *et al.*, 2007), no entanto, a oferta de condições em cativeiro que preconizem a exibição dos comportamentos inatos ainda é pouco valorizada. O camundongo (*Mus musculus*), por exemplo, apresenta organização social bem definida e geralmente vive em unidades familiares compostas de pais e juvenis. Essa espécie também é uma presa e, portanto, exibe alta motivação em permanecer próximo a abrigos seguros, especialmente durante o dia ou enquanto explora novos territórios. Além disso, os camundongos preferem ficar em contato com objetos sólidos, sendo a presença desses objetos identificada com auxílio de pelos sensitivos ao longo do corpo e da cabeça (BOX, 2006). Apesar disso, o ambiente de cativeiro, de modo geral, apresenta limitação de estímulos, o que pode desencadear

alterações fisiológicas e comportamentais e trazer consequências para as capacidades neuro-cognitivas, estado de saúde e desempenho reprodutivo desses animais (BALCOMBE, 2006; BOX, 2006). De fato, vários estudos indicam que ratos e camundongos necessitam de estímulos ambientais, sendo que a ausência dos mesmos afeta física e psicologicamente esses animais, podendo interferir no desenvolvimento cerebral e desencadear a exibição de comportamentos anormais (estereotipados) (VASCONCELLOS, 2005; BALCOMBE, 2006). Portanto, instalações apropriadas, equipamentos especializados e a manutenção em condições de estimulação sensorial adequada e de maior complexidade ambiental são essenciais para o melhor bem estar de animais mantidos em cativeiro (OLSSON & DAHLBORN, 2002; CHORILLI, 2007).

Estudos evidenciam que a implementação do enriquecimento ambiental para roedores mantidos em cativeiro permite aumento da atividade física, lúdica e do comportamento exploratório (VANDERSCHUREN et al., 1995; ABOU-ISMAIL, 2011), promovendo maior capacidade de aprendizagem e plasticidade cerebral (NEWBERRY, 1995; SIMPSON & KELLY, 2011). De fato, prover abrigo ou refúgio a animais de laboratório permite a tomada de decisões frente a desafios, tais como, enfrentar ou fugir de interações agressivas de coespecíficos ou evitar exposição à luminosidade excessiva (VAN DE WEERD & BAUMANS, 1995). Apesar desses benefícios, antes de introduzir um programa de enriquecimento em laboratório é necessário avaliar as respostas dos animais frente aos estímulos oferecidos, por meio de aspectos que indiquem seu estado de bem estar (LAPCHIK et al., 2009).

Em decorrência da amplitude de respostas fisiológicas e comportamentais frente às condições ambientais, é importante que a avaliação do bem estar animal inclua uma variada gama de parâmetros mensurados, tais como, taxa de sobrevivência, crescimento, índices reprodutivos, alterações comportamentais e o estado de saúde (BROOM & MOLENTO, 2001). Assim, para avaliar adequadamente os estados de bem-estar é necessário uma abordagem de várias características, o que reflete a natureza interativa e a amplitude dos sistemas biológicos que permitem a manutenção homeostática do organismo (BOX, 2006).

Testes de preferência e motivação fornecem técnicas úteis para avaliar índices etológicos de bem estar, pois evidenciam escolhas relativas a diferentes aspectos do ambiente e indicam as necessidades dos animais (DAWKINS, 2008). Dentro do contexto do teste de escolha, vários estudos mostram a preferência de ratos e camundongos por

diferentes materiais e/ou estruturas utilizadas no acasalamento e na construção de ninho (ex. VAN-LOO et al., 2005; VAN-DE-WEERD et al., 1998; OLSSON, 2001). No entanto, a avaliação da preferência dos roedores por ambientes com diferente complexidade estrutural e o uso de artefatos alternativos para o enriquecimento ambiental é incipiente.

Diante do exposto, este projeto teve por objetivo testar se camundongos (*Mus musculus*) das linhagens SWISS, C57BL/6 e BALB/C preferem áreas com ou sem enriquecimento ambiental. Além disso, pretende-se testar a preferência dos roedores pelo uso de um produto regional amazônico (*cabaça* - *Lagenaria siceraria* (Molina)) como artefato para enriquecimento ambiental em relação a uma estrutura comercial de acrílico. A cuia é um artefato muito utilizado em refeições, transporte de líquidos e instrumentos musicais (WHITAKER & DAVIS, 1962; LEVIN & LANGE, 1991). Além disso, este produto apresenta baixo custo e pode ser implementado sem nenhuma dificuldade de manejo dentro das gaiolas. Assim, será possível avaliar se os camundongos irão escolher o ambiente que indica os índices fisiológicos e comportamentais mais adequados, conforme resultados obtidos em experimento já desenvolvido (PIB-B/0051/2012). A combinação do teste de preferência com as outras medidas de bem estar fornecerão informações apropriadas para melhorias nas condições de manutenção dos animais em cativeiro.

3. Material e Métodos

3.1. Manutenção dos Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem SWISS, C57BL/6 e BALB/C provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM. Esses animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com 65 cm² sobre cama de maravalha trocadas duas vezes por semana para evitar o excesso de umidade e acúmulo de excretas. A temperatura foi mantida em torno de 25 °C, o fotoperíodo em 12 horas de luz (07:00 h às 19:00 h) e os animais receberam alimentação (ração com 23% de proteína bruta) e água a vontade.

3.2. Delineamento Experimental

Foi avaliada a preferência de camundongos por diferentes ambientes em relação à sua complexidade estrutural e aos tipos de artefatos utilizados para o enriquecimento ambiental. Para isso, o animal foi colocado em um sistema de teste de escolha formado por uma estrutura triangular conectada por meio de corredores transparentes (7 cm de

diâmetro X 14 cm de comprimento) a três gaiolas de acrílico (38 x 21 x 15 cm) com tampa em inox (**Figura 1**). As gaiolas corresponderam ao ambiente sem estrutura (gaiola 1), com estrutura em acrílico- produto comercial (gaiola 2) e com cuia de cabaça- produto regional (gaiola 3). A estrutura de acrílico e a cuia de cabaça tiveram dimensões de 10 X 9 cm com três entradas, conforme padrão comercializado (Alesco.155).

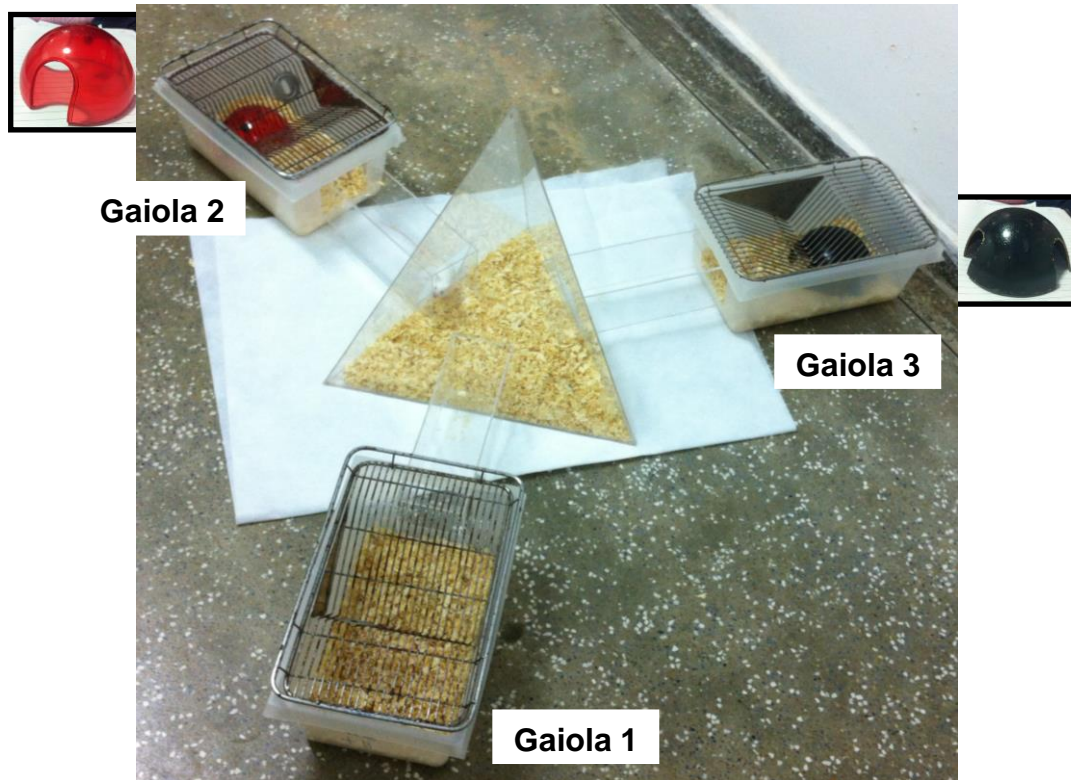


Figura 1. Sistema de teste de preferência: estrutura triangular ligada por meio de corredores transparentes a três gaiolas de acrílico com tampa em inox. **Gaiola 1:** ambiente sem estrutura, **Gaiola 2:** com estrutura em acrílico (produto comercial) e **Gaiola 3:** com cuia de cabaça (produto regional).

A área triangular equivale à região neutra do teste de escolha, onde o animal foi mantido por 5 minutos para o período de aclimação. Após este período, as passagens dos corredores para as gaiolas foram abertas, permitindo que o animal se locomovesse em todas as direções.

Cada animal foi testado individualmente e permaneceu por 35 minutos (desconsiderou-se o tempo na área neutra) no sistema de teste de preferência, totalizando 10 machos adultos por linhagem. A sequência de uso dos animais foi aleatorizada e cada indivíduo foi submetido ao teste nos períodos da manhã e noite. A

disposição das gaiolas foi modificada para evitar efeito na escolha do ambiente. Isso é relevante, pois sabe-se que os roedores utilizam pistas ambientais para a orientação espacial (BOX, 1999) e que apresentam lateralização cerebral (MANSER, 1998).

3.3 Análise do Comportamento

Durante todo o período de teste (35 minutos) foi feito o registro do comportamento com filmadora portátil (Filmadora Digital Sony DCR-SX63) por cinco dias (dois animais em cada dia). As análises das filmagens permitiram a quantificação da latência, frequência e o tempo de permanência dos camundongos em cada ambiente (gaiola). A quantificação das interações foi feita com base no etograma descrito por Coimbra *et al.* (2014) (**Tabela 1**), sendo considerada a frequência e a duração das unidades comportamentais emitidas por cada animal.

3.6 Análise de Dados

Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade da variância pelo teste F max (ZAR, 1999). De acordo com essas análises, a latência para a locomoção e o tempo de permanência nos corredores entre as linhagens e os períodos de observação foram comparados por ANOVA de duas vias. As comparações da duração no corredor e gaiola e da frequência dos comportamentos exibidos entre as linhagens e os tratamentos também foram feitas por ANOVA de duas vias para medidas repetidas. Foi considerado $\alpha \leq 0,05$ para significância estatística. Todas as análises foram baseadas em Zar (1999).

3.7 Nota Ética

Este estudo esteve de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAM, Manaus, AM (n^o protocolo: 013/2013).

Tabela 1. Descrição das categorias comportamentais exibidas por camundongos das linhagens SWISS, C57BL e BALB/C.

Categoria	Unidade	Descrição
LOCOMOÇÃO	Andar normal	Deslocar-se de forma lenta pela gaiola.
	Cheirar o ambiente	Farejar o ambiente à medida que se locomovem na gaiola.
	Cheirar a grade	Se apoiar sob as patas traseiras alongando o corpo para farejar a grade.
	Parar	Posição em pé estacionária apoiado nas quatro patas de olhos abertos.
	Parar nas patas traseiras	Posição em pé estacionária com as patas dianteiras levantadas e com as patas traseiras apoiadas no solo.
	Cavar Escalar	Arranhar o chão com as patas dianteiras. Subir ou descer a grade da gaiola lentamente.
INTERAÇÃO COM O OBJETO	Apoiar	Apoiado com as patas dianteiras na estrutura de acrílico para o teste.
	Cheirar o objeto	Aproximar-se com o focinho esticado para cheirar o objeto.
	Dentro	Entrar no objeto por uma das aberturas.
	Morder o objeto	Morder os cantos das entradas com os dentes superiores dianteiros.
	Subir no objeto	Subir no objeto e ficar em pé sob as patas traseiras.
AUTO LIMPEZA	Lamber as patas	Lamber as patas dianteiras para limpeza.
	Coçar	Esfregar freneticamente alguma parte do corpo com as patas traseiras.
	Lamber	Lamber qualquer parte do corpo inclusive a região genital.
	Esfregar o rosto	Mover repetidas vezes o rosto nas patas dianteiras.

4. Resultados

A latência para a locomoção durante a aclimação foi semelhante entre as linhagens (ANOVA de duas vias, $F = 1,10$; $p = 0,34$) e menor no período noturno (ANOVA de duas vias, $F = 18,41$; $p = 0,002$; **Figura 2**). A frequência nos corredores também não variou entre as linhagens (ANOVA de duas vias, $F = 2,16$; $p = 0,13$) e foi menor durante o dia (ANOVA de duas vias, $F = 68,17$; $p = 0,000$).

Não foi observada diferença para a duração no corredor entre as linhagens e os tratamentos no período de aclimação (ANOVA de duas vias para medidas repetidas, $F = 1,37$; $p = 0,25$). No entanto, houve diferença significativa entre as linhagens e os tratamentos durante o teste, sendo observada maior duração no corredor sem estrutura para o SWISS e BALB/C (ANOVA de duas vias para medidas repetidas, $F = 9,25$; $p = 0,01$) e maior tempo na gaiola sem estrutura para a linhagem C57BL (ANOVA de duas vias para medidas repetidas, $F = 3,22$; $p = 0,02$; **Tabela 2**).

A soma da frequência das unidades relacionadas com o comportamento de locomoção, interação com o objeto e auto limpeza não diferiu entre as linhagens e foi maior no tratamento cuia em relação ao acrílico e ao sem estrutura (ANOVA para medidas repetidas, $F = 140,53$; $p = 0,000$; **Figura 3**). A exibição dos padrões comportamentais foi maior durante a noite em todos os tratamentos e para as três linhagens (ANOVA para medidas repetidas, $F > 35,56$; $p < 0,000$; **Figura 3**).

A locomoção e a auto limpeza foram maiores nos tratamentos com enriquecimento físico em relação ao grupo sem estrutura para todas as linhagens. O tipo de estrutura física interferiu no comportamento de interação com o objeto, sendo maior no tratamento com a cuia (ANOVA para medidas repetidas, $F > 33,45$; $p < 0,000$; **Figura 4**).

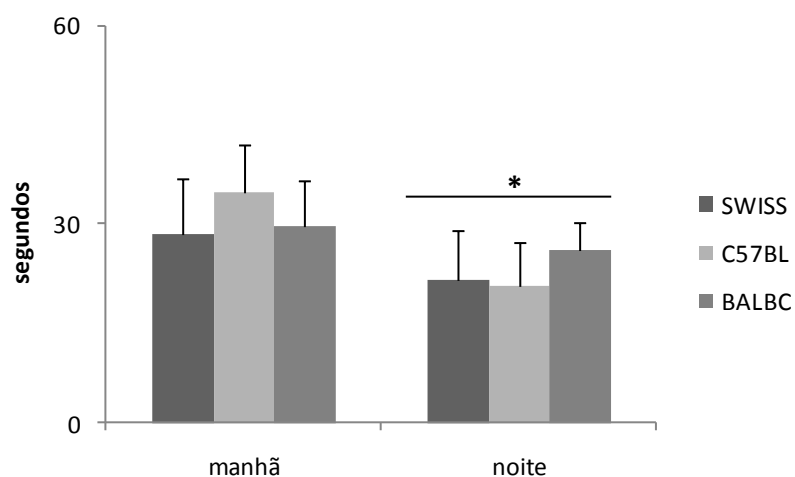


Figura 2. Média (\pm desvio padrão) da latência para a locomoção durante a aclimação entre as três linhagens e em cada período de observação (manhã e noite). Asterisco indica diferença significativa entre os períodos diurno e noturno (ANOVA de duas vias, $F=18,41$; $p=0,002$).

Tabela 1. Média (\pm desvio padrão) da frequência nos corredores durante a aclimação e do teste nas três linhagens em cada tratamento experimental.

Parâmetros (segundos)	SWISS			C57BL			BALB/C			F*
	sem estrutura	cuia	acrílico	sem estrutura	cuia	Acrílico	sem estrutura	cuia	acrílico	
Duração no corredor (aclimação)	42,60 \pm 4,96	65,62 \pm 7,03	78,02 \pm 18,07	44,00 \pm 3,55	59,35 \pm 8,75	55,97 \pm 16,54	42,60 \pm 14,67	26,20 \pm 11,86	13,60 \pm 10,05	1,37
Duração no corredor (teste)	510,22 \pm 117,63 _a	289,42 \pm 79,21 _b	286,37 \pm 65,36 _c	610,22 \pm 80,75 _a	453,1 \pm 71,36 _b	567,19 \pm 146,03 _a	632,22 \pm 131,44 _a	358,15 \pm 117,49 _b	484,94 \pm 57,68 _c	9,25
Duração na gaiola (teste)	513,0 \pm 78,70 _{bc}	495,5 \pm 87,79 _b	504,1 \pm 86,78 _b	369,4 \pm 173,78 _a	472,3 \pm 150,97 _b	800,7 \pm 133,50 _c	606,7 \pm 118,27 _{bc}	575,8 \pm 70,93 _b	633,3 \pm 139,81 _b	3,22

* Análise de Variância de duas vias para medidas repetidas (Tukey, $p < 0,05$)

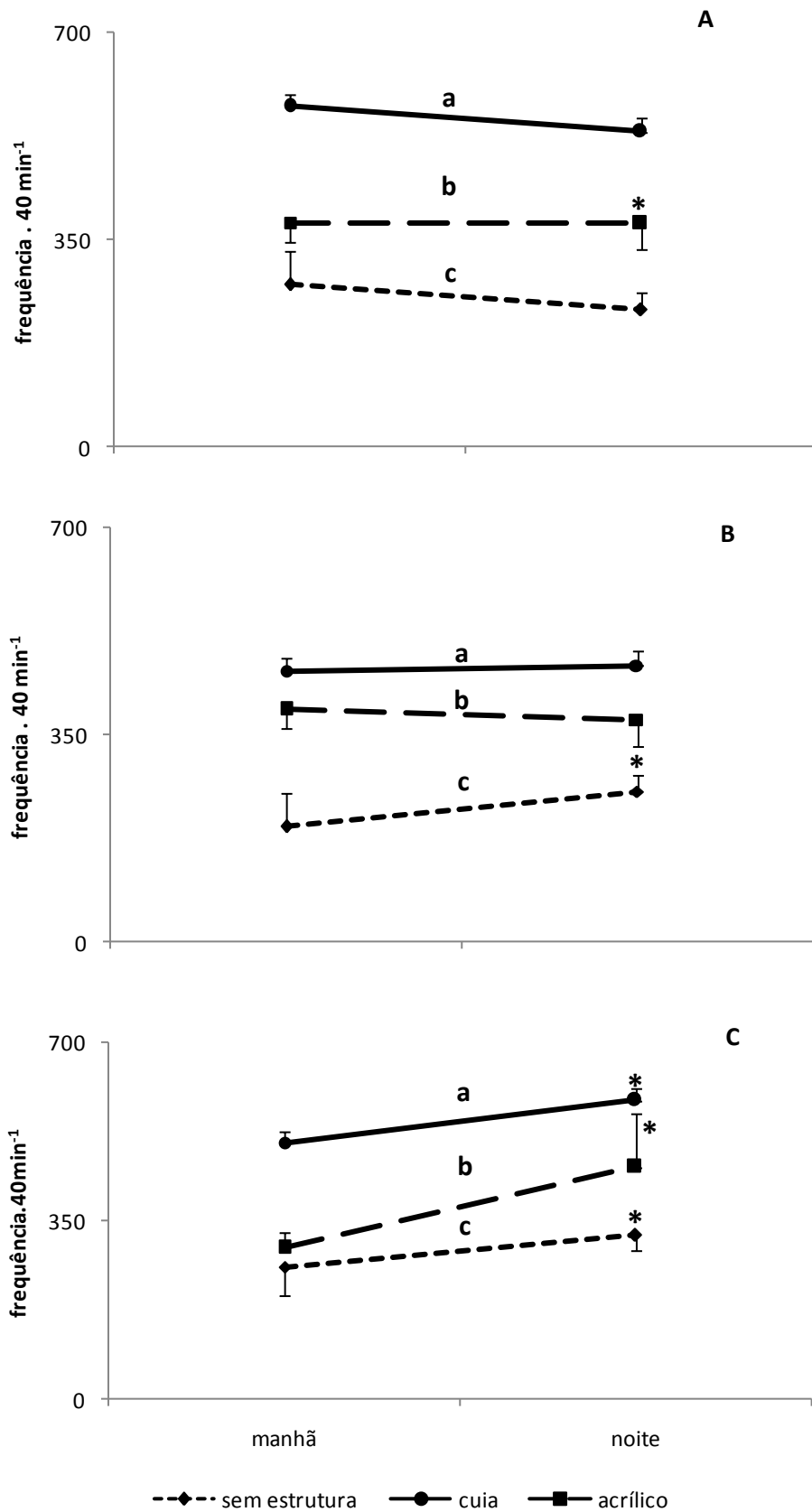


Figura 3. Média (\pm desvio padrão) da soma das unidades comportamentais em cada tratamento experimental e período de observação. **A**-SWISS; **B**- C57BL e **C**- BALB/C. Asterisco indica diferença entre manhã e noite. Letras indicam diferença significativa entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$).

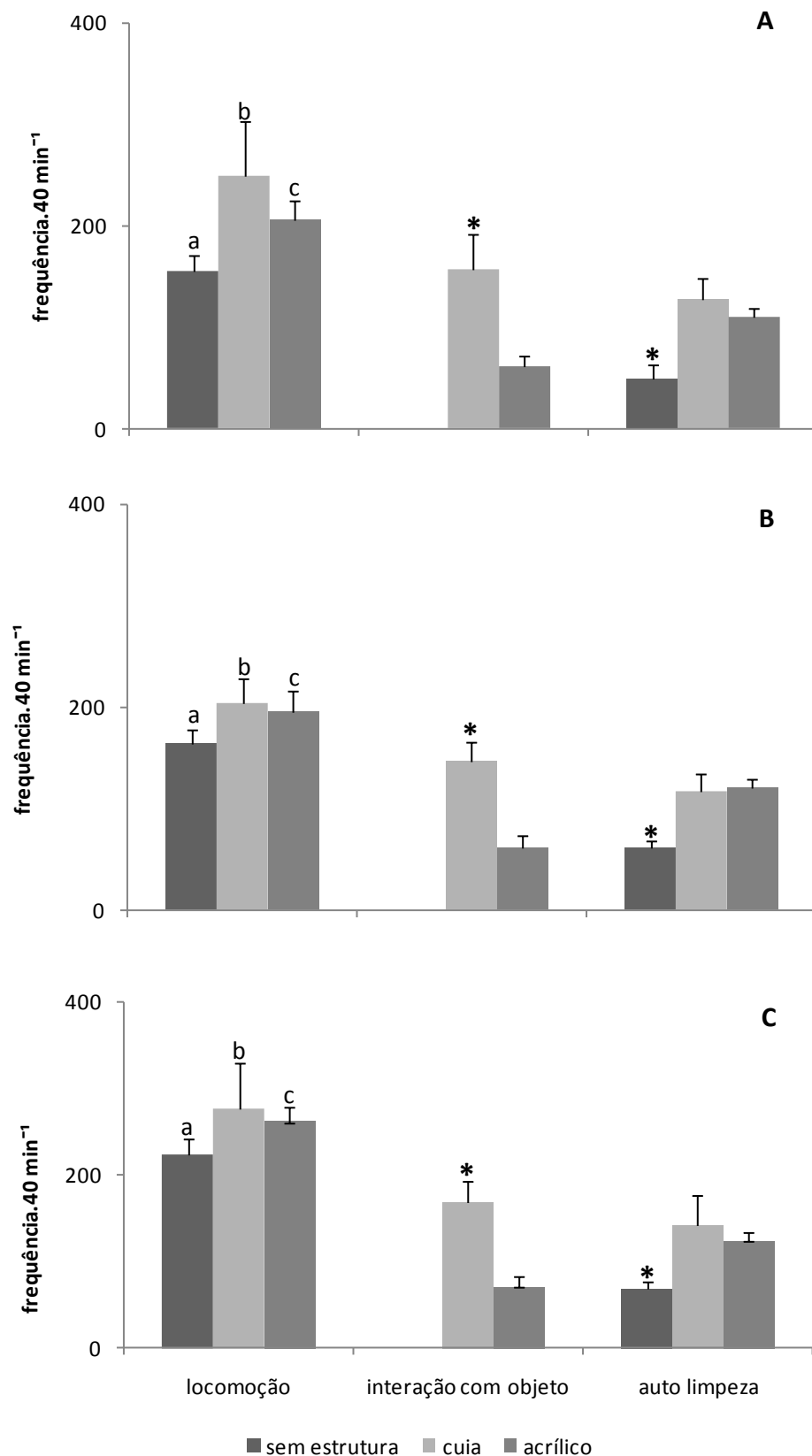


Figura 4. Média (\pm desvio padrão) das categorias comportamentais em cada tratamento experimental e em cada linhagem. **A**-SWISS; **B**- C57BL e **C**- BALB/C. Letras e asterisco indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

As categorias comportamentais encontradas foram semelhantes às descritas para camundongos e ratos (BALCOMBE, 2005; ABOU-ISMAIL, 2011; COIMBRA *et al.*, 2014). Além disso, foi inserida no etograma a unidade de apoiar na estrutura, não descrita nos estudos citados. As análises feitas entre os períodos do dia evidenciam que as categorias comportamentais foram exibidas com maior frequência durante a noite, ressaltando que os roedores apresentam hábitos noturnos (LAPCHIK *et al.*, 2009). Assim, reforça-se a importância de considerar o período de desenvolvimento dos experimentos em laboratório, pois a menor atividade do animal pode interferir nos resultados de trabalhos realizados em diversas áreas.

Não houve diferença na latência para a locomoção e no tempo de permanência nos corredores durante a aclimação entre as linhagens, o que evidencia semelhante motivação para iniciar o comportamento exploratório e a atividade locomotora em camundongos. De fato, Rodrigues *et al.* (2013) resalta que as linhagens SWISS e BALB/C exibem comportamentos de locomoção, alimentação e auto limpeza semelhantes, o que também foi evidenciado pela frequência das unidades comportamentais analisadas.

Considerando o teste de escolha, foi observado que durante a aclimação os animais não tiveram preferência pelos corredores que ligavam a área neutra, indicando a aleatorização do experimento e, conseqüentemente, a adequada aplicação do teste. No entanto, observou-se uma preferência pelo corredor (SWISS e BALB/C) e gaiola sem estrutura (C57BL), mostrando que os animais preferem o tratamento sem estrutura. Essa escolha pode estar relacionada ao maior espaço disponível para a locomoção e exibição de comportamentos associados ao substrato.

O enriquecimento ambiental para animais de laboratório permite aumento da atividade física e de comportamento exploratório (VAN-LOO *et al.*, 2002; VANDERSCHUREN *et al.*, 1995; ABOU-ISMAIL, 2011). De fato, os tratamentos com estrutura (cuia e acrílico) apresentaram maior frequência de exibição dos comportamentos em relação à condição sem estrutura, o que evidencia a importância do enriquecimento ambiental. Além disso, a interação com o objeto indica que o tipo de material interfere no comportamento dos animais, diferindo do que foi relatado por Coimbra *et al.* (2014) para camundongos C57BL mantidos em grupos de quatro indivíduos. Assim, pode-se concluir

que a presença do co-específico interfere na interação dos animais com os diferentes tipos de enriquecimento físico do ambiente.

De acordo com Coimbra *et al.* (2014), a implantação do enriquecimento não altera os parâmetros fisiológicos dos animais, porém modula os parâmetros comportamentais quando os animais são mantidos em grupos, sendo que a estrutura de acrílico aumenta a frequência de interação agressiva em relação à presença de cuia ou à ausência de enriquecimento ambiental. No entanto, os animais alojados individualmente preferem gaiolas sem enriquecimento físico. Isso indica que a importância do espaço disponível para os animais é maior que a presença da estrutura física, ressaltando a necessidade de cuidados durante a manutenção em cativeiro, tais como, a adequada densidade populacional. Diante do exposto, conclui-se que a presença e o tipo de estrutura interferem nos comportamentos de locomoção e auto limpeza e que a condição social modula a escolha pelo ambiente.

6. REFERÊNCIAS

- Abou-Ismaïl, U.A. 2011. Are the effects of enrichment due to the presence of multiple items or a particular item in the cages of laboratory rat? *Applied Animal Behaviour Science*, 134: 72-82.
- Andrade, A.; Pinto, S.C.; Oliveira, R.S. 2002. Animais de Laboratório: Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- Balcombe, J.P. 2006. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review. *Laboratory Animals*, 40: 217-235.
- Box, H.O. 1999. Temperament and socially mediated learning among primates. Pp.33-56, UK: Cambridge University press.
- Box, H.O. 2006. Bem estar animal. In: Yamamoto, M.E; Volpato, G.L. (Eds). Comportamento animal. Natal: Editora UFRN.
- Broom, D.; Johnson, K.G. 1993. Stress and Animal Welfare. London: Chapman & Hall.
- Broom, D.M. (Ed). Forkman, B.; Blokhuis, H.J.; Broom, D.M.; Kaiser, S.; Koolhaas, J.M.; Levine, S.; Mendl, M.; Plotsky, P.M.; Schedlowski, M. Key sources of variability in coping. In: 2001. Coping with challenge: Welfare in animals including humans. Berlin: Dahlem University Press.
- Broom, D.; Molento, K.G. 2004. Animal Welfare: concepts and measurement. *Journal of Animal Science*, 69: 41-69.

- Chorilli, M.; Michelin, D.C.; Salgado, H.R.N. 2007. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28: 6-23.
- Close, B.; Banister, K.; Baumans, V.; Bernoth, E.M.; Bromage, N.B. 1996. Recommendations for for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Laboratory Animals*, 31: 1-32.
- Coimbra, F.C.; Moroni, F.T.; Carvalho, T.B. 2014. Enriquecimento físico afeta parâmetros indicadores de bem estar em camundongos. *RESBCAL*, 2: 195-205.
- Dawkins, M.S. 2008. Battery hens name their price: consumer demand theory and the measurement of ethological 'needs'. *Animal Behavior*, 31: 1195-205.
- Forkman, B.; Blokhuis, H.J.; Broom, D.M.; Kaiser, S.; Koolhaas, J.M.; Levine, S.; Mendl, M.; Plotsky, P.M.; Schedlowski, M. 2001. Key sources of variability in coping. In: Broom, D.M. (Ed). *Coping with challenge: Welfare in animals including humans*. Berlin: Dahlem University Press.
- Fraser A.F.; Broom D.M. 1990. *Farm animal behavior and welfare*. Londres: Bailliere Tindall.
- Goes, T.C.; Antunes, F.D.; Almeida-Souza, T.H.; Ursulino, F.R.C.; Garcez, F.B.; Melo, A.L.L.; Teixeira-Silva, F. 2013. Comportamento de ratos Wistar no Paradigma da Exploração Livre. Departamento de Fisiologia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, 9:12.
- Hughes, B.O.; Duncan, I.J.H. 1998. The notion of ethological "need", models of motivation and welfare. *Animal Behaviour*, 36, 1696-1707.
- Lapchik, V.B.V.; Mattaraia, V.G.M.; KO, G.M. 2009. *Cuidados e manejo de animais de laboratório*. São Paulo: Atheneu Editora.
- Manser, S.E.; Broom, D.M.; Overend, P.; Morris, T.H. 1998. Operant studies to determine the strength of preference in laboratory rats for nest-boxes and nesting materials. *Laboratory Animals*, 32: 36-41.
- Newberry, R.C. 1995. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science*, 44: 229-243.
- Olsson, I.A.S.; Dahlborn, K. 2002. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Laboratory Animals*, 36: 243-70.
- Paixão, R.L.; Schramm, F.R. 2001. Ethics and animal experimentation: what is debated? *Caderno de Saúde Pública*, 15: 99-110.
- Rodrigues, F.V.B.; Klouzel, M.A.; Demarque, K.C.; Rangel, J.A.; da Silva, L.C.C.P.; Batista, W.S.; Gameiro, L.S.; Oliveira, G.M. 2013. Etograma de camundongos em biotério

II: Quais são as principais diferenças no comportamento de swiss webster e balb/c?
RESBCAL, 2: 20-30.

Simpson, J; Kelly, J.P. 2011. Behavioural Brain Research: The impact of environmental enrichment in laboratory rats- Behavioural and neurochemical aspects. Department of Pharmacology and Therapeutics, National University of Ireland, Galway, Ireland.

Vanderschuren, L.J.M.J.; Niesink, R.J.M.; Spruijt, B.; Van-de-Weerd, J.M. 1995. Influence of environmental factors on social play behavior of juvenile rats. *Physiology & Behavior*, 58: 119-123.

Van-de-Weerd, H.A.; Aarsen, E.L. 1995. Preferences for nesting material as environmental for laboratory mice. *Laboratory Animals*, 31: 133-43.

Van-Loo, P.L.P.; Bloom, H.J.M.; Baumans, M.K.M. 2005. Assessment of the use of two commercially available environmental enrichments by laboratory mice by preference testing. *Laboratory Animals*, 39: 58-67.

Vasconcellos, A.S. 2005. Enriquecimento ambiental e bem-estar. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Volpato, G.L.; Yamamoto, M.E. (2007). Comportamento Animal. Natal, RN: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Zar, J. 1999. Biostatistical analyses. New Jersey: Printice Hall.