

Avaliação do comportamento de ratos alojados em caixas de cores diferentes

TELMO JOSÉ MEZADRI, XANA RAQUEL ORTOLAN, ANDRÉ LUIZ THIEME, NATHÁLIA PIACENTINI, VERA LÚCIA LÂNGARO AMARAL E MARCEL FRAJBLAT

Universidade do Vale do Itajaí

A adequação do ambiente físico quanto aos hábitos da espécie em relação ao bem-estar animal e o refinamento das pesquisas, ultimamente vem ganhando importância investigativa. Com o objetivo de avaliar o comportamento de ratos alojados em caixas de diferentes cores, utilizaram-se 48 animais machos com 3 meses de idade divididos em seis grupos, sendo que três grupos foram alojados em caixas brancas e outros três em caixas pretas, durante 4 semanas. Empregando-se o labirinto em cruz elevado (LCE), os resultados mostraram maior tempo de permanência nos braços fechados dos animais alojados nas caixas brancas. No teste do campo aberto (CA), houve maior ambulação do grupo mantido em caixas pretas, e na esquiiva inibitória, os dados indicaram um aumento significativo no tempo de permanência na plataforma do grupo alojado em caixas pretas. Assim, os animais alojados em gaiolas de cor preta apresentaram maior tendência exploratória (menor ansiedade) e melhor aprendizado.

Palavras-chave: Comportamento animal. Alojamento. Ratos Wistar.

Evaluation of the behavior of rats housed in boxes of different colors. Lately, the adequacy of a physical ambient to the specie's habits relating to their well being and refined researches is getting important for researchers. With the aim of evaluate the behavior of rats housed in boxes of different colors, it was used 48 male animals, with 3 months of age, divided in 6 groups, three groups in white boxes and the other three in black boxes, for 4 weeks. Observing on the elevated plus maze, the results showed that the animals from white boxes stayed more time in the closed arms. On the open field test, there was more walking of the group kept in Black boxes, and on the inhibitory avoidance, data indicated a significant increase on the time spent on the platform by the group housed in the black boxes. Thus, the animal housed in Black cages have shown a greater exploratory tendency (decreased anxiety), and better learning.

Key words: Animal behavior. Environmental enrichment. Rats.

A criação e manutenção de animais de laboratório em ambientes controlados têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas para suprir as demandas da comunidade científica, uma vez que o valor dos resultados obtidos em uma pesquisa são diretamente proporcionais à sua qualidade (Heine, 1978).

Muitos fatores associados às necessidades individuais, vida em cativeiro, eventos ameaçadores e/ou estímulos aversivos podem acarretar desequilíbrio físico e psicológico e ameaçar

a homeostasia do organismo. O bem-estar dos animais depende fortemente das sensações, percepções, cognição e motivação individuais (Clark, Rager & Calpin, 1997).

O enriquecimento ambiental consiste em uma série de modificações no ambiente físico e social, que procura ampliar a qualidade de vida dos animais através da identificação e fornecimento de estímulos ambientais necessários para alcançar o bem-estar psíquico e fisiológico, estimulando comportamentos típicos da espécie por contemplar suas necessidades etológicas (Boere, 2001; Hockly, 2002; Hohendorff, 2003).

Ainda, redução do estresse, diminuição de distúrbios comportamentais, redução de in-

Telmo José Mezadri: Rua Uruguai, 458 – Itajaí – SC- CEP: 88302-202 – Caixa Postal 360 Fone: (47) 33417901. E-mail: t.mezadri@univali.br

tervenções clínicas, diminuição da mortalidade e aumento de taxas reprodutivas são alguns benefícios do enriquecimento ambiental (Carlstead & Shepherdson, 2000).

Hipotetiza-se que o ambiente pode atuar sobre conexões sinápticas de duas formas: experiências ambientais podem estimular o crescimento neural e a formação de novas conexões entre os neurônios (o que poderia explicar a aquisição de novas capacidades comportamentais) ou reforçar conexões intrinsecamente determinadas (Greenough, Volkmar & Juraska, 1973).

Os estudos de Hohendorff (2003) indicam que, dado sua eventual capacidade de visão cromática, os animais de laboratório possuem preferências relativas à cor das gaiolas. A literatura descreve que pequenas mudanças no ambiente, como a cor das caixas de alojamento, já podem influenciar nas respostas de comportamento dos animais (Shervim & Glen, 2003).

Este trabalho avaliou o comportamento de ratos com modelos de ansiedade (atividade exploratória) e aprendizado, mantidos em alojamento de cores diferentes (caixas brancas e pretas).

Materiais e métodos

Animais

Ratos Wistar machos (N=48) com 3 meses de idade, pesando entre 280g e 320g e provenientes do biotério da UNIVALI foram utilizados nesse estudo; acondicionados em grupos de quatro animais por caixa e submetidos a ciclos de claro e escuro (CE 12:12), temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, com comida e água à vontade. Dividiram-se em 6 grupos (8 animais/grupo), sendo que destes, 3 grupos ficaram alojados em caixas de polipropileno (49x34x16cm, Beira-Mar Industria e Comércio®) brancas e outros 3 em caixas pretas (mesmas dimensões das caixas brancas, porém de coloração preta opaca).

Após 4 semanas de tratamento (alojamento em caixas brancas e pretas), os animais foram submetidos aos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e esquiiva inibitória, realizados à noite (início às 20h), período no qual os ratos apresentam maior atividade fisiológica. Em cada teste, utilizaram-se 16 animais (8 alojados

em caixas brancas e 8 alojados em caixas pretas), sendo cada grupo submetido somente a um tipo de teste. Este estudo foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVALI, sob parecer nº 418.

Testes comportamentais

Campo aberto

O equipamento consiste de uma arena circular com aproximadamente 120 cm de diâmetro, circundada por uma parede circular de 45 cm de altura, demarcada por 12 quadrantes. Os animais dos grupos alojados em caixas brancas e pretas foram colocados individualmente no centro da arena e se verificou o número de cruzamentos nos quadrantes, durante 5 minutos. Segundo Choleris et al., (2001) e Lister (1990), um aumento na ambulação (número de cruzamentos) indica redução da ansiedade.

Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um método validado para explorar as bases neurobiológicas da ansiedade (Torres & Escarabajal, 2002). O equipamento consiste de estrutura de quatro braços, elevados 50 cm do chão, conectados por uma área central. Dois braços possuem paredes, sendo chamados de braços fechados, e outros dois não possuem as paredes, correspondendo aos braços abertos. Os animais são colocados individualmente na área central, voltados para um dos braços fechados e observados durante cinco minutos (Ho, Eichendorff & Schwarting, 2002), registrando-se o tempo em que o animal permanece nos braços fechados e abertos.

Esquiiva inibitória

O modelo de esquiiva inibitória é um dos mais utilizados em relação a testes de memória e aprendizado (Izquierdo & Medina, 1997) e consiste em inibir a exploração do ambiente pelo animal através da aplicação de choques elétricos. O equipamento é constituído por uma caixa com 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 25 cm de altura. Parte do chão é formada por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro) espaçadas por 1 cm. Outra parte compreende

uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento colocada junto à parede esquerda do aparelho (Roesler, Quevedo & Schroder, 2003).

Na sessão de treino, o animal é colocado sobre a plataforma e se registra o tempo que o rato leva para descer da plataforma com os quatro membros. Imediatamente após a descida da plataforma, o animal recebe um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Vinte e quatro horas após a sessão de treino, tempo necessário para que ocorra consolidação de memória (aprendizado) pelos ratos (Izquierdo & Graudenz, 1980), realiza-se o teste, onde o animal é novamente colocado na plataforma. O tempo que o animal leva para descer é registrado e comparado com o tempo da sessão treino.

Todos os experimentos foram tratados estatisticamente pelo teste t não paramétrico de Student ($p < 0,05$).

Resultados

Campo Aberto

No teste do campo aberto os animais alojados nas caixas pretas tiveram um aumento na ambulação quando comparados com os ratos alojados nas caixas brancas, $p = 0,095$, (Figura 1).

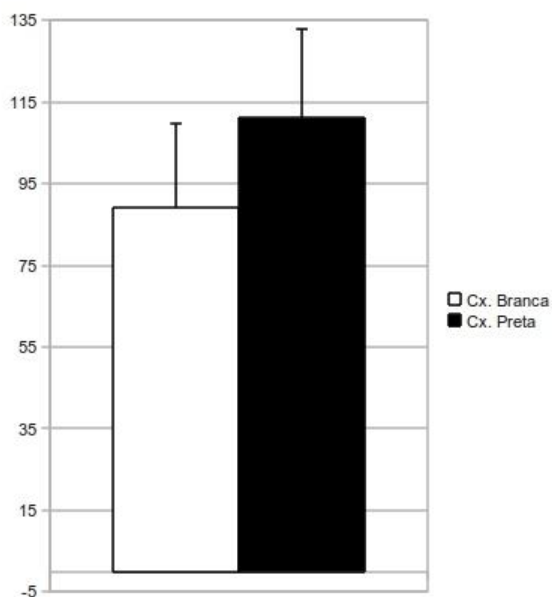


Figura 1. Diferença quanto ao número de cruzamentos entre os grupos.

Labirinto em cruz elevado

Os resultados demonstram que os animais alojados nas caixas brancas permaneceram tempo maior nos braços fechados $p = 0,043$, quando se compara com o grupo de ratos alojados nas caixas pretas. Em relação à permanência nos braços abertos, encontrou-se um $p = 0,096$; entretanto, os animais alojados nas caixas pretas exploraram um tempo maior nos braços abertos (Figura 2).

A discrepância verificada nas colunas referentes aos grupos indica o tempo em que os animais permaneceram em posição de espreita, ou seja, em área do labirinto não correspondente aos braços.

Esquiva inibitória

O teste t ($p < 0,05$) indicou como resultados um aumento significativo ($p = 0,033$) no tempo de permanência na plataforma dos animais alojados em caixas pretas. Em relação aos animais das caixas brancas, a diferença não se mostrou significativa ($p = 0,166$) entre as sessões treino e teste (Tabela 1).

A diferença de tempo de descida dos ratos entre as sessões treino (descida da plataforma e choque) e teste (descida), corresponde à retenção na memória/aprendizado dos ratos quanto ao estímulo inibitório.

Discussão

O enriquecimento ambiental 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 a capacidade de adaptação, tanto fisiológica quanto psicológica, do animal de laboratório (Fox & Harrison, 2006).

Segundo Van de Weerd (1994), fatores ambientais exercem importante influência nos animais de laboratório e nos resultados dos experimentos, uma vez que a gaiola representa seu meio ambiente. Sabe-se que a maioria dos roedores é apontada como espécies de hábitos noturnos e concentram suas atividades na fase escura do dia. Assim, espera-se que tenham preferência por gaiolas escuras, que similarmente ao seu habitat natural podem favorecer comporta-

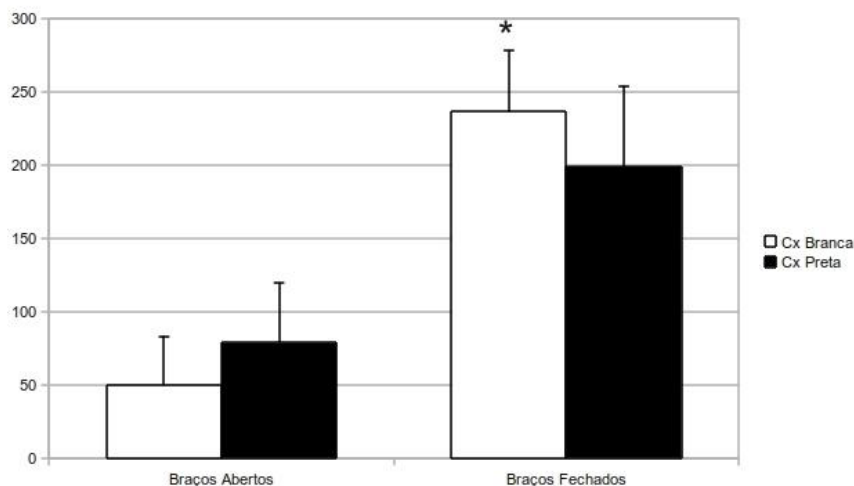


Figura 2. Tempo de permanência nos braços abertos e fechados dos ratos alojados em caixas brancas e pretas.

Tabela 1. Mostra a diferença, significativa (*), entre as médias do tempo de permanência em segundos na plataforma da esquiwa inibitória entre as sessões treino e teste. Tempo (seg) de permanência na plataforma durante o teste da esquiwa inibitória em ratos alojados por 4 semanas em caixas brancas e pretas.

Tratamento	Sessão treino	Sessão teste
Caixas brancas	6,39 ±8,41	19,61 ±25,81
Caixas pretas	10,48 ±11,44	*28,34 ±22,10

mentos típicos da espécie, diminuindo o estresse e a ocorrência de distúrbios comportamentais.

Os efeitos do enriquecimento ambiental podem ser avaliados através da exposição de animais a testes comportamentais, o que permite verificar mudanças no comportamento do rato, como o aumento da exploração de um ambiente, sugerindo diminuição da ansiedade (Van der Weerd & Baumans, 1999).

O labirinto em cruz elevado, por exemplo, é um dos modelos validados para pesquisas de ansiedade em ratos e camundongos, pois se baseia em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. A premissa básica é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando um típico conflito de aproximação/esquiwa. Rodgers et al. (1987) constataram que ratos apresentavam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos, e em uma chance de escolha, como um

labirinto, preferiam consistentemente os braços fechados, interpretando-se a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia.

Os resultados deste trabalho, utilizando caixas de diferentes cores (brancas e pretas), em relação ao labirinto em cruz elevado, mostram que os animais alojados nas caixas brancas apresentaram tempo significativamente maior quanto à permanência nos braços fechados. Os ratos alojados nas caixas pretas permaneceram mais tempo nos braços abertos, embora estatisticamente não significativo.

Estes resultados estão de acordo com estudos experimentais de Prior e Sascher (1995), confirmando que ratos machos mantidos em caixas enriquecidas mostram uma maior tendência para explorar os braços abertos no labirinto, quando comparados a animais mantidos em caixas padrão; indicativo de um menor índice de ansiedade.

Outro modelo, o de campo aberto, tornou-se também largamente utilizado na pesquisa da ansiedade, considerando-se que um aumento na ambulação do animal indica redução de fatores estressantes (Choleris et al., 2001; Lister, 1990).

Segundo Van Der Weerd (1994), artifícios de enriquecimento favorecem baixos níveis de ansiedade, aumentando a atividade locomotora em testes como o de campo aberto. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, onde os animais alojados em caixas pretas apresentaram maior ambulação, embora com diferença não significativa entre os grupos na análise estatística.

Já o modelo de esQUIVA INIBITÓRIA, que consiste na inibição da exploração do ambiente por meio de choques na ordem de mA, tem sido utilizado para avaliar a consolidação da memória de ratos.

Nunes, Bussab e Guerra (2003) descrevem que em ratos o enriquecimento ambiental, independentemente das experiências sociais anteriores, melhora principalmente a aprendizagem e a memória espacial, e acelera a habituação à novidade.

Nesta pesquisa, quanto ao teste de esQUIVA INIBITÓRIA, os dados mostram diferença significativa entre as médias do tempo de permanência na plataforma do grupo que foi alojado em caixas pretas, comparando as sessões treino e teste.

Para Costa (2004), ambientes enriquecidos ou complexos poderiam aumentar a plasticidade neural, resultando em diversas alterações na morfologia e bioquímica do cérebro, como o aumento da ramificação de dendritos e atividade enzimática.

Neste contexto, os animais criados em ambientes enriquecidos parecem apresentar uma organização de comportamento mais complexa e diversificada do que os animais criados em ambientes não enriquecidos.

Conclusão

Através da metodologia usada, verificou-se que o grupo de animais alojados em caixas de cor preta, quando submetidos aos testes do labirinto e do campo aberto, mostrou maior tendência exploratória (menor ansiedade), e o

grupo do teste de esQUIVA INIBITÓRIA apresentou melhor aprendizado.

Referências

- Boere, V. Behavior and environmental enrichment (2001). In: M. E. Fowler, Z. S. Cubas, *Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals* (pp. 263-267). Iowa: Iowa State Press University.
- Carlstead, K., & Shepherdson, D. (2000). Alleviating stress in zoo animals with environmental enrichment. In: G. P. Moberg, J. A. Mench. *The Biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. [S.l.]: CAB International, 16, 337-354.
- Choleris, E., Thomas, A.W., Kavaliers, M., & Prato, F.S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 235-260.
- Clark, J.D., Rager, D.R., & Calpin, J.P. (1997) Animal well-being II. Stress and Distress. *Laboratorial Animal Science*, U.S.A., 47(6), 571-579.
- Costa, I. M. (2004). *Efeitos da estimulação ambiental sobre o comportamento e o hipocampo de ratos*. Monografia de Graduação em Fisioterapia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.
- Fox, C. M. Z., & Harrison, C. (2006). Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behavior Brain Research*. 175, 1-8.
- Greenough, W.T., Volkmar, F.R., & Juraska, J.M. (1973). Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Behav Neurosci*, 104, 430-437.
- Heine, W. (1978). Design for laboratory animal facilities. *Zentralblatt fur veterinarmedizin*, 25(1), 189-195.
- Ho, Y.J., Eichendorff, J., & Schwarting, R. K. (2002). On functionals of linear processes with estimated parameters. *Behav Brain Res.*, 12, 136.

- Hockly E. (2002). Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. *Ann Neurol.*, 51(2), 235-42.
- Hohendorff, R.V. (2003). *Aplicação e avaliação de enriquecimento ambiental na manutenção de bugio (Alouatta spp LACÉPEDE, 1799) no Parque Zoológico de Sapucaia do Sul-RS*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Izquierdo, I., & Graudenz, M. (1980). Memory facilitation by naloxone is due to release of dopaminergic and beta-adrenergic systems from tonic inhibition. *Psychopharmacology*, 67, 265-268.
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to active in other brain structures. *Neurobiology of learning and Memory*, 68(3), 285-316.
- Lister, G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmac. Ther.*, 46, 321-340.
- Nunes, C.R.O., Bussab, V.S.R., & Guerra, R.F. (2003) Enriquecimento ambiental, privação social e manipulação neonatal. *Revista de Ciências Humanas*, 34, 365-394.
- Prior, H., & Sachser, N. (1995). Effects of enriched housing environment on the behaviour of young male and female mice in four exploratory tasks. *Journal of Experimental Animal Science*, 37, 57-68.
- Rodgers, R.J., et al. (1997). Comparative behavioural profiles of buspirone and its metabolite 1-(2-pyrimidine)-piperazine-(1pp) in the murine elevated plus-maze. *J. Méd. Biol. Res.*
- Roesler, R., Quevedo, J., & Schroder, N. (2003). NMDA receptors might be involved in the impairing effects of procyclidine on cognition. *Journal Of Clinical Psychopharmacology*, 23, 666-667.
- Shervim, 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.
- Torres, C., & Escarabajal, M.D. (2002). Validation of a behavioral recording automated system in the elevated plus-maze test. *Life Sci.*, 70, 1751.
- Van der Weerd, H. A. (1994) Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *Journal of Experimental Animal Science*. 36, 117-127.
- Van der Weerd, H. A., & Baumans, V. (1999). Evaluation of Environmental Enrichment for Laboratory Mice. *Animal Welfare Information Center Bulletin*, Spring, 9, 3-4.

Recebido em 21 de dezembro de 2010

Aceito em 19 de setembro de 2011