



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutaí
Programa de Pós-Graduação em Conservação de
Recursos Naturais do Cerrado

Desenvolvimento de um protocolo para avaliação de resposta defensiva antipredatória de camundongos Swiss em ambiente seminatural

BRUNA DE OLIVEIRA MENDES

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Urutaí, fevereiro de 2019



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Gilson Dourado da Silva

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. André Luís da Silva Castro

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Urutaí, fevereiro de 2019

BRUNA DE OLIVEIRA MENDES

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO
DE RESPOSTA DEFENSIVA ANTIPREDATÓRIA DE
CAMUNDONGOS SWISS EM AMBIENTE SEMINATURAL**

Orientador

Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano –
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais
do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí (GO)
2019

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Urutaí

M538d Mendes, Bruna de Oliveira.

Desenvolvimento de um protocolo para avaliação de resposta defensiva antipredatória de camundongos Swiss em ambiente seminatural / Bruna de Oliveira Mendes. --Urutaí, GO: IF Goiano, 2019.

40 fls.

Orientador: Dr. Guilherme Malafaia Pinto

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2019.

1. Enriquecimento ambiental. 2. Comportamento defensivo.
3. Comportamento animal. 4. Protocolo experimental. I. Pinto, Guilherme Malafaia. II. Título.

CDU 57

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| ☐ Tese | ☐ Artigo Científico |
| ☒ Dissertação | ☐ Capítulo de Livro |
| ☐ Monografia – Especialização | ☐ Livro |
| ☐ TCC - Graduação | ☐ Trabalho Apresentado em Evento |
| ☐ Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Bruna de Oliveira Mendes

Matrícula: 2017101330940069

Título do Trabalho: Desenvolvimento de um protocolo para avaliação de resposta defensiva antipredatória de camundongo Swiss em ambiente natural

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: ☒ Não ☐ Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 26/04/2019

O documento está sujeito a registro de patente? ☐ Sim ☒ Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? ☐ Sim ☒ Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

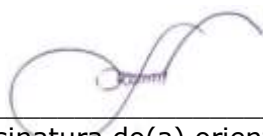
O/A referido/a autor/a declara que:

1. o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
2. obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
3. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 25/04/2019.
Local Data


Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 025

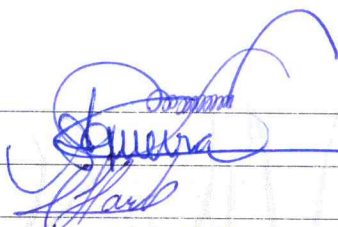
Ata da 25ª Sessão Pública de Defesa de Dissertação de Mestrado do **Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado** do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí. Aos 26 dias do mês de fevereiro de 2019, às 13:00h, reuniram-se na Sala de Videoconferência do Prédio Administrativo do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, a Banca Examinadora composta pelos Professores **Ana Paula Silva Siqueira, Magda Santos dos Santos e Guilherme Malafaia** (orientador do trabalho), sob a presidência deste último, para avaliação da apresentação da mestranda **Bruna de Oliveira Mendes** e de sua dissertação intitulada **“Desenvolvimento de um protocolo para avaliação de resposta defensiva antipredatória de camundongos Swiss em ambiente seminatural.”** Aberta a sessão pelo(a) Presidente da Banca, coube a candidata, na forma regimental, realizar a exposição de seu trabalho, dentro do tempo regulamentar, sendo em seguida questionada pelos membros da banca examinadora, tendo dado as explicações que foram necessárias. A banca examinadora, em caráter sigiloso, após análise e julgamento final, concluiu por:

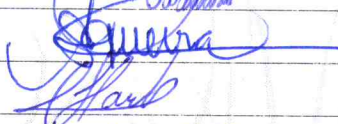
- ☐ Aprovar a dissertação sem alterações
- ☒ Aprovar a dissertação com modificações (vide verso em caso de alteração do título)
- ☐ Reprovar a dissertação

A apresentação e aprovação da dissertação é requisito parcial para a concessão do grau de **MESTRA EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, tendo a candidata ciência de que o título de **MESTRA** só será concedido depois de atendidas as exigências feitas pela Banca Examinadora, bem como das demais exigências estabelecidas no Regulamento do Programa de Pós-graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado. A partir da presente data, a aluna terá o prazo de 60 dias para efetuar as alterações exigidas pela banca e entregar o volume da Dissertação corrigido, devidamente encadernado, assinado pela banca e acompanhado de toda a **documentação pertinente** à abertura do **processo de solicitação de diploma**. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 15h 30 min, sendo lavrada a presente Ata, que uma vez **aprovada**, foi assinada por todos os membros da Banca Examinadora e pela aluna.

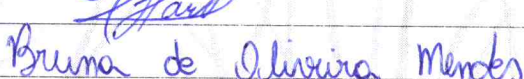
Urutaí, 26 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Profª. Dra. Ana Paula Silva Siqueira
Profª. Dra. Magda Santos dos Santos
Bruna de Oliveira Mendes









*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez.”
(George Bernard Shaw)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus me guiar e me dar capacidade para trilhar jornada em minha vida. Obrigada Pai!

Agradeço à minha mãe, Noêmia que me ensinou a nunca desistir, que compreendeu dentro do possível meus momentos de ausência em casa, e por sempre estar a meu lado em todas decisões tomadas em meu caminho, ao meu pai e ao meu irmão que sempre estiveram ao meu lado e sempre me ajudaram a permanecer mais fortes nos momentos difíceis;

Agradeço imensamente ao meu esposo Dieferson Estela. Meu companheiro, meu amor, a pessoa que nunca me deixou desistir e que hoje é meu ponto de apoio me fazendo ser mais forte e mais sábia a cada passo conquistado. Sou grata, por cuidar de mim, por me incentivar, por me completar;

Aos estudantes e pesquisadores do Laboratório de Pesquisas Biológicas do IF Goiano – Campus Urutaí, por todo apoio no desenvolvimento desta pesquisa e de tantas outras realizadas no decorrer destes anos de estudo e colaboração com o laboratório;

Ao Prof. Dr. Guilherme Malafaia, meu orientador/amigo que me abriu as portas de seu laboratório o qual me conheci como pessoa e como profissional, uma pessoa que sempre lembrarei com muito zelo por toda amizade construída nesses seis anos de convivência. Obrigada por tantos ensinamentos, não só profissionais, mas ensinamentos pessoais que irei me lembrar durante a vida toda;

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás pela bolsa de estudos concedida durante grande parte destes dois anos de curso;

Por fim, agradeço a todos os professores do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, que de alguma forma fizeram destes dois anos, uma virada na minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Enriquecimento ambiental e ambientes laboratoriais.....	12
1.2. Estímulos ambientais e a expressão de comportamentos defensivos.....	13
1.3. Relações entre comportamentos defensivos antipredatórios e contexto ecológico.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. Animais e grupos experimentais.....	16
2.2. Design experimental.....	17
2.3. Aparato dos Ambientes Padrão e Seminatural.....	17
2.4. Teste de resposta defensiva antipredatória por meio de confronto direto e procedimentos.....	19
2.5. Análise dos dados.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4. CONCLUSÃO.....	34
5. REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1. Imagens ilustrativa de caixas moradias em que os camundongos Swiss do grupo Ambiente Padrão permaneceram durante o período de experimentação.....	17
Figura 2. Representação esquemática do aparato utilizado no Ambiente seminatural para exposição de camundongos Swiss a habituação e confronto com serpentes falsas e verdadeiras. São apresentadas as distâncias e dimensões de cada componente utilizado na composição da paisagem seminatural.....	19
Figura 3. Serpentes da espécie <i>Pantherophis guttatus</i> conhecida como <i>Corn Snake</i> (serpente do milho), que foram utilizadas na realização do teste de resposta defensiva antipredatória por meio de confronto direto com camundongos Swiss.....	20
Figura 4. Aparato utilizado como moradia e testes de resposta defensiva antipredatória por meio de confronto direto dos camundongos Swiss dos grupos Ambiente Padrão. A: Foto representativa do local em que os animais do grupo Ambiente Padrão foram submetidos ao teste de comportamento. B: Imagem esquemática da caixa do Ambiente Padrão. C: Desenho esquemático dos animais do grupo Ambiente Padrão durante a primeira sessão teste. D: Desenho esquemático de como os animais do grupo Ambiente Padrão foram dispostos nas sessões de confronto direto com serpentes falsas e verdadeiras.....	21
Figura 5. Representação esquemática do aparato do ambiente seminatural em que camundongos Swiss passaram pelo teste comportamental. A: Foto representativa do local em que os animais do grupo Ambiente Seminatural foram submetidos ao teste de comportamento de resposta defensiva antipredatória por meio de confronto direto. B: Desenho esquemático da primeira sessão do teste. C: Desenho esquemático da segunda sessão (serpente falsa) e da terceira sessão (serpente verdadeira) retratando a maneira em que o predador falso/verdadeiro foi posicionado no aparato juntamente com o animal em teste.....	23
Figura 6. Índices de frequência (A) e tempo (B) de autolimpeza em camundongos Swiss em ambiente convencional e seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a períodos de habituação aos ambientes e a serpentes falsas e verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença	

estatística com nível de confiança de 5 % ($p<0,05$) por meio dos testes ANOVA <i>three-way</i> e Tukey.....	25
Figura 7. Frequência de evitação em camundongos Swiss em ambiente convencional e seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a períodos de habituação aos ambientes e a serpentes falsas e verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p<0,05$) por meio dos testes ANOVA <i>three-way</i> e Tukey.....	26
Figura 8. Frequência de espreita em camundongos Swiss em ambiente convencional e seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a períodos de habituação aos ambientes e a serpentes falsas e verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p<0,05$) por meio dos testes ANOVA <i>three-way</i> e Tukey.....	28
Figura 9. Índices de frequência (A) e tempo (B) de congelamento em camundongos Swiss em ambiente convencional e seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a períodos de habituação aos ambientes e a serpentes falsas e verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p<0,05$) por meio dos testes ANOVA <i>three-way</i> e Tukey.	29
Figura 10. Índices de frequência (A) e tempo (B) de interação com serpentes e frequência de fugas (C) em camundongos Swiss mantidos em ambiente convencional e seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a serpentes falsas (arquétipos) e verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p<0,05$) por meio dos testes ANOVA <i>three-way</i> e Tukey.....	31
Figura 11. Frequência de ida até as pedras (A) e tempos de permanência nas pedras (B) e nos galhos (C) em camundongos Swiss mantidos em ambiente seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a períodos de habituação, serpentes falsas (arquétipos) e serpentes verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p<0,05$) por meio dos testes ANOVA <i>three-way</i> e Tukey.....	33

Desenvolvimento de um protocolo para avaliação de resposta defensiva antipredatória de camundongos Swiss em ambiente seminatural

RESUMO

A utilização de animais de laboratório como modelos experimentais é uma prática antiga; contudo, nas últimas décadas tem crescido a preocupação com o bem-estar destes animais e o questionamento de como as condições laboratoriais podem influenciar os resultados dos estudos. Assim, os esforços de enriquecimento ambiental têm buscado formas de melhorar o bem-estar e refinar os resultados das mais diversas investigações. Por outro lado, a falta de padronização nas práticas de enriquecimento ambiental dificulta sua replicação e a avaliação de suas influências sobre os estudos. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi propor um protocolo para avaliação de resposta defensiva antipredatória de camundongos Swiss em ambiente seminatural. Partimos da hipótese de que respostas antipredatórias apresentadas em ambientes seminaturais são mais próximas às moldadas pela história evolutiva da espécie (quando comparadas àquelas exibidas em ambientes laboratoriais padrões), uma vez que estes oferecem maior número de estímulos-chaves para a diminuição de fatores que podem estressar os animais. Assim, proles de camundongos Swiss foram distribuídas em quatro grupos que foram mantidos em ambiente padrão por um dia (AP 1D) e cinco dias (AP 5D) e mantidos em ambiente seminatural pelos mesmos períodos (ASN 1D e ASN 5D). Ao final dos períodos, os animais foram confrontados com serpentes falsas e verdadeiras. Foram avaliados os comportamentos de autolimpeza, congelamento, espreita, evitação, fuga, interação com as serpentes e exploração de refúgios (pedras e galhos). De modo geral, nossos resultados demonstraram que todos os grupos conseguiram diferenciar as serpentes verdadeiras das falsas e exibiram comportamentos defensivos antipredatórios inatos. Porém, os animais dos grupos ASN, especialmente aqueles mantidos por cinco dias, expressaram tais comportamentos com maior intensidade, o que indica que tais ambientes podem prover resultados mais sensíveis que dependem da exibição comportamental inata dos camundongos. Até onde vai nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que apresenta um protocolo de teste comportamental envolvendo ambiente seminatural, que pode ser utilizado em estudos farmacológicos ou ecotoxicológicos relacionados ao medo, transtornos de ansiedade e/ou de déficits de respostas defensivas antipredatórias.

Palavras-chave: Enriquecimento ambiental, comportamento defensivo, comportamento animal, protocolo experimental.

Development of a protocol for the evaluation of the antipredator defensive response of Swiss mice in a semi-natural environment

ABSTRACT

The use of laboratory animals as experimental models is an old practice; however, in recent decades there has been growing concern about the welfare of these animals and the questioning of how laboratory conditions can influence the results of the studies. Thus, environmental enrichment efforts have sought ways to improve welfare and refine the results of the most diverse investigations. On the other hand, the lack of standardization in the practices of environmental enrichment hinders its replication and the evaluation of its influences on the studies. In this sense, the objective of this study was to propose a protocol for the evaluation of the antipredatory defensive response of Swiss mice in a semi-natural environment. We start from the hypothesis that antipredatory responses presented in semi-natural environments are closer to those shaped by the evolutionary history of the species (when compared to those exhibited in standard laboratory environments), since these offer a greater number of key stimuli for the decrease of factors that can stress the animals. Thus, pups of Swiss mice were distributed in four groups that were kept in standard environment for one day (AP 1D) and five days (AP 5D) and maintained in a semi-natural environment for the same periods (ASN 1D and ASN 5D). At the end of the periods, the animals were confronted with true and false snakes. Self-cleaning, freezing, lurking, avoidance, escape, interaction with snakes and exploitation of refuges (stones and branches) were evaluated. Overall, our results demonstrated that all groups were able to differentiate between true and false snakes and exhibit innate predatory defensive behaviors. However, animals in the ASN groups, especially those maintained for five days, expressed such behaviors with greater intensity, indicating that such environments may provide more sensitive results that depend on the innate behavioral display of the mice. To the best of our knowledge, this is the first study to present a behavioral test protocol involving a semi-natural environment, which can be used pharmacological or ecotoxicological studies related to fear, anxiety disorders and/or deficits of antipredatory defensive responses.

Keywords: Environmental enrichment, defensive behavior, animal behavior, experimental protocol.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enriquecimento ambiental e ambientes laboratoriais

A utilização de animais como modelos experimentais é bastante antiga e largamente utilizada para pesquisas de diversas áreas do conhecimento. Instalações para animais de laboratório geralmente são projetadas para fornecer condições padronizadas, onde os animais são mantidos em boa saúde física, enquanto os requisitos econômicos e ergonômicos humanos também são atendidos (Olsson e Dahlborn 2002). Contudo, a preocupação com o bem-estar destes animais deve ser considerada de grande importância, proporcionando melhor qualidade de vida aos animais e contribuindo para melhores resultados nos estudos, evitando que condições ruins os afetem (Baumans 2005).

O enriquecimento ambiental é uma prática que tem ganhado espaço nas últimas décadas, fundamentado na busca por bem-estar animal. Tal prática vem sendo definida de muitas formas, desde a ótica da melhora na qualidade de vida de animais de cativeiro até a melhoria na rotina de quem manuseia tais animais (Boissy et al. 2007, Simpson e Kelly 2011). Segundo Newberry (1995), a definição mais apropriada seria uma melhoria no funcionamento biológico de animais cativeiros, resultante de modificações em seu ambiente. Tais melhorias no funcionamento biológico podem incluir aumento do sucesso reprodutivo, aumento da aptidão inclusiva, melhores respostas a situações de perigo, maior expressão de emoções positivas, resultados mais fidedignos nos estudos, dentre outras (Newberry 1995, Boissy et al. 2007).

O enriquecimento ambiental é utilizado de diversas formas, de modo que a ausência de padronização nesta utilização dificulta sua aplicação e reprodução no contexto da Etologia aplicada. Os avanços teóricos e aplicados desta prática devem ser suportados por metodologias claramente descritas, que se pautaram em uma hipótese, com predições passíveis de serem testadas em suas aplicações (Newberry 1995).

Dentre as possibilidades de enriquecimento ambiental, muitos autores defendem a aproximação com o ambiente natural de onde as espécies foram retiradas, diminuindo assim o estresse causado pelas condições laboratoriais (Moodie e Chamove 1990, Gilloux et al. 1992, Pines 2007). Contudo, os ambientes laboratoriais possuem limitações que os distanciam da condição ambiental natural, de modo que os ambientes enriquecidos devem atingir uma realidade aproximada à natural, denominada de seminatural, mas que seja viável para as condições laboratoriais (Newberry 1995, Olsson e Dahlborn 2002).

Inicialmente, o foco do enriquecimento ambiental para animais de laboratório esteve sobre o questionamento da validade e aplicabilidade dos resultados de pesquisas obtidos de indivíduos alojados em gaiolas de laboratório padrão (Bayne et al. 1992, Widman et al. 1992). Também foi questionado sobre o quanto os materiais utilizados no enriquecimento poderiam alterar resultados de pesquisas realizadas com estes animais (Van de Weerd et al. 2002, Toth et al. 2011). Contudo, apesar dos questionamentos, muitos estudos demonstram que o enriquecimento ambiental, utilizado de forma adequada, é neutro ou melhora os resultados das pesquisas, além de contribuir de forma robusta para o bem-estar animal (Van de Weerd et al. 2002, Baumans 2005, Baumans et al. 2010, Bailoo et al. 2018).

1.2. Estímulos ambientais e a expressão de comportamentos defensivos

No desenvolvimento comportamental em ambientes laboratoriais, são observados casos de perdas de respostas comportamentais silvestres e mudanças na frequência de expressão de comportamentos, geralmente sem mudanças na forma como tal comportamento é expresso (Huck e Price 1976, Price 1999). Esta variação está relacionada à baixa frequência ou ausência de certos estímulos chave no ambiente físico de animais cativos, que pode resultar em menor frequência de expressão ou ausência do comportamento (Ulrich 1983, Price 1999). Os estímulos sensoriais presentes no ambiente natural como auditivos, visuais e olfativos são chaves para certos comportamentos e para o bem-estar dos animais e, portanto, apresentam grande potencial no enriquecimento ambiental (Wells 2009).

A preservação de comportamentos é observada mesmo em animais altamente domesticados, que mantem um repertório comportamental moldado pela seleção natural durante sua história evolutiva, e exibem esses comportamentos em níveis variados quando mantidos em ambientes laboratoriais padrões, enriquecidos ou seminaturais (Ulrich 1983, Pines 2007). Desse modo, o enriquecimento ambiental, sobretudo do ponto de vista de ambientes seminaturais, que forneça estímulos chave, é uma importante prática para gerar bem-estar nos animais e propiciar a expressão de um repertório comportamental mais próximo ao observado no ambiente natural (Ulrich 1983, Price 1999, Bailoo et al. 2018).

Dentre os comportamentos inatos mantidos mesmo após longos períodos de domesticação, os comportamentos defensivos se destacam pelo alto grau de conservação, uma vez que estão ligados diretamente à sobrevivência da espécie (Carthey e Blumstein 2018). Reações defensivas são provavelmente os padrões de comportamento mais prevalentes e comumente usados para a maioria das espécies animais (Blanchard et al. 1990). Como

comportamentos defensivos inadequados frequentemente resultam em consequências desastrosas rápidas, os sistemas de defesa são considerados produtos de pressões de seleção extraordinariamente fortes, não apenas na forma e magnitude da defesa, mas também na relação entre o comportamento defensivo e os estímulos e situações que provocam essa ação (Blanchard et al. 1989).

Mesmo após longos períodos de tempo na ausência de predadores, como na extinção de predadores ou ambientes laboratoriais, os comportamentos defensivos antipredatórios são mantidos altamente conservados, desde que existam os estímulos chave necessários para sua expressão (Love 1994, Carthey e Blumstein 2018). Devido a grande variação entre espécies, são descritas algumas hipóteses que visam explicar a persistência evolutiva destes comportamentos em diferentes contextos ecológicos, sendo que as características destes contextos são direcionais para definição da hipótese mais provável para explicar a persistência (Carthey e Blumstein 2018).

1.3. Relações entre comportamentos defensivos antipredatórios e contexto ecológico

Estudos sobre comportamentos defensivos antipredatórios demonstram que as presas possuem uma ampla gama de mecanismos para evitar a predação, e que estes mecanismos possuem plasticidade frente aos diferentes níveis de contato com o predador (St-Cry et al. 2018, Sánchez-González et al. 2018). Camundongos adultos descendentes de mães expostas ao odor do predador durante a gestação apresentaram comportamento antipredatório aumentado, comportamento de forrageamento mais cauteloso e, evitam áreas abertas no labirinto em cruz elevado (St-Cry^a et al. 2018). Estas modificações comportamentais relacionadas ao estresse estão associadas à herança epigenética e à abundância alterada de transcritos de genes relacionados ao estresse no hipocampo e na amígdala (St-Cyr e McGowan 2015, St-Cyr et al. 2017, St-Cry^b et al. 2018).

Além da influência materna sobre a expressão de comportamentos antipredatórios, é conhecido que a concentração de pistas sensitivas de predadores é positivamente correlacionada a uma maior expressão destes comportamentos, ocorrendo influência nesta expressão da fase reprodutiva em que ambos os sexos se encontram (Sánchez-González et al. 2018). Em estudo na natureza com Camundongos-dos-bosques (*Apodemus sylvaticus*), na presença de pistas do predador, animais ativos sexualmente apresentaram maior cautela na exploração do ambiente; contudo, fêmeas foram capturadas com maior frequência que machos (Sánchez-González et al. 2018). Em laboratório, fêmeas de ratos Long-Evans nas fases estro e proestro do ciclo estral

apresentam menores níveis de expressão de comportamentos defensivos inatos (Pentkowski et al. 2018).

Outro fator com grande influência sobre comportamentos antipredatórios é o contexto ecológico em que são expressos, pois os elementos estruturais do ambiente e seres vivos envolvidos afetam a percepção da presa sobre a pressão de predação exercida pelos predadores (Mc Naughton e Corr 2018). A análise de risco realizada pelo animal, bem como as táticas de escape possíveis estão diretamente relacionados à complexidade e configuração estética e funcional do ambiente (Ulrich 1983, Heithaus et al. 2009, MC Naughton e Corr 2018). Estas características do ambiente fornecem, juntamente com o predador, os estímulos chave para a expressão de comportamentos defensivos antipredatórios, sendo que a percepção dos estímulos varia de acordo com a espécie (Heithaus et al. 2009, MC Naughton e Corr 2018).

Os comportamentos defensivos antipredatórios inatos são modulados por estruturas presentes no ambiente, sob as quais camundongos apresentam um aprendizado espacial rápido. No estudo de Vale et al. (2017), foi observado que camundongos C57BL/6J machos com idades entre 6 e 12 semanas fogem instintivamente de sinais sonoros e círculos escuros (simulando ataque de um predador aéreo) para locais de abrigo previamente memorizados no ambiente e que esta memorização pode ocorrer em uma única visita ao abrigo, mesmo que com duração inferior a 20 segundos.

Sobre o reconhecimento do predador, pistas visuais no ambiente mesmo que não seja exatamente o predador ou arquétipos podem desencadear comportamentos antipredatórios. De Franceschi et al. (2016) apresentaram discos escuros com tamanhos e velocidades diferentes sobrevoando camundongos C57BL/6 machos adultos, simulando a aproximação de predadores aéreos, e observaram que discos menores, em maior velocidade, desencadearam o comportamento de congelamento. Já discos maiores e mais lentos desencadearam o comportamento de voo nos animais, este comportamento de fuga é apresentado em situações de risco iminente, neste caso simulado por um predador que estivesse iniciando ataque.

Essa capacidade de reação rápida a pistas visuais está relacionada a circuitos neurais relacionados a retina que desencadeiam a expressão de comportamentos inatos (Yilmaz e Meister 2013). Segundo os autores, essa resposta é uma nova adição ao repertório de comportamentos defensivos inatos em camundongos, que permite a detecção e a prevenção de predadores aéreos e estimula estudos com outros estímulos chave e seus receptores ligados a comportamentos defensivos inatos.

Dessa forma, pode-se observar que a configuração ambiental e o contexto ecológico são muito importantes para que ocorra a expressão de comportamentos defensivos antipredatórios e o refinamento destes. Contudo, estudos relacionados ao medo, ansiedade e comportamentos antipredatórios têm negligenciado a importância da condição ecológica envolvida e falhado em recriar condições experimentais mais apropriadas ao estudo destes temas (Heithaus et al. 2009, Mobbs 2018). Além disso, a carência de metodologias padronizadas, com parâmetros claros a serem avaliados e recriados em outros estudos limita o avanço de pesquisas sobre medo antipredatório (Newberry 1995, Mobbs 2018).

Diante desse cenário, o objetivo deste estudo foi propor e apresentar um protocolo para avaliação de resposta defensiva antipredatória de camundongos Swiss em um ambiente seminatural padronizado, quando colocados em confronto direto com serpentes. Partimos da hipótese de que respostas antipredatórias exibidas em ambientes seminaturais são mais próximas às moldadas pela história evolutiva da espécie que as apresentadas em ambientes laboratoriais padrões, uma vez que estes oferecem maior número de estímulos chave para expressão de tais comportamentos e diminuem o estresse animal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e grupos experimentais

Para a realização do estudo foram utilizados 80 camundongos da linhagem Swiss, (*Mus musculus*), obtidos no biotério do Laboratório de Pesquisas Biológicas do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí (Urutaí – GO). Os animais foram mantidos em condições controladas com ciclo claro/escuro (12h/12h) em estantes ventiladas com umidade entre 40 - 60% e temperatura (entre 23° - 25°), sendo alimentados *ad libitum* com dieta padrão para roedores. Os animais foram separados com idade entre 30 - 35 dias de vida pesando em média 15g. Essa idade corresponde à fase juvenil dos animais, fase em que ainda não se tem a predominância e interferência dos hormônios sexuais entre machos e fêmeas, o que por sua vez, poderia interferir em possíveis comportamentos durante o teste de resposta antipredatória de confronto direto (Andrade et al., 2002).

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: Ambiente Padrão 1 Dia (AP 1D); Ambiente Padrão 5 Dias (AP 5D); Ambiente Seminatural 1 Dia (ASN 1D) e Ambiente Seminatural 5 Dias (ASN 5D). Os quatro grupos foram compostos por 20 animais/cada, distribuídos por massa corporal de forma equitativa entre eles. Os animais de cada grupo foram

inicialmente habituados entre si, formando grupos sociais, durante 24h e posteriormente transferidos para seus respectivos ambientes experimentais.

Os animais pertencentes aos grupos de Ambiente Padrão (AP) inicialmente passaram por habituação ao grupo social e em seguida foram transferidos para uma nova caixa moradia com nova maravalha, ração, bebedouros e foram mantidos conforme seus respectivos dias experimentais (1 e 5) de habituação com água e ração (Figura 1). Tais animais foram mantidos em estante ventilada em condições controladas e uma vez ao dia a ração e água eram repostos às 15h em todos os dias de habituações para todos os grupos seguindo sempre o mesmo padrão de manuseio e tempo de contato.



Figura 1. Imagens ilustrativas de caixas moradias em que os camundongos Swiss do grupo Ambiente Padrão permaneceram durante o período de experimentação.

Os animais referentes aos grupos Ambiente Seminatural (ASN) após passarem por habituação ao grupo social estabelecido foram levados a um ambiente separado para acontecer a habituação em seu novo ambiente de experimentação. Neste ambiente permaneceram em condições controladas, seguindo temperatura e ciclo claro/escuro monitorados rigorosamente para que não houvesse nenhum estresse aos animais e quaisquer interferências em relação a estas condições no comportamento dos animais. A dieta dos animais pertencentes a estes grupos seguiu o mesmo padrão que os animais dos grupos AP.

2.2. Aparato dos Ambientes Padrão e Seminatural

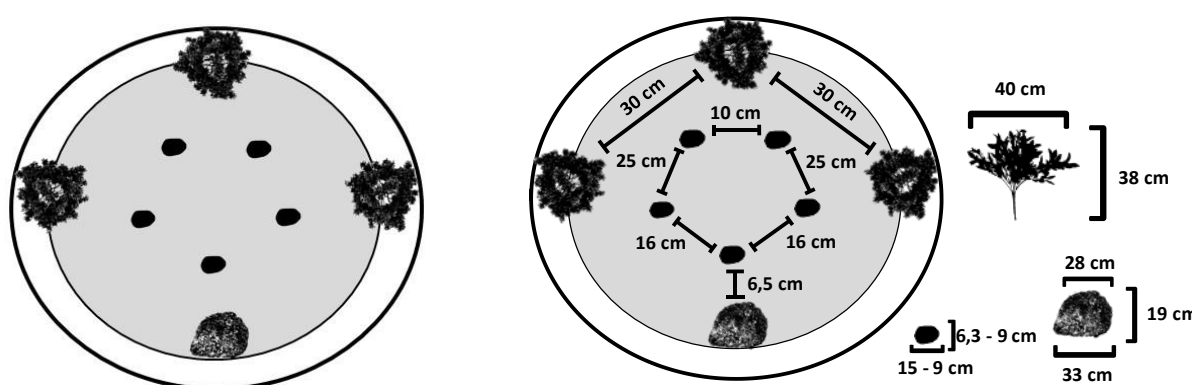
Os animais do grupo AP foram mantidos em suas próprias caixas moradias (Figura 1) em estante ventilada. As caixas são confeccionadas com material de polipropileno, de cor branca, tendo as seguintes dimensões 41x34x17,8 cm, com tampa de arame perfilado em aço inox nas medidas de 41x34 cm, malha 0,5cm, com comedouro embutido em V, laterais triangulares fixas, divisórias separando-o do bebedouro (Figura 1). A caixa foi forrada com uma

cama de maravalha em uma espessura de 5cm com a finalidade de absorver a urina e água derramada no interior da gaiola, mantendo o fundo seco além de servir como isolante térmico para os animais (Figura 1).

O aparato dos animais do grupo ASN consistiu em uma caixa d'água de polietileno com a capacidade de 500 litros de água, medindo 72x124x105cm sem tampa. Para a construção do ambiente foram utilizados cerca de 15 kg areia fina lavada sendo colocada no fundo em uma espessura de 15cm. Foram distribuídas cinco pedras naturais de tamanhos variando entre 9cm à 15cm de comprimento e 6,3 à 9cm de altura formando um losango em sua distribuição no interior da caixa, conforme medidas apresentadas na Figura 2.

Além do losango de pedras menores, um aglomerado de pedras maiores foi colocado em um ponto oposto de um dos galhos com dimensões de 33cm de largura, 19cm de altura e 28cm de comprimento. Este aglomerado representava mais um ponto de refúgio para os animais, juntamente com galhos fixados em três pontos equidistantes nas laterais da caixa com intervalor de 30cm entre elas, sendo que cada galho apresentava 38cm de altura e 40cm de largura e foram fixados de maneira que os animais pudessem escalar e explorar livremente os galhos (Figura 2).

A alimentação dos animais dos grupos ASN aconteceu da mesma forma que nos grupos AP, uma porção de ração ofertada diariamente juntamente com 50 mL de água para os animais do ambiente seminatural. A ração e a água foram colocadas em um recipiente plástico transparente com dimensões de 11x11x3,5cm, sendo que os animais tinham livre acesso a ração.



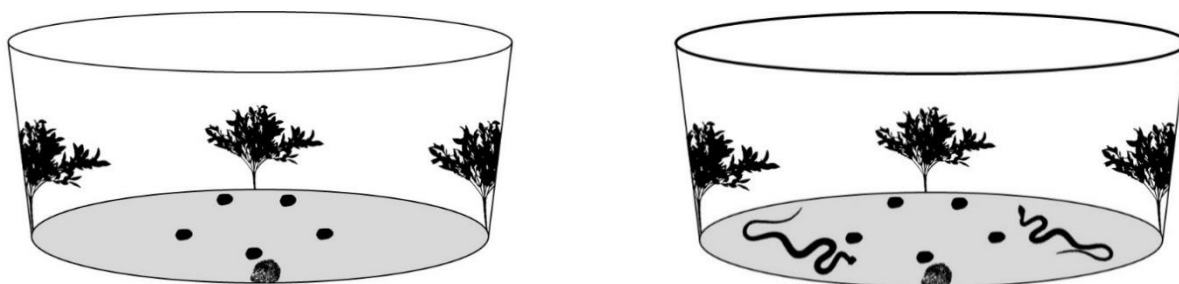


Figura 2. Representação esquemática do aparato utilizado no Ambiente seminatural para exposição de camundongos Swiss a habituação e confronto com serpentes falsas e verdadeiras. São apresentadas as distâncias e dimensões de cada componente utilizado na composição da paisagem seminatural.

2.3. Teste de resposta defensiva antipredatória por meio de confronto direto e procedimentos

O teste de resposta defensiva antipredatória de confronto direto tem como objetivo avaliar o comportamento defensivo dos camundongos quando são submetidos a um confronto direto com seu predador, sendo utilizados como estímulos, o campo visual, auditivo, olfatório e o contato real com seu predador. O protocolo adotado foi adaptado de Yang et al. (2004), Souza et al. (2018) e Mendes et al. (2018), nos quais o aparato impediu que houvesse contato físico entre presa e predador, e de Hirsch & Bolles (1980), Guimarães-Costa et al. (2007), Coimbra et al. (2017) que utilizaram aparatos que permitia o contato físico entre presa e predador.

O predador escolhido para a realização desde teste foi a serpente, uma vez que esta é um predador natural de roedores (Frings et al. 1951). As serpentes utilizadas foram as *Corn Snake* (conhecida como serpente do milho) da espécie *Pantherophis guttatus*, as quais são constritoras e conhecidas por serem de fácil manuseio. As serpentes utilizadas para o teste foram dois machos com aproximadamente um ano de idade medindo cerca de 1 metro cada, sendo que uma serpente era de cor avermelhada com manchas em vermelho e a outra com fundo marrom contrastando com rajadas em marrom escuro e com manchas amarelas ao longo do corpo (Figura 3).



Figura 3. Serpentes da espécie *Pantherophis guttatus* conhecida como *Corn Snake* (serpente do milho), que foram utilizadas na realização do teste de resposta defensiva antipredatória por meio de confronto direto com camundongos Swiss.

As serpentes foram mantidas no terrário em um outro repartimento no laboratório de pesquisas biológicas sendo que estas não possuem contato algum com o ambiente em que os roedores permanecem, estas foram mantidas em condições favoráveis, ciclo claro e escuro 12/12h com temperatura entre 22° - 24° com livre acesso a água. Sua alimentação aconteceu 12h antes do teste, composta de 3 camundongos Swiss para cada indivíduo visando evitar ataques aos camundongos em teste. Cerca de 1h antes de sua participação no teste, as serpentes foram umedecidas e expostas ao sol por cerca de 30 minutos com intuito de elevar a taxa metabólica dos indivíduos para que eles permanecem ativos e em movimento durante o tempo do teste.

Antes da realização do teste de resposta defensiva, cada grupo foi alojado por 12h na sala de testes comportamentais visando uma aclimação neste ambiente, os grupos AP foram colocados em uma arena circular 72x124x105cm contendo uma cama de 15cm de maravalha (Figuras 4A e 4B). Esse manejo aconteceu as 19h sendo retirados para início do teste as 9h do dia seguinte, respeitando devidamente a transição do ciclo claro/escuro. A sala de testes é equipada com isolamento acústico, iluminação artificial, temperatura controlada e três câmeras de vídeo acopladas a um computador localizado externamente. Os animais dos grupos ASN passaram pela mesma aclimação a sala de testes permanecendo no mesmo ambiente seminatural em que eles foram mantidos durante o período experimental. Vale ressaltar que a realização do teste aconteceu de maneira independente para todos os grupos (Figura 4 e 5).

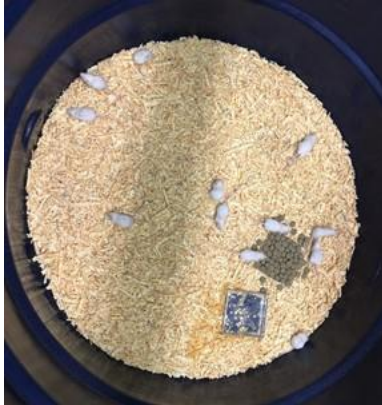
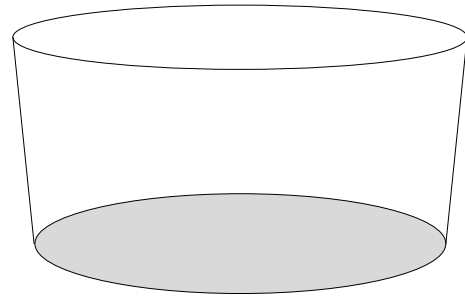
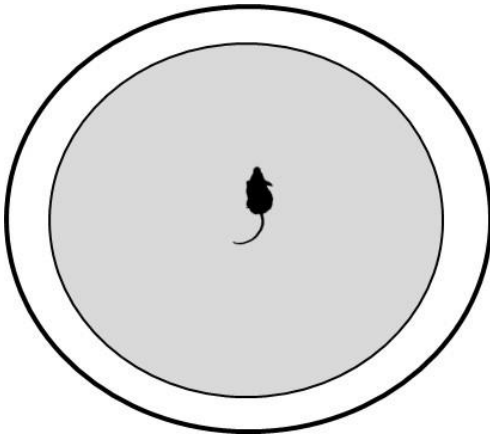
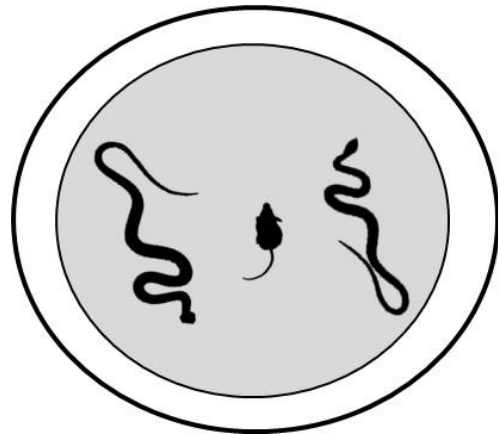
A**B****C****D**

Figura 4. Aparato utilizado como moradia e testes de resposta defensiva antipredatória por meio de confronto direto dos camundongos Swiss dos grupos Ambiente Padrão. **A:** Foto representativa do local em que os animais do grupo Ambiente Padrão foram submetidos ao teste de comportamento. **B:** Imagem esquemática da caixa do Ambiente Padrão. **C:** Desenho esquemático dos animais do grupo Ambiente Padrão durante a primeira sessão teste. **D:** Desenho esquemático de como os animais do grupo Ambiente Padrão foram dispostos nas sessões de confronto direto com serpentes falsas e verdadeiras.

Após a aclimação à sala de testes, os animais foram retirados do aparato de realização do teste (ambientes padrão e seminatural), para posteriormente serem submetidos individualmente a três sessões teste distintas (Figuras 4A e 5A). Durante a execução do teste, os animais que não estavam em teste foram mantidos em ambientes com as mesmas condições de seus respectivos ambientes experimentais, sendo retirados um a um para serem submetidos às sessões testes. Durante a primeira sessão teste os animais permaneceram por 5 minutos nos respectivos ambientes, a fim de se habituarem ao aparato e a condição de isolamento de coespecíficos (Figura 5B).

Depois de todos os animais terem cumprido a 1ª sessão, se deu início a segunda sessão de teste, na qual foram colocadas duas serpentes falsas no centro do aparato com cabeças orientadas para lados opostos (Figuras 4D e 5C). Tais serpentes mediam 130cm, foram produzidas com material de silicone não tóxico e inodoro na cor preta. Antes de serem introduzidas no aparato e a cada troca de animais as serpentes foram higienizadas com álcool a 10%.

Para a realização da terceira sessão as serpentes de silicone foram substituídas pelas serpentes verdadeiras, sempre na mesma posição das serpentes falsas, cada qual virada para um dos lados permanecendo sempre com as cabeças orientadas para lados opostos. A cada troca de animal as serpentes verdadeiras eram reposicionadas e se iniciava assim mais uma rodada com outro indivíduo, cada animal também permaneceu nesta sessão por 5 minutos (Figuras 4D e 5C). Vale ressaltar que todos os animais foram colocados na mesma posição em todas as sessões, sendo colocados no centro do losango formado pelas pedras com o focinho orientado para o lado oposto do montante de pedras.

A



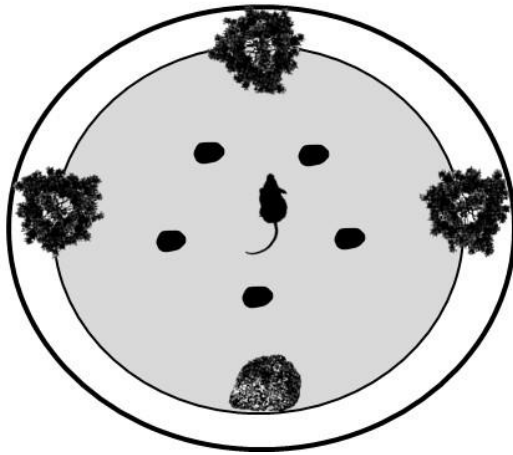
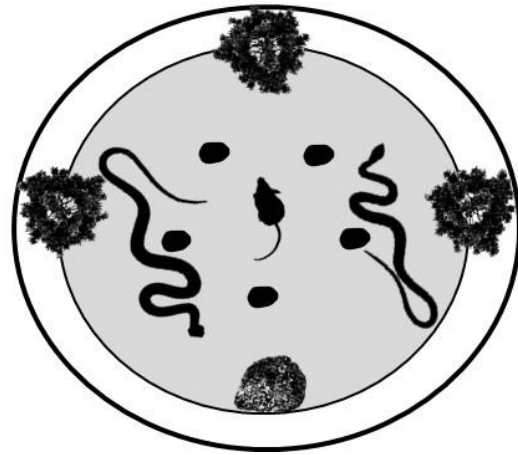
B**C**

Figura 5. Representação esquemática do aparato do ambiente seminatural em que camundongos Swiss passaram pelo teste comportamental. **A:** Foto representativa do local em que os animais do grupo Ambiente Seminatural foram submetidos ao teste de comportamento de resposta defensiva antipredatória por meio de confronto direto. **B:** Desenho esquemático da primeira sessão do teste. **C:** Desenho esquemático da segunda sessão (serpente falsa) e da terceira sessão (serpente verdadeira) retratando a maneira em que o predador falso/verdadeiro foi posicionado no aparato juntamente com o animal em teste.

Após a coleta de dados, foram analisados os seguintes parâmetros: Índices de frequência e tempo de autolimpeza; índices de frequência e tempo de interação com a serpente falsa/verdadeira; frequência de evitação a serpente falsa/verdadeira; frequência de espreita; índice de frequência e tempo de congelamento; frequência de fuga; tempo e permanência nos galhos; frequência de idas nas pedras e; tempo de permanência nas pedras.

Para calcular estes índices o tempo total considerado no ambiente seminatural foi corrigido para o tempo em que os animais permaneciam no chão, desconsiderando o tempo de permanência nos galhos. Esta correção se fez necessária devido à dificuldade de observar os comportamentos que os animais expressavam enquanto estavam nos galhos, além da própria presença dos galhos interferir na expressão destes comportamentos. Dessa forma, a correção do tempo total considerado no ASN torna os ambientes corretamente comparáveis e elimina vieses de dificuldade de observação de comportamentos nos galhos. Para cálculo dos referidos índices foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Índice no AP} = \frac{\text{Frequência ou tempo do comportamento}}{\text{Tempo total da sessão}} \times 100$$

$$\text{Índice no ASN} = \frac{\text{Frequência ou tempo do comportamento}}{\text{Tempo total da sessão} - \text{tempo de permanência nos galhos}} \times 100$$

2.4. Análise dos dados

Inicialmente todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, que foi seguido pelo teste Levene de homogeneidade de variância, sendo que quando não atendiam aos pressupostos foram submetidos a transformação e atenderam aos requisitos. Os dados referentes aos parâmetros Frequência de ida nas pedras; Tempo de permanência nas pedras; Tempo de permanência nos galhos, foram submetidos ao teste *two-way* ANOVA de acordo com o modelo fatorial 2x3, utilizando os fatores “Ambiente” [dois níveis: seminatural 1 dia e seminatural 5 dias] e fator “Estímulo” [três níveis: Habituação; Serpente Falsa; Serpente Verdadeira].

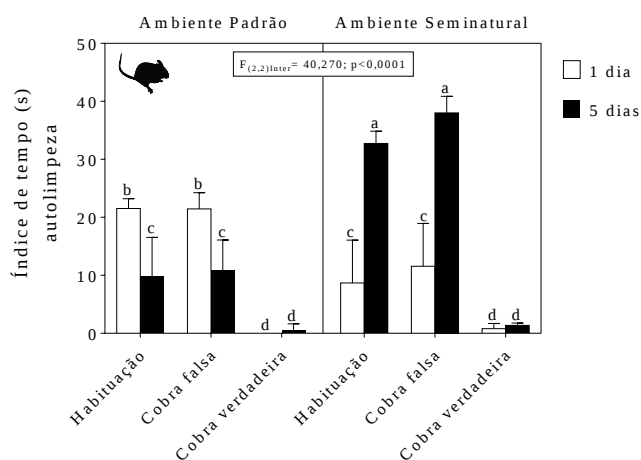
O restante dos parâmetros analisados foi submetido a análise de variância de acordo com o modelo *three-way* ANOVA, que corresponderam aos seguintes fatores: fator 1: ‘Tempo’ (dois tempos: 1 Dias e 5 Dias); fator 2: ‘Ambiente’ (Ambiente Convencional e Ambiente Realista) e fator 3: ‘Estímulo’ (Habituação, Serpente Falsa e Serpente Verdadeira). As comparações múltiplas foram realizadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises e gráficos foram realizados no software GraphPad Prism (versão 7.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo do estudo não foram observadas diferenças estatísticas na massa corporal entre os grupos com exposição de um dia (Ambiente padrão (AP) e Ambiente seminatural (ASN)), bem como entre os grupos de exposição de cinco dias (AP e ASN). Estes dados demonstram que a diferença de ambientes não afetou a massa corporal dos animais. Foi observada diferença estatística apenas entre os dois tempos de exposição (um (1D) e cinco (5D) dias), sendo que a diferença de quatro dias a mais de estudo foram suficientes para ocorrer ganho de massa corporal significativa entre os grupos de cinco dias. Apesar da pequena diferença de dias entre os grupos, o ganho de massa na fase juvenil dos camundongos é acentuado na prole.

Nos resultados referentes aos índices de frequência e tempo de autolimpeza (*grooming*), os animais dos grupos ASN 5D apresentaram maiores índices de autolimpeza que os grupos ASN 1D e AP (1D e 5D) durante a habituação e na presença da serpente falsa (Figura 6), com exceção apenas do grupo AP 1D durante a habituação, no qual não houve diferença estatística. Na presença da serpente verdadeira não foi observada diferença entre os grupos de um e cinco dias em ambos os ambientes e índices; contudo, todos os grupos expostos a serpente verdadeira apresentaram menores índices que os grupos habituação e serpente falsa em ambos os ambientes (Figura 6).

A



B

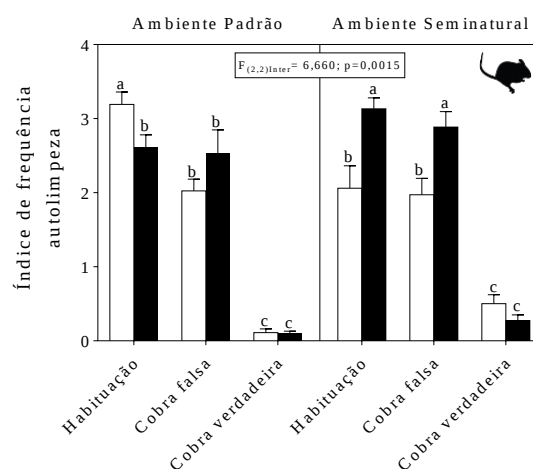


Figura 6. Índices de frequência (A) e tempo (B) de autolimpeza em camundongos Swiss em ambiente convencional e seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a períodos de habituação aos ambientes e a serpentes falsas e verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p < 0,05$) por meio dos testes ANOVA *three-way* e Tukey.

Se tratando dos parâmetros avaliados como resposta antipredatória, o comportamento de autolimpeza é considerado um comportamento inato em roedores, que envolve vários processos fisiológicos em seu desenvolvimento, desde o nascimento até a idade adulta, o tornando considerado de grande potencial quando se refere a pesquisas no âmbito da neurociência (Kalueff et al. 2016). O comportamento de autolimpeza também está relacionado diretamente a níveis de estresse e ansiedade em roedores, bem como a riqueza de estímulos presentes no ambiente, sendo assim, pode ser mais expresso em ambientes enriquecidos ou em condições estressantes (Kalueff et al. 2016, Fernández-Teruel e Estanislau 2016).

Nos resultados aqui apresentados, a maior expressão de autolimpeza pelos animais no ambiente seminatural, após cinco dias e na ausência da serpente verdadeira, é explicada pela riqueza de estímulos presentes nesse ambiente novo e com enriquecimento natural (Key 2004, Estanislau et al. 2013). Já a grande redução observada nos grupos expostos a serpente verdadeira se deve ao risco iminente de morte proporcionado pela condição, sendo conhecido que em casos como esse o animal apresenta inibição de atividades normais, como comer e autolimpeza, e se concentra em comportamentos de análise de risco (Blanchard e Blancard 2008, Estanislau et al. 2013, Fernández-Teruel e Estanislau 2016). Este foco na análise de risco está representado nos parâmetros apresentados a seguir, os quais foram expressos em grande parte dos cinco minutos da sessão teste em questão.

A avaliação do comportamento de evitação relacionado à análise de risco possui relação direta com o medo, pois seus atributos auxiliam na identificação de predadores e na evitação do embate direto (Hacquemand et al. 2010, Yokota et al. 2017). A evitação acontece quando o camundongo se afasta para fazer uma avaliação daquele ambiente, ou da presença de algo novo no ambiente, o levando a se afastar do risco, por isso é considerado um comportamento de vigilância, parte do repertório de comportamentos defensivos (Hacquemand et al. 2010, Lezak et al. 2017).

Os resultados do comportamento de evitação demonstraram interação entre os fatores tipo de ambiente e tipo de estímulo, na qual animais do grupo ASN 5D apresentaram maior frequência de evitações que o grupo AP por cinco dias, quando expostos ao confronto direto com a serpente verdadeira (Figura 7). Não houve diferença neste comportamento entre os grupos ASN expostos a serpente verdadeira (1D e 5D) e destes com o grupo AP 1D. Contudo, os quatro grupos em confronto com serpentes verdadeiras expressaram maiores frequências que os grupos sem este confronto (Figura 7). Estes resultados demonstram que os quatro grupos expostos a serpente verdadeira reconheceram a ameaça representada pelo predador, o diferenciaram do arquétipo da serpente falsa, e apresentaram maior frequência deste comportamento característico da análise de risco.

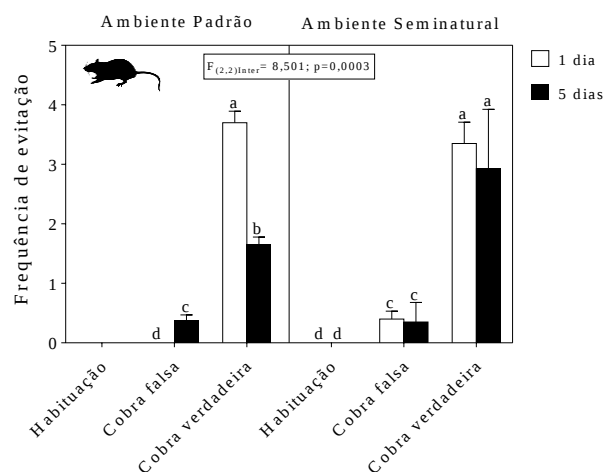


Figura 7. Frequência de evitação em camundongos Swiss em ambiente convencional e seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a períodos de habituação aos ambientes e a serpentes falsas e verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p < 0,05$) por meio dos testes ANOVA *three-way* e Tukey.

Conforme discutido por Korte et al. (1999), o comportamento de evitação é classificado de duas formas, a evitação passiva e ativa, sendo que na passiva os animais tendem a permanecer a uma distância segura da ameaça, enquanto na evitação ativa o animal após o

reconhecimento da ameaça iminente tende a se afastar rapidamente da fonte de risco. Como observado neste estudo, os estímulos ambientais ameaçadores, como um predador, são percebidos pelos roedores que demonstram o comportamento de evitação em maiores frequências que na ausência destes estímulos (Lezak et al. 2017).

Assim como a evitação, o comportamento de espreita também faz parte do repertório comportamental apresentado na análise de risco, sendo utilizado na obtenção de informações do contexto e possível fonte de risco no ambiente em que o animal se encontra. Visualmente à espreita é reconhecida pela projeção do tronco do animal juntamente com suas patas dianteiras, realizando o reconhecimento do local e da ameaça encontrada nele (Almeida et al. 2016).

Neste estudo foi observada interação entre os fatores tipo de ambiente e diferentes tempos, na qual os animais dos grupos ASN (1D e 5D) apresentaram maiores frequências de espreita que os grupos AP (1D e 5D) quando expostos a serpente verdadeira (Figura 8). Também houve diferença entre os grupos ASN em confronto direto com as serpentes verdadeiras, na qual o grupo cinco dias apresentou maior frequência de espreita que o grupo um dia (Figura 8). Esses dados revelam que no ambiente seminatural os animais expressam mais este comportamento que no ambiente padrão e que um maior tempo de convívio neste ambiente (5D) proporciona uma expressão ainda maior que um dia no ambiente enriquecido ou no AP.

Este padrão de maior expressão de um comportamento defensivo no ambiente seminatural que no padrão, e expressão ainda maior com maiores períodos de convivência nesse ambiente enriquecido, ressalta a importância do contexto ecológico em que são expressos, pois os elementos estruturais do ambiente afetam a percepção da presa sobre a pressão de predação exercida pelos predadores (Mc Naughton e Corr 2018).

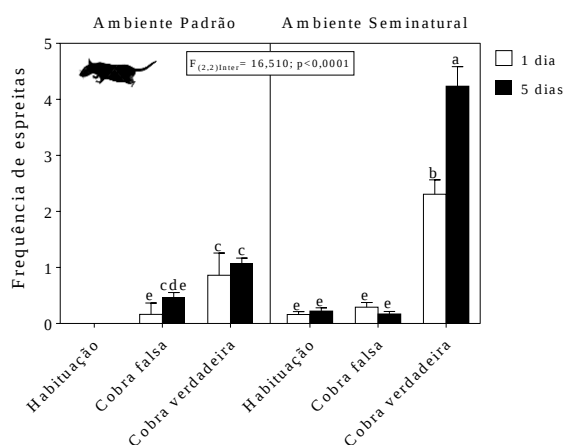


Figura 8. Frequência de espreita em camundongos Swiss em ambiente convencional e seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a períodos de habituação aos ambientes e a serpentes falsas e verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p < 0,05$) por meio dos testes ANOVA *three-way* e Tukey.

A análise de risco realizada pelo animal, tendo à espreita como um importante comportamento de análise do contexto, está diretamente relacionada à complexidade e configuração estética e funcional do ambiente (Ulrich 1983, Heithaus et al. 2009, MC Naughton e Corr 2018). Dessa forma, o enriquecimento proporcionado pelo ambiente seminatural, com estímulos chave para a expressão do comportamento de espreita e diminuição do estresse, proporcionou uma análise de risco mais elaborada, possibilitando maiores chances de sobrevivência em um confronto direto com predador ou fornecendo uma possível utilização em estudos etológicos e farmacológicos.

A análise de risco é conduzida com o intuito de evitar o embate inescapável com a fonte de risco, porém quando esta condição acontece o animal apresenta outros comportamentos como o congelamento (*freezing*), fuga e voo em função do pânico gerado. A análise realizada orienta qual defesa será expressa de acordo com o grau de risco, a proximidade com o estímulo aversivo e as possibilidades ambientais de evitar o confronto inescapável (Blanchard e Blanchard 2008).

Recentemente De Franceschi et al. (2016) apresentaram discos com tamanhos e velocidades diferentes sobrevoando camundongos C57BL/6 machos adultos, simulando a aproximação de predadores aéreos, e observaram que uma proximidade intermediária ao predador provoca a expressão do congelamento, uma estratégia para não ser notado ou para minimizar as chances de ataque. Já em uma alta proximidade os autores observaram a expressão do voo (sobressalto) como tática de escape explosivo do ataque do predador.

Os índices de frequência e tempo de congelamento neste estudo demonstraram interação entre o tipo de estímulo e o tipo de ambiente, sendo que o grupo ASN 5D apresentou estatisticamente maiores índices de congelamento que os demais grupos quando expostos as serpentes verdadeiras (Figura 9). Este dado demonstra que um período de convivência de cinco dias em um ambiente seminatural ocasiona melhoria na percepção da presa sobre as serpentes verdadeiras e expressão do congelamento.

O congelamento de camundongos Swiss e outros roedores também foi observado em várias condições de confrontos com predadores como diferentes espécies de serpentes em aparatos tradicionalmente utilizados como labirintos e campo aberto (Guimaraes-Costa et al

2007, Coimbra et al. 2017) e à exposição de odores como de serpentes (Crisanto et al. 2015), gratos (Canteras et al. 2015, Crisanto et al. 2015) e raposas (Hacquemand et al. 2010).

Não foram observadas diferenças entre os demais grupos nos diferentes ambientes nas sessões de habituação e serpente falsa. Também não foi observada diferenças entre os grupos AP (1D e 5D) e o grupo ASN 1D expostos as serpentes verdadeiras no índice de tempo de congelamento. Porém no índice de frequência de congelamento o grupo ASN 1D apresentou menor índice que os grupos AP expostos ao predador (Figura 9).

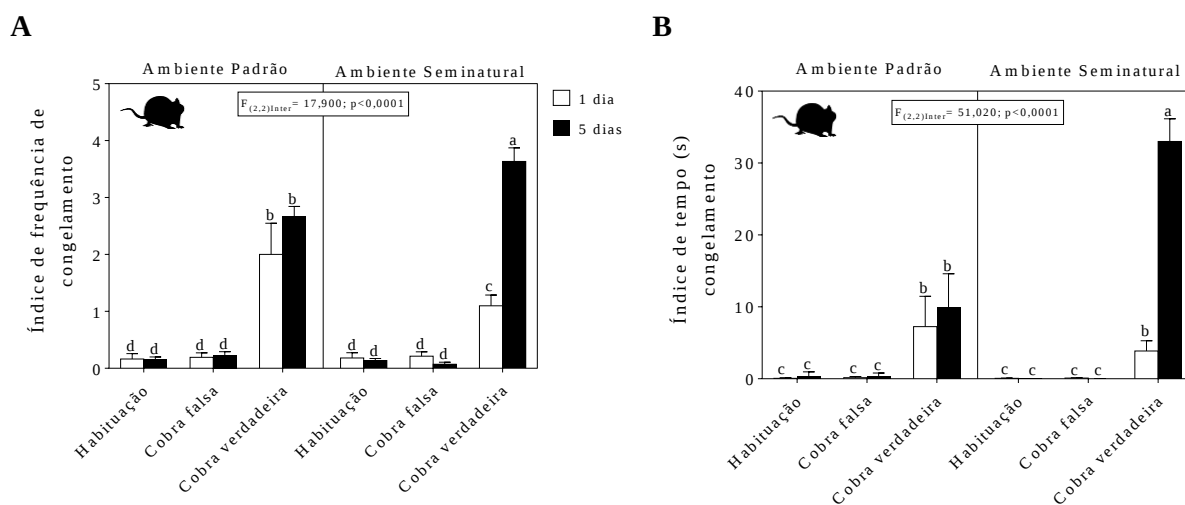


Figura 9. Índices de frequência (A) e tempo (B) de congelamento em camundongos Swiss em ambiente convencional e seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a períodos de habituação aos ambientes e a serpentes falsas e verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p < 0,05$) por meio dos testes ANOVA *three-way* e Tukey.

Semelhante ao comportamento de espreita, a expressão do congelamento possui relação com o contexto ecológico e à complexidade e configuração estética e funcional do ambiente (Ulrich 1983, Heithaus et al. 2009, MC Naughton e Corr 2018). Estes resultados frisam a importância do enriquecimento proporcionado pelo ambiente seminatural, proporcionando estímulos e diminuição do estresse que contribuem para expressão mais aprimorada destes comportamentos. Também reforça que a complexidade ecológica, assim como a proposta nesse estudo, deve ser valorizada em estudos etológicos e farmacológicos ligados a comportamentos defensivos inatos (Heithaus et al. 2009, Mobbs 2018).

Como possibilidade interessante para estudos farmacológicos envolvendo transtornos ligados a ansiedade, o congelamento é um forte indicador desta condição, sendo utilizado como parâmetro em testes de drogas altamente eficazes no tratamento do Transtorno de Ansiedade Generalizada, como os ansiolíticos benzodiazepínicos (Conti et al. 1990). Estes fármacos

proporcionam uma atenuação ou mesmo o desaparecimento da resposta de congelamento em ratos em uma faixa de dose semelhante à utilizada em humanos (Landeira-Fernandez et al. 2006).

Em contraponto, fármacos ansiogênicos como algumas beta-carbolinas, produzem sintomas de ansiedade em humanos e aumentam a magnitude da resposta condicionada de congelamento ao contexto em ratos Sprague Dawley (Conti et al. 1990). Nesse sentido a possibilidade de realizar estudos em roedores de laboratório e extrapolar, dentro das devidas ponderações, os resultados para humanos é atraente e ganhou apoio com o estudo de Low et al. (2015). Os autores realizaram um ensaio em que humanos foram submetidos a uma dinâmica com ameaças imprevisíveis como círculos e estrelas em diferentes distâncias e choques em diferentes intensidades, e observaram o comportamento de congelamento em condições muito semelhantes às estudadas em roedores de laboratório, reafirmando a comparações destes estudos com humanos.

Os dados obtidos demonstram que o protocolo utilizado neste estudo tem grande potencial para utilização em estudos comportamentais associados a distúrbios de ansiedade e pânico e para testes envolvendo fármacos relacionados a estes distúrbios. O ambiente seminatural se mostra como condição ideal para realização de estudos com este fim, uma vez que possibilita expressões mais refinadas de comportamentos de interesse que em condições padrão (Blanchard et al. 2001) como pode ser observado nos resultados aqui apresentados.

Em relação ao encontro próximo entre os camundongos e as serpentes, foram avaliados os comportamentos de fuga e interação com os predadores, sendo observada correlação negativa entre estes comportamentos, uma vez que são mutuamente exclusivos (Figura 10). No índice de frequência de interação os animais expostos as serpentes verdadeiras dos grupos ASN (1D e 5D) e AP 5D não apresentaram diferença entre si, mas expressaram menor índice estatisticamente do que o grupo AP 1D e os grupos (AP e ASN) expostos a serpente falsa (Figura 10 A). Já nos resultados do índice de tempo de interação o grupo ASN cinco dias apresentou menor índice que todos os demais grupos, seguido pelos grupos ASN um dia e AP cinco dias, não havendo diferença entre os dois últimos (Figura 10 B).

Negativamente correlacionado com a interação, a frequência de fuga observada nos animais dos grupos expostos as serpentes verdadeiras (AP e ASN) foi maior que em contato com as serpentes falsas (Figura 10 C). No confronto direto com as serpentes verdadeiras os grupos ASN (1D e 5D) apresentaram maiores frequências de fuga que os grupos AP (1D e 5D), demonstrando que no ambiente seminatural os animais foram mais eficientes em fugir dos predadores verdadeiros que no ambiente padrão.

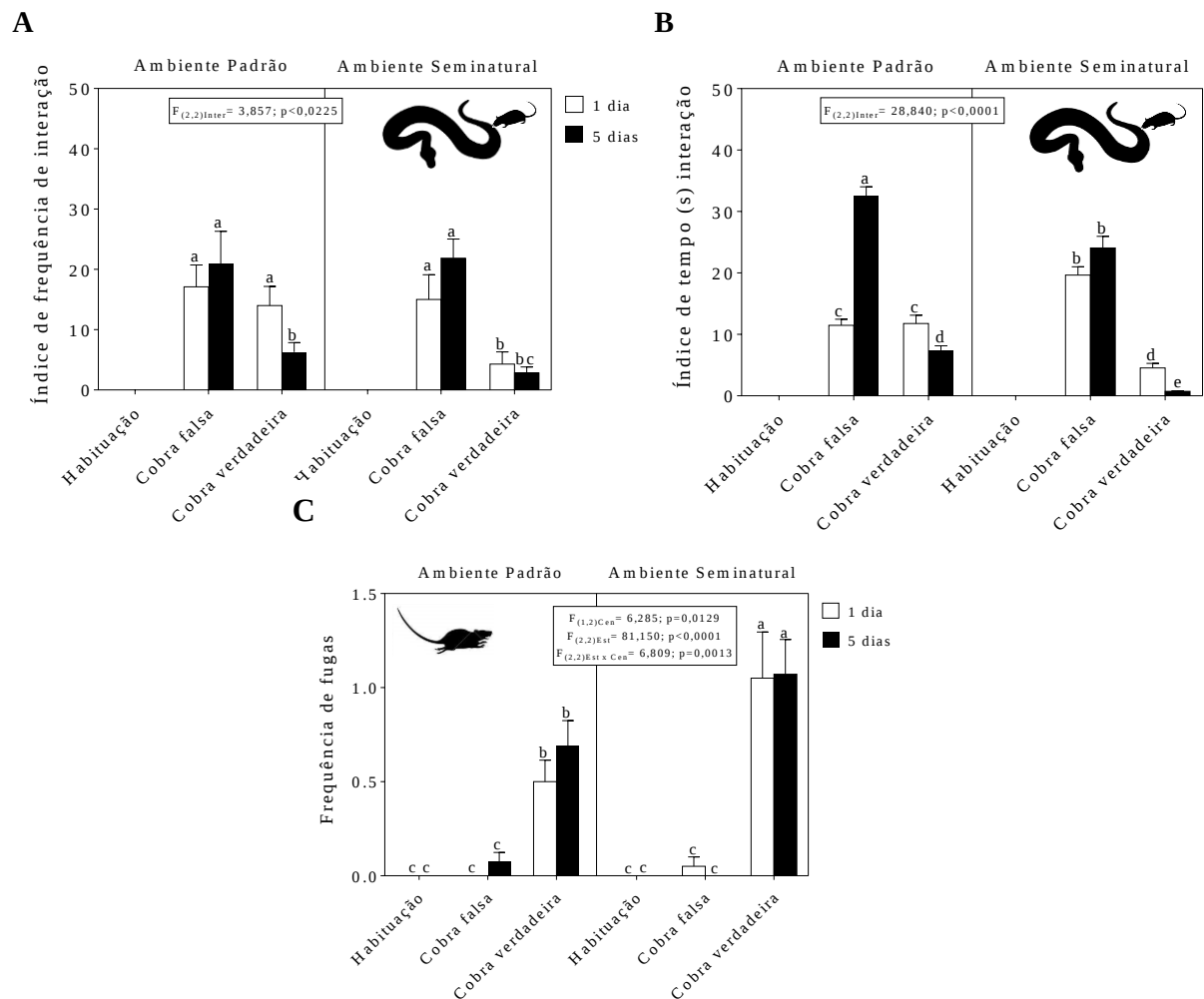


Figura 10. Índices de frequência (A) e tempo (B) de interação com serpentes e frequência de fugas (C) em camundongos Swiss mantidos em ambiente convencional e seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a serpentes falsas (arquétipos) e verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p < 0,05$) por meio dos testes ANOVA *three-way* e Tukey.

Dessa forma, nota-se que os animais expostos as serpentes verdadeiras foram eficazes em diferencia-las das falsas e reconhece-las como predadoras apresentando pequenos índices de interação com elas. Da mesma forma, os grupos com predadores reais apresentaram maiores frequências de fugas, reforçando a eficácia em reconhecer os predadores verdadeiros e evitando ao máximo o confronto que poderia resultar na morte dos indivíduos.

O comportamento de fuga apresenta correlação com o congelamento e ambos com a distância do predador. Quando a distância é maior os animais costumam expressar o congelamento com o intuito de não ser notado ou evitar um ataque em caso de já ter sido notado, por outro lado, quando a distância é curta o congelamento pode significar a morte e nesses casos a fuga é o melhor recurso (Blanchard e Blanchard 2008). A fuga tem sido observada em

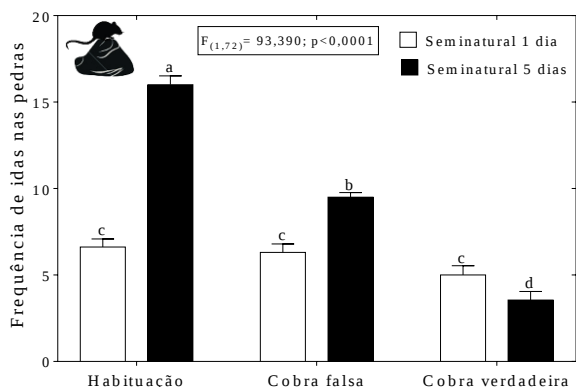
confrontos com diferentes predadores em curtas distâncias, mesmo que sejam apenas objetos simulando predadores (De Franceschi et al. 2016, Coimbra et al. 2017).

Assim como nos comportamentos de congelamento e espreita, a interação e fuga indicam uma melhor condição no grupo exposto ao enriquecimento ambiental proporcionado pelo ambiente seminatural durante cinco dias. Estes quatro parâmetros comportamentais, ligados a condições de ansiedade e pânico, indicam que o protocolo seguido no grupo ASN cinco dias é melhor para a condução de experimentos etológicos, farmacológicos, dentre outros que necessitem avaliar estes comportamentos em condições de medo não condicionado.

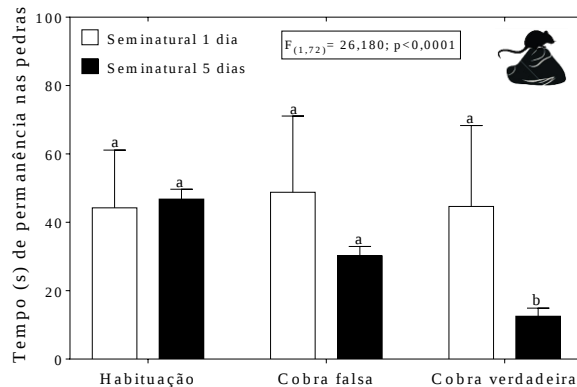
O protocolo proposto para o ambiente seminatural além de apresentar melhores resultados, como os apresentados neste estudo, possibilita a análise de outros parâmetros etológicos que não são possíveis no ambiente padrão. Neste experimento foram avaliados os parâmetros de ida e permanência nas pedras e tempo de permanência nos galhos, tais parâmetros avaliam a exploração destes pontos de possível refúgio contra os predadores por parte dos camundongos no ambiente seminatural.

Foi observada correlação negativa entre frequência de idas e tempo de permanência nas pedras e tempo de permanência nos galhos, uma vez que são mutuamente exclusivos. Os animais do grupo ASN 5D exploraram menos as pedras e permaneceram mais tempo nos galhos na presença das serpentes verdadeiras. O mesmo grupo também apresentou diminuição de idas nas pedras na presença das serpentes falsas, mas foi estatisticamente maior que na presença das serpentes verdadeiras. Em relação aos tempos de permanência nas pedras e nos galhos não houve diferenças entre os grupos ASN (1D e 5D) nas sessões de habituação e exposição a serpente falsa.

A



B



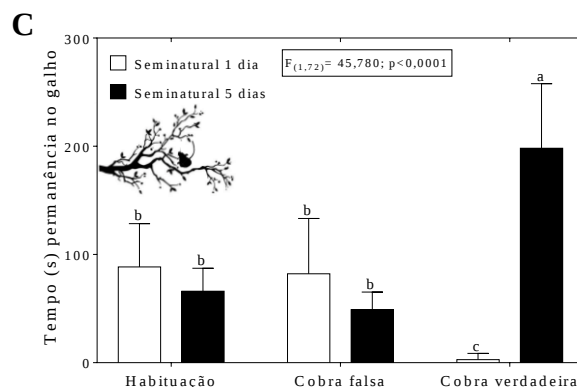


Figura 11. Frequência de ida até as pedras (A) e tempos de permanência nas pedras (B) e nos galhos (C) em camundongos Swiss mantidos em ambiente seminatural durante um ou cinco dias de experimento. Os animais foram expostos a períodos de habituação, serpentes falsas (arquétipos) e serpentes verdadeiras. Diferenças entre letras representam diferença estatística com nível de confiança de 5 % ($p < 0,05$) por meio dos testes ANOVA *three-way* e Tukey.

Desse modo, observa-se que o grupo ANS 5D foi eficaz em diferenciar as serpentes verdadeiras das falsas e apresentou maior busca pelos galhos que consistia no melhor refúgio disponível em detrimento das pedras que deixava os animais mais vulneráveis. Em comparação ao tempo de convivência no ambiente seminatural com seus aspectos de enriquecimento ambiental, o grupo ASN 1D se mostrou menos eficiente em buscar pelos refúgios, não havendo diferenças na presença das serpentes verdadeiras ou demonstrou comportamento oposto ao grupo 5D, permanecendo menos tempo nos galhos na presença das serpentes verdadeiras que nas sessões anteriores. Sendo assim, em complemento aos outros parâmetros avaliados, o protocolo de cinco dias no ASN apresenta grande potencial para ser utilizado em estudos comportamentais e farmacológicos ligados a comportamentos defensivos antipredatórios.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo é possível concluir que os grupos foram capazes de diferenciar as serpentes verdadeiras das falsas em ambos os ambientes e expressaram comportamentos defensivos antipredatórios inatos não condicionados. Na maioria dos parâmetros avaliados o ambiente seminatural com seus enriquecimentos ambientais proporcionou a expressão de comportamentos antipredatórios em maior intensidade que o ambiente padrão. Também foi observado que o maior tempo no ambiente seminatural (cinco dias) apresentou melhores resultados que o ambiente padrão e o próprio ambiente seminatural por um dia apenas.

Desse modo, conclui-se que o protocolo para o ambiente seminatural por cinco dias é mais eficiente que as condições padrão praticadas em muitos estudos, e configura uma interessante condição para realização de estudos ligados ao medo, transtornos de ansiedade e comportamentos defensivos antipredatórios em proles de camundongos Swiss. Por fim, propõe-se que novos estudos investiguem se um maior período de vivência no ambiente seminatural proporciona melhores resultados e avaliem a utilização de indivíduos de diferentes idades, controlando as variações hormonais pós puberdade para que não influenciem os resultados.

5. REFERÊNCIAS

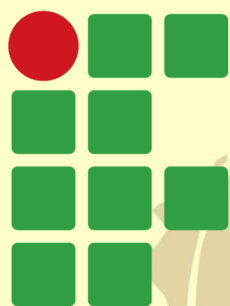
- Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS (Orgs.). (2002). *Animais de laboratório – criação e experimentação*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 388p.
- Bailoo JD, Murphy E, Boada-Saña M, Varholick JA, Hintze S, Baussière C, Hahn KC, Göpfert C, Palme R, Voelkl B, Würbel H. (2018). Effects of Cage Enrichment on Behavior, Welfare and Outcome Variability in Female Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12: 232. Doi: 10.3389/fnbeh.2018.00232
- Baumans V, Van Loo PLP, Pham TM. (2010). Standardisation of environmental enrichment for laboratory mice and rats: utilisation, practicality and variation in experimental results. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 37: 101–114.
- Baumans V. (2005). Environmental Enrichment for Laboratory Rodents and Rabbits: Requirements of Rodents, Rabbits, and Research. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 46(2): 162–170. Doi: 10.1093/ilar.46.2.162
- Bayne KAL, Hurst JK, Dexter SL. (1992). Evaluation of the preference to and behavioral effects of na enriched environment on male rhesus monkeys. *Lab. Anim. Sci.*, 42: 38-45.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. (2008). Chapter 2.4 Defensive behaviors, fear, and anxiety. *Handbook of Behavioral Neuroscience*: 63–79. Doi: 10.1016/s1569-7339(07)00005-7
- Blanchard DC, Griebelc G, Blanchard RJ. (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 25(3): 205–218. Doi: 10.1016/s0149-7634(01)00009-4
- Blanchard RJ, Blanchard DC, Hori K. (1989). Ethoexperimental approaches to the study of defensive behavior. In: Blanchard RJ, Brain PF, Blanchard DC, Parmigiani S. eds. *Ethoexperimental approaches to the study of behavior*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 11'4-136.b
- Blanchard RJ, Blanchard DC, Rodgers J, Weiss SM. (1990). The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 14(4): 463-472. Doi: 10.1016/S0149-7634(05)80069-7
- Boissy A, Manteuffel G, Jensen MB, Moe RO, Spruijt B, Keeling LJ, Winckler C, Forkman B, Dimitrov I, Langbein J, Bakken M, Veissier I, Aubert A. (2007). Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & Behavior* 92: 375–397. Doi: 10.1016/j.physbeh.2007.02.003.
- Canteras NS, Pavesi E, Carobrez AP. (2015). Olfactory instruction for fear: neural system analysis. *Frontiers in Neuroscience* 9:276. Doi: 10.3389/fnins.2015.00276

- Carthey AJR, Blumstein DT. (2018). Predicting Predator Recognition in a Changing World. *Trends in Ecology & Evolution* 33(2): 106-115. Doi: 10.1016/j.tree.2017.10.009
- Coimbra NC, Paschoalin-Maurin T, Bassi GS, Kanashiro A, Biagioni AF, Felippotti TT, Elias-Filho DH, Mendes-Gomes J, Cysne-Coimbra JP, Almada RC, Lobão-Soares B. (2017). Critical neuropsychobiological analysis of panic attack- and anticipatory anxiety-like behaviors in rodents confronted with snakes in polygonal arenas and complex labyrinths: a comparison to the elevated plus- and T-maze behavioral tests. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 39(1): 72–83. Doi: 10.1590/1516-4446-2015-1895
- Conti LH, Maciver CR, Ferkany JW, Abreu ME. (1990). Footshock-induced freezing behavior in rats as a model for assessing anxiolytics. *Psychopharmacology* (Berl) 102: 492-497.
- Crisanto KO, de Andrade WMG, de Azevedo Silva KD, Lima RH, de Oliveira Costa MSM, de Souza Cavalcante J, Lima RRM, Nascimento Jr ES, Cavalcante JC. (2015). The differential mice response to cat and snake odor. *Physiology & Behavior* 152: 272–279. Doi: 10.1016/j.physbeh.2015.10.013
- De Franceschi G, Vivattanasarn T, Saleem AB, Solomon SG. (2016). Vision Guides Selection of Freeze or Flight Defense Strategies in Mice. *Current Biology* 26(16): 2150–2154. Doi: 10.1016/j.cub.2016.06.006
- Estanislau CR, Díaz-Moran S, Canete T, Blázquez G, Tobeña A, FernandezTeruel A. (2013). Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. *Neuroscience Research* 77: 187-201. Doi: 10.1016/j.neures.2013.09.012
- Fernández-Teruel A, Estanislau C. (2016). Meanings of self-grooming depend on an inverted U-shaped function with aversiveness. *Nature Reviews Neuroscience* 17(9): 591–591. Doi: 10.1038/nrn.2016.102
- Frings M, Frings H. (1950). Behavior Patterns of the Laboratory Mouse under Auditory Stress. *The Journal of the Acoustical Society of America* 22(5): 682–682. Doi: 10.1121/1.1917225
- Gilloux I, Gumell J, Shepherdson D. (1992). An enrichment device for great apes. *Animal Welfare* 1: 279-289.
- Guimarães-Costa R, Guimarães-Costa MB, Pippa-Gadioli L, Weltson A, Ubiali WA, Paschoalin-Maurin T, Felippotti TT, Elias-Filho DH, Laure CJ, Coimbra NC. (2007). Innate defensive behaviour and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth: Behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey versus predator paradigm. *Journal of Neuroscience Methods* 165(1): 25–37. Doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.05.023
- Hacquemand R, Jacquot L, Brand G. (2010). Comparative Fear-Related Behaviors to Predator Odors (TMT and Natural Fox Feces) before and after Intranasal ZnSO₄ Treatment in Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4: 188. Doi: 10.3389/fnbeh.2010.00188
- Heithaus MR, Wirsing AJ, Burkholder D, Thomson J, Dill LM. (2009). Towards a predictive framework for predator risk effects: the interaction of landscape features and prey escape tactics. *Journal of Animal Ecology* 78(3): 556–562. Doi: 10.1111/j.1365-2656.2008.01512.x
- Hirsch SM, Bolles RC. (1980). On the Ability of Prey to Recognize Predators. *Zeitschrift Für Tierpsychologie* 54(1): 71–84. Doi: 10.1111/j.1439-0310.1980.tb01064.x

- Huck UW, Price EO. (1976). Effect of the post-weaning environment on the climbing behaviour of wild and domestic Norway rats. *Animal Behaviour* 24(2): 364-371. Doi: 10.1016/S0003-3472(76)80044-9
- Kalueff AV, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience* 17(1): 45–59. Doi: 10.1038/nrn.2015.8
- Key D. (2004). Environmental Enrichment Options for Laboratory Rats and Mice. *Lab Animal* 33(2): 39–44. Doi: 10.1038/labon0204-39
- Korte SM, De Boer SF, Bohus B. (1999). Fear-Potential in the Elevated Plus-Maze Test Depends on Stressor Controllability and Fear Conditioning. *Stress* 3(1): 27–40. Doi: 10.3109/10253899909001110
- Landeira-Fernandez J, Cruz APM, Brandão ML. (2006). Padrões de respostas defensivas de congelamento associados a diferentes transtornos de ansiedade. *Psicologia USP* 17(4): 175-192.
- Lezak KR, Missig G, Carlezon WA. (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 19(2): 181-191.
- Love JA. (1994). Group housing: meeting the physical and social needs of the laboratory rabbit. *Laboratory animal science* 44: 5-11.
- Löw A, Weymar M, Hamm AO. (2015). When Threat Is Near, Get Out of Here. *Psychological Science* 26(11): 1706–1716. Doi: 10.1177/0956797615597332
- Mc Naughton N, Corr PJ. (2018) Survival circuits and risk assessment. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 24:14–20. Doi: 10.1016/j.cobeha.2018.01.018
- Mendes B, Mesak C, Calixto JED, Malafaia G. (2018). Mice exposure to haloxyfop-p-methyl ester at predicted environmentally relevant concentrations leads to anti-predatory response deficit. *Environmental Science and Pollution Research*. Doi: 10.1007/s11356-018-3222-5
- Moodie EM, Chamove AS. (1990). Brief threatening events beneficial for captive tamarins? *Zoo Biol* 9:275-286. Doi: 10.1002/zoo.1430090403
- Newberry, RC. (1995). Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science* 44(2-4): 229–243. Doi:10.1016/0168-1591(95)00616-z
- Olsson IAS, Dahlborn K. (2002). Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Laboratory Animals* 36(3): 243-270. Doi: 10.1258/002367702320162379
- Pentkowski NS, Litvin Y, Blanchard DC, Blanchard RJ. (2018). Effects of estrus cycle stage on defensive behavior in female Long-Evans hooded rats. *Physiology & Behavior* 194: 41–47. Doi: 10.1016/j.physbeh.2018.04.028
- Pines MK, Kaplan G, Rogers LJ. (2007). A note on indoor and outdoor housing preferences of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Applied Animal Behaviour Science* 108(3–4): 348-353. Doi: 10.1016/j.applanim.2006.12.001
- Price EO. (1999). Behavioral development in animals undergoing domestication. *Applied Animal Behaviour Science* 65: 245–271.

- Sánchez-González B, Barja I, Piñeiro A, Hernández-González MC, Silván G, Illera JC, Latorre R. (2018). Support vector machines for explaining physiological stress response in Wood mice (*Apodemus sylvaticus*). *Scientific Reports* 8(1). Doi:10.1038/s41598-018-20646-0
- Simpson J, Kelly JP. (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research* 222(1): 246–264. Doi: 10.1016/j.bbr.2011.04.002
- Souza JM, Rabelo LM, Faria DBG, Guimarães ATB, Silva WAM, Rocha TL, Quintão T, Mendes BO, Malafaia G. (2018). The intake of water containing a mix of pollutants at environmentally relevant concentrations leads to defensive response deficit in male C57Bl/6J mice. *Science of total environment* 628-629: 186-197. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.040.
- St-Cyr S, McGowan PO. (2015). Programming of stress-related behavior and epigenetic neural gene regulation in mice offspring through maternal exposure to predator odor. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9. Doi:10.3389/fnbeh.2015.00145
- St-Cyr S^a, Abuaish S, Spinieli RL, McGowan PO. (2018). Maternal Predator Odor Exposure in Mice Programs Adult Offspring Social Behavior and Increases Stress-Induced Behaviors in Semi-Naturalistic and Commonly-Used Laboratory Tasks. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12:136. Doi: 10.3389/fnbeh.2018.00136
- St-Cyr S^b, Abuaish S, Welch KC, McGowan PO. (2018). Maternal predator odour exposure programs metabolic responses in adult offspring. *Scientific Reports* 8(1). Doi: 10.1038/s41598-018-26462-w
- Toth LA, Kregel K, Leon L, Musch TI. (2011). Environmental enrichment of laboratory rodents: the answer depends on the question. *Comparative Medicine* 61(4): 314–321.
- Ulrich RS. (1983). Aesthetic and affective response to natural environment. In: I. Altman & J. Wohlwill (Eds.), *Human Behavior and Environment*, v. 6: Behavior and Natural Environment., New York: Plenum, 85-125.
- Vale R, Evans DA, Branco T. (2017). Rapid Spatial Learning Controls Instinctive Defensive Behavior in Mice. *Current Biology* 27(9): 1342–1349. Doi: 10.1016/j.cub.2017.03.031
- Van de Weerd HA, Aarsen EL, Mulder UMA, Kruitwagen CLJJ, Hendriksen CFM, Baumans V. (2002). Effects of Environmental Enrichment for Mice: Variation in Experimental Results. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 5: 87-109. Doi: 10.1207/S15327604JAWS0502_01
- Wells DL. (2009). Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: A review. *Applied Animal Behaviour Science* 118(1-2): 1–11. Doi:10.1016/j.applanim.2009.01.002
- Widman DR, Abrahamsen GC, Rosellini RA. (1992). Environmental enrichment: the influences of restricted daily exposure and subsequent exposure to uncontrollable stress. *Physiology and Behavior* 5(1): 309-318. Doi: 10.1016/0031-9384(92)90146-S
- Yang M, Augustsson H, Markham C, Hubbard D, Webster D, Wall P, Blanchard R, Blanchard D. (2004). The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiology & Behavior* 81(3): 465–473. Doi: 10.1016/j.physbeh.2004.02.010
- Yilmaz M, Meister M. (2013). Rapid Innate Defensive Responses of Mice to Looming Visual Stimuli. *Current Biology* 23(20): 2011–2015. Doi: 10.1016/j.cub.2013.08.015

Yokota S, Suzuki Y, Hamami K, Harada A, Komai S. (2017). Sex differences in avoidance behavior after perceiving potential risk in mice. *Behavioral and Brain Functions* 13(1). Doi: 10.1186/s12993-017-0126-3



**INSTITUTO
FEDERAL**

Goiano

Campus
Urutaí

