



**GABRIELA BUENO DE CAMARGO PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE  
CAMUNDONGOS BALB/C SUBMETIDOS A ENRIQUECIMENTO  
AMBIENTAL DE NIDIFICAÇÃO DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E  
ALEITAMENTO**

**LAVRAS – MG**

**2023**

**GABRIELA BUENO DE CAMARGO PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE CAMUNDONGOS  
BALB/C SUBMETIDOS A ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL DE NIDIFICAÇÃO  
DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E ALEITAMENTO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Prof. Dr. Marcelo Passamani

Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dra. Samantha Mesquita Favoretto

Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

PEREIRA, GABRIELA BUENO DE CAMARGO.  
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS REPRODUTIVOS  
DE CAMUNDONGOS BALB/C SUBMETIDOS A  
ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL DE NIDIFICAÇÃO  
DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E ALEITAMENTO /  
GABRIELA BUENO DE CAMARGO PEREIRA. - 2023.  
27 p. : il.

Orientador(a): Marcelo Passamani.  
Coorientador(a): Samantha Mesquita Favoretto.  
Monografia (graduação) - Universidade Federal de  
Lavras, 2023.  
Bibliografia.

1. Camundongo. 2. Gestação e aleitamento. 3.  
Enriquecimento Ambiental. I. Passamani, Marcelo. II.  
Favoretto, Samantha Mesquita. III. Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu orientador(a).

**GABRIELA BUENO DE CAMARGO PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE CAMUNDONGOS BALB/C  
SUBMETIDOS A ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL DE NIDIFICAÇÃO  
DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E ALEITAMENTO**

**EVALUATION OF REPRODUCTIVE PARAMETERS OF BALB/C MICE  
SUBJECTED TO NESTING ENVIRONMENTAL ENRICHMENT DURING THE  
GESTATION AND LACTATING PHASE**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

APROVADA em 13 de dezembro de 2023.

Prof. Dr. Marcelo Passamani UFLA

Prof<sup>a</sup>. Dra. Samantha Mesquita Favoretto UFLA

**LAVRAS – MG**

**2023**

*A todos os animais que fizeram parte da minha trajetória.  
Aqueles que cuidei e/ou resgatei, que tive contato no Parque São Francisco de Assis, que tive  
o prazer de cuidar no GEAS, aos meus Poka, Alaska, Órfão, Nina, Pingo e Gorda e aos  
camundongos que estudei.  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus avós Cida e Hélio, que sempre me apoiaram e foram minha base para tudo.

A minha mãe e aos meus irmãos por sempre estarem ao meu lado mesmo de longe.

Ao meu melhor amigo Gabriel que segue sendo minha família e meu maior aliado desde quando nos conhecemos.

A todos os meus amigos em Lavras e Valinhos que me apoiaram com muita paciência e perseverança desde o começo dessa jornada, especialmente ao Pedro, Marco, Amanda, Vinicius, Lucas, Vitória e Enzo, que acompanharam tudo de pertinho.

Ao Dr. Marco Dinali Viglioni, que além de amigo, ajudou na elaboração do projeto.

A Co-orientadora professora Dra. Samantha, pela oportunidade e por me ensinar sobre garra, determinação e coragem, desde o núcleo de estudos que me motivou imensamente até a execução do projeto no biotério.

Ao Orientador professor Dr. Marcelo Passamani, por me orientar e auxiliar na elaboração do projeto.

Aos professores Dr. Marconi Souza Silva e Dr. Sérgio Alves Bambirra por aceitarem fazer parte da banca avaliadora.

Muito obrigada!!

## RESUMO

O camundongo é o mamífero mais utilizado como modelo de experimentação animal no mundo, porém animais de experimentação estão sempre em risco de estresse quando criados em cativeiro. Diversos fatores podem influenciar no aparecimento de estresse em camundongos cativos, comprometendo o seu bem-estar. O emprego de práticas como Enriquecimento Ambiental (EA) beneficiam o animal uma vez que atuam na redução do estresse e contribuem para a regulação fisiológica do corpo através da expressão de comportamentos naturais da espécie. Durante a fase reprodutiva é fundamental a oferta de EA por influenciar positivamente nos parâmetros reprodutivos dos camundongos. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar os parâmetros reprodutivos de camundongos Balb/c submetidos a EA de nidificação durante a fase de gestação e aleitamento a um grupo sem EA. Para comparação entre os grupos foi utilizada a Análise de estatística descritiva (média, mediana, desvio padrão) e o teste de ANOVA para os parâmetros reprodutivos. O experimento teve a duração de 2 meses, do dia da junção dos casais até o desmame da última ninhada. Foram utilizados 120 camundongos (*Mus musculus*), da linhagem Balb/C originados do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os camundongos foram divididos em casais e distribuídos em 2 grupos. O grupo controle (SEA), contendo 30 casais, sem oferta de EA, e o grupo enriquecido (CEA), contendo 30 casais, aos quais foi ofertado uma folha de papel absorvente (lenço de papel) da marca *kleenex*<sup>1</sup>. Foram analisados os parâmetros relacionados aos dias até o primeiro parto, número de filhotes nascidos por caixa, peso dos filhotes um dia após o nascimento, número de filhotes desmamados por caixa, peso dos filhotes no desmame, ganho de peso dos filhotes, taxa de sobrevivência dos filhotes e taxa de fertilidade das fêmeas. Os resultados não apontam diferença significativa entre os parâmetros. Entretanto, a presença do EA influenciou positivamente, diminuindo a variabilidade dos dados em torno da mediana para o grupo com enriquecimento. Isso sugere que a utilização de enriquecimento ambiental pode favorecer a padronização dos parâmetros zootécnicos observados dos filhotes dentro de colônias de reprodução de camundongos.

Palavras-chave: Camundongo; Gestação e aleitamento; Enriquecimento Ambiental.

---

<sup>1</sup> Kleenex: Fabricante de lenço de papel

## ABSTRACT

The mouse is the most widely used mammal as an animal model in experimental research worldwide; however, experimental animals are consistently at risk of stress when bred in captivity. Several factors can influence the onset of stress in captive mice, compromising their well-being. Implementing practices such as Environmental Enrichment (EE) benefits the animal by reducing stress and contributing to the physiological regulation of the body through the expression of natural species-specific behaviors. During the reproductive phase, offering EE is fundamental as it positively influences the reproductive parameters of mice. Hence, the objective of this study was to compare the reproductive parameters of Balb/c mice subjected to nest-building EE during the gestation and lactation phases against a group without EE. Descriptive statistical analysis (mean, median, standard deviation) and ANOVA testing were used to compare the groups concerning reproductive parameters. The experiment lasted for 2 months, from the day the pairs were joined until the weaning of the last litter. We used 120 mice (*Mus musculus*), of the Balb/C lineage, sourced from the Central Animal Facility of the Federal University of Lavras (UFLA). The mice were paired and distributed into 2 groups: the control group (SEA), consisting of 30 pairs without EE, and group enriched (CEA), comprising 30 pairs provided with a *kleenex*® brand absorbent paper sheet. Parameters related to days until the first parturition, number of pups born per cage, birth weight of pups, number of pups weaned per cage, weaning weight of pups, pup weight gain, survival rate, and fertility rate were analyzed. The results did not indicate a significant difference among the parameters. However, the presence of EE positively influenced smaller variations around the median for this group. This suggests that the use of environmental enrichment can favor the standardization of the zootechnical parameters observed in mouse breeding colonies

Key-words: Mouse; Pregnancy and breastfeeding; Environmental enrichment.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equipamentos utilizados para alojamento das caixas de camundongos .....	11
Figura 2 – Peso dos filhotes ao nascimento e ao desmame. ....	14
Figura 3 – Ganho de peso dos filhotes até o desmame.....	14
Figura 4 – Correlação entre o ganho de peso e o número de filhotes desmamados.....	15
Figura 5 – Dias até o primeiro parto das fêmeas. ....	16
Figura 6 – Número de filhotes nascidos e desmamados.....	17
Figura 7 – Taxa de sobrevivência.....	17

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Estatística descritiva dos parâmetros reprodutivos entre os grupos SEA e CEA... 13	13
Tabela 2 – Correlação entre o ganho de peso e o número de filhotes desmamados. .... 15	15

## LISTA DE SIGLAS

EA	Enriquecimento Ambiental
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
SNC	Sistema Nervoso Central
CEA	Com Enriquecimento Ambiental
SEA	Sem Enriquecimento Ambiental

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 OBJETIVO</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Objetivo geral.....	2
1.2.2 Objetivos específicos.....	2
<b>1.3 Justificativa</b> .....	<b>3</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Camundongos</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Pressão do cativeiro</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3 Gestação e desmame</b> .....	<b>5</b>
<b>2.4 Bem-estar animal</b> .....	<b>6</b>
<b>2.5 Legislação e Refinamento</b> .....	<b>6</b>
<b>2.6 Enriquecimento Ambiental</b> .....	<b>7</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 Amostra de animais</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 Grupos analisados</b> .....	<b>10</b>
<b>3.4 Manejo dos animais</b> .....	<b>10</b>
<b>3.5 Parâmetros zootécnicos</b> .....	<b>11</b>
<b>3.6 Método estatístico</b> .....	<b>12</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>12</b>
<b>4.1 Peso dos filhotes</b> .....	<b>13</b>
<b>4.2 Número de dias até o primeiro parto</b> .....	<b>15</b>
<b>4.3 Quantidade de filhotes</b> .....	<b>16</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>5.1 Peso dos filhotes</b> .....	<b>18</b>
<b>5.2 Número de dias até o primeiro parto</b> .....	<b>19</b>
<b>5.3 Quantidade de filhotes</b> .....	<b>20</b>
<b>5.4 Correlação entre ganho de peso e quantidade de filhotes</b> .....	<b>20</b>
<b>5.5 Discussão final</b> .....	<b>20</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>22</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Mesmo o camundongo sendo o mamífero mais investigado durante décadas é observada uma grande lacuna de conhecimento a seu respeito, assim como a disseminação de mitos sobre a espécie (ANDERSON, 1981; TIMM, 2011). O camundongo, também conhecido como “rato doméstico” ou “*house mouse*”, é um animal que pertence à espécie *Mus musculus* (LINNAEUS, 1758), do gênero *Mus* da família *Muridae* da ordem *Rodentia* e classe mamíferos. Seu ancestral veio da Ásia e atualmente é o animal com a maior distribuição global dentre todos os mamíferos não humanos (KO *et al.*, 2017; MacKAY, 2010).

Suas relações com os seres humanos são registradas desde o século XVII e perduram até os dias atuais, tanto no cotidiano quanto nas instituições de pesquisas. Além disso, suas características biológicas propiciam sua utilização em pesquisas por apresentarem fácil manutenção, curto ciclo de vida, alta fecundidade e um custo de vida relativamente baixo, e com isso possibilitam a instalação de colônias de reprodução e manejo de forma mais fácil e acessível (KO *et al.*, 2017; SANTOS, 2006).

Em colônias de reprodução, diversos parâmetros podem ser controlados, inclusive os parâmetros reprodutivos (KO *et al.*, 2017). A gestação dos camundongos é breve e dura cerca de 21 dias, podendo durar mais em fêmeas lactantes. O seu ciclo estral tem duração de 5 dias, ocorrendo ainda a possibilidade de um cio pós-parto em sistemas de reprodução que permitem a presença do macho durante a gestação (CHORILLI *et al.*, 2007). Em biotérios a reprodução acontece durante o ano todo fornecendo um alto número de animais disponíveis para a pesquisa (MacKAY, 2010).

Os filhotes de camundongo nascem com um peso médio de um grama, desprovidos de pelos e completamente dependentes do cuidado materno. Portanto esta fase inicial é crucial para um desenvolvimento saudável, tornando-se um período crítico para sua sobrevivência. É durante essa fase também que observamos o registro de canibalismo dos filhotes pela mãe (KO *et al.*, 2017). O canibalismo, ou negligência dos filhotes, é uma evidência do estresse parental e afeta diretamente a taxa de sobrevivência da ninhada (LECKER; FROBERG-FEJKO, 2016). O estresse materno, devido a falta de materiais para ninho, manejo inadequado, nessa fase pode trazer consequências negativas tanto para a fêmea quanto para os filhotes (DONADIO *et al.*, 2014; REINHARDT; REINHARDT, 2006).

Apesar de serem frequentes na literatura estudos sobre enriquecimento ambiental em camundongos pouquíssimos trabalhos utilizam esta ferramenta em fase de gestação, mesmo está sendo uma fase crítica (SANTOS, 2006). Segundo Olsson e Dahlbor (2002), existe a

necessidade de realizar mais estudos sobre o tema com o enfoque no enriquecimento ambiental como ferramenta para a diminuição do estresse parental.

Estudos como de Cymerblit-Sabbaet *al.* (2013), Cutuli *et al.* (2015) e Zuena *et al.* (2016) destacam que a oferta de EA na fase pré-natal possui diversos benefícios emocionais, cognitivos e comportamentais para a prole e podem ter influências hormonais a longo prazo em seus descendentes. Segundo Reinhardt e Reinhardt (2006), o uso do EA pode diminuir o índice de infanticídio, canibalismo ou negligência, aumentar a taxa de sucesso de acasalamentos e melhorar o comportamento social do grupo.

A confecção do ninho, comportamento inato da espécie, pode ser afetado pela pressão do cativeiro. Comportamentos inatos como esse são de extrema importância na vida dos roedores e sua diminuição pode resultar na falta do cuidado parental (LEWARCH; HOEKSTRA, 2018) e consequente diminuição de prolificidade em cativeiro. Conclui-se assim que a oferta de material para a expressão de tal comportamento é indispensável e possui influência direta em parâmetros reprodutivos (HUTCHINSON, 2005).

## 1.2 OBJETIVO

### 1.2.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral comparar os parâmetros reprodutivos de camundongos Balb/c submetidos a enriquecimento ambiental de nidificação durante as fases de gestação e aleitamento.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Para atender ao objetivo geral foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar os números de filhotes nascidos e desmamados entre os grupos com e sem enriquecimento;
- b) Analisar o peso dos filhotes nascidos e desmamados entre os grupos com e sem enriquecimento;
- c) Avaliar as taxas de fertilidade dos casais dos grupos com e sem enriquecimento;
- d) Avaliar as taxas de sobrevivência dos filhotes dos grupos com e sem enriquecimento.

### 1.3 Justificativa

O bem-estar dos animais de experimentação não é benéfico apenas para o indivíduo, mas também contribui com a diminuição da variabilidade e do viés de pesquisa (FURTADO; OLIVEIRA, 2018). Fatores ambientais, como a possibilidade de expressar comportamentos essenciais da espécie, são imprescindíveis para garantia de maiores níveis de bem estar animal para camundongos em pesquisas biomédicas, como a formação de grupos, a construção de ninho e a possibilidade de exploração do ambiente. A dificuldade de expressão desses comportamentos pode levar ao desenvolvimento de comportamentos anormais como as estereotípias, automutilação, infanticídio e podem influenciar diretamente na saúde destes animais (BAUMANS *et al.*, 2010).

Devido à necessidade de uma alta produtividade em biotérios de criação, justifica-se o uso de técnicas que garantam bem-estar animal e, com isso, possam resultar em maiores taxas reprodutivas nas fêmeas, especialmente durante a fase de gestação e aleitamento. O EA é frequentemente mencionado como uma das principais técnicas para aumentar a qualidade de vida dos animais através da possibilidade de desenvolver suas funções biológicas e diminuir o estresse (KO *et al.*, 2017). Além disso, pode ser uma ferramenta importante no controle de comportamentos estereotipados, contexto frequentemente observado em ambientes cativos, como o biotério do presente estudo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Camundongos

O camundongo é um roedor que coexiste com o homem há milhares de anos. Esse roedor é um mamífero pertencente à ordem *Rodentia*, família *Muridae*, gênero *Mus* e espécie *Mus musculus*. Essa espécie possui hábitos noturnos e uma boa adaptação a lugares diversificados. Naturalmente, sua cor varia entre marrom escuro, claro e cinza. Sua audição é o seu sentido mais apurado, atingindo alta sensibilidade a ultrassons e ruídos de diferentes intensidades. O seu olfato também é de extrema importância, uma vez que influencia diretamente no seu comportamento social, através de odores e feromônios. Além disso, esses roedores possuem uma visão pouco eficiente, o que possibilita o refinamento dos outros sentidos durante seu período de atividade (KO *et al.*, 2017; SANTOS, 2002). Em vida livre, esses roedores possuem o hábito de cavar túneis subterrâneos como forma de locomoção e

buscam por áreas menos abertas a fim de ter menor visibilidade aos predadores. Com isso, passam cerca de duas a três horas do tempo forrageando à procura de alimentos e diversos outros materiais (ANDERSON, 1981).

Sua introdução como animal de laboratório deve-se principalmente ao fato de ser pequeno, muito prolífero, ter o período de gestação curto e ser de fácil domesticação e manutenção. O período gestacional curto dos camundongos viabiliza seu uso e a instalação de colônias de reprodução em biotérios. As fêmeas contam com um ciclo estral de 4 a 5 dias, os quais são divididos em proestro, estro, metaestro e diestro. E ainda, quando agrupadas somente as fêmeas, apresentam a peculiaridade do anestro, condição definida pela ausência do ciclo estral por conta da falta do macho. Sua gestação, assim como o tempo de desmame, duram em média 21 dias, porém, se estiverem amamentando neste período a gestação pode durar mais alguns dias (CHORILLI *et al.*, 2007; KO *et al.*, 2017; SANTOS, 2006).

Por conta disso, em meados do século XIX, os camundongos se tornaram um recurso comum de laboratório, especialmente no ramo da genética, o que levou ao aparecimento de diferentes linhagens e o aumento do seu uso. Por volta dos anos 2000, cerca de 67% de todas as pesquisas com animais em biomedicina e ensaios biológicos contavam com experimentos em camundongos (NRC, 1988; SANTOS, 2006). Entretanto, o ambiente de cativeiro resulta em diversas limitações quanto às suas necessidades biológicas e comportamentais. As principais atividades registradas nesses ambientes são a exploração do ambiente, procura de alimento, higienização e repouso (CHUMBINHO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Dessa forma, vemos que o confinamento nas gaiolas e a falta de atividades motoras e cognitivas dificultam a expressão de comportamentos naturais das espécies e são uns dos principais desafios encontrados, influenciando diretamente a sua qualidade de vida (REINHARDT; REINHARDT, 2006).

## 2.2 Pressão do cativeiro

Animais de experimentação estão em constante risco de estresse quando expostos a métodos de criação em confinamento permanente, manejo inadequado e/ou por realização de procedimentos que causem desconforto (REINHARDT; REINHARDT, 2006). Biologicamente, o estresse é inevitável e ocorre quando estímulos externos induzem respostas fisiológicas, alterando sua homeostase. Porém, como aponta Moberg (1985), uma vez que o estresse está presente na evolução dos sistemas biológicos, devemos tentar minimizar os custos de um estresse indesejável, a fim de aumentar o bem-estar animal.



Alguns autores analisam o estresse do cativo em camundongos buscando uma forma de minimizá-los. Estudos como o de Van de Weerd *et al.* (2002), Weed e Raber (2005) e Belzet *al.* (2003) têm demonstrado que diversos fatores podem influenciar no estresse de camundongos em cativeiro, incluindo o tamanho do recinto, a presença de enriquecimento ambiental, expressão comportamental e formação de grupos sociais.

A dificuldade de executar atividades básicas da espécie, tais como roer e triturar objetos, realizar interações sociais e comportamentos específicos, como a construção de ninho, podem influenciar negativamente nos níveis de estresse dos camundongos. (BLOOMSMITH *et al.*, 2018). O estudo de Belzet *al.* (2003), que disponibilizou materiais para tais atividades e observou concentrações de adrenocorticotrofina e corticosterona (hormônios indicadores de estresse) significativamente menores. Além disso, Ivy *et al.* (2008) evidenciaram alterações no comportamento básico dos roedores cativos em relação à falta de materiais para a construção de ninhos, o que influenciou na quantidade e qualidade da ninhada, além do aumento nos níveis de corticosterona.

### 2.3 Gestação e desmame

A influência da falta no material de ninho durante a gestação acontece porque, para os roedores, a construção de ninho é um comportamento reprodutivo fundamental que auxilia na termorregulação e no aumento do cuidado parental (LEWARCH; HOEKSTRA, 2018). Os camundongos recém-nascidos são extremamente dependentes do cuidado parental, especialmente do cuidado materno. Por exemplo, a limitação desse cuidado pode impactar no comprometimento do comportamento reprodutivo e, conseqüentemente, no desenvolvimento dos filhotes, além de resultar em altos níveis de estresse e ansiedade nos filhotes (IVY *et al.* 2008).

Uma forma de evidenciar o estresse nas fêmeas é a identificação de canibalismo ou da negligência dos filhotes (LECKER; FROBERG-FEJKO, 2016). O estresse durante o período pré-natal traz uma série de conseqüências fisiológicas e comportamentais, tais como a diminuição no desenvolvimento cognitivo e maturação dos filhotes. Além disso, também pode desencadear alterações permanentes em vários sistemas, especialmente no Sistema Nervoso Central (SNC) (DONADIO *et al.*, 2014; HAUSER *et al.*, 2009). Seu prolongamento até o período pré-desmame também possui influência no desenvolvimento das funções fisiológicas e nas mudanças comportamentais predispostas pelo estresse pré-natal (ZAGRON;

WEINSTOCK, 2006). A partir disso vemos a necessidade do controle do estresse em animais de experimentação, especialmente durante a fase gestacional.

#### 2.4 Bem-estar animal

O estresse presente em ambientes de cativeiro pode ser evitado a fim de promover um maior grau de bem-estar para esses animais. Segundo Broom (1986), o bem-estar de um indivíduo está relacionado às suas tentativas de lidar (*coping*) com o ambiente externo. Já Mellor et al. (2009), afirmam que o bem-estar é o estado em que o animal se encontra a partir da sua experiência de convergência entre os estímulos internos e externos aos quais está sujeito. Ou seja, o bem-estar é alcançado quando há uma interação harmoniosa entre o estado mental e físico do indivíduo e seu ambiente, demonstrando um equilíbrio que favorece a saúde e o conforto animal.

Durante décadas, animais de experimentação viveram em confinamento solitário em gaiolas sem qualquer estímulo ou preocupação com a expressão do seu repertório comportamental (BEAVER, 1989). A popularização desse contexto através de livros como “Animal Machines” de Ruth Harrison (1964) somado aos avanços científicos acerca da biologia dos animais possibilitou que o estudo do bem-estar animal fosse mais bem estabelecido, corroborando com a implementação de diversas legislações que promovem o bem-estar animal durante os experimentos (BROOM, 2011).

No Brasil, a preocupação com a adoção de princípios éticos que visem o bem-estar animal em atividades científicas vem crescendo desde o início dos anos 2000. Diversas comissões foram organizadas a fim de regularizar e garantir que toda e qualquer manipulação em animais seja realizada de forma adequada, tendo como objetivo o bem-estar animal (ANDERSEN; HELFENSTEIN, 2015). No ano de 2008 foi estabelecida a lei 11.794 de 2008, também conhecida como Lei Arouca, que garante que toda pesquisa com modelos animais seja credenciada junto ao Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) através do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) vinculado às instituições de ensino e pesquisa.

#### 2.5 Legislação e Refinamento

Entre as principais competências do CEUA estão a avaliação da justificativa da utilização de animais e a responsabilidade ética do uso visando o bem-estar animal. Além

disso, esta deve garantir os princípios dos 3R's (*replacement, reduction, refinement*), ou seja, que buscam a substituição, a redução e o refinamento das técnicas de experimentação animal (MARIGO *et al.*, 2013). O livro “*The Principles of Humane Experimental Technique*” foi originalmente publicado em 1959 por Russel e Burch e desde então segue fundamentando protocolos e programas que visam avançar a qualidade da ciência que estuda técnicas de manejo e criação de modelos animais (TANNENBAUM; BENNETT, 2015).

Os 3R's foram definidos neste livro como conceitos que buscavam a melhora do tratamento dos animais enquanto avançavam na qualidade das pesquisas. Esse contexto motivou diversos pesquisadores, uma vez que o bem-estar dos animais de experimentação não é benéfico apenas para o indivíduo, mas também influencia na diminuição da variabilidade e do viés de pesquisa (FURTADO; OLIVEIRA, 2018).

Um desses conceitos é a substituição, que visa utilizar modelos e ferramentas juntamente às mais recentes tecnologias, acelerando o desenvolvimento de novas técnicas que resolvam questões científicas cruciais sem recorrer ao uso de animais. Já o conceito de redução, busca minimizar o número de animais utilizados de acordo com o objetivo científico através de um desenho experimental adequado e reprodutível. Por fim, o refinamento, tem por objetivo fomentar o progresso na pesquisa do bem-estar animal por meio da exploração das tecnologias *in vivomais* recentes, aprimorando a compreensão do impacto do bem-estar nos resultados científicos (National Centre For the Replacement, Refinement & Reduction of Animals In research – NC3Rs, 2023). Assim, o emprego de técnicas de refinamento, como o enriquecimento ambiental, beneficia os animais cativos, já que reduzem o estresse e contribuem para o equilíbrio e homeostase do corpo, contribuindo assim para o avanço do cuidado animal (BLOOMSMITH *et al.*, 2018).

## 2.6 Enriquecimento Ambiental

O EA é frequentemente mencionado como uma das principais técnicas para a promoção do bem-estar animal, melhorando a qualidade de vida dos animais e possibilitando o desempenho de suas necessidades biológicas, cognitivas e sociais (BOERE, 2001). Além disso, o enriquecimento pode diminuir a pressão do cativeiro, através da introdução de materiais no ambiente que influenciam diretamente na fisiologia e no comportamento dos animais (SANTOS, 2006; BELZ *et al.*, 2003). A definição do que pode ser enriquecimento ambiental ainda é assunto de debate entre alguns autores e traz diversos desafios para aqueles que buscam uma definição exata do assunto (RATUSKI; WEARY, 2022). Entretanto, desde

que foi descrito por Yerkes, em 1925, o EA é utilizado como sinônimo de complexidade ambiental a fim de promover um maior leque de possibilidades e escolhas, aumentando assim o bem estar dos animais cativos.

O enriquecimento atua através da utilização de estímulos externos que promovem a expressão de comportamentos mais próximos possíveis do natural (SHEPHERDSON, 1998). Segundo Young (2003), esses estímulos podem ser sensoriais, sociais, alimentares, cognitivos e/ou estruturais. Por exemplo, estímulos cognitivos trazem desafios mentais como, por exemplo, quebra cabeças e dispositivos de caixas com aberturas. Estímulos sociais contam com interações entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes. Além disso, estímulos alimentares procuram oferecer os alimentos de uma forma interativa, priorizando a biologia e comportamento alimentar da espécie em questão. Já o estímulo sensorial explora os cinco sentidos do animal através da oferta de materiais que exalam odores específicos, ou possuem gosto ou textura diferentes. E por fim, o estímulo estrutural promove o acréscimo e/ou a mudança de estruturas no recinto a fim de promover novas experiências periodicamente para o animal (YOUNG, 2003; MARKOWITZ, 2011).

O efeito do enriquecimento ambiental no bem-estar animal é avaliado através dos parâmetros comportamentais e fisiológicos (HILL; BROOM, 2009). Portanto o objetivo do enriquecimento deve ser claro e conciso, já que este deve ser pautado na biologia e na necessidade da espécie, visando a escolha do estímulo mais adequado ao animal. Para animais de experimentação como os camundongos, os quais interagem muito com o exterior, a falta de controle do seu ambiente pode ser um grande fator de estresse e desequilíbrio dos parâmetros comportamentais e fisiológicos (LINE, 1987). As condições da habitação, como o espaço da gaiola, os grupos sociais, os sistemas de ventilação, temperatura, possibilidade de termorregulação, materiais para cama e enriquecimentos são pontos importantes de discussão e fatores imprescindíveis de se considerar na hora do manejo dessas espécies (GONDER; LABER, 2007).

Um exemplo disso é durante o período reprodutivo, no qual é indispensável a oferta de material para ninho para que a expressão de comportamentos reprodutivos e maternos sejam feitos de forma saudável (FURTADO; OLIVEIRA, 2018; HUTCHINSON, 2005). De acordo com revisões recentes sobre enriquecimento para camundongos, como a de Ratuski, e Weary (2022), o material para ninho é o enriquecimento mais utilizado e recomendado para esse caso. Dentro dos materiais disponíveis, o lenço de papel é o material preferido pelos camundongos, sendo frequentemente mencionado nos estudos de preferência e revisões

(MANSER *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2018, OLSSON; DAHLBORN, 2002, REINHARDT; REINHARDT, 2006, ROSA, 2022, WEERD *et al.*, 1997).

Não somente os comportamentos reprodutivos, mas os parâmetros reprodutivos também são influenciados pela presença de enriquecimento. Moreira (2015) observou maior produtividade em grupos de camundongos que receberam EA. Além disso, Silva *et al.* (2021) testaram diferentes enriquecimentos para avaliar parâmetros reprodutivos evidenciando a preferência pelos materiais de nidificação. Ambos evidenciaram a importância do bem-estar da fêmea, especialmente durante a fase reprodutiva, como salienta Rosa (2022). Ambientes enriquecidos durante a fase gestacional são de extrema importância por aumentar o cuidado materno com a prole e diminuir respostas ansiosas (STRZELEWICZ *et al.*, 2019). Além disso, a recente revisão de literatura feita por Sparling *et al.* (2020) evidenciou que o EA é fundamental durante o período de desenvolvimento gestacional.

O enriquecimento ambiental durante o período gestacional em camundongos desempenha um papel fundamental no bem-estar materno e no desenvolvimento da prole. Estudos científicos nessa área têm revelado a significativa influência da construção de ninho na expressão de comportamentos naturais, no estresse materno, e até mesmo na saúde dos filhotes (ROSA, 2022). Compreender e aprimorar estratégias de enriquecimento durante essa fase crucial não só promove um ambiente mais natural e enriquecedor para os camundongos de laboratório, mas também influencia na validade e diminuição do viés de pesquisa (FURTADO; OLIVEIRA, 2018).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Amostra de animais

Foram utilizados 120 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Balb/C, originados do Biotério Central da UFLA. Os animais são considerados convencionais, estando alojados em um biotério sem barreiras sanitárias. No momento da realização do experimento os animais estavam com aproximadamente 80 dias e foram monitorados durante a fase de gestação e aleitamento (Entre os meses de julho e agosto).

Os animais foram alojados por casal e mantidos em sistema monogâmico intensivo, ou seja, um macho e uma fêmea (POILEY, 1970), em caixas de polipropileno com 30 x 19 cm, cama de maravalha marca “J.R. MARAVALHA<sup>2</sup>”, com ração “NUVILAB CR-1<sup>3</sup>” e água

---

<sup>2</sup>J.R. MARAVALHA: Comerciante de serragens.

*ad libitum*. As estantes estavam dentro de uma sala com exaustão, temperatura de 23°C e fotoperíodo 12/12 horas. A limpeza das caixas foi realizada 2 vezes por semana (terça-feira e sexta-feira), no horário que se estende das 7:00 às 11:00 horas, seguindo cronograma preestabelecido do Biotério Central da UFLA. O manejo dos animais foi realizado sempre pela mesma pessoa, e com o auxílio de tubos de papelão para evitar alterações no comportamento do animal e viés de pesquisa. Todos os protocolos experimentais utilizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFLA), protocolo CEUA/UFLA nº 037/23.

### 3.2 Grupos analisados

Os camundongos foram agrupados em um casal por caixa, totalizando 60 casais/caixa e as caixas foram distribuídas em dois grupos: grupo controle - sem enriquecimento ambiental (SEA), e Grupo tratado- com enriquecimento ambiental (CEA) Ao SEA não foi fornecido qualquer material além da cama, água e ração *ad libitum*. Ao CEA foi fornecido, além dos itens básicos, uma folha de papel absorvente (lenço de papel) da marca “kleenex®<sup>4</sup>” duas vezes por semana, durante todo o período do experimento.

### 3.3 Enriquecimento Ambiental

A oferta do enriquecimento ocorreu dois dias após a junção dos casais e as reposições aconteceram nas datas de troca de caixa. Os animais eram monitorados diariamente. O desmame e sexagem dos filhotes foram feitos 21 dias após a data de nascimento.

### 3.4 Manejo dos animais

Para a avaliação do número de filhotes, assim que o nascimento foi detectado, esperou-se um dia para fazer a coleta e a pesagem da ninhada a fim de não interferir no comportamento materno pós-parto. No que se refere à pesagem dos filhotes, foi utilizada uma balança da marca “Balmak®”<sup>5</sup>, modelo ELP-10, fabricada em 2020. O peso dos filhotes foi avaliado um dia após o nascimento e no dia do desmame aos 21 dias de vida.

---

<sup>3</sup>NUVILAB CR-1: Empresa de produtos agropecuários.

<sup>4</sup>Kleenex: marca de lenço de papel da Kimberly-Clark.

<sup>5</sup>Balmak: Produtos de tecnologia

A fim de evitar o estresse e a diminuição do cuidado materno, o manuseio dos neonatos e dos casais durante a pesagem e limpeza das caixas, foi realizado de forma rápida, com a utilização de luvas de látex friccionadas na maravalha e um rolo de papel para transporte dos animais sem contato humano.

As imagens da Figura 1(a, b e c) ilustram os materiais utilizados, tais como a estante e a rack utilizadas no experimento onde foram alojadas as caixas.

Figura 1 – Equipamentos utilizados para alojamento das caixas de camundongos



Legenda: A Figura 1(a) indica a estante com porta e controle de entrada de ar onde foram alojadas as caixas. A Figura 1(b) indica a rack desligada e sem ventilação onde também foram alojadas as caixas. A Figura 1(c) indica a caixa de manutenção dos camundongos sem o bebedouro e sem a cama de maravalha.

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

### 3.5 Parâmetros zootécnicos

- a) No que se refere aos parâmetros zootécnicos, foram analisados pelo período de dois meses os seguintes parâmetros:
- b) Os dias até o primeiro parto (DAP) - Dias entre a data da junção dos casais e o dia do parto.

- c) O número de filhotes nascidos por caixa ( $N_{\text{nascidos}}$ ) - Média do número de filhotes avaliado um dia após o nascimento. Caso houvesse nascimento e morte antes do dia um, estes não eram contabilizados no experimento.
- d) O peso dos filhotes ao nascimento ( $P_{\text{nascidos}}$ ) - Média do peso dos filhotes no dia seguinte ao seu nascimento.
- e) O número de filhotes desmamados por caixa ( $N_{\text{desmamados}}$ ) - Média do número de filhotes no dia do desmame por caixa.
- f) O peso dos filhotes ao desmame ( $P_{\text{desmamados}}$ ) - Média do peso dos filhotes no dia do desmame.
- g) O ganho de peso dos filhotes ( $\text{ganho\_peso}$ ) - Média do valor absoluto em gramas do peso ao desmame subtraindo-se o peso ao nascimento.
- h) A taxa de sobrevivência ( $\text{taxa\_sobrevive}$ ) - Número de filhotes ao desmame / Número de filhotes ao nascimento.
- i) A taxa de fertilidade - Número total de casais que reproduziram em cada grupo / total de casais no grupo após exclusão das caixas com vazamento de bebedouro.

### 3.6 Método estatístico

Todos os parâmetros possuem distribuição normal e foram analisados através do teste ANOVA com auxílio do *software* STATA 14. Foi realizada uma análise de *one-way* ANOVA (ou univariada) com um intervalo de confiança para a média de 95% (VIEIRA, 2015) para avaliar a homogeneidade da variância em cada um dos parâmetros nos dois grupos (SEA e CEA). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos abaixo de 5% ( $p < 0.05$ ) como padrão para o experimento (QUINN; KEOUGH, 2002).

## 4 RESULTADOS

Durante o experimento, cinco casais foram removidos por conta de uma possível inundação na caixa (três deles pertenciam ao grupo enriquecido e dois deles ao grupo controle) resultando em 28 caixas no grupo Sem EA (SEA) e 27 caixas no grupo com EA (CEA). Outros oito casais não apresentaram gravidez durante todo o período do experimento (três deles pertenciam ao grupo enriquecido e cinco deles ao grupo controle). Estes, por outro lado, não foram removidos do experimento (ANEXO A, Tabela 1A).



Com isso, a taxa de fertilidade no grupo SEA foi de 82,14% (23/28) e no grupo CEA foi de 88,88% (24/27). Conforme a Tabela 1, é possível observar as médias, medianas, desvio padrão e os valores estatísticos de F e p-valor do teste ANOVA, para os grupos CEA e SEA conforme os parâmetros analisados.

Tabela 1 – Estatística descritiva dos parâmetros reprodutivos entre os grupos SEA e CEA.

Parâmetros	Sem EA			Com EA			Estatística	
	Média	Mediana	Desvio	Média	Mediana	Desvio	F	p-valor
P_nascidos(g)	1.85	1.87	0.29	1.87	1.90	0.22	0.05	0.816
P_desmamados(g)	8.75	8.66	1.80	8.90	9.28	1.67	0.13	0.717
Ganho_peso(g)	6.86	6.71	1.76	7.04	7.28	1.64	0.11	0.737
DAP	25.54	23.00	7.18	23.21	22.00	3.34	1.97	0.167
N_nascidos	6.77	7.00	3.30	7.65	7.00	2.18	1.12	0.296
N_desmamados	5.68	6.00	3.44	6.56	7.00	2.84	0.88	0.352
Taxa_sobrevive	0.79	1.00	0.36	0.84	1.00	0.29	0.26	0.610

Legenda: P\_nascidos (g) representa a média do peso dos filhotes nascidos em gramas, por caixa. P\_desmamados (g) representa a média do peso dos filhotes ao desmame em gramas, por caixa. Ganho\_peso (g) representa a média, em gramas, do peso dos filhotes ao desmame subtraindo-se do peso dos filhotes ao nascimento. DAP representa os dias desde a junção dos casais até o parto da primeira ninhada. N\_nascidos representa a média do número total de filhotes nascidos. N\_desmamados representa a média do número total de filhotes desmamados. Taxa\_sobrevive representa o número de caixas que reproduziu dividido pelo número total de caixas em cada grupo.

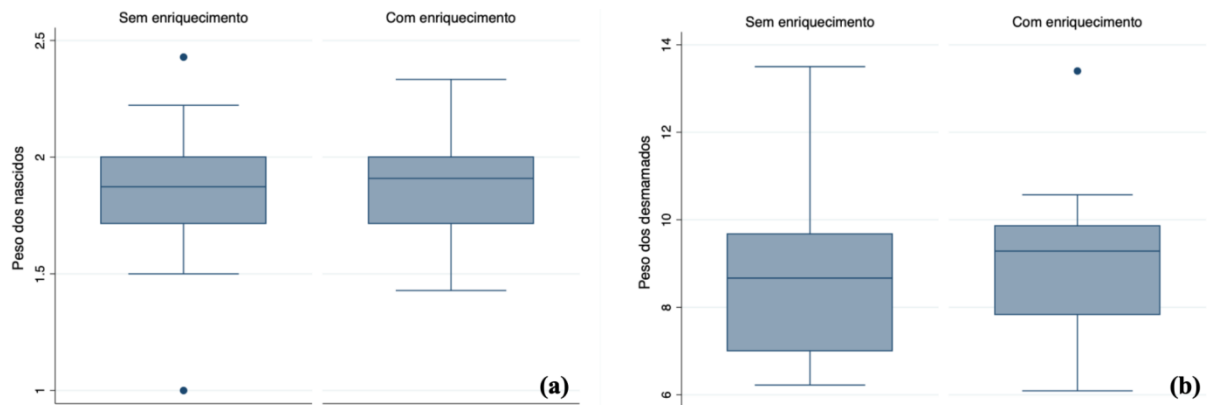
Fonte: Arquivo pessoal (2023).

#### 4.1 Peso dos filhotes

A média de peso dos filhotes ao nascimento (P\_nascidos) do grupo CEA foi levemente superior em relação à média do grupo SEA, 1,87 e 1,85 respectivamente, sem apresentar diferença significativa entre os grupos ( $F=0,05$ ,  $p=0,816$ ). Semelhante à média de peso dos grupos ao desmame (P\_desmamados), que também foi superior para o grupo enriquecido, porém, não apresentou significância estatística para teste de ANOVA ( $F=0,13$ ,  $p=0,717$ ).

A Figura 2(a) demonstra o peso dos filhotes nascidos, e indica uma variação levemente maior em torno da mediana para o grupo CEA. Entretanto, apresentou mais uniformidade sem *outliers* como mostra o gráfico do grupo SEA. Na Figura 2(b) demonstra o peso dos filhotes desmamados, indicando uma variação maior em torno da mediana para o grupo SEA, maiores pesos e maior uniformidade do peso em proximidade a mediana para o grupo CEA.

Figura 2 – Peso dos filhotes ao nascimento e ao desmame.



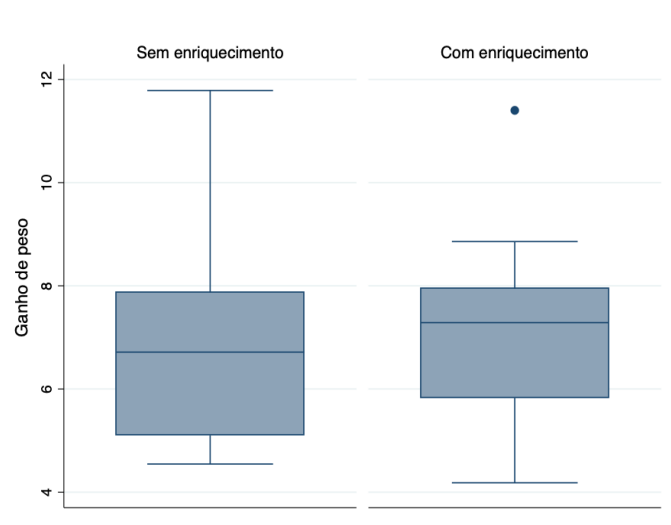
Legenda: Na Figura 2(a) indica o peso dos filhotes no nascimento. A Figura 2 (b) ilustra o peso dos filhotes no desmame.

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

#### 4.2 Ganho de peso

O ganho de peso ( $\text{Ganho\_peso}$ ) apresentou médias distintas entre os grupos. O grupo CEA apresentou média de 7.04 gramas e o grupo SEA apresentou média de 6.86 g, entretanto estas diferenças não foram significativas ( $F= 0.11$ ,  $p=0.737$ ), conforme indicado na Tabela 1. A Figura 3 apresenta uma variação maior em torno da mediana para o grupo SEA e uma concentração do ganho de peso menor em torno da mediana para o grupo CEA. Evidencia também o “outlier” para o grupo CEA.

Figura 3 – Ganho de peso dos filhotes até o desmame.

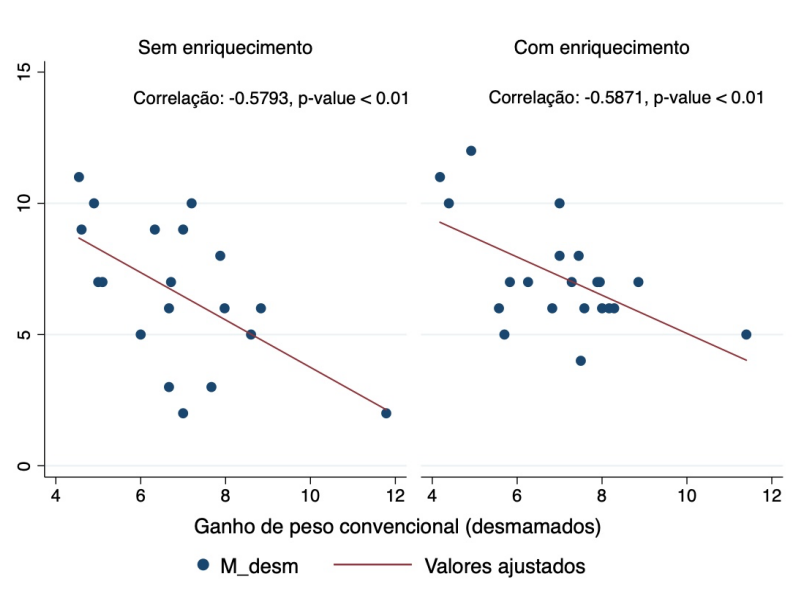


Legenda: Na figura, o gráfico da esquerda indica a quantidade de ganho de peso para o grupo sem enriquecimento. O gráfico da direita indica a quantidade de ganho de peso para o grupo com enriquecimento.

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Já a Figura 4, evidencia a correlação entre o ganho de peso em relação ao número de desmamados. Ambos os grupos apresentaram uma tendência negativa, entretanto, o grupo CEA apresenta uma distribuição menor com valores mais concentrados.

Figura 4 – Correlação entre o ganho de peso e o número de filhotes desmamados.



Legenda: A figura 4 a esquerda, indica o gráfico de correlação do ganho de peso com o número de desmamados para o grupo sem enriquecimento. A direita, a figura indica o gráfico de correlação entre o ganho de peso e o número de desmamados para o grupo com enriquecimento.

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Conforme a tabela 2, vemos que os grupos SEA e CEA apresentaram correlação acima da média (acima de 0.50), porém não muito forte, uma vez que os valores são inferiores a 0.7 (VIEIRA, 2015)

Tabela 2 – Correlação entre o ganho de peso e o número de filhotes desmamados.

Parâmetro	Sem enriquecimento	Com enriquecimento
N_desm	1.0000	1.0000
Ganho peso	-0.5793	-0.5871

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

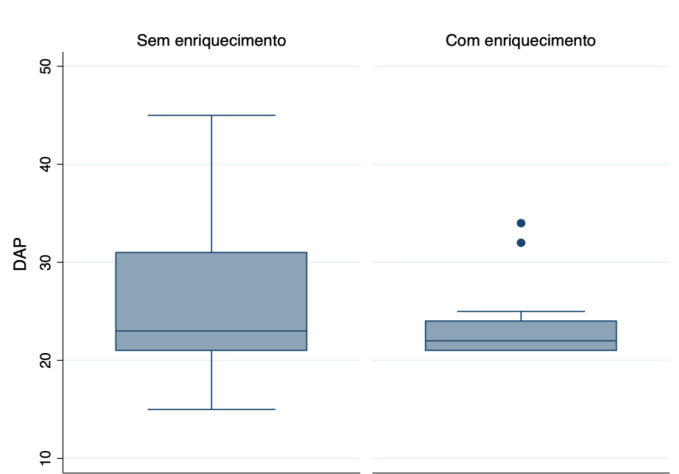
#### 4.2 Número de dias até o primeiro parto

Em relação ao tempo (em dias) até o primeiro parto (DAP), o grupo CEA demorou um pouco menos tempo (média de 23 dias) em relação ao grupo SEA (média de 25 dias) como

mostra a Tabela 1. Entretanto esta diferença não foi significativa ( $F=1,97$ ,  $p=0,167$ ). A taxa de fertilidade no grupo SEA foi de 78,26% (18/23) e no grupo CEA foi de 87,50% (21/24).

A Figura 5 indica que o grupo CEA apresentou uma variação menor de DAP em torno da mediana em relação ao grupo SEA, resultando em uma padronização maior da ninhada em relação ao tempo do acasalamento até o primeiro parto, embora no grupo CEA houve dois *outliers* por volta de 30 dias.

Figura 5 – Dias até o primeiro parto das fêmeas.



Legenda: Na figura, o gráfico da esquerda indica a quantidade de dias até o primeiro parto para o grupo sem enriquecimento. O gráfico da direita indica a quantidade de dias até o primeiro parto para o grupo com enriquecimento.

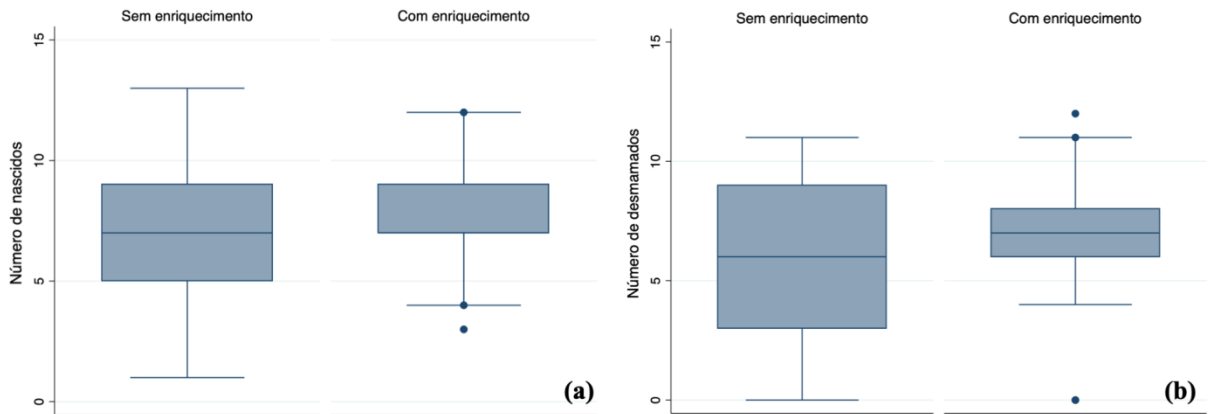
Fonte: Arquivo pessoal (2023).

#### 4.3 Quantidade de filhotes

Observa-se através da Tabela 1, que o número de nascidos ( $N_{\text{nascidos}}$ ) do grupo CEA apresentou média superior em relação ao grupo SEA: 7,00 e 6,77 nascidos, respectivamente; entretanto, não apresentou diferença significativa ( $F=1,12$ ,  $p=0,296$ ). Ao desmame ( $N_{\text{desmamados}}$ ), a média no grupo enriquecido também foi maior (Tabela 1), mas também sem diferença significativa ( $F=0,88$ ,  $p=0,352$ ).

A Figura 6(a-b) representa a quantidade de filhotes ao nascimento (a) e ao desmame (b). Ambos indicam uma variação muito maior em torno da mediana para o grupo SEA, enquanto a variação em torno da mediana para o grupo CEA é muito menor. Com isso, os valores para o grupo CEA são mais uniformes e constantes.

Figura 6 – Número de filhotes nascidos e desmamados.

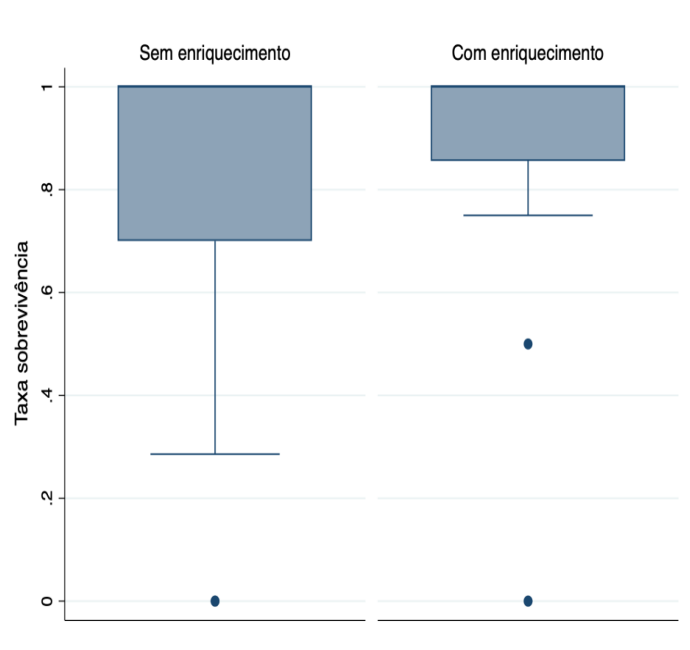


Legenda: A Figura 6(a) indica o número de filhotes no nascimento. A Figura 6(b) ilustra o número de filhotes no desmame.

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

A Figura 7 destaca que a taxa de sobrevivência dos filhotes por caixa foi maior no grupo enriquecido (0,84%) em comparação ao não enriquecido (0,79%), porém, sem diferença significativa ( $F=0,26$ ,  $p=0,610$ ).

Figura 7 – Taxa de sobrevivência.



Legenda: Na figura 7, o gráfico da esquerda indica a variação da taxa de sobrevivência para o grupo sem enriquecimento. O gráfico da direita indica a variação da taxa de sobrevivência para o grupo com enriquecimento.

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

## 5 DISCUSSÃO

A proposta de oferecer enriquecimento ambiental para fêmeas gestantes e lactantes é fornecer a chance de um ambiente que se assemelhe ao natural, atendendo às necessidades de cuidados com a prole. Além disso, busca reduzir a pressão do cativeiro, visando a diminuição do estresse, o aumento do cuidado materno e o equilíbrio dos parâmetros reprodutivos (DONADIO, 2014; IVY, 2008).

### 5.1 Peso dos filhotes

A média de peso da ninhada ao nascer para o grupo enriquecido foi maior, entretanto, a variação em torno da mediana também foi maior. Em contrapartida, os pesos encontram-se concentrados no centro sem apresentar *outliers*, como vemos no gráfico do grupo não enriquecido. Isso indica que há uma padronização do peso dos filhotes ao nascer para o grupo CEA. Durante a gestação, os níveis de estresse e gasto energético da fêmea podem influenciar no desenvolvimento pré natal dos filhotes (ZAGRON; WEINSTOCK, 2006). O material para enriquecimento é importante durante essa fase uma vez que pode contribuir para a diminuição do estresse da fêmea e expressão de comportamentos reprodutivos como a confecção do ninho (IVY, 2008).

Ao desmame, o peso dos filhotes, para o grupo CEA apresentou uma média maior e uma variação menor em torno da mediana. Com isso, podemos evidenciar a influência do enriquecimento pós-parto sobre o cuidado materno e conseqüentemente, a amamentação (CUTULI *et al.* 2015), por apresentar maiores pesos ao desmame no grupo CEA.

Médias semelhantes foram encontradas por Silva *et al.* (2021) e Moreira (2015), entretanto estas não apresentaram diferenças significativas, assim como no presente estudo. Já no estudo realizado por Gaskill *et al.* (2013), os grupos de camundongos Balb/c que receberam materiais para confecção de ninho apresentaram diferença significativa no peso dos filhotes apenas no desmame. Em Van de Weerd *et al.* (2002), observou-se que ratos criados em gaiolas com enriquecimento de lenço eram mais pesados e apresentavam maiores ganho de peso do que os ratos criados em gaiolas sem nenhum tipo de enriquecimento. Em mamíferos, o ambiente fornecido pela mãe pode influenciar no aumento do cuidado materno e este cuidado, é um dos fatores mais primários e determinantes para a sobrevivência da prole, influenciando em traços como tamanho da ninhada e ganho de peso (CHEVERUD; MOORE 1994; MOUSSEAU; FOX, 1998).

Neste estudo, o ganho de peso dos filhotes, mesmo sem apresentar diferença significativa, apresentou uma média maior e variação de peso menor para o grupo CEA em relação ao SEA, o que demonstra mais padronização do ganho de peso no grupo CEA. Fornecer materiais para confecção de ninho, como o enriquecimento “lenço de papel”, pode aumentar os níveis desse cuidado pois a confecção do ninho é uma forma de comportamento materno que possibilita a termorregulação e aumento da amamentação e é um fator crítico no cuidado parental dos roedores, além de estar intrinsecamente relacionada ao seu sucesso reprodutivo (maior número de filhotes, maior ganho de peso e etc.) e a sobrevivência e *fitness* dos filhotes (BULT; LYNCH, 1997; LEWARCH; HOEKSTRA, 2018; DONADIO *et al.*, 2014).

Além disso, resultados semelhantes foram encontrados em Silva *et al.* (2021), Moreira (2015), e Shair *et al.* (2012), onde a oferta de material para ninho influenciou de forma positiva o ganho de peso, mesmo sem apresentar diferença significativa. Já Gaskill *et al.* (2013), testando também material para ninho observou diferença no ganho de peso entre os grupos tratado e não tratado assim como Whitaker *et al.* (2009), em seu estudo com a linhagem C57BL/6. Assim, o principal fator relacionado ao ganho de peso em filhotes é a amamentação. A amamentação depende de fatores externos como o estímulo a sucção, pelos filhotes (NUMAN, 2009). Portanto, a presença do ninho estimula o cuidado parental trazendo um ambiente favorável para a fêmea e para a ninhada e possibilitando assim, a maior amamentação, termorregulação e expressão de comportamentos maternos.

## 5.2 Número de dias até o primeiro parto

O enriquecimento ambiental (EA) foi um fator positivo para os parâmetros reprodutivos em relação aos dias até o primeiro parto, já que no grupo CEA houve uma variação menor nos dias quando comparado ao grupo SEA (23 dias e 25 dias, respectivamente). Desse modo, a variação do DAP também foi menor para grupos enriquecidos em trabalhos como de Fontes *et al.* (2012) e Silva *et al.* (2021), no entanto, estes autores também não obtiveram diferença significativa. Ambos testaram a influência de diferentes enriquecimentos nos dias até o parto em roedores. Apenas no estudo de Martinelli *et al.* (2018) foi encontrado diferença significativa ao analisar o tempo do 1º parto para ratas fêmeas enriquecidas com cama de sabugo de milho.

Considerando que no presente estudo a menor variação do DAP no grupo CEA, sugere-se que o uso de EA seja promissor para colônias de reprodução, uma vez que há

necessidade de nascimento síncrono de filhotes para fornecimento de animais aos pesquisadores de forma padrão. A padronização das idades dos animais é essencial para evitar viés dentro de uma pesquisa (KO *et al.*, 2017).

### 5.3 Quantidade de filhotes

Neste experimento, as médias de filhotes nascidos e desmamados do grupo com enriquecimento (CEA) foram maiores do que as médias do grupo sem enriquecimento (SEA), mesmo não sendo diferenças significativas. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Silva *et al.* (2021), Shair *et al.* (2012) e por Moreira (2015). Apenas em Whitaker *et al.* (2009) e Gaskill *et al.* (2013) foi identificado que a oferta do EA influenciou significativamente no número de filhotes.

### 5.4 Correlação entre ganho de peso e quantidade de filhotes

Normalmente, um aumento no número de descendentes resulta numa redução na sua qualidade, uma vez que os mesmos recursos parentais são divididos entre um maior número de indivíduos (SMITH; SMITH, 1955). Ao correlacionar o ganho de peso com o número de filhotes desmamados, evidenciamos esse fato devido à tendência negativa, que nos mostra que o aumento do número de filhotes, resulta em uma diminuição do ganho de peso da ninhada. O grupo CEA por sua vez, apresenta um agrupamento maior na parte central em relação ao SEA. Ou seja, o enriquecimento contribuiu para a padronização do ganho de peso em relação aos filhotes desmamados.

### 5.5 Discussão final

Portanto, apesar de não ter sido observada diferença estatística neste estudo a oferta de lenços de papel como material para nidificação foi relevante através da diminuição da variação em torno da mediana para os parâmetros reprodutivos analisados. Fatores externos como a presença do ninho contribuiu com a termorregulação dos filhotes, o aumento da amamentação e expressão de comportamentos maternos como a lambedura e os estímulos iniciais nos filhotes, contribuindo assim para seu desenvolvimento fisiológico e cognitivo (PARENT; MEANEY, 2008; LAMBERT *et al.*, 2005). Além disso, a confecção do ninho é



um comportamento inato da espécie e contribui com a manutenção do bem estar através de atividades motoras e exploratórias (LEWARCH; HOEKSTRA, 2018).

## 6 CONCLUSÕES

Essa pesquisa teve como objetivo geral comparar os parâmetros reprodutivos de camundongos Balb/c submetidos a enriquecimento ambiental de nidificação durante as fases de gestação e aleitamento. Os resultados por meio da análise de ANOVA indicaram que o enriquecimento ambiental não teve diferença significativa nos parâmetros zootécnicos, mas influenciou de forma positiva nas taxas de fertilidade e sobrevivência, assim como na quantidade e peso dos filhotes.

Desse modo, foi possível concluir que as fêmeas foram expostas às mesmas condições nutricionais, luminosas e higiênicas, e com isso a possibilidade da interação com outros materiais, sem ser o material de cama, proporcionou uma maior expressão de comportamentos maternos como a construção de ninho e a manutenção dos filhotes. Isso indica que o enriquecimento pode contribuir para o aumento do bem-estar dos casais e com o aumento do cuidado materno, resultando em uma ninhada mais pesada. No entanto, são necessários maiores estudos comportamentais sobre a influência nos parâmetros reprodutivos dos camundongos, a fim de melhor compreender as dinâmicas individuais dos casais e como estas podem influenciar no desenvolvimento da prole.

Por fim, é possível destacar que o refinamento das técnicas como o EA merece atenção, pois podem ser aplicadas a diversas espécies e situações, além de ser uma ferramenta valiosa na promoção do bem-estar animal. Especialmente em colônias de reprodução, onde os parâmetros reprodutivos são controlados, o enriquecimento pode ser uma ferramenta valiosa para reduzir o estresse e promover o cuidado materno da ninhada. Portanto, é esperado que pesquisas futuras continuem a explorar mais a fundo esse tema, buscando identificar padrões não abordados neste estudo.

## REFERÊNCIAS

ANDERSEN M. L.; HELFENSTEIN, Tatiana. (coord.). Guia prático da legislação vigente sobre experimentação animal Ceua/Unifesp. São Paulo: **Unifesp**, p 10-40 2015.

ANDERSON, P. K. In: BERRY, R. J. (coord.). The biology of the house mouse. Symposia of the Zoological Society of London. Academic Press Inc., London, 715p, **Journal of Mammalogy**, Baltimore, v. 63, n. 3, p. 539-540, 1981.  
BAUMANS, V.; *et al.* Standardisation of environmental enrichment for laboratory mice and rats: Utilisation, practicality and variation in experimental results. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 37, n. 2, p. 101-114, 2010.

BEAVER, B. V. Environmental enrichment for laboratory animals. *ILAR Journal*, Oxford, v. 31, n. 2, p. 5-13, 1989.

BELZ, E. E. *et al.* Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 76, n. (3-4), p. 481-486, 2003.

BLOOMSMITH, M. A. *et al.* Behavioral Management Programs to Promote Laboratory Animal Welfare. In: WEICHBROD R. H.; THOMPSON G. A. NORTON J. N. (coord.). **Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing**. 2. ed. Boca Raton (FL), CRC Press, Chapter 5. p 63-82, 2018.

BOERE V. Behavior and environment enrichment. In: Fowler ME, Cubas ZS. **Biology, medicine and surgery of South American wild animals**. Ames, IA: Iowa University Press, p.263-266, 2001.

BROOM, D. M. Bem-estar animal. In: YAMAMOTO, Maria Emília.; VOLPATO Gilson Luiz, **Comportamento Animal**, 2. ed. p. 457-482. 2011.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v. 142, n. 6. p.524-526. 1986.

BULT, A.; LYNCH, C. B. Nesting and fitness: lifetime reproductive success in house mice bidirectionally selected for thermoregulatory nest-building behavior. **Behavior genetics**, v. 27, n. 3, p. 231-240, 1997.

CHEVERUD, J. M. & MOORE, A. J. (1994) Quantitative genetics and the role of the environment provided by relatives in behavioral evolution. In: BOAKE, Christine R. B. Chapter 2, **Quantitative Genetic Studies of Behavioral Evolution**. The University of Chicago Press, Chicago, 1994. 400p.

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 destes animais dentro da gaiola? **RESBCAL**, v.1 n.3, p. 255-262, jul./ago./set. 2012.

CUTULI, D. *et al.* Prereproductive maternal enrichment influences rat maternal care and offspring developmental trajectories: behavioral performances and neuroplasticity correlates. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, n. 66 p. 1-18, 2015.

CYMERBLIT-SABBA, A. *et al.* Prenatal Enriched Environment improves emotional and attentional reactivity to adulthood stress. **Behavioural Brain Research**, v. 241, n. 15, p. 185-90, 2013.

DONADIO, M.; VARGAS M. Efeitos do estresse no período gestacional em diferentes modelos experimentais: uma revisão da literatura. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 12, n. 41, p.81-86, 2014.

FONTES, R. S. *et al.* Efeito do enriquecimento ambiental na produção de camundongos C57BL/6 mantidos em diferentes sistemas de alojamento / Effects of environment enrichment on the production of C57BL/6 mice kept in diferente housing systems, **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 54-63, 2012, 2012.

FURTADO, A. K. S.; OLIVEIRA, G. M. A importância do bem-estar em animais de laboratório e sua influência nos resultados de ensaios científicos. **Revista Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 6, n. 2, 2018.

GASKILL, B. N. *et al.* The naked truth: Breeding performance in nude mice with and without nesting material. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 143, n. (2-4), p. 110-116, 2013.

GONDER, J. C.; LABER, K. A Renewed Look at Laboratory Rodent Housing and Management. **ILAR Journal**, Oxford, v. 48, p. 29-36. 2007.

HARRISON, R. Animal machines. London, UK: Vincent Stuart Ltd. 1964.

HAUSER J.; FELDON, J.; PRYCE, C. R. Direct and dam mediated effects of prenatal dexamethasone on emotionality, cognition and HPA axis in adult Wistar rats. **Hormones and behavior**, v. 56, n. 4, 364-375, 2009.

HILL, S. P.; BROOM, D. M. Measuring Zoo Animal Welfare: Theory and Practice. **Zoo Biology**, v. 28, p. 531-544, 2009.

HOUSE MOUSE. Integrated Pest Management for Home Gardeners and Landscape Professionals. **PEST NOTES**, University of California, Agriculture and Natural Resources, State wide Integrated Pest Management Program, Publication 7483, 2011. Disponível em: [https://ipm.ucanr.edu/legacy\\_assets/pdf/pestnotes/pnhousemouse.pdf](https://ipm.ucanr.edu/legacy_assets/pdf/pestnotes/pnhousemouse.pdf). Acesso em: 02 agosto 2023.

HUTCHINSON, E.; AVERY, Anne.; VANDEWOUDE, Sue. Environmental Enrichment for Laboratory Rodents. **ILAR Journal**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 148-161, 2005.

IVY, A. S.; BRUNSON, K. L.; SANDMAN, C.; BARAM, T. Z. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: A clinically relevant model for early-life stress. **Neuroscience**, v. 154, n. 3, p. 1132-1142, 2008.

KO, G. M.; LUCA R. R.; OLIVEIRA G. M. Camundongo de Laboratório In: LAPCHIK, V. V.; MATTARAIA, V. M.; KO, G. M. (coord.). Cuidados e manejo de animais de laboratório. Rio de Janeiro: Atheneu, 2. Ed., p. 169-199. 2017.

LAMBERT, T. J.; FERNANDEZ, S. M.; FRICK, K. M. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 83, n. 3, p. 206-216. 2005.

LECKER, J.; FROBERG-FEJKO, K. Using environmental enrichment and nutritional supplementation to improve breeding success in rodents. **Lab Animal**, 45(10), 406-407, 2016.

LEI 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm). Acesso em: 02 agosto 2023.

LEWARCH, C. L.; HOEKSTRA, H. E. The evolution of nesting behaviour in *Peromyscus* mice. **Animal Behaviour**, v. 139, p. 103-115. 2018.

LINE S.W. Environmental enrichment for laboratory primates. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 190, p. 854-859, 1987.

MacKAY, J. *Mus musculus* (house mouse). **CABI Digital Library**. 2010. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.35218>. Acesso em: 22 agosto 2023.

MANSER, C. E.; BROOM, D. M.; OVEREND, P.; MORRIS, T. H. Operant studies to determine the strength of preference in laboratory rats for nest-boxes and nesting materials. **Laboratory Animals**, v. 32, n. 1., p. 36-41. 1998.

MARIGO, A. L. S.; CASTRO, V. L. S. S. de; JONSSON, C. M. A importância da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA. **Embrapa Meio Ambiente**, EMBRAPA, 2013. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/982054/a-importancia-da-comissao-de-etica-no-uso-de-animais---ceua-embrapa-meio-ambiente>. Acesso em: 12 setembro 2023.

MARKOWITZ, H. *Enriching Animal Lives*. Pacifica, Mauka Press, 2011. 238p.

MELLOR, D.; PATTERSON-KANE, Emily.; STAFFORD, Kevin J. *The Sciences of Animal Welfare*. 212p. 2009.

MOBERG, G. P. **Animal Stress: biological response to stress: key to assessment of animal wellbeing**. USA: Ed. G. Moberg, p. 27-49. 1985.

MOREIRA, V. B.; MATTARAIA, V. G.; MOURA, A. S.M.T. Life time reproductive efficiency of BALB/c mouse pairs after an environmental modification at 3 mating ages.

**Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, p. 29-34. 2015.

MOUSSEAU, T. A., FOX, C. W. **Maternal Effects as Adaptations**. New York: Oxford University Press, Oxford, 1998.

NC3Rs. Replacement, reduction and Refinement. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research. 2023. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/>. Acesso em: 08 novembro 2023.

NRC. National research Council. Use of laboratory animals in biomedical and behaviour research. Washington: **Nation Academy of Science**. 1988.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v 30, n.1, p. 46-64. 2009.

OLIVEIRA, Gabriel.; BRÜCK, Miguel.; VERONEZ, Thais. Enriquecimento Ambiental: Qual a melhor forma de utilização do Enriquecimento Ambiental para camundongos em biotério? Rio de Janeiro/RJ: **Fiocruz**. p. 119. 2018.

OLSSON, I. A. S.; DAHLBORN, K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment. **Laboratory Animals**, p. 243-270. 2002.

PARENT, C. I., MEANEY, M. J. The influence of natural variations in maternal care on play fighting in therat. **Developmental psychobiology**, v. 50, n. 8, p. 767-776, 2008.

POILEY, S.M. Animal husbandry and laboratory. **Laboratory Animal Care**, v. 20, n. 6, p. 1159-60, 1970.

QUINN; G.; KEOUGH, M. J. **Experimental Design and Data Analysis for Biologists**. Cambridge, New York, 2002. 553p.

RATUSKI, A. S.; WEARY, D. M. Environmental Enrichment for Rats and Mice Housed in Laboratories: A Metareview. **Animals** v. 12, p. 414, 2022.

REINHARDT, V.; REINHARDT, A. Variables, refinement and environmental enrichment for rodents and rabbit kept in research institutions-making life easier for animals in laboratories: Making life easier for animals in laboratories. Washington: **Animal Welfare Institute**, 2006. 71p.

ROSA, N. M. Enriquecimento ambiental e a modulação da emocionalidade, cuidado materno e metilação de genes em camundongos fêmeas LG/J. 2022.

SANTOS B. F. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. (). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz. Ed 1. p.115-118. 2006.

SHAIR, H. N.; NUNEZ, Y.; OSMAN, M. M. Enrichment materials do notnegativelyaffectreproductivesuccessandoffspringsurvivalandweight in mice. **Lab Animal**, New York, v. 41, n. 1, p. 14-19, 2012.

SHEPHERDSON, D. J. Tracing the path of environmental enrichment in zoos, pp. 1-12. In: Shepherdson, D.J.; Mellen, J.D. & Hutchins, M. (coord.). *Second Nature: environmental enrichment for captive animals*. Washington, **Smithsonian Institution Press**, 350p. 1998.

SILVA, A. C. R. da.; OLIVEIRA, T. A. de.; AZEVEDO, I. B.; CUNHA, G. N. Influência de diferentes materiais de enriquecimento ambiental na performance reprodutiva de ratos Wistar mantidos em biotério. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 15, n. 3, p. 289-295, 2021.

SMITH, T. M.; SMITH, Robert Leo. **Elements of Ecology**. Pearson Education, Inc., San Francisco. 1955.

SPARLING, J. E.; BARBEAU, K.; BOILEAU, Kayla.; KONKLE, Anne T. M. Environmental enrichment and its influence on rodent offspring and maternal behaviours, a scoping style review of indices of depression and anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 197, p. 172-997, 2020.

STRZELEWICZ, A. R, *et al.* Access to a high resource environment protects against accelerated maturation following early life stress: A translational animal model of high, medium and low security settings. **Hormones and Behavior**, p. 46-59, 2019.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, T. B. Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, p. 120-132, 2015.

VAN DE WEERD, H. A. *et al.* Effects of environmental enrichment for mice: Variation in experimental results. **Journal of Applied Animal Welfare Science** v. 5, p. 87-109. 2002.

VAN DE WEERD, H. A. *et al.* Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. **Laboratory animals**, v. 31, n. 2, 133-143, 1997.

VIEIRA, S. *Bioestatística: Introdução a Bioestatística*. 5ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2015, 264p.

WEED, J. L.; RABER, J. M. Balancing Animal Research with Animal Well-being: Establishment of Goals and Harmonization of Approaches. **ILAR Journal**, Oxford, v. 46, n. 2, 118-128. 2005.

WHITAKER, J. *et al.* Effects of cage size and enrichment on reproductive performance and behavior in C57BL/6Tac mice. *Lab Anim*, v. 38, p. 24-34, 2009.

YERKES R.M. *Almos thuman*. London: Jonathan Cope, p. 229. 1925.

YOUNG, R. J. *Environmental Enrichment for Captive Animals*. Oxford, **Wiley-Blackwell**, 2003. 240p.

ZAGRÓN, G.; WEINSTOCK, Marta. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 2, p. 323-328, 2006.

ZUENA, A. R. *et al.* Maternal exposure to environmental enrichment before and during gestation influences behaviour of rat offspring in a sex-specific manner. **Physiology & Behavior**, 163, p. 274-287, 2016.

## ANEXOS

## ANEXO A

TABELA 1A – Parâmetros reprodutivos dos grupos com enriquecimento (E) e sem enriquecimento (C) relacionados aos dias até o primeiro parto (DAP), Número de filhotes ao nascimento (N NASC), Peso médio dos filhotes ao nascimento (PM NASCIDOS), Numelho de filhotes desmamados (N DESM), peso médio dos filhotes ao desmame (PM DESMAMAD, Ganho de peso dos filhotes (GANHO DE PESO) e Taxa de sobrevivência (TX SOBREV).

Caixas	Grupos	DAP	N NASC	PM NASCIDOS	N DESM	PM DESMAMAD	GANHO DE PESO	TX SOBREV
105	E	22	3	1,66666667	0	-	-	0
108	E	21	8	1,625	7	9,57142857	7,94642857	0,875
109	E	24	10	2	10	9	7	1
110	E	22	7	1,42857143	6	7	5,57142857	0,85714286
111	E	22	8	2	8	9	7	1
112	E	22	8	1,75	6	9,33333333	7,58333333	0,75
113	E	21	7	1,71428571	7	10,5714286	8,85714286	1
114	E	24	7	1,97142857	7	9,86	7,88857143	1
115	E	25	7	1,71428571	6	10	8,28571429	0,85714286
118	E	22	10	1,9	5	7,6	5,7	0,5
119	E	21	5	2	5	13,4	11,4	1
120	E	34	9	1,44444444	0	-	-	0
121	E	32	8	1,925	8	9,375	7,45	1
122	E	24	11	1,90909091	10	6,3	4,39090909	0,90909091
124	E	24	8	1,84	6	8,66666667	6,82666667	0,75
125	E	24	11	1,90909091	11	6,09090909	4,18181818	1
126	E	22	6	2,33333333	6	10,3333333	8	1
128	E	21	12	1,75	12	6,66666667	4,91666667	1
129	E	21	7	2	7	9,28571429	7,28571429	1
130	E	21	6	2	6	10,1666667	8,16666667	1
131	E	22	7	2	7	7,82857143	5,82857143	1
132	E	22	4	2	4	9,5	7,5	1
134	E	21	7	2,31428571	7	8,57142857	6,25714286	1
135	C	22	10	1,7	10	8,9	7,2	1
137	C	22	9	2	0	-	-	0
138	C	19	3	2	3	9,66666667	7,66666667	1
139	C	24	1	1	0	-	-	0
141	C	22	7	1,85714286	6	9,83333333	7,97619048	0,85714286
142	C	31	13	1,61538462	9	6,22222222	4,60683761	0,69230769
144	C	31	3	2	3	8,66666667	6,66666667	1
145	C	45	1	2	0	-	-	0
146	C	24	10	1,7	10	6,6	4,9	1
147	C	36	11	1,72727273	11	6,27272727	4,54545455	1
148	C	36	10	1,9	7	7	5,1	0,7
150	C	21	9	1,88888889	9	8,88888889	7	1
151	C	24	7	1,71428571	2	13,5	11,7857143	0,28571429
152	C	21	5	2	5	10,6	8,6	1
153	C	24	6	1,83333333	6	8,5	6,66666667	1
156	C	21	7	2,42857143	7	9,14285714	6,71428571	1
157	C	21	7	1,71428571	7	6,71428571	5	1
158	C	22	6	2,16666667	6	11	8,83333333	1
159	C	36	8	1,75	8	9,625	7,875	1
160	C	15	5	2,2	5	8,2	6	1
161	C	24	2	1,5	2	8,5	7	1
164	C	21	9	2,22222222	9	8,55555556	6,33333333	1