

DESENVOLVIMENTO DE ITENS DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PARA CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) MANTIDOS EM BIOTÉRIO DE EXPERIMENTAÇÃO

Bianca do Nascimento LOPES¹

Maricleide de Farias NAIFF²

Leonardo Brandão MATOS³

¹Bolsista PAIC/FAPEAM;

²Orientador CSAS/INPA; ³Colaborador CPAAF/INPA

INTRODUÇÃO

O enriquecimento ambiental (EA) é uma técnica de manejo animal com estratégias temporais, físicas, sociais e sensoriais, visando oferecer uma série de estímulos que possam aumentar o conforto e capacidade de adaptação, tanto fisiológica quanto psicológica, do animal (Chefer *et al.* 2015).

O objetivo principal do enriquecimento é dar ao animal em cativeiro condições que estimulem seu comportamento natural. Qualquer modificação que altere de forma benéfica o ambiente ou a rotina do animal pode ser considerada um enriquecimento ambiental (Frajblat *et al.* 2008).

Em trabalhos como o de Coimbra *et al.* (2014), pode-se observar efeito do enriquecimento físico ambiental sobre parâmetros comportamentais e fisiológicos indicadores de bem-estar (locomoção, alimentação, interação com o objeto, reprodução e agressividade) em camundongos C57BL/6.

Para colaborar com a elucidação sobre a possibilidade de interferência do enriquecimento ambiental em relação ao sistema imunológico de animais de laboratório, o presente estudo pretende observar a influência do enriquecimento ambiental na fisiologia e comportamento de camundongos machos através da avaliação de células leucocitárias e do comportamento agonístico destes.

MATERIAL E MÉTODOS

Respeitando a Lei Arouca no 11.794/08 (Brasil 2008), e Decreto no 6.899/09 (Brasil 2009), este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia sob o número 031/2015 e sua aprovação emitida no dia 18 de dezembro de 2015.

Animais e Manejo

Foram utilizados 72 camundongos Balb-c machos pertencentes ao projeto “Estudos proteômicos e dinâmica da Leishmaniose Tegumentar e Doença de Chagas, correlação entre aspectos climáticos e fauna de flebotomíneos”, com 21 a 51 dias de vida, que foram agrupados em gaiolas contendo 6 animais.

Estes foram mantidos nos grupos durante 30 dias, em gaiolas tipo-mini-isolador contendo cama de material absorvente, com oferta *ad libitum* de ração e água. As gaiolas serão mantidas em racks ventilados acondicionados em sala de experimentação com temperatura ambiente variando de 20° a 22°C e umidade relativa média de 70%, com ciclo de luz de 12/12 horas.

Divisão dos grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, sendo o primeiro com animais inoculados (G1) e o segundo sem nenhum procedimento de inoculação (G2).

Cada um desses grupos foi submetido em 6 tratamentos: no primeiro grupo (A), os animais não foram submetidos a qualquer tratamento; no segundo grupo (B) os animais foram submetidos a um enriquecimento ambiental 1; o terceiro grupo (C) recebeu um item de enriquecimento ambiental artesanal 2; os animais do quarto grupo (D) receberam uma peça artesanal 3; o quinto grupo (E) recebeu um enriquecimento ambiental 4; enquanto o sexto e último grupo (F) recebeu um enriquecimento ambiental 5.

Elementos para enriquecimento ambiental

Elemento 1: enriquecimento ambiental fabricado em polissulfona, conhecido comercialmente como *Iglu de enriquecimento*.

Elemento 2: enriquecimento ambiental artesanal, produzido com o ouriço da castanha do Brasil, denominado *Oca de enriquecimento*.

Elemento 3: peça artesanal fabricada a partir do caroço de tucumã, onde se retirou a amêndoa de seu interior e neste compartimento interno foram acrescentadas sementes de girassol, no intuito de o animal buscar retirá-la. A reposição das sementes foi feita sempre que se observou sua falta dentro do caroço de tucumã.

Elemento 4: enriquecimento ambiental utilizando-se sementes de girassol. Estas foram espalhadas em pequenas quantidades na gaiola. A reposição foi feita sempre que se observou sua falta.

Elemento 5: enriquecimento ambiental denominado labirinto. Este, resistente a autoclavação, foi confeccionado a partir de papelão, utilizando-se método de encaixe. De formato aleatório, sua reposição foi feita semanalmente, independentemente de sua condição.

Observação dos comportamentos agonísticos

Os animais mantidos nos grupos experimentais foram observados durante um mês (30 dias) para monitorar o aparecimento de feridas, lacerações, ou óbito, para avaliação de possíveis brigas e/ou interações agonísticas entre si. Na ocorrência de qualquer um destes sinais, o mesmo permaneceu no grupo até a finalização do experimento, sendo realizada anotação destes sintomas individualmente, em áudio, para registro e posterior análise.

Eutanásia

Os animais foram eutanasiados conforme protocolo estabelecido no projeto acima citado. Foram pesados individualmente e realizou-se colheitas de amostra sanguínea por punção cardíaca, acondicionadas em tubos anticoagulante (EDTA), na proporção de 0,8 µL para 0,5 mL de sangue.

Confecção e análise do esfregaço sanguíneo

Foram desenvolvidos dois esfregaços para cada animal, totalizando 144 esfregaços. Estes foram corados utilizando-se panótico rápido e posteriormente analisados manualmente.

Análise estatística

Para prever o efeito da inoculação de *Leishmania sp.*, sobre os parâmetros leucocitários foi utilizada a Análise de variância (Anova). Para comparação dos resultados obtidos com cada grupo utilizou-se do teste Tukey (5%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para o perfil leucocitário dos animais experimentais encontram-se na Tabela 01, 02, 03 e 04. Os dados estão apresentados nas médias dos grupos e desvio padrão.

Ao se observar os parâmetros leucocitários, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas em relação aos basófilos. Isso se deve ao fato de que os basófilos correspondem a menos de 1% dos leucócitos no sangue e no baço (Caldeira, sem data).

Foram constatados apenas dois resultados (linfócitos e monócitos) quanto aos animais parasitados, ambos com animais que tem como enriquecimento a *Oca*. Em estudo feito por Camargo e Barcinski (2003), expôs-se que, independentemente da espécie de leishmania, elas vivem e proliferam em macrófagos e monócitos de vários tecidos no sistema fagocítico mononuclear. Tal informação corrobora com os baixos níveis percentuais de monócitos encontrados no presente estudo em animais infectados por *Leishmania sp.*

Constatou-se que, em relação aos comportamentos agonísticos, camundongos que tinha como enriquecimento a *Oca*, apresentaram menores níveis de tais, o que colaborou com o aumento das taxas de monócitos e, conseqüentemente, resultados mais estressores. A *Oca* então se apresentou em nível de monócito, um pior desempenho na diminuição de estresse nos animais.

Levando em conta linfócitos como parâmetros, a presença de parasitas tem impacto no número de linfócitos circulantes. Animais que foram expostos a *Oca* apresentaram os menores percentuais de linfócitos e menos ocorrências de comportamentos agonísticos, o que influenciou diretamente no percentual de linfócitos circulantes. A partir de tal resultado, pode-se inferir que estes animais apresentaram maiores níveis de estresse. Outros grupos experimentais, enriquecidos com tucumã, sementes de girassol, labirinto e iglu, diferem de tal resultado, apresentando percentuais mais elevados. De acordo com Coe *apud* Ballone (2008), o estresse agudo em humanos, cuja fisiologia é semelhante às reações de luta que se vê no reino animal, geralmente aumenta o número e a atividade das Células NK, contudo tais atividades só ocorrem no primeiro momento da atitude de defesa. Em animais que receberam enriquecimentos com tucumã e sementes de girassol, os resultados podem ser explicados com a incidência de comportamentos agonísticos, como percepção de comportamentos agressivos, ocorrência de brigas e possessividade em relação ao enriquecimento fornecido. Para se afirmar os dados obtidos através da análise de animais que receberam o iglu como enriquecimento, os dados do presente estudo corroboram com aqueles obtidos por Sherwin e Glen (2003) onde foram analisadas as preferências de camundongos por diferentes cores de gaiolas, onde se sugere que a cor vermelha não deve ser recomendada.

Houve apenas um caso significativo com relação ao percentual de eosinófilos. A *Oca* apresentou-se como um elemento estressor frente as sementes de tucumã, por exibir menores percentuais de eosinófilos circulantes. Tal informação não respalda com os comportamentos agonísticos apresentados pelos grupos durante período de experimentação, já que os animais do grupo *Oca* mostraram-se muito mais sociáveis em comparação aos animais com ambientes enriquecidos com semente de girassol, que apresentaram comportamentos de agressividade.

Referente aos neutrófilos, a *Oca* de enriquecimento obteve o maior percentual de neutrófilos circulantes, o que pode delimitá-la como um fator estressante para camundongos frente a outros enriquecimentos. Os outros enriquecimentos testados tiveram percentuais parecidos com o grupo controle, não obtendo resposta significativa.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos linfócitos de camundongos machos inoculados ou não com *Leishmania sp.*, mantidos em ambientes com diferentes tipos de enriquecimento ambiental.

	TRATAMENTO					
	Controle	Iglu	Oca	Tucumã	Girassol	Labirinto
GRUPO 1	77,05	75,30	77,06A	73,15	81,85	75,46
	±10,06	±7,33	±7,64	±6,18	±7,27	±6,44
GRUPO 2	81,70a	79,78a	60,65Bb	81,13a	79,14a	75,79a
	±5,76	±6,39	±11,27	±5,02	±7,92	±8,42

P ≤ 0,05

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa

Grupo 1 – Inoculados; Grupo 2 – Não-inoculados

Tabela 2. Média e desvio padrão dos monócitos de camundongos machos inoculados ou não com *Leishmania sp.*, mantidos em ambientes com diferentes tipos de enriquecimento ambiental.

	TRATAMENTO					
	Controle	Iglu	Oca	Tucumã	Girassol	Labirinto
GRUPO 1	0,15	0,15	0,31A	0,14	0,45	0,07
	±0,24	±0,23	±0,40	±0,23	±0,49	±0,18
GRUPO 2	0,62a	0a	4,94Bb	0,07a	0a	0,14a
	±0,38	±0	±2,63	±0,19	±0	±0,35

P ≤ 0,05

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa

Grupo 1 – Inoculados; Grupo 2 – Não-inoculados

Tabela 3. Média e desvio padrão dos neutrófilos de camundongos machos inoculados ou não com *Leishmania sp.*, mantidos em ambientes com diferentes tipos de enriquecimento ambiental.

	TRATAMENTO					
	Controle	Iglu	Oca	Tucumã	Girassol	Labirinto
GRUPO 1	20,13	22,83	21,83	24,73	15,73	22,85
	±9,40	±6,97	±6,97	±5,51	±6,46	±6,04
GRUPO 2	16,12a	18,52a	34,31b	16,91a	18,24a	22,22
	±4,60	±6,16	±10,21	±5,16	±7,08	±7,17

P ≤ 0,05

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa

Grupo 1 – Inoculados; Grupo 2 – Não-inoculados

Tabela 4. Média e desvio padrão dos eosinófilos de camundongos machos inoculados ou não com *Leishmania sp.*, mantidos em ambientes com diferentes tipos de enriquecimento ambiental.

	TRATAMENTO					
	Controle	Iglu	Oca	Tucumã	Girassol	Labirinto
GRUPO 1	2,64 ±1,21	1,71 ±0,81	0,77 ±0,84	1,95 ±1,33	1,95 ±0,92	1,60 ±0,96
GRUPO 2	1,54 ±1,26	1,68 ±1,83	4,94b ±2,63	1,86 ±0,48	2,60a ±1,40	1,83 ±1,17

P ≤ 0,05

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa

Grupo 1 – Inoculados; Grupo 2 – Não-inoculados

CONCLUSÃO

Apesar de apresentar menores níveis de comportamentos agonísticos, ao se avaliar os índices leucocitários, a Oca de enriquecimento é o elemento mais estressor. Os enriquecimentos desenvolvidos a partir do tucumã e semente de girassol são menos estressores frente aos parâmetros leucocitários, sendo o tucumã o que apresenta mais comportamentos agonísticos entre os dois.

REFERÊNCIAS

- Ballone GJ -Alterações Imunológicas no Estresse - in. PsiqWeb, Internet, disponível em www.psiqweb.med.br. revisto em 2008.
- Brasil. Lei no 11.794, de 08 de outubro de 2008.
- Brasil. Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009.
- Caldeira, C.; Basófilos, uma revisão bibliográfica. Internet, disponível em <http://docslide.com.br/documents/basofilos-uma-revisao-bibliografica.html>, sem data.
- Chefer, D.M.; Miguel, M.R.; Baggio, L.T.; Fernandes, R.R.; Pavanelli, M.F.2015. Enriquecimento Ambiental para Camundongos de Biotério. *Anais do VI CONCCEPAR: Congresso Científico da Região Centro-Occidental do Paraná / Faculdade Integrado de Campo Mourão*. - Campo Mourão, PR.
- Coimbra, F.C.; Moroni, F.T.; Carvalho, T.B.2014. Enriquecimento físico afeta parâmetros indicadores de bem-estar em camundongos (*Mus musculus*). *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, 195-205.
- Cruz, J.G.P.; Dal Magro, D.D.; Cruz, J.N. 2010. Efeitos da música clássica como elemento de enriquecimento ambiental em *Mus musculus* em cativeiro (Rodentia: Muridae). *Revista Biotemas*, 191-197.
- Frajblat, M.; Amaral, V.L.L.; Rivera, E.A.B. 2008. Ciência em animais de laboratório. *Ciência e Cultura*, 60.
- Luna, S. 2008. Dor, sciência e bem-estar em animais. *Ciência Veterinária nos Trópicos*. Recife, PE, p. 17-21.
- Sherwin, C.M.; Glen, E.F. 2003. Cage colour preferences and effects of home cage colour on anxiety in laboratory mice. *Animal behavior*, 66: 1085-1092.