

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

Efeito do enriquecimento ambiental sobre o bem estar de camundongos (*Mus musculus*)
alojados no Biotério Central da UFAM

Bolsista: Flávia Cuadal Coimbra, FAPEAM

MANAUS

2013

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

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0051/2012

Efeito do enriquecimento ambiental sobre o bem estar de camundongos (*Mus musculus*)
alojados no Biotério Central da UFAM

Bolsista: Flávia Cuadal Coimbra, FAPEAM

Orientador: Prof^a Dr^a Thaís Billalba Carvalho

MANAUS

2013

Sumário

1. RESUMO.....	4
2. INTRODUÇÃO	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1 Delineamento Experimental	8
3.2 Análise do Comportamento	11
3.3 Parâmetros Reprodutivos	11
3.4 Variáveis Fisiológicas	11
3.5 Análise de Dados.....	12
3.6 Nota Ética	13
4. RESULTADOS.....	13
5. DISCUSSÃO	24
6. REFERÊNCIAS.....	26

1. Resumo

A ausência de estímulos ambientais pode interferir no comportamento e na fisiologia dos animais. O objetivo foi testar o efeito do enriquecimento ambiental sobre parâmetros comportamentais e fisiológicos indicadores de bem estar em camundongos C57BL/6. Quatro animais foram agrupados e submetidos a três tratamentos (n=6). Controle: sem enriquecimento ambiental; Acrílico: com estrutura no formato de iglu em acrílico; Cuias: com cuias de cabaça. Foram descritos etogramas das seguintes categorias comportamentais: locomoção, alimentação, interação com o objeto, autolimpeza, reprodução e interação. O enriquecimento ambiental não afetou os parâmetros fisiológicos e reprodutivos, porém modulou o comportamento. A cuias é um artefato que pode ser utilizado para o enriquecimento, pois os animais interagiram da mesma forma com acrílico e exibiram menor agressividade. Além disso, a cuias apresenta baixo custo, pode ser implementada sem nenhuma dificuldade de manejo e melhorar o bem estar de animais mantidos em cativeiro.

Palavras-chave: comportamento social; estímulo ambiental; estresse; roedor

2. Introdução

Há séculos o homem utiliza diversos animais em experimentos para a busca do conhecimento científico e de melhorias para a saúde de ambos (FRAJBLAT *et al.*, 2008). Por exemplo, espécies de roedores são amplamente utilizadas em estudos biológicos e médicos (ex. HUGHES & DUNCAN, 1998; ANDRADE *et al.*, 2002; CHORILLI *et al.*, 2007). No entanto, a manutenção desses animais em cativeiro (ambiente com limitação de estímulos) pode desencadear alterações fisiológicas e comportamentais e trazer consequências para suas experiências cognitivas, saúde física e capacidade reprodutiva (BALCOMBE, 2006; BOX, 2006). De fato, vários estudos indicam que ratos e camundongos necessitam de estímulos ambientais, sendo que a ausência dos mesmos afeta física e psicologicamente esses animais (VASCONCELLOS, 2005), podendo interferir no desenvolvimento cerebral e desencadear a exibição de comportamentos anormais (estereotipados). (BALCOMBE, 2006; BRANDÃO & MAYER, 2011). Portanto, instalações apropriadas, equipamentos especializados e a manutenção em condições de estimulação sensorial adequada são essenciais para o bem estar de animais mantidos em cativeiro (CHORILLI *et al.*, 2007; LAPCHIK *et al.*, 2009). Dessa forma, a preocupação acerca do bem estar animal envolve questões científicas, éticas, legais e práticas (PAIXÃO & SCHRAMM, 1999; BOX, 2006).

O bem estar animal é o estado do indivíduo que enfrenta ou tenta enfrentar as dificuldades em seu ambiente— incluindo sua saúde e sentimentos (BROOM & JOHNSON, 1993). Além disso, bem estar é uma característica de um indivíduo e não do ambiente; não é um estado absoluto, mas varia com o tempo e em uma escala de muito ruim a muito bom (FRASER & BROOM, 1990; FORKMAN *et al.*, 2001; BOX, 2006). O bem estar também deve ser definido de modo que permita pronta relação com outros conceitos, tais como: necessidades, liberdades, capacidade de cognição, sentimentos, sofrimento, dor, ansiedade, medo, tédio, estresse e saúde. O termo “cinco liberdades”, proposto por Webster (1985), reconhece as necessidades comportamentais e físicas e são consideradas como um ponto inicial para o estudo do bem estar animal. Dessa forma, os animais devem: 1- ser livre de fome e de sede; 2- livre de desconforto; 3- livre de dor, lesões ou doença; 4- livre para expressar os seus comportamentos normais e 5- livre de medo e aflição (BOX, 2006). Diante deste contexto, parâmetros etológicos podem ajudar a melhorar o bem estar de animais mantidos em laboratório e, conseqüentemente, contribuem para a validação das pesquisas científicas que utilizam esses indivíduos (VAN DE WEERD & AARSEN, 2002; OLSSON *et al.*, 2003).

O enriquecimento ambiental pode ser dividido em dois tipos: social e físico. O primeiro refere-se à manipulação do número, idade e sexo dos indivíduos mantidos em um mesmo grupo social. Já o enriquecimento físico envolve modificações estruturais por meio de estimulação sensorial, gerada por objetos inanimados, como rodas de atividades, canos, brinquedos, caixas, túneis, plataformas, entre outros (REINHARDT & REINHARDT, 2005).

Estudos evidenciam que o enriquecimento ambiental para animais de laboratório permite aumento da atividade física, lúdica e do comportamento exploratório (VANDERSCHUREN *et al.*, 1995; ABOU-ISMAIL, 2011a). Além disso, essa prática modula o ciclo sono-vigília e pode reduzir a agressividade, diminuindo o estresse social e os seus efeitos em relação ao estabelecimento da posição hierárquica dentro do grupo (VAN LOO *et al.*, 2002; ABOU-ISMAIL *et al.*, 2007; ABOU-ISMAIL, 2011b). De fato, uma série de parâmetros pode ser alterada com a maior complexidade ambiental, tais como: diminuição do nível de excitabilidade dos animais diante dos procedimentos de manipulação no laboratório; melhora nas condições gerais de saúde; diminuição dos níveis de agressão intra-específica; diminuição dos níveis circulantes de hormônios supra-renais associados ao estresse; diminuição da frequência de comportamentos estereotipados; menor incidência de perda de filhotes por infanticídio, canibalismo e negligência e maior taxa de sucesso de acasalamento (FRAJBLAT *et al.*, 2008).

De acordo com Newberry (1995) e Simpson & Kelly (2011), a implementação do enriquecimento ambiental para roedores mantidos em laboratórios tem sido recomendada e pode prover uma maior capacidade de aprendizagem, plasticidade cerebral e sucesso reprodutivo, além de melhor estado de saúde e desempenho corporal. Apesar desses benefícios, antes de introduzir um programa de enriquecimento em laboratório é necessário avaliar as respostas dos animais frente aos estímulos oferecidos, por meio de observações de aspectos comportamentais e fisiológicos associados ao bem estar animal (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Diante do exposto, este projeto teve por objetivo testar o efeito do enriquecimento ambiental sobre parâmetros comportamentais e fisiológicos indicadores de bem estar em camundongos C57BL/6 alojados no Biotério Central da UFAM. Os artefatos físicos podem ser utilizados como refúgio e, portanto, reduzir o comportamento agressivo e o estresse social na espécie estudada. Também foram avaliados outros parâmetros comportamentais (ingestão alimentar, atividade locomotora, interação com o objeto e comportamento reprodutivo) e fisiológicos (glicemia, hematócrito, hemoglobina, número

de eritrócitos e taxa de crescimento) como indicadores de bem estar (ex. MARASHI *et al.*, 2003; OLSSON *et al.*, 2003). Além disso, foi testada a eficiência do uso de um produto regional amazônico (*cabaça* - *Lagenaria siceraria* (Molina)) como artefato para enriquecimento ambiental. A cuia é muito utilizada em refeições, transporte de líquidos e instrumentos musicais (WHITAKER & DAVIS, 1962; LEVIN & LANGE, 1991). Além disso, este produto apresenta baixo custo e pode ser implementado sem nenhuma dificuldade de manejo dentro das gaiolas. Dessa forma, tal enriquecimento pode trazer benefícios para biotérios e laboratórios, tendo por finalidade diminuir a condição estressora, reduzindo os comportamentos estereotipados e aumentando o sucesso reprodutivo dos animais.

3. Material e Métodos

3.1. Manutenção dos Animais

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

3.2. Delineamento Experimental

Foram avaliados parâmetros comportamentais e fisiológicos associados ao estresse de grupos submetidos a três tratamentos experimentais, com seis repetições cada. 1- controle: animais alojados em gaiola sem enriquecimento ambiental; 2- acrílico: animais alojados em gaiola com uma estrutura no formato de iglu em acrílico; 3- cuia: animais alojados em gaiola com cuia de cabaça (**Figura 1**). A estrutura de acrílico e a cuia de cabaça possuem tamanho (10 X 9 cm) e formato (três entradas) semelhantes conforme padrão comercializado (Alesco.155) e foram utilizadas como refúgio pelos animais.

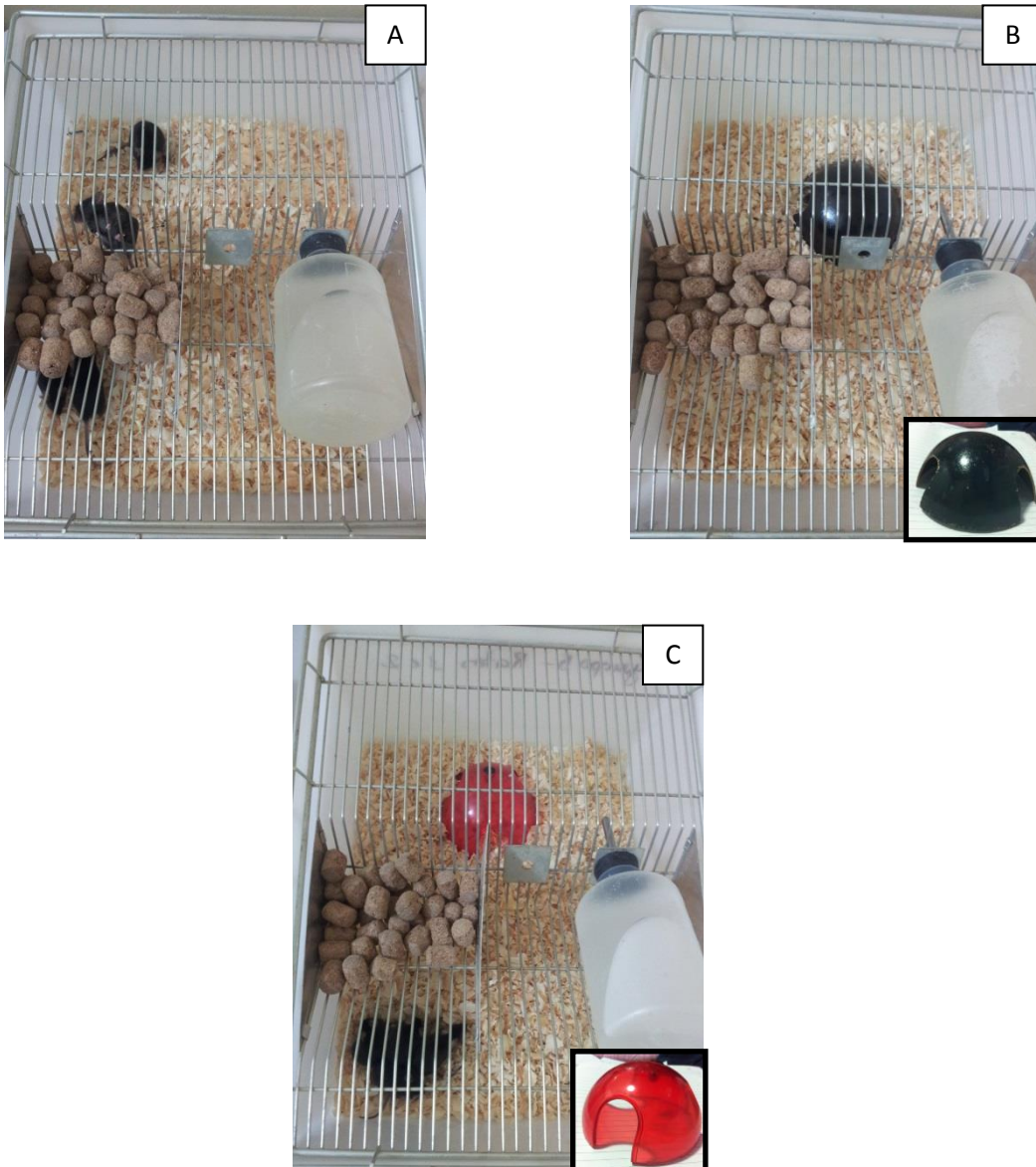


Figura 1. Tratamentos experimentais: **A-** sem estrutura; **B-** cuia de cabaça; **C-** iglu de acrílico.

Cada grupo foi formado por quatro indivíduos adultos (um macho e três fêmeas) mantidos durante 60 dias. Nesse período, a interação agonística, a ingestão alimentar, a taxa de locomoção, os índices reprodutivos, os comportamentos estereotipados os e parâmetros fisiológicos (glicemia, parâmetros hematológicos, crescimento, índices hepatossomático e gonadossomático) foram analisados para cada indivíduo em cada tratamento experimental. A estratégia de distribuição das gaiolas nas estantes permitiu que os camundongos, dos três diferentes grupos, estivessem submetidos à mesma intensidade de luz (FONTES *et al.*, 2012).

Antes do agrupamento, no trigésimo dia e no final do experimento os animais foram anestesiados com cetamina- xilazina (1:3,5) por via intraperitoneal (volume injetado: 0,05 ml) (**Figura 2**) para a realização das coletas de sangue (MONTERO *et al.*, 1994). O sangue foi coletado no sino retro orbital (0,2 ml por coleta) (HOFF & RLATG, 2000) utilizando-se pipeta de vidro com anticoagulante EDTA (**Figura 3**). Devido à dificuldade em coletar sangue pela cauda no experimento piloto, foi-se necessária à mudança de local, pois a quantidade de sangue retirada foi maior para fazer todas as análises fisiológicas. Em seguida, o material (com exceção do destinado aos parâmetros hematológicos) foi centrifugado para coleta do plasma (3000 rpm / 15 min), o qual foi congelado a -10°C para análises bioquímicas (glicose, colesterol, triglicerídeos e proteínas). Devido à realização do experimento piloto foi necessária mudanças na coleta de sangue e no registro das análises comportamentais.



Figura 2. Anestesia aplicada via intraperitoneal.



Figura 3. Coleta de sangue no sino retro orbital com pipeta de vidro.

A cada quinze dias de agrupamento foram realizadas medidas biométricas (comprimento naso-anal e peso corporal) de cada animal do grupo (**Figura 4**) para avaliar a taxa de crescimento em cada tratamento experimental. No final do experimento, os

animais foram mortos por deslocamento cervical e, em seguida, dissecados para a retirada do fígado e das gônadas (**Figura 5**).

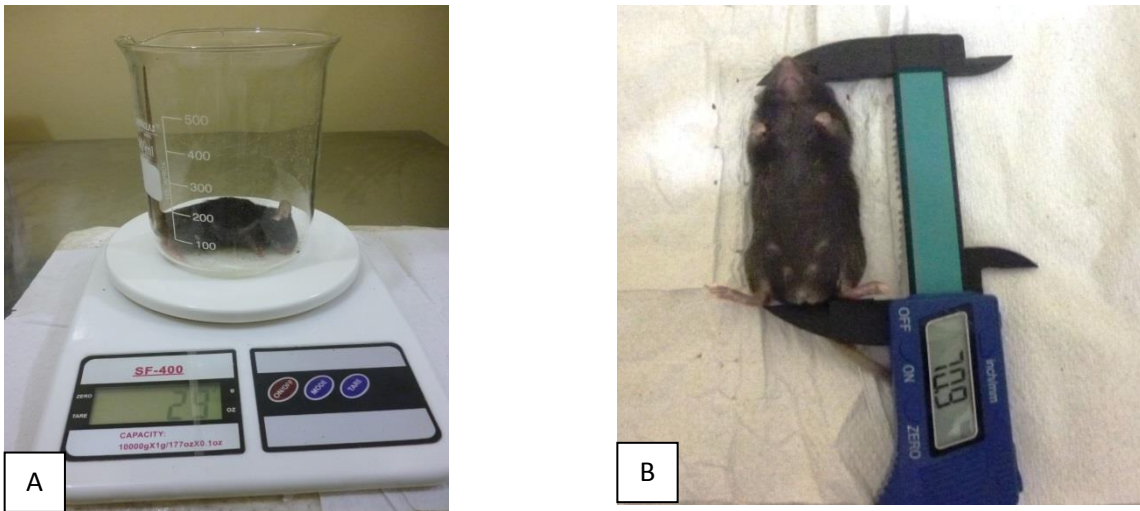
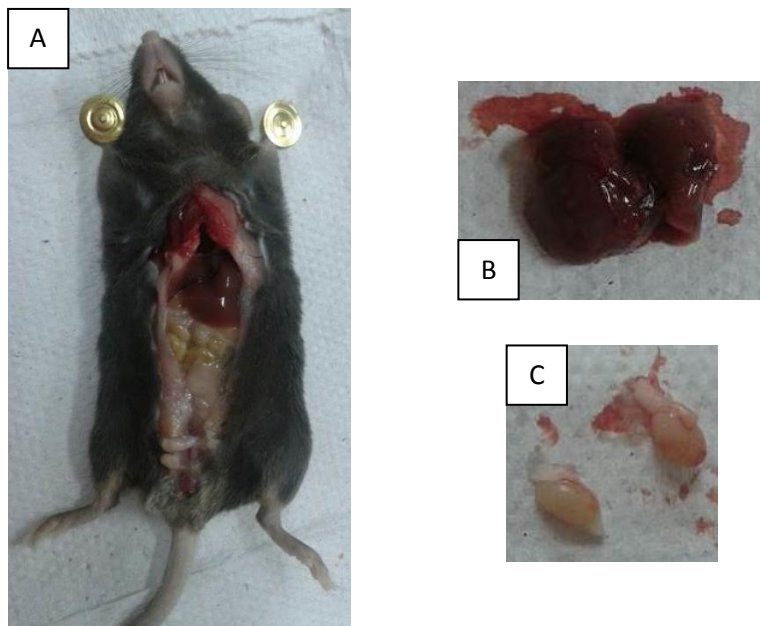


Figura 4. Biometria dos animais: **A-** pesagem dos animais em balança digital e **B-** medição dos animais com paquímetro digital.



Figuras 5. **A-** Animal dissecado; **B-** Fígado e **C-** Gônadas masculinas.

3.3 Análise do Comportamento

O comportamento foi registrado por meio de filmagem (Filmadora Digital Sony DCR-SX63) no primeiro, 30º e no 60º dias de agrupamento nos períodos da manhã, tarde e noite (10 minutos / cada). A quantificação das interações foi feita com base no etograma descrito, sendo considerada a frequência e a duração das unidades comportamentais emitidas por todos os animais do grupo. Além disso, a ingestão hídrica foi medida utilizando garrafas preenchidas com 500 mL de água, nas quais a variação de volume foi verificada a cada sete dias, por meio de provetas graduadas (SANTOS *et al.*, 2010). O consumo de ração total foi verificado a cada sete dias, pela diferença entre o alimento oferecido e o residual. O Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) foi obtido pelo quociente entre o ganho de peso total e o consumo de ração durante o experimento (COSTA *et al.*, 2000; MADRUGA *et al.*, 2004).

3.4 Parâmetros Reprodutivos

Durante o período de 60 dias foram analisados os parâmetros abaixo, conforme descrito por Braggio *et al.* (2003) e Fontes *et al.* (2012).

- Taxa de fertilidade: (número de fêmeas paridas / total de fêmeas acasaladas) x 100;
- Índice de natalidade: número de filhotes nascidos / fêmea;
- Taxa de mortalidade pré-desmame: (número de filhotes mortos / fêmea) x 100;
- Curva de ganho de peso semanal dos filhotes: Com vinte e um dias os filhotes foram retirados e separados da gaiola dos animais adultos para desmame e medidos a cada sete dias para o acompanhamento do ganho de peso até a sua idade de maturidade sexual.

3.5 Variáveis Fisiológicas

Índice Hepatossomático (%)

O índice hepatossomático (IHS) representa a proporção do peso corporal alocado no fígado. Com base no peso corporal e hepático obtidos após a morte do animal foi calculado o IHS através da fórmula: $IHS = (\text{peso fresco do fígado} / \text{peso fresco corporal}) \times 100$, conforme realizado por Ceolin (2010) e Santos *et al.* (2010).

Índice Gonadossomático (%)

O índice gonadossomático (IGS) representa a proporção do peso corporal alocado em gônadas. Com base no peso corporal e das gônadas obtidos após a morte do animal

foi calculado o IGS através da fórmula: $IGS = (\text{peso das gônadas} / \text{peso corporal}) \times 100$, conforme realizado por Moraes *et al.* (2009) e Ceolin (2010).

Crescimento

O crescimento individual dos animais foi avaliado pela taxa de crescimento específico (TCE), que é a taxa instantânea de crescimento obtida de uma unidade de peso em um período de tempo definido. Além disso, o desenvolvimento corporal foi avaliado por meio da relação comprimento naso-anal / peso corporal, conforme descrito por Mazeti & Pedrosa-Furlan (2008).

$TCE = [\ln Pf - \ln Pi / \Delta t] \times 100$, onde: Pi= peso inicial do animal; Pf= peso final do animal; Δt = tempo do experimento.

Glicose

A concentração de glicose plasmática foi determinada com o uso de kit comercial (Glicose PAP Liquiform, Labtest).

Parâmetros Hematológicos

A contagem de eritrócitos (RBC, milhões/mm³ sangue) foi realizada por meio de contagem manual em câmara de Neubauer. A concentração de hemoglobina sanguínea (Hb, g/dL) foi analisada pelo método da cianometahemoglobina (KAMPEN & ZIJLSTRA, 1964). O hematócrito (Ht, %) foi determinado pelo método do microhematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971), onde os tubos capilares foram centrifugados a 13000 rpm por 6 minutos. Os índices hematimétricos absolutos, ou seja, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados de acordo com Wintrobe (1934).

3.6 Análise de Dados

Foi analisada a existência de valores discrepantes (outliers) que foram retirados dos dados brutos e substituídos pelas medianas. Em seguida, os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade da variância pelo teste F max (ZAR, 1999). Os índices hepatossomático e gonadossomático e a taxa de crescimento foram comparados entre os tratamentos por Análise de Variância de uma via, completadas pelo teste de LSD para comparações múltiplas. A comparação da frequência das interações comportamentais e dos parâmetros fisiológicos entre os tratamentos e os períodos de observação foi feita por Análise de Variância de duas vias para amostras repetidas. Foi considerado $\alpha \leq 0,05$ para significância estatística. Todas as análises foram baseadas em Zar (1999) e Siegel & Castellan Jr. (2006).

3.7 Nota Ética

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAM, Manaus, AM (nº protocolo: 091/2012).

4. Resultados

Análise do Comportamento

Foram descritos etogramas de seis categorias comportamentais: locomoção, alimentação, interação com o objeto, autolimpeza, reprodução e interação social (agressividade) (**Tabela 1**). Considerando a soma dos períodos de observação, observou-se que a frequência e a duração da locomoção foram maiores no tratamento acrílico (ANOVA de uma via, $F > 4,344$, $p < 0,032$; **Figuras 6 e 7**). Não houve diferença na duração das unidades de alimentação entre os tratamentos, no entanto, a frequência foi maior no tratamento sem estrutura (ANOVA de uma via, $F = 8,822$, $p = 0,002$; **Figura 8**). O enriquecimento ambiental (cua e acrílico) estimulou a frequência de autolimpeza (ANOVA de uma via, $F > 6,095$, $p < 0,021$; **Figura 9**), mas não afetou a duração deste comportamento (ANOVA de uma via, $F < 0,218$, $p > 0,657$). A interação com o objeto foi semelhante nos grupos alojados em gaiolas com cua e acrílico (ANOVA de uma via, $F < 13,413$, $p > 0,169$; **Figura 10**). A frequência de carregar a prole e do total de reprodução foi maior no tratamento sem estrutura (ANOVA de uma via, $F > 5,449$, $p < 0,016$; **Figura 11**), no entanto, o enriquecimento ambiental estimulou a duração da amamentação e dos itens reprodutivos em geral (ANOVA de uma via, $F > 12,341$, $p < 0,000$; **Figura 12**). O comportamento agressivo foi maior no tratamento acrílico e semelhante entre os demais tratamentos (ANOVA de uma via, $F > 35,360$, $p < 0,000$; **Figura 13**). Não foi observada diferença na fuga, perseguição e cheirar o co-específico (ANOVA de uma via, $F > 26,657$, $p > 0,328$; **Tabela 2**). A comparação das categorias comportamentais ao longo do tempo evidencia que a frequência foi maior no período noturno e no tratamento acrílico (ANOVA de duas vias para amostras repetidas, $F > 3,373$, $p < 0,042$; **Figura 14**).

Tabela 1. Descrição das categorias comportamentais exibidas por camundongos da linhagem C57BL.

Categoria	Unidade	Descrição
LOCOMOÇÃO	andar normal	Deslocar-se de forma lenta pela gaiola.
	andar sob a maravalha	Andar normalmente sob as quadro patas por cima da maravalha.
	andar na grade	Andar sob as quatro patas na grade da gaiola ficando de cabeça para baixo.
	cheirar o ambiente	Farejar o ambiente à medida que se locomovem na gaiola.
	cheirar a grade	Se apoiar sob as patas traseiras alongando o corpo para farejar a grade.
	parado	Posição em pé estacionária apoiado nas quatro patas de olhos abertos.
ALIMENTAÇÃO	parado nas patas traseiras	Posição em pé estacionária com as patas dianteiras levantadas e com as patas traseiras apoiadas no solo.
	cavar	Arranhar o chão com as patas dianteiras.
	escalar	Subir ou descer a grade da gaiola lentamente.
INTERAÇÃO COM O OBJETO	manipular o alimento com as patas	Manipular alimentos menores com as patas dianteiras.
	manipular o alimento com as patas	Manipular alimentos menores com as patas dianteiras.
	carregar a comida	Retirar a comida do comedouro e levar para outro local na gaiola
	comer	Levar a boca e mastigar o alimento.
INTERAÇÃO COM O OBJETO	em cima sob as patas traseiras	Subir no objeto e ficar em pé sob as patas traseiras.
	cheirar o objeto	Aproximar-se com o focinho esticado para cheirar o objeto.
	dentro	Entrar no objeto por uma das aberturas.
	morder o objeto	Morder os cantos das entradas com os dentes superiores dianteiros.
AUTO LIMPEZA	em cima sob as patas traseiras	Subir no objeto e ficar em pé sob as patas traseiras.
	lamber as patas	Lamber as patas dianteiras para limpeza.
	coçar	Esfregar freneticamente alguma parte do corpo com as patas traseiras.
	lamber	Lamber qualquer parte do corpo inclusive a região genital.
	esfregar o rosto	Mover repetidas vezes o rosto nas patas dianteiras.
REPRODUÇÃO	lamber os filhotes	Lamber as crias para limpeza.
	cópula	Postura de monta acompanhada de movimentos copulatórios.
	carregar a prole	A fêmea carrega o filhote pelo pescoço com a boca.
	compartilhamento de ninho	Duas ou mais fêmeas combinam suas ninhadas em um único ninho e criam juntos. As ninhadas podem ser de iguais ou diferentes idades.
INTERAÇÃO SOCIAL	amamentação	A fêmea deita sobre os filhotes para os mesmo mamarem.
	aproximação	Andar em direção ao outro animal.
	cheirar o co-específico	O macho aproxima-se das fêmeas para cheirar a região genital.
	fuga	Fugir de outro indivíduo que se aproxima.
	perseguição	Correr atrás do outro animal.
	ataque/ investida	Atacar outro indivíduo numa investida de agressão.
	lamber outro	Lamber outro animal na região bucal.

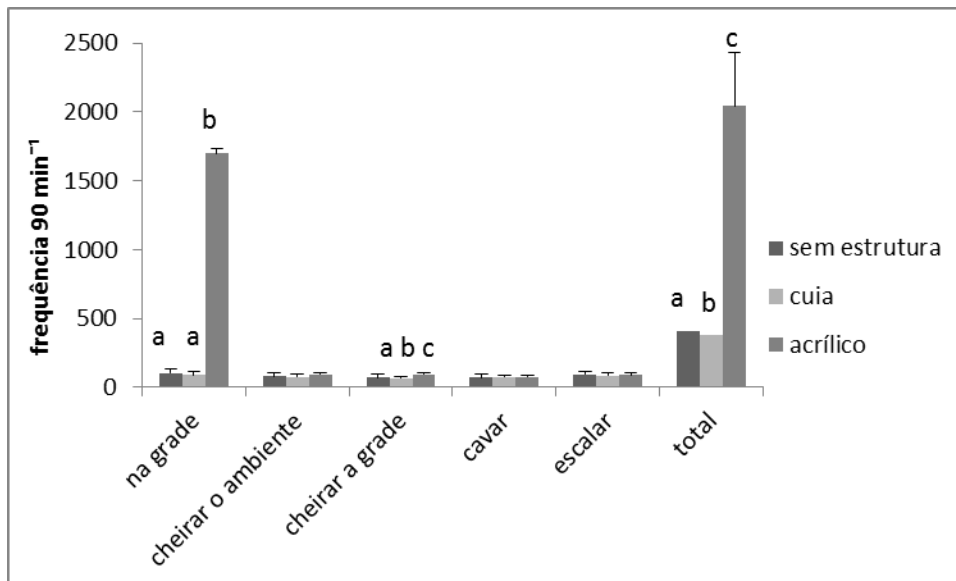


Figura 6. Média (\pm desvio padrão) da frequência de locomoção em cada tratamento experimental. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos experimentais (LSD, $p < 0,05$).

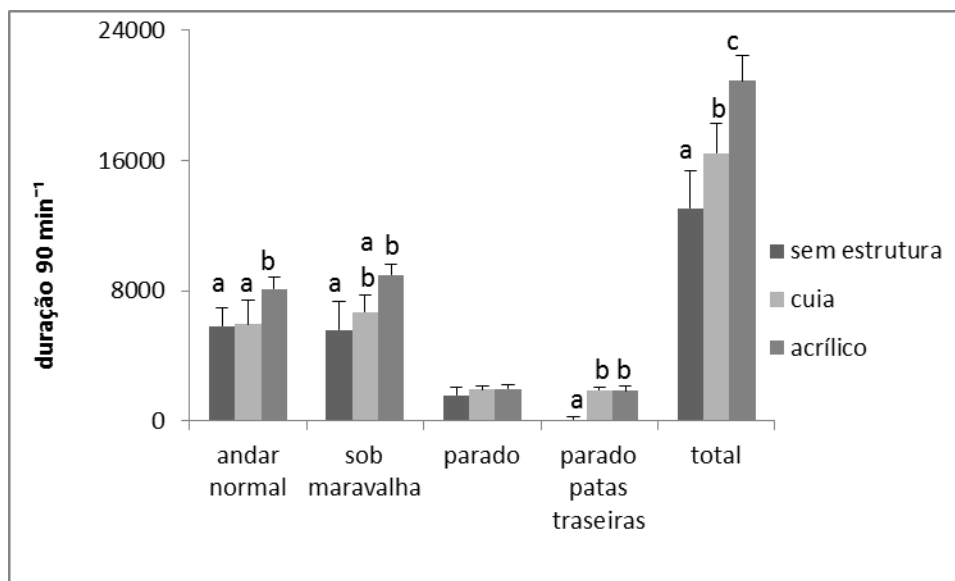


Figura 7. Média (\pm desvio padrão) da duração de locomoção em cada tratamento experimental. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos experimentais (LSD, $p < 0,05$).

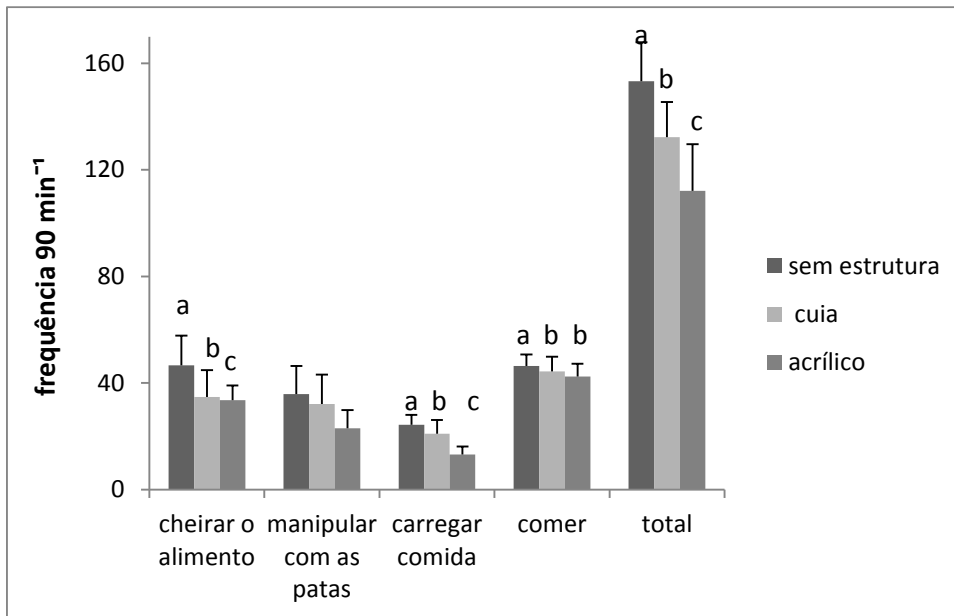


Figura 8. Média (\pm desvio padrão) da frequência de alimentação em cada tratamento experimental. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos experimentais (LSD, $p < 0,05$).

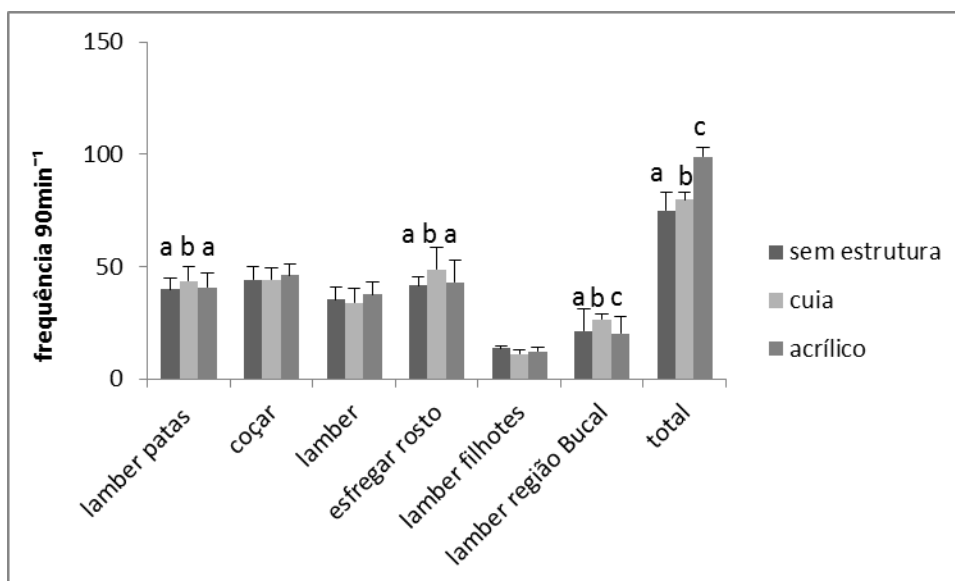


Figura 9. Média (\pm desvio padrão) da frequência de autolimpieza em cada tratamento experimental. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos experimentais (LSD, $p < 0,05$).

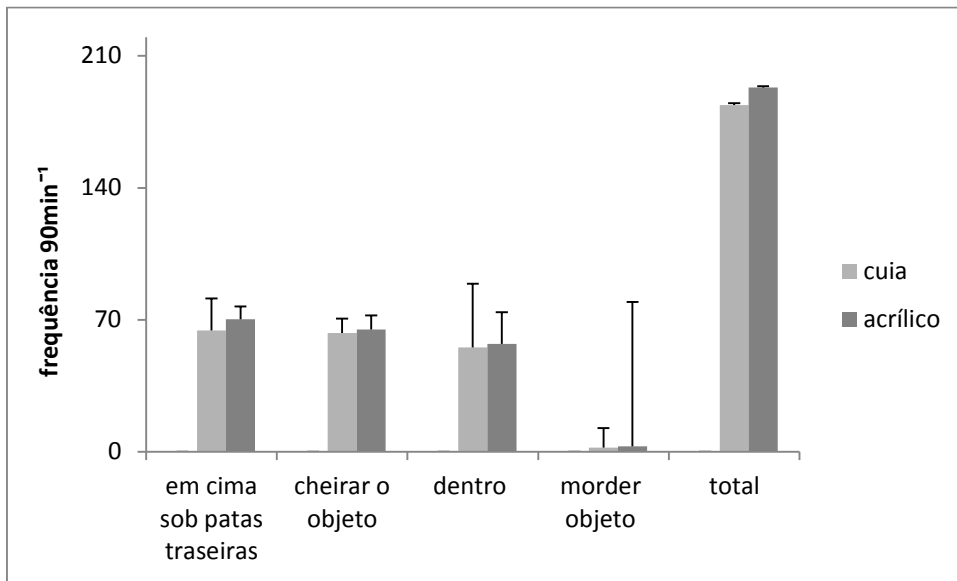


Figura 10. Média (\pm desvio padrão) da frequência de interação com o objeto em cada tratamento experimental (ANOVA de uma via, $F < 13,413$, $p > 0,169$).

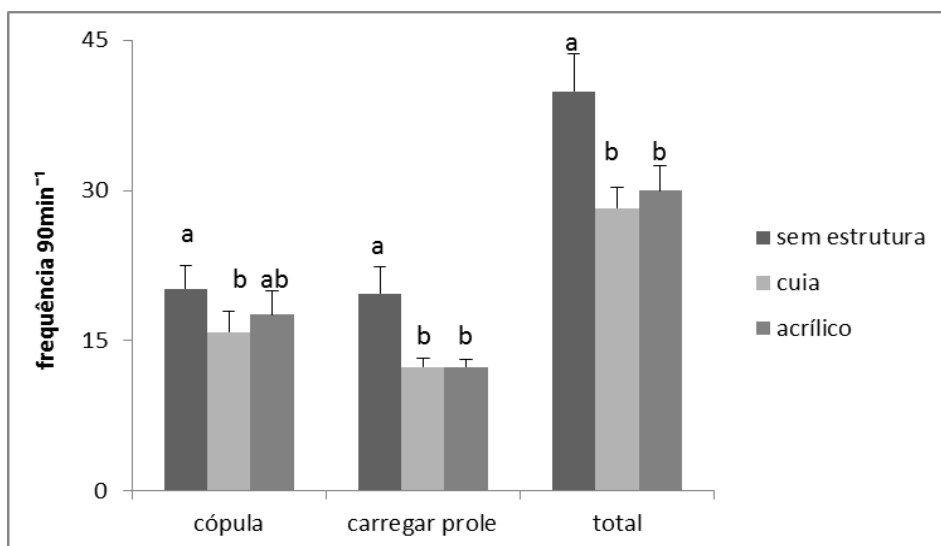


Figura 11. Média (\pm desvio padrão) da frequência de reprodução em cada tratamento experimental. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos (LSD, $p < 0,05$).

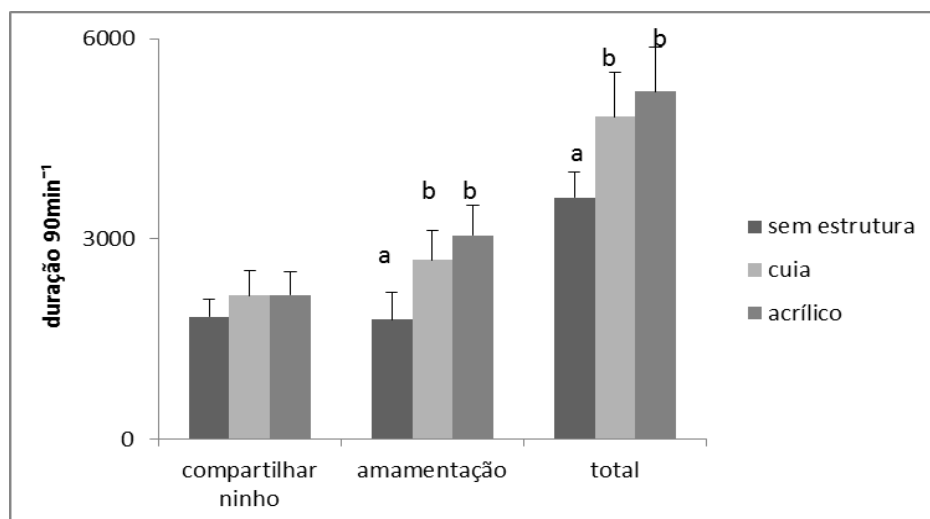


Figura 12. Média (\pm desvio padrão) do tempo de duração na reprodução em cada tratamento experimental. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos (LSD, $p < 0,05$).

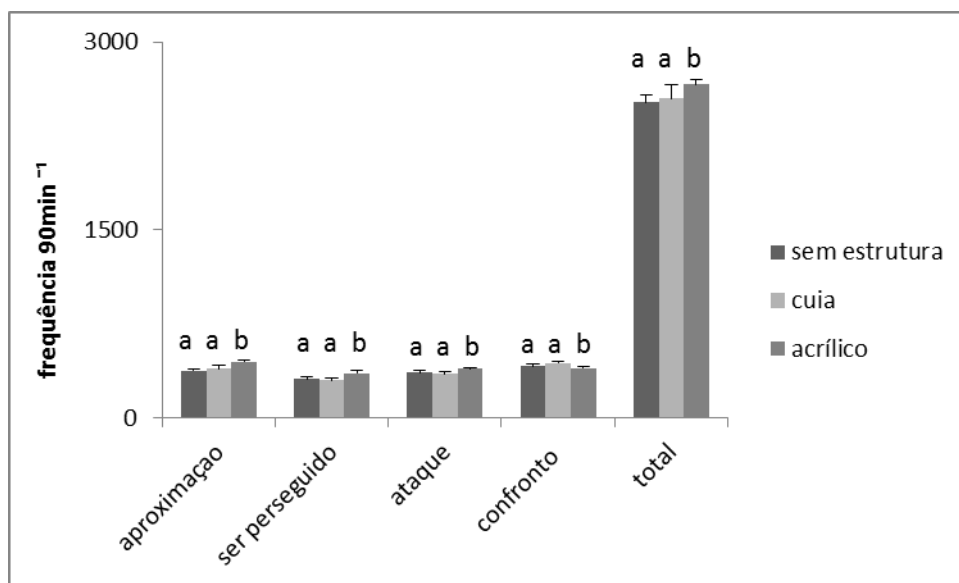


Figura 13. Média (\pm desvio padrão) da frequência de agressividade em cada tratamento experimental. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos (LSD, $p < 0,05$).

Tabela 2. Média (\pm desvio padrão) do comportamento agressivo em cada tratamento experimental.

	Sem estrutura	Cuia	Acrílico	F*	P
Cheirar co-específico	381,833 \pm 16,005	263,210 \pm 11,032	363,166 \pm 12,921	3,080	0,075
Fuga	325 \pm 9,359	241,001 \pm 7,633	339,001 \pm 14,601	3,030	0,078
Perseguição	345,833 \pm 11,052	301,622 \pm 9,547	358,833 \pm 15,227	1,970	0,174

* Análise de Variância de uma via

Parâmetros Reprodutivos

Não houve diferença significativa nos parâmetros reprodutivos entre os tratamentos (ANOVA de uma via, $F < 1,863$, $p > 0,189$; **Tabela 3**). No entanto, foi observado aumento no peso dos filhotes após desmame ao longo do tempo (ANOVA de duas vias para medidas repetidas, $F < 2,998$; $p < 0,015$; **Figura 15**). A taxa de fertilidade foi de 100% em todas as fêmeas nos três tratamentos experimentais.

Variáveis Fisiológicas

Não houve diferença na taxa de crescimento específico (TCE), na ingestão hídrica, no consumo de ração, no coeficiente alimentar, nos índices hepatossomático e gonadossomático entre os tratamentos experimentais (ANOVA de uma via, $F < 3,421$, $p > 0,059$; **Tabela 4**). No entanto, os dados biométricos dos adultos (comprimento e o peso corporal) aumentaram durante o período de agrupamento em todos os tratamentos (ANOVA de duas vias para medidas repetidas, $F > 8,263$; $p < 0,000$; **Figuras 16 e 17**) e o ganho de peso foi maior no tratamento sem estrutura (ANOVA de uma via, $F = 4,233$; $p = 0,034$; **Figura 18**). Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram semelhantes entre os tratamentos e ao longo do tempo (ANOVA de duas vias para medidas repetidas, $F < 1,189$; $p > 0,110$; **Tabela 5**).

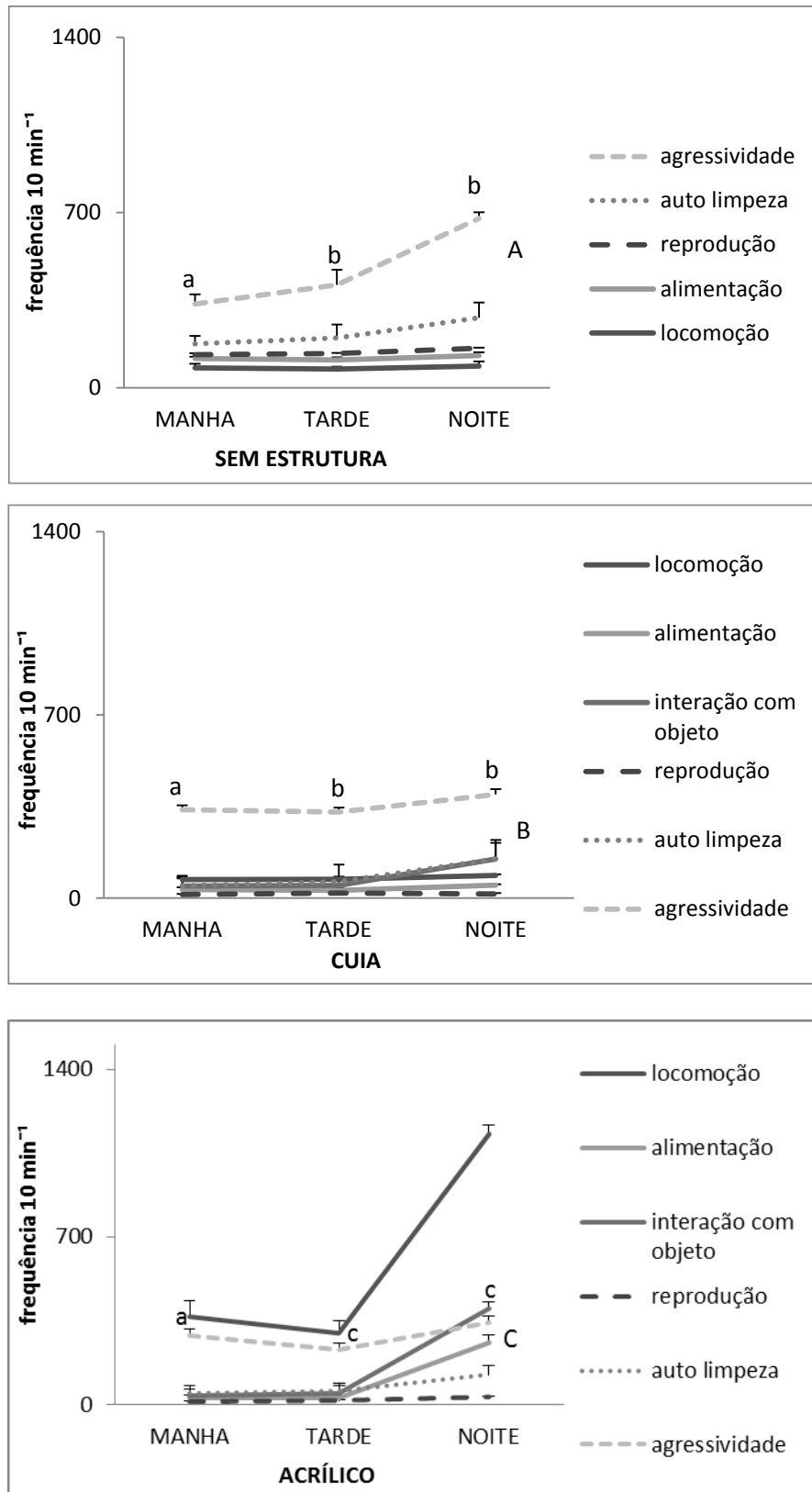


Figura 14. Média (\pm desvio padrão) das categorias comportamentais nos diferentes períodos do dia e em cada tratamento experimental. Letras indicam diferença estatística significativa: minúscula- entre os períodos e maiúscula- entre os tratamentos (LSD, $p < 0,05$).

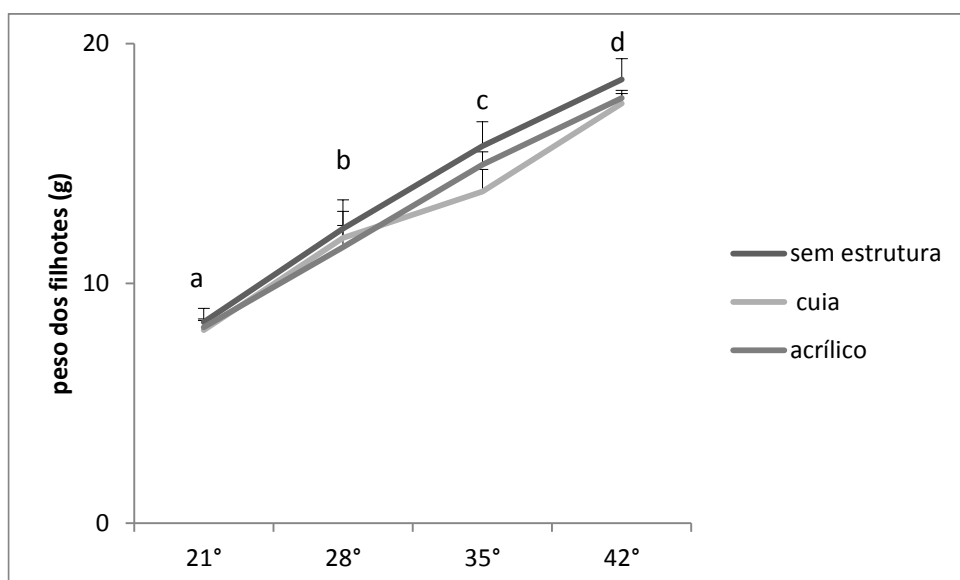


Figura 15. Média (\pm desvio padrão) do peso dos filhotes após desmame nos três tratamentos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os períodos de observação (LSD, $p < 0,05$).

Tabela 3. Média (\pm desvio padrão) dos parâmetros reprodutivos: número de ninhadas, número de filhotes, natalidade, mortalidade, filhotes vivos, filhotes mortos, mortalidade, sobrevivência e a taxa de crescimento específico dos filhotes (TCE).

	Sem estrutura	Cuia	acrílico	F*	p
N° ninhadas	5,166 \pm 0,752	5 \pm 1,414	4,833 \pm 0,752	0,159	0,853
N° filhotes	26,333 \pm 4,760	24,833 \pm 4,020	24,5 \pm 4,415	0,294	0,749
Natalidade	8,777 \pm 1,586	8,391 \pm 1,917	8 \pm 1,032	0,374	0,693
Filhotes vivos	21,666 \pm 2,943	21,833 \pm 4,355	19,666 \pm 3,444	0,662	0,530
Filhotes mortos	5 \pm 3,633	2 \pm 1,788	4,333 \pm 2,250	2,080	0,159
Mortalidade	0,178 \pm 0,127	0,109 \pm 0,076	0,184 \pm 0,110	0,915	0,421
Sobrevivência	0,821 \pm 0,127	0,890 \pm 0,076	0,815 \pm 0,113	0,816	0,323
TCE (filhotes)	1,886 \pm 0,093	1,847 \pm 0,098	1,847 \pm 0,088	0,336	0,720

*Análise de Variância de uma via

Tabela 4. Média (\pm desvio padrão) da taxa de crescimento específico (TCE), ingestão hídrica, consumo de ração, coeficiente alimentar, índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS) nos três tratamentos experimentais.

	Sem estrutura	Cuia	Acrílico	F*	P
TCE	0,607 \pm 0,107	0,509 \pm 0,089	0,438 \pm 0,172	2,623	0,105
Ingestão hídrica	220,75 \pm 68,903	108,125 10,830	262,916 \pm 59,079	2,705	0,099
Consumo de ração	99,416 \pm 10,349	182,333 \pm 50,706	97,041 \pm 27,976	0,608	0,557
Coeficiente alimentar	0,099 \pm 0,012	0,050 \pm 0,012	0,0767 \pm 0,054	3,421	0,059
IHS	6,409 \pm 1,195	5,734 \pm 0,902	5,314 \pm 1,384	1,321	0,296
IGS	0,273 \pm 0,026	0,220 \pm 0,083	0,257 \pm 0,027	1,589	0,236

* Análise de Variância de uma via

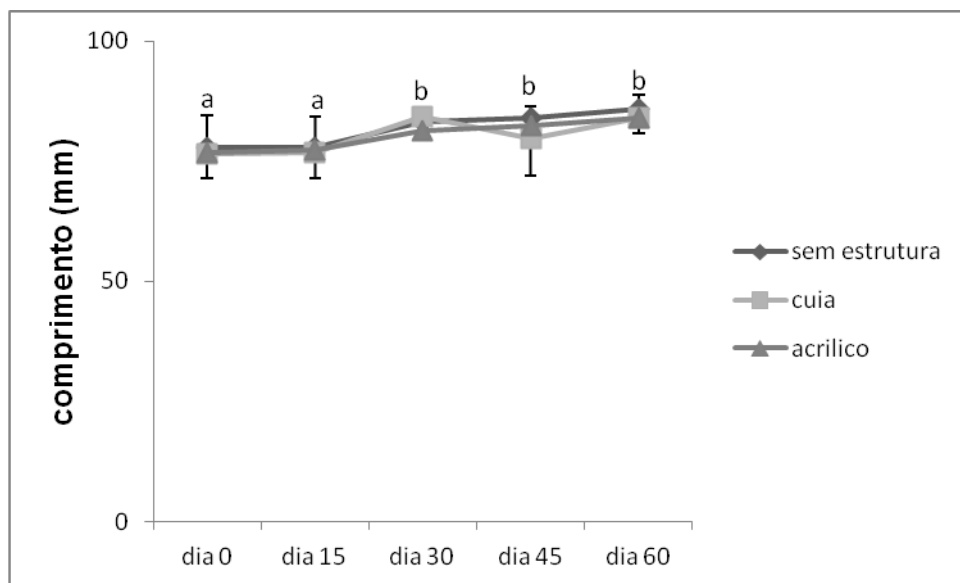


Figura 16. Média (\pm desvio padrão) do comprimento naso-anal dos animais nos três tratamentos experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os períodos de observação (LSD, $p < 0,05$).

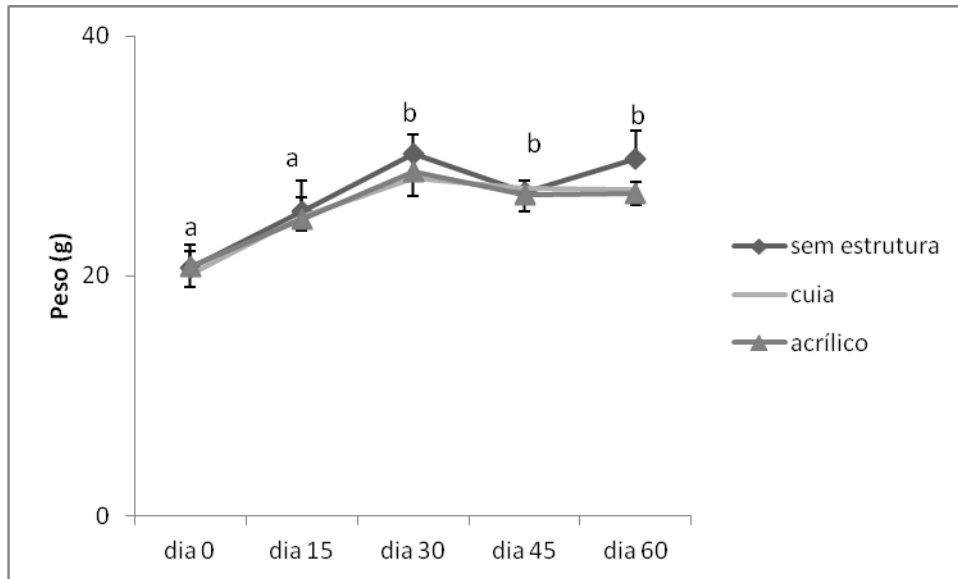


Figura 17. Média (\pm desvio padrão) do peso dos adultos nos três tratamentos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os períodos de observação (LSD, $p < 0,05$).

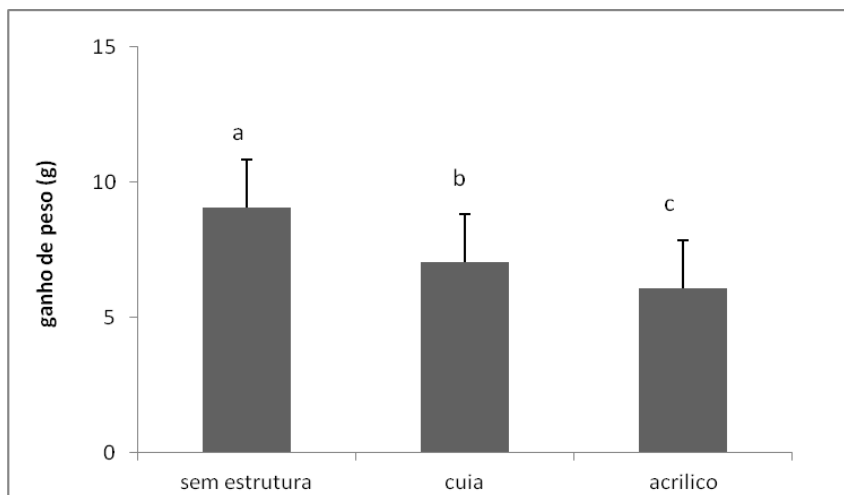


Figura 18. Média (\pm desvio padrão) do ganho de peso dos animais adultos nos três tratamentos experimentais. Letras diferentes mostram diferença significativa entre os tratamentos (LSD, $p < 0,05$).

Tabela 5. Média (\pm desvio padrão) dos parâmetros fisiológicos: hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), glicose, triglicerídeos, colesterol e proteínas totais nos três tratamentos experimentais.

	Sem estrutura	Cuia	Acrílico	F*	p
Hb (g/dL)	24,886 \pm 4,055	27,049 \pm 4,639	23,854 \pm 3,905	0,697	0,554
Ht (%)	38,062 \pm 5,478	39,208 \pm 4,343	38,854 \pm 4,415	0,978	0,110
RBC ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	6,461 \pm 1,162	6,197 \pm 1,665	6,275 \pm 1,330	1,879	0,139
VCM (fL)	68,367 \pm 11,819	75,129 \pm 15,129	79,900 \pm 10,284	0,346	0,844
HCM (g.dL⁻¹)	45,527 \pm 12,624	54,509 \pm 23,916	48,484 \pm 11,777	0,316	0,864
Glicose (mg.dL⁻¹)	126,995 \pm 36,278	135,403 \pm 29,843	125,023 \pm 34,926	0,450	0,771
CHCM (pg)	69,417 \pm 20,877	71,936 \pm 19,941	62,798 \pm 15,534	0,373	0,694
Triglicerídeos (mg dL⁻¹)	55,864 \pm 24,904	45,269 \pm 16	51,855 \pm 26,967	0,896	0,478
Colesterol (mg.dL⁻¹)	50,022 \pm 17,486	52,893 \pm 20,556	39,278 \pm 12,789	1,068	0,389
Proteínas totais (g.dL⁻¹)	2,229 \pm 0,672	2,537 \pm 0,817	2,034 \pm 0,472	1,189	0,335

*Análise de Variância para medidas repetidas

5. DISCUSSÃO

As categorias comportamentais encontradas foram semelhantes às descritas para camundongos e ratos (Balcombe, 2005; Abou-Ismaïl, 2011a), porém, algumas unidades observadas neste estudo (ex. lambar outro animal na região bucal, carregar a prole e o compartilhamento de ninho) não foram evidenciadas pelos referidos autores. De acordo Newberry (1995), roer a grade da gaiola é considerado uma estereotipia, no entanto, Balcombe (2005) e Abou-Ismaïl (2011a) consideram esta unidade como um comportamento normal para roedores mantidos em laboratório. Dessa forma, considera-se que as condições experimentais não desencadearam a exibição de comportamentos anormais e, conseqüentemente, indica a ausência de efeito negativo da manutenção dos animais em cativeiro sobre parâmetros etológicos.

De acordo com Van Loo *et al.* (2002), Vanderschuren *et al.* (1995) e Abou-Ismaïl (2011a), o enriquecimento ambiental para animais de laboratório permite aumento da atividade física e redução a agressividade. De fato, os tratamentos com estrutura (cuia e

acrílico) apresentaram semelhante frequência de exibição dos comportamentos e diferiram da condição sem estrutura, o que evidencia a importância do enriquecimento ambiental. Além disso, a interação com o objeto indica que o tipo de material não interfere no comportamento dos animais e, portanto, esses indivíduos não apresentam rejeição pela cuia em relação à estrutura comercial (acrílico). A autolimpeza também foi semelhante entre nos tratamentos com enriquecimento físico.

Considerando a reprodução, observou-se que houve uma maior frequência total na condição sem estrutura, evidenciada pela maior exibição de carregar a prole. Por outro lado, houve uma maior duração total e da amamentação na cuia e no acrílico. Assim, conclui-se que a presença da estrutura modula o tipo de cuidado parental, sendo que a amamentação pode ser considerada o item mais relevante, pois está diretamente associado com a obtenção de energia para o crescimento e desenvolvimento dos filhotes.

A estrutura de acrílico aumenta a frequência de interação agressiva em relação à presença de cuia ou à ausência de enriquecimento ambiental. Isso indica que o acrílico é prejudicial para os animais, pois a maior agressividade pode causar injúrias, desencadear um maior gasto energético para o grupo e, conseqüentemente, uma situação potencialmente estressora. Além disso, a locomoção e a alimentação foram diferentes entre os três tratamentos e apresentou níveis intermediários nos grupos alojados em gaiolas com a cuia.

As análises feitas entre os períodos do dia evidenciam que as categorias comportamentais foram exibidas com maior frequência no período da noite, reforçando que os roedores apresentam hábitos noturnos (LAPCHIK *et al.*, 2009). Assim, ressalta-se a importância de considerar o período de desenvolvimento dos experimentos em laboratório, pois a menor atividade do animal pode interferir nos resultados de trabalhos realizados em diversas áreas.

Não houve diferença significativa nos parâmetros reprodutivos, na taxa de crescimento específico, na ingestão hídrica, no consumo de ração, no coeficiente alimentar, nos índices hepatossomático e gonadossomático, nos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre os tratamentos experimentais, indicando que o enriquecimento não modula essas variáveis. Todos os parâmetros analisados apresentaram valores semelhantes aos encontrados por Yoshida *et al.* (2000), Spinelli *et al.* (2012) e Fontes *et al.* (2012). O aumento do peso e comprimento nos adultos e do crescimento nos filhotes após desmame ao longo do tempo foi semelhante ao observado por Fontes *et al.* (2012) e Neves *et al.* (2013).

Diante do exposto, conclui-se que o enriquecimento ambiental não afeta os parâmetros fisiológicos e reprodutivos, porém modula o comportamento dos animais. A cuia pode ser utilizada como um artefato para o enriquecimento físico, pois os animais interagiram da mesma forma com acrílico e exibiram menor agressividade. Além disso, a cuia apresenta baixo custo, pode ser implementada sem nenhuma dificuldade de manejo e melhorar o bem estar de animais mantidos em cativeiro.

6. REFERÊNCIAS

- Abou-Ismaïl, U.A.; Burman, O.H.B.; Nicol, C.J.; Mendl, M. 2007. Can sleep behaviour be used as an indicator of stress in group-housed rats (*Rattus norvegicus*)? *Animal Welfare*, 16: 185-188.
- Abou-Ismaïl, U.A. 2011a. Are the effects of enrichment due to the presence of multiple items or a particular item in the cages of laboratory rat? *Applied Animal Behaviour Science*, 134: 72-82.
- Abou-Ismaïl, U.A. 2011b. The effects of cage enrichment on agonistic behaviour and dominance in male laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Research in Veterinary Science*, 90: 346-351.
- Andrade, A.; Pinto, S.C.; Oliveira, R.S. (orgs). 2002. Animais de Laboratório: Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- Balcombe, J.P. 2006. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review. *Laboratory Animals*. 40: 217-235.
- Box, H.O. 2006. Bem estar animal. In: Yamamoto, M.E; Volpato, G.L. (Eds). Comportamento animal. Natal: Editora UFRN.
- BOSSO, P. L. 2009. Tipos de enriquecimento. Disponível em: <http://www.zoologico.sp.gov.br/peca2.htm>. Acesso em: 13 de jun.
- Braggio, M.M; Martins, A.R.S.; Valeros, V.B. 2003. Influência do manejo na produtividade e no desenvolvimento de camundongos (*Mus musculus*). *Arq. Inst. Biol.* 70: 149-153.
- Brandão, J.L.M.V.; Mayer, J. 2011. Behavior of rodents with an emphasis on enrichment. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 20: 256-269.
- Broom, D.; Johnson, K.G. 1993. Stress and Animal Welfare. London: Chapman & Hall.
- Chorilli, M.; Michelin, D.C.; Salgado, H.R.N. 2007. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28: 6-23.
- Ceolin, D. 2010. Efeito da exposição crônica do manganês sobre camundongos machos adultos. Tese de doutorado da Universidade Federal de Viçosa- Minas Gerais.

Costa, M.J.C.C.; Moraes, L.H.M.; Bion, F.M.; Rivera, M.A.A.; Moura, L.S.A.; Conceição, M.L. 2000. Avaliação da eficácia da suplementação com melão na dieta de ratos normais e depletados. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Caracas, Caracas*. - Paraíba, Brasil. 50: 103-122.

Fontes, R.S.; Santos, R.A.; Ong, F.M.P.; Neves, S.M.P.; Balieiro, J.C.C.; Damy, S.B. 2012. Efeito do enriquecimento ambiental na produção de camundongos C57BL/6 mantidos em diferentes sistemas de alojamento. *RESBCAL*. 1: 54-63.

Forkman, B.; Blokhuis, H.J.; Broom, D.M.; Kaiser, S.; Koolhaas, J.M.; Levine, S.; Mendl, M.; Plotsky, P.M.; Schedlowski, M. 2001. Key sources of variability in coping. In: Broom, D.M. (Ed). *Coping with challenge: Welfare in animals including humans*. Berlin: Dahlem University Press.

Frajblat, M.; Amaral, V.L.L.; Rivera, E.A.B. 2008. Ciência em animais de laboratório. *Ciência e Cultura*. 60: 44-46.

Fraser A.F.; Broom D.M. 1990. *Farm animal behavior and welfare*. Londres: Bailliere Tindall.

Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; HALL, E.; Brosious, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*. 35-39.

Hoff, J.; Rlatg, L.V.T. 2000. *Methods of Blood Collection in the Mouse: Lab Animal*. San Diego: TECHNIQUE. 10: 51-53.

Hughes, B.O.; Duncan, I.J.H. 1998. The notion of ethological “need”, models of motivation and welfare. *Animal Behaviour*. 36, 1696-1707.

Kampen, E.J.; Zijlstra, W.G. 1964. Standardization of haemoglobinometry In: BOROVICZÉNY, G. *Erythrocytometric methods and their standardization*. New York: Bibliotheca haematologica. 68-72.

Lapchik, V.B.V.; Mattaraia, V.G.M.; KO, G.M. 2009. *Cuidados e manejo de animais de laboratório*. São Paulo: Atheneu Editora.

Levin, H.G.; Lange, E. 1991. *Verduras de todo el mundo*. Madrid: Editorial Everest S.A.

Madruga, M.S.; Santos, H.B.; Bion, F.M.; Antunes, N.L.M. 2004. Avaliação nutricional de uma dieta suplementada com multimistura: estudo em ratos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24: 129-133.

Marashi, V.; Barnekow, A. Ossendorf, E.; Sachser, N. 2003. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Hormones and Behavior*. 43: 281-292.

Mazeti, C.M.; Pedrosa-furlan, M.M.D. 2008. Crescimento e parâmetros reprodutivos de ratas Wistar, em restrição alimentar desde o nascimento. *Acta Scientiarum*. 30: 197-204.

Montero, E.F.S.; Barbieri, C.L.; Giorgio S.; Garcez-silva, M.H.; Sato, H.; Goldenberg, S.; Straus, A.H.; Takahashi, H.K.; Koh, I.H.J. 1994. Immunomodulatory effects of glycosphingolipids on lymphoproliferation and IL-2 production in rodents. *Transplant Proceedings*. 26: 1597-1598.

Morais. A.C.T, Barbosa.L.P.; Neves.M.M.; Matta.S.L.P.; Morais. D.B.; Melo, B.E.S. 2009. Parâmetros morfofisiológicos testiculares de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geleia real. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 61: 110-118.

Neves, S.M.P.; Ong, F.M.P.; Rodrigues, L.D.; Santos, R.A.; Fontes, R.S.; Santana, R.O. 2013. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. FCF-IQ/USP. 216p.

Newberry, R.C. 1995. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments, *Applied Animal Behaviour Science*. 44: 229-243.

Olsson, I.A.S.; Nevisonb, C.M.; Patterson- kanec, E.G.; Sherwind, C.M.; vand de weed, H.A.; Würbelf, H. 2003. Understanding behavior: the relevance of ethological approaches in laboratory animal science. *Applied Animal Behaviour Science*. 81: 245-264.

Paixão, R.L.; Schramm, F.R. 1999. Ethics and animal experimentation: what is debated? *Caderno de Saúde Pública*. 15: 99-110.

Reinhardt, V.; Reinhardt, A. 2005. Variables, refinement and environmental enrichment for rodents and rabbits kept in Research Institutions: Making life easier for animals in laboratories. New Jersey: Animal Welfare Institute.

Santos, M.R.V.; Souza, V.H.; Menezes, I.A.C.; Bitencurt, J.L.; Rezende-Neto, J.M.; Barreto, A.S.; Cunha, F.A.; Marçal, R.M.; Teixeira-Silva, F.; Quintans-Junior, L.J.; Barbosa, A.P.O. 2010. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena*. 6: 1-6.

Siegel, S.; Castellan Jr, N. J. 2006. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento; Tradução: CARMONA, S. I. C. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed.

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

- Vanderschuren, L.J.M.J.; Niesink, R.J.M.; Spruijt, B.; Van ree, J.M. 1995. Influence of environmental factors on social play behavior of juvenile rats. *Physiology & Behavior*. 58: 119-123.
- Spinelli, M.O.; Cruz, R.J.; Godoy, C.M.S.; Motta, M.C. 2012. Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. *Revista Scientia Plena*. 8,1. São Paulo-SP.
- Van de Weerd, H.A.; Aarsen, E.L. 2002. Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 5: 87-109.
- Van Loo, P.L.P.; Kruitwagen, C.L.J.J.; Koolhaas, J.M.; Van de weerd, H.A.; Van zutphen, L.F.M.; Baumans, V. 2002. Influence of cage enrichment on aggressive behavior and physiological parameters in male mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 76: 65-81.
- Vasconcellos, A.S. 2005. Enriquecimento ambiental e bem-estar. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Webster, A.J.F. 1985. *Animal Welfare: a cool eye towards Eden*. Oxford: Blackwell Science.
- Wintrobe, M.M. 1934. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. *Folia Haematologica*. 51: 32-49.
- Whitaker, T.W.; Davis, G.N. 1962. *Cucurbits: botany, cultivation and utilization*. New York: Interscience.
- Yoshida, H.S.; Spinelli, M.O.; Guedes, R.; Cruz, R.J.; Damy, S.B.; Takano, J.O.; Tolosa, E.M.C. 2000. Valores hematológicos e bioquímicos em linhagens de camundongos isogênicas A.Snell, Balb/c, C57Bl/6J e heterogênica suíça, *Rev. Bras. Méd. Vet.* 22: 122-124.
- Zar, J. 1999. *Biostatistical analyses*. New Jersey: Printice Hall.