

Eficiência reprodutiva de camundongos BALB/c em diferentes sistemas de acasalamento

Reproductive efficiency of BALB/c mice in different mating systems

Eficiencia reproductiva de ratones BALB/c en diferentes sistemas de apareamiento

Recebido: 22/07/2020 | Revisado: 01/08/2020 | Aceito: 05/08/2020 | Publicado: 13/08/2020

Maydson Vieira Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0227-6153>

Centro Universitário de Anápolis, Brasil

E-mail: maydsonrds@gmail.com

Valdomiro Souza dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7476-6875>

Centro Universitário de Anápolis, Brasil

E-mail: valdomiro18@hotmail.com

Leandro Norberto da Silva Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2628-8746>

Universidade de São Paulo, Brasil

E-mail: silvajunior@usp.br

Kelly Cristina Borges Tacon

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2399-9051>

Centro Universitário de Anápolis, Brasil

E-mail: kellytaconn@hotmail.com

Jalsi Tacon Arruda

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7091-4850>

Centro Universitário de Anápolis, Brasil

E-mail: jalsitacon@gmail.com

Resumo

O camundongo é muito utilizado em pesquisas experimentais envolvendo teste laboratoriais in vivo. Apresenta pequeno porte, fácil manuseio, período reprodutivo curto e fácil domesticação são características que fazem dele um bom modelo, além de excelente compatibilidade com o genoma humano. Os biotérios adotam diferentes métodos de reprodução, muitas vezes usando sistemas de acasalamento de forma aleatória, sem fazer uma análise técnica da eficiência reprodutiva. Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo analisar a taxa reprodutiva de

camundongos BALB/c em diferentes sistemas de acasalamento no biotério. Foram utilizados 28 camundongos da linhagem BALB/c, sendo 10 machos e 18 fêmeas distribuídos entre 03 sistemas diferentes: monogâmico permanente, poligâmico permanente e poligâmico temporário. Foram observadas três gerações para cada tipo de acasalamento no biotério do Centro Universitário de Anápolis, UniEvangélica. O sistema monogâmico permanente foi o mais eficiente em quantidade de filhotes produzidos, tanto na taxa de natalidade quanto no desmame. A segunda geração apresentou melhor eficiência reprodutiva em todos os sistemas, na qual os animais atingiram maior maturidade sexual.

Palavras-chave: Comportamento sexual animal; Técnico de biotério; Reprodução animal.

Abstract

The mice are widely used in experimental research involving in vivo laboratory tests. It presents small size, easy handling, short reproductive period and easy domestic, which are characteristics that make it a good model, in addition to excellent compatibility with the human genome. The maintenance vivarium adopts different methods of reproduction, often using stranding systems at random, without making a technical analysis of reproductive efficiency. Thus, the present study aims to analyze the reproduction rates of BALB/c mice in different mating systems in the vivarium. Were used 28 BALB/c mice, 10 males and 18 females distributed among 03 different systems: permanent monogamous, permanent polygamous and temporary polygamous. Three generations were observed for each type of mating in the vivarium of the University Center of Anápolis, UniEvangélica. The permanent monogamous system was the most efficient in the number of pups used, both in birth rate and in weaning. The second generation showed better reproductive efficiency in all systems, in which animals reached greater sexual maturity.

Keywords: Animal sexual behavior; Biothermal technician; Animal reproduction.

Resumen

El ratón es ampliamente utilizado en investigaciones experimentales que involucran pruebas de laboratorio in vivo. Presenta pequeño tamaño, fácil manejo, corto período de reproducción y fácil domesticación, son características que lo convierten en un buen modelo, además de una excelente compatibilidad con el genoma humano. Los bioterios de animales adoptan diferentes métodos de reproducción, a menudo utilizando sistemas de apareamiento al azar, sin hacer un análisis técnico de la eficiencia reproductiva. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo analizar la tasa de reproducción de ratones BALB/c en diferentes sistemas de

apareamiento en el vivero. Se utilizaron 28 ratones de la cepa BALB/c, 10 machos y 18 hembras distribuidos en 03 sistemas diferentes: monógamos permanentes, polígamos permanentes y polígamos temporales. Se observaron tres generaciones para cada tipo de apareamiento en el vivero del Centro Universitario de Anápolis, UniEvangélica. El sistema monógamo permanente fue el más eficiente en cantidad de crías producidas, tanto en la tasa de natalidad como en el destete. La segunda generación mostró una mejor eficiencia reproductiva en todos los sistemas, en los que los animales alcanzaron una mayor madurez sexual.

Palabras clave: Comportamiento sexual animal; Técnico de vivarium; Reproducción animal.

1. Introdução

A utilização de modelos biológicos surgiu por questões científicas, visto que não era possível obter dados a respeito do organismo, como um todo, em muitas experimentações (Neves et al., 2013). Por muito tempo os institutos de pesquisa foram os responsáveis pela criação de seus próprios modelos biológicos para uso, mas por não ter uma estrutura adequada para criação, os resultados obtidos nos experimentos apresentavam variações (Almeida et al., 2016). Os biotérios surgem dessa necessidade, da produção adequada para atender as pesquisas que utilizam animais, não só em quantidade para as demandas necessárias, mas também na qualidade dos animais disponibilizados para os estudos (Santos, 2002; Almeida et al., 2016). O biotério então, passa a ter o papel de oferecer um ambiente adequado, de acordo com a necessidade de cada espécie, controlando níveis de estresse, características do ambiente como temperatura, umidade, períodos de claro/escuro, disponibilidade de alimento, entre outras (Andersen et al., 2004; Lapchik et al., 2017).

Os animais utilizados nas experimentações devem apresentar compatibilidade genética com humanos, uma vez que serão utilizados, principalmente, em estudos na área da saúde (Andrade et al., 2002). Esses animais de laboratório são caracterizados pela sua genética (isogênicos – *inbred* ou heterogênicos – *outbred*) definida através de práticas reprodutivas sistemáticas (Neves et al., 2013; Machado & Zatti, 2015). Pesquisas experimentais que utilizam animais geralmente optam por ratos ou camundongos (Chorilli et al., 2007; Zanatto et al., 2019).

Os camundongos são os animais mais utilizados, conseqüentemente, são os que se tem mais informações científicas, além de apresentar grande compatibilidade com o genoma humano, com 99% de semelhança (Santos, 2002; Machado & Zatti, 2015). São de pequeno porte, de fácil manuseio, com período reprodutivo curto e fácil domesticação (Neves et al., 2013; Lapchik et al., 2017). Os biotérios têm um papel importante no fornecimento destes

camundongos para atender programas de pesquisas e ensino (Chorilli et al., 2007; Almeida et al., 2016; Almeida Junior et al., 2020). No entanto, tem-se observado que bioteristas adotam técnicas empíricas na reprodução desses animais, utilizando o sistema monogâmico por algum tempo ou só o poligâmico (permanente ou temporário), não analisando a eficiência de cada um desses sistemas reprodutivos (Mattaraia & Moura, 2012; Braga, 2017).

Sabendo disso, a investigação de sistemas de reprodução mais eficazes é importante para que se obtenha dados científicos que, posteriormente, poderão ser usados visando maior número de indivíduos qualificados. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo analisar a taxa reprodutiva de camundongos BALB/c em diferentes sistemas de acasalamento no Biotério do Centro Universitário de Anápolis, UniEvangélica.

2. Metodologia

Trata-se de uma pesquisa de campo com estudo experimental controlado, realizado em laboratório, do tipo quantitativa. A pesquisa experimental é uma abordagem científica que tem como finalidade testar hipóteses sobre um determinado assunto, na qual determinadas variáveis serão mantidas sob controle constante, enquanto outras variáveis serão medidas de acordo com os experimentos propostos no estudo. Deste modo, a manipulação das variáveis proporciona o estudo da relação entre causa e efeito do fenômeno abordado. Para alcançar o objetivo proposto no estudo a pesquisa experimental pretende dizer de que modo ou por que causas o fenômeno foi produzido (Pereira et al., 2018).

O estudo foi realizado no Biotério Central do Centro Universitário de Anápolis, UniEvangélica, localizado na Unidade Experimental no município de Anápolis-Goiás. O modelo biológico utilizado foi o camundongo BALB/c (isogênico) de hábitos diurnos. Os camundongos foram distribuídos em gaiolas de polipropileno (30 x 20 x 13cm) forradas com cama de maravalha autoclavadas, trocadas 2 vezes por semana, e bolas de papel branco não reciclado para o enriquecimento ambiental (Figura 1). A limpeza das gaiolas, trocas de água e a disposição da ração foram realizadas no período de 12 horas de luz. A ração foi disponibilizada 2 vezes por semana e a água potável 3 vezes por semana, sempre no mesmo horário para todos os sistemas de acasalamento. A alimentação dos camundongos foi feita com Ração Presence[®] Ratos e Camundongos *ad libitum*.

Figura 1. Sala de manutenção experimental I do biotério e camundongos BALB/c.



Fonte: Autores.

As gaiolas com os camundongos foram colocadas na sala de experimentação especial controlada por barreiras sanitárias, com controle no fluxo de pessoas, sistema de iluminação, controle de temperatura e exaustores com vazão de $144\text{m}^3/\text{h}$ à altura das gaiolas para controlar a dispersão de amônia no ambiente. A temperatura do ambiente foi mantida entre 22°C e 24°C com os níveis de umidade entre 40% a 60%, ciclo de iluminação de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão (12L:12E) com nível de iluminação entre 50 a 120 lux. Duas vezes por semana a temperatura, umidade, luminosidade foram medidas e anotadas.

Sistemas de acasalamento

Foram testados três sistemas de acasalamento: (G1) monogâmico permanente, (G2) poligâmico permanente e (G3) poligâmico temporário. Foram utilizados 28 camundongos, sendo 18 fêmeas e 10 machos, todos nascidos no biotério. Os animais foram separados para o experimento quando atingiram o período reprodutivo (60 dias de vida). Os machos foram colocados próximos das caixas das fêmeas antes da formação dos casais, para que feromônio fosse sentido pelas fêmeas e ocasionasse a sincronização do cio. As entradas dos machos nas gaiolas foram de acordo com a sincronização das fêmeas (Figura 2).

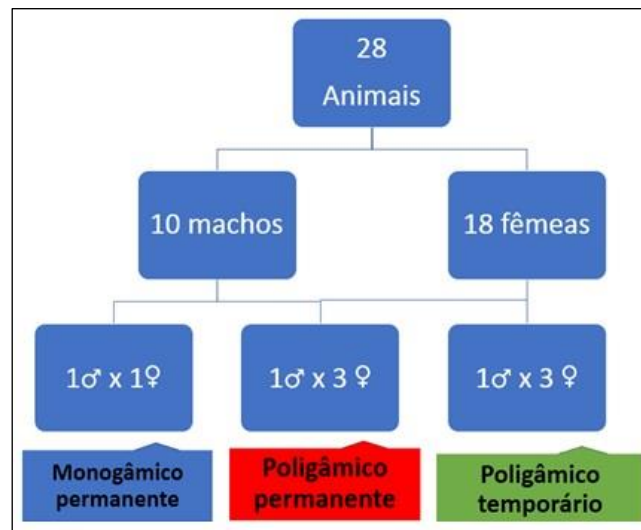
Figura 2. Gaiolas contendo as fêmeas para cada sistema de acasalamento. A): monogâmico permanente (G1), B): poligâmico permanente (G2), C): poligâmico temporário (G3).



Fonte: Autores.

No sistema monogâmico permanente (G1) os camundongos foram distribuídos em 06 gaiolas cada uma com um par de indivíduos (casal). Nos sistemas poligâmicos (harém) foi adotado a proporção de 01 macho para 03 fêmeas. Para cada sistema poligâmico (permanente (G2) e temporário (G3)) os camundongos foram divididos em 02 gaiolas, cada uma contendo 01 macho e 03 fêmeas. A mesma quantidade de fêmeas foi distribuída entre os sistemas analisados, 06 por sistema. Os indivíduos de cada sistema receberam uma marcação na pelagem para individualização e coleta dos dados. Foram analisadas três gestações de cada sistema reprodutivo (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma de distribuição dos animais para cada sistema de acasalamento.



Fonte: Autores.

Os animais permaneceram juntos por 13 dias nas gaiolas. Após esse período foram separados em caixas individuais, devidamente identificados de acordo com os respectivos sistemas de acasalamento testados e os grupamentos formados. As fêmeas foram acompanhadas durante o período da primeira gestação (F1), parto e até que os filhotes desmamassem. Após esse momento, as fêmeas foram separadas de acordo com o sistema de acasalamento em outra gaiola, e os machos foram colocados próximos das gaiolas para que o feromônio fosse sentido e ocasionasse novamente a sincronização do cio, para iniciar a gestação seguinte (F2). Posteriormente, as fêmeas foram recolocadas nas gaiolas, com o respectivo macho de acordo com cada sistema, devidamente identificados.

Após a parição dos filhotes a cada gestação, foram anotados os dados da ninhada: data de nascimento, quantidade de filhotes nascidos vivos, natimortos. A sexagem foi realizada no período do desmame e foi verificada a data do desmame. A análise da taxa de mortalidade foi feita durante todo período de amamentação, calculando a quantidade total de nascidos, subtraindo do número de filhotes desmamados e subtraindo a quantidade de natimortos, tendo assim o resultado de mortalidade durante o período de amamentação em cada sistema (Figura 4).

Figura 4. Identificação individual dos machos e suas respectivas fêmeas.



Fonte: Autores.

Análise de dados e aspectos éticos

As variáveis analisadas foram: o total de nascimentos a cada gestação, quantidade de filhotes fêmeas e machos, natimortos, mortos, desmamados. Os dados coletados a cada geração, totalizando 3 gestações para cada sistema de acasalamento, foram verificados por estatística descritiva e quanto a análise de variância (ANOVA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os cálculos estatísticos foram realizados no GraphPad Prism (7.0 GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, nº 005/2019) garantindo que todo experimento seguiu os padrões de controle do ambiente adequado para a espécie.

3. Resultados

Esse biotério institucional iniciou seu funcionamento em fevereiro de 2018. É um local destinado a criação e experimentação com animais de laboratório e atende a instituição através de estágios oferecidos a diversos cursos de graduação e pós-graduação, ensinando e capacitando

para o respeito a Ciência de Animais de Laboratório, e também atendendo a pesquisadores interessados em realizar experimentações.

Na primeira gestação (F1) o sistema monogâmico permanente (G1) foi o mais eficiente em quantidade de indivíduos, com maior taxa de natalidade e desmame em comparação aos outros grupos. Todos os sistemas apresentaram maior quantidade de filhotes fêmeas na primeira gestação. Observou-se menor mortalidade (incluindo filhotes natimortos e mortos) no sistema G2 e maior quantidade no G3. Na segunda gestação (F2) o sistema G1 foi o mais eficiente em comparação com os outros sistemas, com maior quantidade de nascimentos e desmames. O sistema G2 apresentou maior quantidade de machos nessa gestação, sendo que nos sistemas G1 e G3 foi observado novamente maior quantidade de fêmeas, como na primeira gestação. Na terceira gestação (F3) o número de nascimentos foi maior no sistema G2. Contudo, a taxa de mortalidade nesse sistema foi maior. Nesta gestação o número de machos foi superior ao de fêmeas, com exceção do sistema G3, que obteve a mesma quantidade em ambos os sexos. O sistema G1 teve uma menor taxa de mortalidade (mortos e natimortos) em comparação com G2 e G3 (Tabela 1). No entanto, nenhum dos sistemas avaliados apresentou diferença estatisticamente significativa quando foram comparadas as médias entre as variáveis analisadas ($p>0,05$).

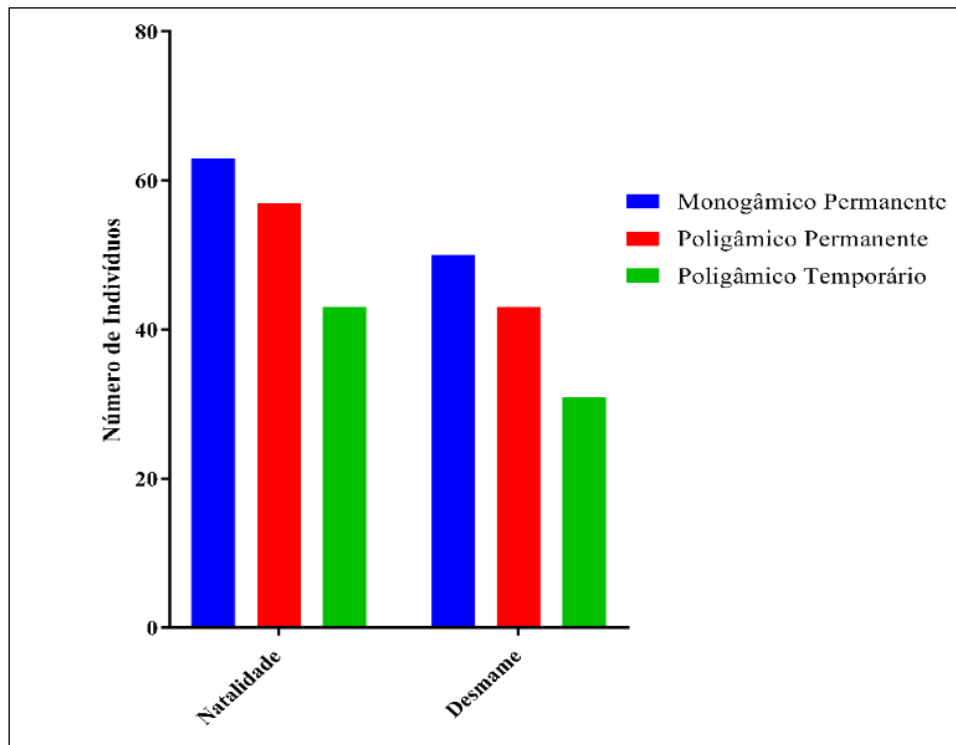
Tabela 1. Taxas observadas para cada parâmetro analisado nas três gestações.

	Monogâmico permanente (G1)			Poligâmico Permanente (G2)			Poligâmico Temporário (G3)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Natalidade	64	78	48	57	56	58	27	65	36
Natimortos	04	08	01	12	01	06	01	12	10
Fêmeas	31	34	22	22	21	17	13	28	11
Machos	22	29	23	20	23	27	11	19	11
Mortos	07	07	02	03	11	08	02	06	04
Desmamados	53	63	45	42	44	44	24	47	22

Fonte: Autores.

O sistema G1 apresentou maior eficiência em produtividade tanto na quantidade de nascimentos e filhotes desmamados em comparação aos sistemas poligâmicos (Figura 5). No sistema G1 houve maior produtividade na segunda gestação (F2) em comparação outras 2 gestações. Houve menor mortalidade e o número de desmamados foi maior na F3.

Figura 5. Taxa reprodutiva observada a partir da média total de filhotes viáveis nas três gestações nos sistemas de acasalamento analisados.



Fonte: Autores.

O sistema G1 apresentou a melhor eficiência reprodutiva, produzindo 190 filhotes no total das 3 gestações, gerando 84,7% de filhotes desmamados. O sistema G2 produziu 171 filhotes com um total de 76% de filhotes desmamados. E o sistema G3 produziu 128 filhotes e 72,6% desmamados (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação temporal da eficiência reprodutiva de cada geração (F1, F2, F3) analisando as variáveis natalidade e desmame.

GESTAÇÃO	F1	F2	F3
Monogâmico permanente	n (%)	n (%)	n (%)
Natalidade	64	78	48
Desmamados	53 (82,8)	63 (80,8)	45 (93,7)
Poligâmico permanente			
Natalidade	57	56	58
Desmamados	42 (73,7)	44 (78,6)	44 (75,9)
Poligâmico temporário			
Natalidade	27	65	36
Desmamados	24 (88,9)	47 (72,3)	22 (61,1)

Fonte: Autores.

4. Discussão

Uma colônia heterogênica apresenta animais com variabilidade genética. Também chamada de Colônia Estoque ou de Fundação (Mattaraia & Lapchik, 2009). Utiliza métodos de acasalamento para minimizar a consanguinidade entre as gerações, o que não deve exceder 1% por geração, produzindo 99% de heterozigose entre genes alelos (Neves et al., 2013). Os acasalamentos para a produção de indivíduos no biotério seguem normas padrão (Machado & Zatti, 2015). A escolha do tipo depende do espaço existente no biotério, do número de animais necessários, da característica genética necessária, permitindo que a população se mantenha constante em todas as suas características pelo maior número de gerações possíveis (Santos, 2002; Lapchik et al., 2017; Almeida Junior et al., 2020).

Os acasalamentos produzem animais da Colônia Fundação (heterogênicos), a inicial de uma determinada linhagem, que segue padrão monogâmico permanente, sem introdução de novos pares reprodutivos, com uma população tão grande quanto possível, acasalamento randômico para que todos os indivíduos tenham igual chance de participação, e usa esquemas com métodos reprodutivos como: Poiley, Han-rotation, Robertson's, Falconer, entre outros (Baumans, 2006). Chama-se de linhagem os animais consanguíneos (isogênicos – *inbred strain*, também chamadas de endocriadas ou endogâmicas) que resultam do acasalamento sistemático e ininterrupto, entre irmãos, por mais de 20 gerações consecutivas a partir de casais monogâmicos permanentes (da colônia de fundadores ou casais de fundação), alcançando um coeficiente de consanguinidade de 98,6% de alelos idênticos (homozigose) (Mattaraia &

Lapchik, 2009; Neves et al., 2013). Esses animais são fontes para estudos transgênicos, *KnockOut* (KO) ou mutantes. Cada linhagem tem sua característica individual e única (Sirois, 2007; Braga, 2017).

No presente estudo foram utilizados camundongos BALB/c isogênicos para a formação dos grupos de acasalamento testados: monogâmico permanente, poligâmico permanente e poligâmico temporário. As fêmeas quando alojadas juntas e sem a presença de machos entram em anestro (ausência de ciclos estrais), diestro ou pseudoprenhez, um efeito chamado de Lee-Boot (Lapchik et al., 2017). Quando essas fêmeas são expostas ao feromônio de machos ou ao próprio macho, começam a ciclar em 48 a 72 horas, numa reação denominada efeito de Whitten que permite a sincronização da ovulação em grupos (Baumans, 2006; Mattaraia & Lapchik, 2009).

Outra característica comumente observada em camundongos é o efeito de Bruce. Nesse caso, durante o acasalamento das fêmeas com um macho, quando elas são expostas a outro macho ou aos seus feromônios em até 24 horas após o primeiro acasalamento, pode haver a reabsorção de 50% dos embriões (Santos, 2002; Chorilli et al., 2007). O feromônio do segundo macho atua no sistema reprodutivo da fêmea inibindo a nidação do embrião, afetando a secreção de prolactina (Andersen et al., 2004). A fêmea entra em estro em 4 a 5 dias após o estímulo e isso só é observado em camundongos (Baumans, 2006; Zanatto et al., 2019).

As fêmeas de camundongos ao atingirem maturidade sexual (60 dias de vida) iniciam o primeiro cio (Santos, 2002; Sirois, 2007). Embora a primeira gestação seja produtiva, a segunda apresenta melhor eficiência na produtividade justamente por conta da maturidade sexual. Camundongos ao atingirem 7-8 meses de vida devem ser substituídos, visto que com o tempo, os animais diminuem a performance reprodutiva (Braga, 2017). Tem se evidenciado uma clara preferência por machos para serem usados nas pesquisas, pois utilizando fêmeas podem surgir diversas variações fisiológicas por conta dos ciclos estrais. As variações hormonais podem interferir nos resultados da pesquisa (Severino et al., 2004; Almeida Junior et al., 2020).

Cada camundongo necessita de uma área mínima de 65cm² (Santos, 2002; Machado & Zatti, 2015). Nos sistemas poligâmicos o número de animais por caixa é maior, o que possibilita estresse nesse sistema, resultando em uma menor taxa reprodutiva (Chorilli et al., 2007; Lapchik et al., 2017). Porém, estudos utilizando rastos Wistar mostram que um dos problemas do sistema monogâmico é o maior uso de caixas e machos reprodutores em comparação com os sistemas poligâmicos (Mattaraia & Moura, 2012).

Embora a monogamia não seja comum em muitos mamíferos, os resultados desta pesquisa mostram uma eficiência reprodutiva melhor observada no sistema monogâmico,

apontando-o como modelo propício a ser utilizado pelos biotérios quando se visa maior quantidade de animais (Machado & Zatti, 2015; Almeida et al., 2016; Lapchik et al., 2017). Porém, esse estudo apresenta limitações, como a quantidade de indivíduos analisados e o número de gerações observadas. Esses fatos abrem espaço para mais questionamentos e novas possibilidades que deverão ser melhor analisadas futuramente, buscando avaliar se realmente o monogamismo permanece eficiente quando se analisa todo o ciclo de vida reprodutiva do animal, desde a sua maturidade sexual até sua morte natural.

5. Considerações Finais

A constante construção do conhecimento sobre os sistemas de acasalamento passa por várias análises. Novos estudos sobre os sistemas de acasalamento devem ser realizados, com um número maior de indivíduos e por um período de tempo maior, observando mais gerações de cada sistema. Isso possibilitará apontar qual o modelo ideal de acasalamento a ser utilizado pelos biotérios. Preparar e atualizar as técnicas do profissional bioterista é necessário para alcançar uma melhor eficiência, buscando sempre atender as necessidades ambientais e fisiológicas dos animais. Conseqüentemente, aumentará a eficiência reprodutiva para atender as demandas das pesquisas solicitadas.

Referências

Almeida, I. B., Barros Neto, J. J. S., & Oliveira, T. K. B. (2016). *Princípios básicos de pesquisa de animais de laboratório*. Aracaju-SE: Edifs, 54 p.

Almeida Junior, S., et al. (2020). Validation of renal and hepatic profile parameters of rodents *Rattus norvegicus* kept in the maintenance vivarium of the University of Franca. *Research, Society and Development*, 9(5), e18952619. doi: 10.33448/rsd-v9i5.2619

Andersen, M. L., D'Almeida, V., Ko, G. M., Kawakami, R., Martins, P. J. F. Magalhães, L. E., & Tufik, S. (2004). *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo; Cromosete; 167 p.

Andrade, A., Pinto, S. C., & Oliveira, R. S. (2002). *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 115-8.

Baumans, V. The laboratory mouse. (2006). In: Poole, T. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*. (7th ed.), British: Blackwell Science; 1, 282-312.

Braga, L. M. G. M. (2017). Controle reprodutivo em biotérios de criação de animais de laboratório com ênfase em roedores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41(1), 105-109.

Chorilli, M., Michelin, D. C., & Salgado, H. R. N. (2007). Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 8(1), 11-23.

Lapchik, V. B. V., Mattaraia, V. G. M., & Ko, G. M. (2017). *Cuidados e manejo de animais de laboratório*. (2a ed.), São Paulo: Atheneu.

Machado, C. C., & Zatti, R. A. (2015). *Animais de laboratório: o camundongo*. Anais V Simpoc, 5(1), 169-176.

Mattaraia, V. G. M., & Lapchik, V. B. V. (2009). Métodos para produção de ratos e camundongos de laboratório. In: Lapchik, V. B. V., et al. *Cuidados e manejo de animais de laboratório*. São Paulo: Atheneu, cap.10, 141-153.

Mattaraia, V. G. M., & Moura, A. S. A. M. T. (2012). Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. *Ciência Rural*, 42(8), 1490-1496.

Neves, S. M. P., Mancini Filho, J. & Menezes, E. W. (2013). *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP*. São Paulo: FCF-IQ/USP, 216 p.

Pereira, A. S., et al. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Recuperado de https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

Santos, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade, A.; Pinto, S. C., & Oliveira, R. S. (2002). *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 115-8.

Severino, G. S., Fossati, I. A., Padoin, M. J., Gomes, C. M., Trevizan, L., Sanvitto, G. L., Franci, C. R., Anselmo-Franci, J. A., & Lucion, A. B. (2004). Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiology & behavior*, 81(3), 489–498.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.019>

Sirois, M. (2007). *Medicina de Animais de Laboratório: Princípios e procedimentos*. São Paulo: Editora Roca.

Zanatto, D. A., et al. (2019). *Boas práticas em experimentação animal: procedimentos em ratos de laboratório, 2019*. BPEA. São Paulo.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Maydson Vieira Silva – 20%

Valdomiro Souza dos Santos – 20%

Leandro Norberto da Silva Junior – 20%

Kelly Cristina Borges Tacon – 20%

Jalsi Tacon Arruda – 20%