

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Baixo impacto do ruído no bem-estar: avaliação no modelo experimental de camundongo infectado por *Herpes simplex-1***

por

FERNANDA TRINDADE MADEIRA ARAÚJO

BELO HORIZONTE  
2018

TESE

DCS – IRR F. T. M. TRINDADE

2018

FERNANDA TRINDADE MADEIRA ARAÚJO

**Baixo impacto do ruído no bem-estar: avaliação no modelo experimental de camundongo infectado por *Herpes simplex-1***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. Marco Antônio Siva Campos  
Coorientação: Dr. Robert John Young

BELO HORIZONTE

2018

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

A663b Araújo, Fernanda Trindade Madeira.

Ano

Baixo impacto do ruído no bem-estar: avaliação no modelo experimental de camundongo infectado por *Herpes simplex* 1/ Fernanda Trindade Madeira Araújo. – Belo Horizonte, 2018.

XVIII, 104 f.: il.; 210 x 297mm.  
Bibliografia: f. 95-104

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Bem-estar 2. Ruídos em biotério 3. *Herpes simplex* 1  
I. Título. II. Campos, Marco Antônio Silva (Orientação). III. Young, Robert John (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 636.908

FERNANDA TRINDADE MADEIRA ARAÚJO

**Baixo impacto do ruído no bem-estar: avaliação no modelo experimental de camundongo infectado por *Herpes simplex-1***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marco Antônio Silva Campos (IRR/FIOCRUZ) Presidente  
Dra. Soraya Torres Jangola (IRR/FIOCRUZ) Titular  
Dra. Kelly Alves Bicalho Carvalho (IRR/FIOCRUZ) Titular  
Profa. Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard (UFMG) Titular  
Prof. Dra. Ana Paula Madureira (UFSJ) Titular  
Prof. Dra. Denise da Silveira Lemos Giunchetti (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 14/08/2018



*Dedico este trabalho a todos que contribuem com uma Ciência mais consciente com o bem-estar dos animais na pesquisa.*

## **AGRADECIMENTOS**

Sempre à Deus por ser o grande condutor da minha vida;

Ao Marco Campos pela orientação, discussões e troca de experiências neste longo período;

Ao Robert Young pela idealização e coorientação neste projeto;

Aos colaboradores Ana Carolina Teixeira, Lilia de Cássia E. Santo, Marina Duarte, Angélica Vasconcellos, Kevin Alvarenga, Alexandre Magno e Krisdany Cavalcante pelo grande auxílio em suas áreas de conhecimento;

À Bia por todo auxílio durante esta jornada;

Ao Bruno Galvão pelo auxílio nos ensaios de CBA;

À Karina Barbosa pelo auxílio na estatística;

À Kika (BIP) pela fundamental contribuição na realização da técnica de ELISA;

Ao José Luiz e Paulo do SINFO pela grande ajuda na montagem da câmera para a filmagem dos testes de comportamento;

À toda a equipe do biotério, Lilia, Elem, Cleyson, Gildo, Wagner, Rosa, Ana Paula, Néviton, Jaci e Samuel por toda dedicação, zelo e cuidado com os animais! Sem vocês este trabalho não teria sido possível;

Aos colegas do grupo Imunologia de Doenças Virais, Natália Lucinda, Natalinha, Ana Paula, Katy, Pedro e Thaís, que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho;

À Plataforma de Citometria de Fluxo, pelo suporte técnico;

À Ana Carolina Campi pelo auxílio nas análises de CBA;

À Zélia Profeta por acreditar na importância deste projeto para o bem-estar dos animais;

À Biblioteca do IRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma;

Aos meus pais pela presença constante em minha caminhada;

Ao meu marido por toda dedicação e incentivo constante em minha carreira como bioterista;

Ao meu anjo Gabriel, que chegou no meio desta empreitada, para me estimular ainda mais nesta caminhada no cuidado e respeito com os animais;

À minha querida e amada vó Naza que sempre acreditou na minha escolha em ser bióloga e por toda a ajuda em todos os momentos.

## RESUMO

As práticas de criação adotadas e os equipamentos tipicamente encontrados em biotérios produzem sons em frequências dentro da faixa de audição dos camundongos (1 a 100 kHz) que podem causar efeitos auditivos e não auditivos. Outro aspecto que pode potencialmente afetar o bem-estar de animais experimentais seria sua condição de saúde prejudicada, uma vez que além de todas as variáveis presentes no ambiente, alguns deles são infectados por patógenos de interesse. Este estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos da exposição crônica de camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>, não infectados e infectados com uma baixa m.o.i. por *Herpes simplex-1*, a diferentes níveis de ruído presentes nas salas "Silêncio" e "Ruído". Considerando todos os procedimentos, foi utilizado um total de 51 camundongos machos, sendo 27 da linhagem C57BL/6 e 24 da linhagem Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>. Parâmetros fisiológicos, como ganho de peso, hemograma, colesterol, glicose, corticosterona e citocinas envolvidas na resposta imune foram avaliados juntamente com as respostas comportamentais dos animais nos testes Campo Aberto e Claro/Escuro. Com relação aos parâmetros fisiológicos, em C57BL/6, houve interação entre infecção x ruído ( $p < 0,05$ ) com maior ganho de peso pelo grupo "Silêncio" infectado ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo "Ruído" infectado. No hemograma de C57BL/6 houve interação entre infecção x ruído ( $p < 0,01$ ) nas plaquetas, com aumento pelo grupo "Silêncio" infectado quando comparado ao grupo "Silêncio" controle e "Ruído" infectado ( $p < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nas dosagens de colesterol, glicose e corticosterona. Quanto à produção de citocinas, em C57BL/6 houve interação entre infecção x ruído ( $p < 0,05$ ), com menor produção de interferon gama no grupo "Silêncio" controle quando comparado aos grupos "Silêncio" infectado e "Ruído" controle (todos  $p < 0,05$ ). Nos testes comportamentais não houve diferença entre os grupos. Nossos resultados demonstraram que, embora a influência do ruído e da infecção tenha provocado alterações em alguns parâmetros fisiológicos e imunológicos, eles não foram suficientes para promover mudanças mensuráveis nos parâmetros de estresse avaliados, uma vez que a dosagem de corticosterona e as respostas dos animais dos diferentes grupos aos testes comportamentais não foram diferentes. Este estudo demonstrou que o nível de ruído encontrado no biotério causou um baixo impacto no bem-estar de animais experimentais.

**Palavras-chaves:** ruídos em biotério, camundongos, bem-estar, comportamento, fisiologia, *Herpes simplex virus -1*

## ABSTRACT

The breeding practices adopted and the equipment typically found in animal facilities produce sounds at frequencies within the auditory range of the mice (1 a 100 KHz), which can cause hearing and other non-hearing effects. Another aspect that could potentially affects the welfare of experimental animals would be their impaired health condition, since in addition to all the variables present in the environment, some of them are deliberately infected with pathogens. This study aimed to evaluate the possible effects of the chronic exposure of C57BL/6 and Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> mice, uninfected and infected, with a low m.o.i. of *Herpes simplex-1*, at different noise levels present in the “Quiet” and “Noisy” rooms. Considering all procedures, a total of 51 male mice were used, 27 of the C57BL/6 and 24 of the Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> strains. Physiological parameters such as weight gain, hemogram, cholesterol, glucose, corticosterone and cytokines involved in the immune response were evaluated together with the animals’ behavioral responses in Open Field and Light/Dark tests. In relation to the physiological parameters in C57BL/6, there was infection x noise interaction ( $P < 0.05$ ) with greater weight gain by the infected “Quiet” group ( $P < 0.05$ ) when compared to the infected “Noisy” group. In the hemogram of C57BL/6 there was infection x noise interaction ( $P < 0.01$ ) in the platelets, with increase by the infected “Quiet” group when compared to the control “Quiet” and infected “Noisy” group ( $P < 0.05$ ). No significant differences were found between the groups in the cholesterol, glucose and corticosterone concentrations. Regarding the production of cytokines in C57BL/6 there was infection x noise interaction ( $P < 0.05$ ), with a lower production of gamma interferon in control “Quiet” group when compared to the infected “Quiet” group and to the control “Noisy” group (all  $P < 0.05$ ). In behavioral tests there was no difference between the groups. Our results demonstrated that although the noise and infection influence have caused changes in some physiological and immunological parameters, they were not sufficient to promote measurable change in the stress parameters evaluated, since that corticosterone concentration and the responses of the animals from different groups in the behavioral tests were not different. This study demonstrated that the noise level found in the animal facility caused a low impact on the welfare of experimental mice.

**Key words:** noise in animal facility, mice, welfare, behavior, physiology, *Herpes simplex virus -1*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Intensidade das características faciais de camundongos são codificadas em uma escala de três pontos.</b> Para cada uma das cinco características são apresentadas imagens que exibem um comportamento correspondente aos três valores.....	22
<b>Figura 2: Resposta ao estresse: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e sistema nervoso autônomo.....</b>	29
<b>Figura 3: Fatores externos que interferem no equilíbrio fisiológico, biológico e comportamental de camundongos.....</b>	31
<b>Figura 4: Sensibilidade auditiva de humanos e das principais espécies de animais utilizadas na pesquisa biomédica.....</b>	34
<b>Figura 5: Patogênese da infecção por HSV-1.....</b>	40
<b>Figura 6: Medidor de nível sonoro B&amp;K 2270.....</b>	47
<b>Figura 7: Medidor de nível sonoro AR125 Binary Technology Acoustic.....</b>	47
<b>Figura 8: Medidores posicionados dentro do mini-isolador.....</b>	48
<b>Figura 9A e B: Nível de ruído encontrado nas salas "Silêncio" e "Ruído" utilizando o medidor B&amp;K2270.</b> Comparação dos períodos do dia (manhã, tarde e noite) nos descritores $L_{Aeq}$ , $L_{Zeq}$ e $L_{Zesp}$ .....	59
<b>Figura 10A, B e C: Comparação do nível de ruído entre as salas "Silêncio" e "Ruído", utilizando o medidor B&amp;K2270, nos descritores <math>L_{Aeq}</math>, <math>L_{Zeq}</math> e <math>L_{Zesp}</math>.</b> (A) Manhã, (B) Tarde e (C) Noite.....	61
<b>Figura 11: Nível de ruído encontrado nas salas "Silêncio" e "Ruído" utilizando o medidor AR125BAT.</b> Comparação entre as salas nas frequências do espectro auditivo de camundongos na curva de ponderação Z.....	62
<b>Figura 12: Ganho de peso.</b> Camundongos C57BL/6 (A) e Tlr2/Tlr9 <sup>(-/-)</sup> (B) controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído".....	63
<b>Figura 13: Comparação do ganho de peso entre linhagens.</b> Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9 <sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído".....	64
<b>Figura 14: Teste campo aberto (Open Field Test).</b> Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9 <sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". (A) Distância total percorrida por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9 <sup>(-/-)</sup> ; (B) Número de entradas no centro por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9 <sup>(-/-)</sup> ; (C) Tempo de permanência no centro por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9 <sup>(-/-)</sup> .....	65

**Figura 15: Comparação do teste campo aberto (*Open Field Test*) entre as linhagens.** Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". **A:** Distância total percorrida; **B:** Número de entradas no centro; **C:** Tempo de permanência no centro.....67

**Figura 16: Teste claro/escuro (*Light/Dark Box Test*).** Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". **(A)** Tempo de permanência no compartimento escuro por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>; **(B)** Número de entradas no compartimento escuro por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>; **(C)** Distância percorrida no compartimento claro por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> .....69

**Figura 17: Comparação do teste claro/escuro entre as linhagens.** Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". **(A):** Tempo de permanência no compartimento escuro; **(B):** Número de entradas no compartimento escuro; **(C):** Distância percorrida no compartimento claro.....71

**Figura 18: Comparação do hemograma entre as linhagens.** Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". **A:** glóbulos brancos (WBC), **B:** glóbulos vermelhos (RBC), **C:** hemoglobina (HGB), **D:** hematócrito (HCT), **E:** plaquetas (PLT) e índices hematimétricos **F:** volume corpuscular médio (MCV), **G:** hemoglobina corpuscular média (MCH) e **H:** concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC).....76

**Figura 19: Concentração de colesterol em soro.** Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído".....78

**Figura 20: Comparação da concentração de colesterol em soro entre as linhagens.** Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído".....79

**Figura 21: Determinação da concentração de glicose em soro de camundongos.** C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>, controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído".....80

**Figura 22: Comparação da concentração de glicose entre as linhagens de camundongos.** Soro de camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>, controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído".....81

**Figura 23: Concentração de corticosterona em fezes.** Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído".....82

**Figura 24: Comparação da concentração de corticosterona em fezes entre as linhagens.** Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído".....83

**Figura 25: Produção de citocinas em gânglio trigêmeo.** TNF alfa (A), IFN gama (B), IL2 (C) e IL4 (D) em camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído".....86



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Comportamentos normais e anormais de roedores com propostas de soluções.....25

**Tabela 2:** Perda auditiva em algumas das linhagens de camundongos mais utilizadas na pesquisa biomédica.....35

**Tabela 3:** Mediana e valores interquartis (25% e 75%) do nível de ruído, utilizando o medidor B&K2270, encontrados nas salas "Silêncio" e "Ruído" em  $L_{Aeq}$  (nível médio equivalente ponderado em "A"),  $L_{Zeq}$  (nível médio equivalente ponderado em "Z") e  $L_{Zesp}$  (nível médio equivalente ponderado em "Zespecial") nos períodos da manhã (6 às 12h), tarde (12 às 18h) e noite (18 às 6h).....60

**Tabela 4:** Efeitos da infecção e do ruído no hemograma de camundongos a) C57BL/6 e b) Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> após oito semanas de exposição ao ruído e 15 dias pós inoculação de HSV-1 ou Phosphate-Buffered Saline - PBS (controle).....73

**Tabela 5:** Efeitos da infecção e do ruído na produção das citocinas TNF alfa, IFN gama, IL2 e IL4 no gânglio trigêmeo de camundongos a) C57BL/6 e b) Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> após oito semanas de exposição ao ruído e 15 dias pós inoculação de HSV-1 ou Phosphate-Buffered Saline - PBS (controle).....85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**ACTH** - Hormônio adrenocorticotrófico

**BIOTEX** - Biotério de Experimentação

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais

**CBA** - Análise citométrica por arranjo de *beads*

**CONCEA** - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**IRR** - Instituto René Rachou

**dB** - Decibél

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**ELISA** - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Teste imunoenzimático

**FACScan** - *Fluorescence Activated Cell Sorter*

**FAWC** - *Farm Animal Welfare Council*

**FELASA** - *Federation of Laboratory Animal Science Associations*

**GT** - Gânglio trigêmeo

**HGB** - Hemoglobina

**HCT** - Hematócrito

**HPA** - Eixo hipotálamo-pituitária (hipófise)-adrenal

**HSV-1** - *Herpes simplex* tipo 1

**Hz** - Hertz

**ICTV** - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

**Ifn- $\gamma$**  - Interferon gama

**IL2** - Interleucina 2

**IL4** - Interleucina 4

**kHz** - kilohertz

**kpb** - mil pares de base

**LDBT** - *Light/Dark Box Test* - Teste claro/escuro

**L<sub>Aeq</sub>** - Nível médio equivalente ponderado em "A"

**L<sub>Ze</sub>** - Nível médio equivalente ponderado em "Z"

**L<sub>Zesp</sub>** - Nível médio equivalente ponderado em "Zespecial"

**μL** - Microlitro

**MCH** - Hemoglobina corpuscular média

**MCHC** - Concentração da hemoglobina corpuscular média

**MCV** - Volume corpuscular médio

**m.o.i.** - Multiplicidade de infecção

**NK** - *Natural Killer*

**NPS** - Nível de pressão sonora

**OFT** - *Open Field Test* - Teste campo aberto

**Pa** - Pascal

**PBS** - *Phosphate buffered saline* - Tampão fosfato-salino

**p.f.u.** - Unidade formadora de placa

**PLT** - Plaquetas

**RBC** - *Red Blood Cells* - Células vermelhas do sangue

**R-Ctrl** - Grupo "Ruído" controle

**R-Infestado** - Grupo "Ruído" infectado

**S-Ctrl** - Grupo "Silêncio" controle

**S-Infestado** - Grupo "Silêncio" infectado

**TLRs** - *Toll Like Receptors* - Receptores do tipo Toll

**TNF** - Fator de necrose tumoral

**USA** - *United States of America*

**WBC** - *White Blood Cells* - Células brancas do sangue

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1 Animais de Laboratório - Camundongos</b> .....	19
<b>1.2 Bem-estar animal</b> .....	20
<b>1.3 Comportamento animal</b> .....	24
1.3.1 Comportamento de camundongos em biotérios .....	25
1.3.2 Testes de comportamento .....	27
<b>1.4 Estresse</b> .....	28
<b>1.5 Fundamentos do som e sua medição</b> .....	30
<b>1.6 Ruídos em biotério</b> .....	31
<b>1.7 Espectro da frequência auditiva de camundongos</b> .....	33
<b>1.8 Efeitos auditivos e não auditivos do ruído</b> .....	35
<b>1.9 Herpes simplex-1</b> .....	37
1.9.1 Infecção experimental e bem-estar animal .....	37
1.9.2 HSV-1 .....	38
1.9.3 Patogênese e Epidemiologia .....	39
1.9.4 Aspectos gerais da imunidade do hospedeiro .....	41
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	43
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	43
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	43
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
<b>3.1 Levantamento dos níveis de ruído no biotério</b> .....	45
<b>3.2 Gravação dos níveis de ruído e configuração dos medidores</b> .....	46
<b>3.3 Considerações éticas</b> .....	48
<b>3.4 Camundongos</b> .....	49
<b>3.5 Vírus</b> .....	50
3.5.1 Titulação por contagem de placas .....	50
<b>3.6 Avaliação do ganho de peso</b> .....	50
<b>3.7 Anestesia</b> .....	51
<b>3.8 Infecção por Herpes simplex-1</b> .....	51
3.8.1 Infecção intranasal .....	52

3.9 Testes de comportamento .....	52
3.10 Coleta de sangue .....	53
3.11 Eutanásia e coleta do gânglio trigêmeo .....	54
3.12 Determinação de parâmetros hematológicos .....	54
3.13 Concentração de colesterol e glicose .....	55
3.14 Concentração de corticosterona .....	55
3.15 Avaliação da produção de citocinas por Cytometric Beads Array .....	56
3.16 Análise estatística dos dados .....	56
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
4.1 Níveis de ruído no biotério .....	58
4.2 Avaliação do ganho de peso .....	62
4.3 Teste campo aberto (Open Field Test) .....	64
4.4 Teste claro/escuro (Light/Dark Box Test) .....	68
4.5 Determinação de parâmetros hematológicos .....	72
4.6 Concentração de colesterol e glicose .....	78
4.7 Concentração de corticosterona .....	82
4.8 Avaliação da produção de citocinas por Cytometric Beads Array .....	83
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>88</b>
5.1 Potenciais limitações do estudo .....	93
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>95</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### *1.1 Animais de Laboratório - Camundongos*

Os animais de laboratório são utilizados em pesquisas envolvendo as mais diversas áreas da pesquisa biomédica, sendo imprescindíveis para o desenvolvimento das ciências biológicas e da saúde e assim, tendo grande relevância para as medicinas humana e veterinária (De Lucca et al., 1996; Andrade et al., 2002; Majerowicz, 2008; Salgado, 2010).

A aplicação de modelos animais é tão diversa quanto as áreas de investigação existentes (Svendsen e Hau, 1994). Para a obtenção de resultados experimentais confiáveis, a escolha do modelo animal deve ser feita de acordo com o protocolo experimental, adotando espécies disponibilizadas com qualidade adequada e em menor número possível (Gilioli, 2003; Ferreira et al., 2005).

Neste contexto, Russel & Burch (1959) sintetizaram em três palavras o Princípio Humanitário da Experimentação Animal (Princípio dos 3 R's), onde se deve utilizar o menor número possível de animais (Reduction), substituir o modelo animal por modelos alternativos (Replacement) e aprimorar as técnicas de pesquisa visando minimizar o sofrimento do animal (Refinement) (Andrade et al., 2002; National Research Council, 2010). A pesquisa animal conduzida com ética e responsabilidade oferece sempre expectativas para o desenvolvimento de novos métodos de prevenção, tratamento, cura e controle de doenças, do sofrimento e da dor (Majerowicz, 2005).

No século passado, espécies de roedores como ratos e camundongos começaram a ser utilizados de forma considerável como modelos a serem adotados na pesquisa devido à facilidade de acompanhamento das diferentes fases de seu desenvolvimento (Gilioli, 2003). Atualmente, o camundongo é o animal mais amplamente utilizado para fins de ensino e pesquisa (Lapchik et al., 2017). A escolha por esta espécie se justifica pelo fato de serem mamíferos pequenos, prolíferos, de manuseio e manutenção fáceis, com curtas gerações e proporcionando assim, um custo reduzido na experimentação animal e um maior número de animais disponíveis (Mazzaccara et al., 2008; Lapchik et al., 2010). Desde então, o camundongo tem desempenhado um papel fundamental na genética de mamíferos e na pesquisa biomédica. Além disso, a capacidade de se adicionar e alterar seletivamente o genoma deste roedor aumentou seu poder como uma ferramenta para o entendimento das bases genéticas em processos de saúde e doenças humanas. Camundongos isogênicos e

mutantes frequentemente possuem síndromes similares às doenças humanas hereditárias devido à proximidade metabólica e anatômica interna com os seres humanos (Hedrich, 2004).

Desta forma, o grande avanço do conhecimento humano na medicina humana e veterinária e a utilização de animais de laboratório em pesquisas científicas fez com que houvesse a necessidade de implementação de novas técnicas que favorecessem assim o bem-estar dos animais de laboratório (Frajblat et al., 2008).

## ***1.2 Bem-estar animal***

O bem-estar animal foi inicialmente definido por Barry Hughes em 1976 como o estado de completa saúde, física e mental, onde o animal está em harmonia com seu ambiente. A este conceito Hurnik (1992) acrescentou a idéia de que o bem-estar significa uma alta qualidade de vida do animal, defendendo que um ótimo funcionamento biológico do organismo ocorre somente quando a sua vida está identificada ou alinhada com o ambiente, reiterando que este cenário denomina-se estado de harmonia. Outra definição foi dada por Broom (1986) em que o bem-estar animal é o estado do organismo durante as suas tentativas de se ajustar ao seu ambiente para a manutenção da homeostase. Isto significa que quando os desafios são vencidos com pouco esforço e gasto de recursos, o bem-estar do indivíduo é satisfatório. Por outro lado, quando o indivíduo falha no enfrentamento destes desafios, o bem-estar pode ser comprometido (Manteca et al., 2013).

Neste contexto, Broom e Johnson (1993) identificaram três aspectos relacionados com a questão: o bem-estar é uma característica do animal e não algo que o homem pode fornecer; o bem-estar pode variar de muito bom a muito ruim e o bem-estar pode ser medido cientificamente (Manteca et al., 2013). Desta forma, Broom e Molento (2004) defendem que o bem-estar deve ser definido de forma que permita pronta relação com outros conceitos, tais como: necessidades, liberdades, felicidade, adaptação, controle, capacidade de previsão, sentimentos, sofrimento, dor, ansiedade, medo, tédio, estresse e saúde. Segundo Nordquist et al., (2017) o conceito de bem-estar foi melhor sumarizado por Webster (2012): "Existe agora um amplo consenso entre acadêmicos e o público em geral de que o bem-estar de um animal senciente é definido por quão bem se sente, como ele é capaz de lidar com os desafios físicos e emocionais aos quais está exposto".

Segundo Orientação Técnica nº12 do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), de 8 de maio de 2018, atualmente para o estudo do



bem-estar animal três abordagens principais são utilizadas: baseada no comportamento dos animais de vida livre, em suas experiências subjetivas e no seu funcionamento fisiológico.

Existem fortes evidências de que os animais são capazes de experimentar e expressar diferentes emoções ou estados afetivos, incluindo aqueles de valência positiva, como felicidade ou prazer (Poole, 1997; Finlayson et al., 2016). Desta forma, se torna de extrema relevância o equilíbrio entre experiências positivas e negativas, entre a previsibilidade e imprevisibilidade, bem como controlabilidade e incontrolabilidade, semelhantes às dos animais de vida livre (Baumans, 2005). As emoções positivas têm sido identificadas como um marcador crítico para o bem-estar dos animais, assim, é essencial investigar métodos para reconhecer estados emocionais negativos e positivos em animais. Nos animais, os estados emocionais podem ser deduzidos do comportamento, incluindo vocalizações, fisiologia, neurofisiologia ou cognição (Finlayson et al., 2016). Em camundongos os estados emocionais podem ser inferidos a partir do comportamento do animal e, além disso, diferentes estados emocionais podem ser expressos por meio de mudanças na expressão facial (Finlayson et al., 2016). Langford e colaboradores (2010) demonstraram que as lesões de regiões específicas do cérebro em camundongos, cuja atividade está associada à percepção de dor nos seres humanos, atenuam as expressões faciais de dor, sugerindo que a face que expressa dor pode refletir diretamente a experiência de um estado emocional. A **Figura 1** ilustra diferentes características faciais como o aperto orbital, a contração nasal e das bochechas, orelhas arqueadas para trás ou para os lados e ainda, o posicionamento das vibrissas, que são codificadas por meio de uma escala de três pontos: não presente, moderado e grave.



Figura 1: Intensidade das características faciais de camundongos são codificadas em uma escala de três pontos. Para cada uma das cinco características são apresentadas imagens que exibem um comportamento correspondente aos três valores. Fonte: Lapchik et al., 2017, pág 581.

Webster (2016) reitera conceitos elaborados e adotados pelo Farm Animal Welfare Council (FAWC) em 1979 sobre as Cinco Liberdades do bem-estar animal que tem como objetivo apresentar pontos a serem observados nas condições em que os animais são mantidos. Tais liberdades atualmente são: Liberdade de sede, fome e má-nutrição, Liberdade de dor, ferimentos e doença, Liberdade de desconforto, Liberdade para expressar comportamento natural e Liberdade de medo e distresse (FAWC, 1993). Molento (2003) propõe ainda que as Cinco Liberdades sejam expressas como: Liberdade Nutricional (ausência de fome e de sede), Liberdade Sanitária (ausência de doenças e de fraturas),

Liberdade Ambiental (edificações adaptadas), Liberdade Comportamental (possibilidade de exprimir comportamentos normais) e Liberdade Psicológica (ausência de medo e de ansiedade) (Baptista et al., 2011). Importante mencionar que esses cinco itens procuram oferecer uma abordagem para a compreensão do *bem-estar* como é percebido pelo próprio animal (e não como definido por seu criador ou mesmo pelo consumidor) e servem como um ponto de partida para avaliar os aspectos bons e ruins de um sistema de criação (Webster, 2016).

Com relação aos animais de laboratório, o bem-estar é considerado como um dos principais fatores que pode influenciar o resultado de um experimento, uma vez que o confinamento pode resultar na impossibilidade de resolução de situações indesejáveis. Assim, é fundamental entender o universo artificial onde o animal está contido e compreender aspectos da anatomia, fisiologia, etologia e manejo das espécies em questão (Frajblat et al., 2008). A partir desse conhecimento é gerada uma série de obrigações éticas e legais que certamente favorecerão o bem-estar destes animais por meio da aplicação do princípio dos 3 R's. Em biotérios, o estado ideal de bem-estar pode ser assumido quando a equipe envolvida no projeto certifica que a habitação dos animais e os cuidados destinados a estes são consistentes com as melhores práticas, e ainda, que os animais estão saudáveis e que estão totalmente habituados às suas rotinas de alojamento e de criação (Hawkins et al., 2011).

No que diz respeito à legislação brasileira, a Lei Federal 11.794/Lei Arouca foi aprovada em 2008, após tramitar por 13 anos no Congresso Nacional. Esta lei gerou condições para que se estabelecesse uma política nacional para o uso de animais no ensino e na pesquisa, regulamentando assim o uso de animais em experimentos científicos. Neste sentido, a pertinência, bem como a análise crítica da real necessidade do uso de animais em situações experimentais, constituem bases imprescindíveis para que a sociedade como um todo, compreenda e aceite como justificável a participação de animais em procedimentos didáticos e científicos. Além disso, esta lei foi responsável pela criação do CONCEA, que formula normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica, bem como estabelece procedimentos para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal.

### 1.3 Comportamento animal

O comportamento do animal é uma das características mais importantes quando se caracteriza o estresse, pois é fundamental nas adaptações das funções biológicas e representa a parte do organismo que interage com o ambiente (Snowdon, 1999). A observação das alterações comportamentais é considerada um dos métodos mais rápidos e práticos quando se avalia o bem-estar animal (Pizzutto, 2007). Por meio da observação comportamental é possível mensurar o estado do indivíduo em relação ao seu ambiente (Broom, 2011). O comportamento do animal em combinação com a avaliação fisiológica pode proporcionar uma compreensão mais completa das perturbações homeostáticas de um organismo devido aos estímulos estressivos internos ou externos (Filiciotto et al., 2014). No entanto, proporcionar e mensurar bem-estar para animais mantidos em cativeiro representa um grande desafio para profissionais da área (Dawkins, 2004; Pizzutto et al., 2013).

Todo animal apresenta um comportamento padrão da espécie e a presença de comportamentos anormais pode ser considerada como um indicador de que o bem-estar não está sendo alcançado (Sanders e Fejjó, 2007). Desta forma, as esteriotipias, geralmente definidas como padrões comportamentais invariáveis e repetitivos, sem meta ou função aparente podem ser utilizadas como indicadores da ausência ou redução de bem-estar (Pizzutto et al., 2013). Os roedores tendem a desenvolver estereotipias e comportamentos impulsivos/compulsivos e, reconhecer estes comportamentos anormais se torna de extrema relevância na promoção do bem-estar (**Tabela 1**). Os herbívoros e onívoros tendenciam a desenvolver principalmente estereotipias orais, enquanto que os predadores desenvolvem estereotipias locomotoras como " *pacing* " (andar de um lado para outro) e rotas traçadas. Neste contexto, o enriquecimento ambiental tem sido utilizado como uma ferramenta importante na busca de comportamentos típicos da espécie, melhor qualidade de vida e bem-estar desejável (Young, 2003).

Tabela 1: Comportamentos normais e anormais de roedores com propostas de soluções.

Espécie	Comportamento normal	Comportamento estereotipado	Soluções propostas
Camundongo	Noturno, construção de ninho, tigmotaxia, forrageando, roendo e escavando	Barbeamento, lutas, triturar os alimentos, roer a grade, limpeza excessiva	Produtos oferecendo oportunidades para abrigar, exercitar, construir ninho, roer e forragear, e ainda recompensas comestíveis
Rato	Noturno, construção de ninho, tigmotaxia, forrageando, roendo e escavando, coprofagia	Barbeamento, lutas, triturar os alimentos	Produtos oferecendo oportunidades para abrigar, construir ninho, roer e forragear, e ainda recompensas comestíveis
Hamster	Noturno, exploratório, forrageando, roendo e escavando, lutas, estoca o alimento	Canibalismo, lutas	Produtos oferecendo oportunidades para abrigar, construir ninho, roer e forragear, e ainda recompensas comestíveis

Fonte: Adaptado de Brandão & Mayer (2011).

### 1.3.1 Comportamento de camundongos em biotérios

Com relação aos camundongos, eles foram domesticados há séculos e têm sido utilizados para fins de pesquisa desde o século XVII, embora o desenvolvimento do camundongo de laboratório como modelo de pesquisa animal não tenha começado até o início do século XX. Apesar da condição de cativeiro em que estes animais vivem, eles ainda mantêm muitas características dos seus ancestrais selvagens (Mattaraia e Oliveira, 2012).

O camundongo é uma espécie extremamente ativa, que se empenha em altos níveis nas interações sociais e recíprocas. A socialização é de grande importância para o animal, uma vez que determina a ocorrência de uma adaptação adequada às estruturas sociais. Assim, animais criados em condições sociais não apropriadas, tornam as relações com outros indivíduos agressivas e elevam o nível de estresse no grupo (Mattaraia e Oliveira, 2012). Kaiser e Sachser (2005) relatam que durante a socialização os animais aprendem algumas regras sociais como, por exemplo, “*respeitar as associações entre machos e fêmeas e as relações de dominância*”. Os sintomas comportamentais do estresse do isolamento (também denominado síndrome de isolamento) incluem agressão, estereotípias, convulsões, ansiedade e dificuldade no manuseio. Os sintomas fisiológicos incluem imunoincompetência, maior

incidência tumoral, ulcerações gástricas, hipersensibilidade a toxinas e aumento de patologias (Balcombe et al., 2004; Balcombe, 2006).

Em biotérios, o camundongo apresenta um interessante e elaborado repertório de comportamento social e individual, com características marcantes de nidificação, acasalamento, maternidade, marcação territorial e agressividade (principalmente entre machos em idade adulta) (Mattaraia e Oliveira, 2012, Coimbra et al., 2013). A comunicação é primordialmente baseada no olfato, pela sinalização por meio da percepção de feromônios. Outro sistema importante de reconhecimento social e exploratório é o uso tátil das vibrissas que possibilita ao animal receber informações como vibração, contato, pressão e deslocamento (Mattaraia e Oliveira, 2012).

O comportamento de *grooming* (higiene) é um componente-chave e uma atividade social importante em várias espécies animais, incluindo camundongos, que passam de 30% a 50% de seu tempo acordado. A higiene social foi considerada no passado como um comportamento agressivo, mas mais recentemente concluiu-se que esse comportamento ocorre em algumas espécies de roedores e foi interpretado como sendo semelhante a um aperto de mão em humanos (Brandão e Mayer, 2011). **Alguns perfis de respostas comportamentais, como por exemplo, o aumento das atividades de limpeza e higiene, são causados pela exposição sonora. A atividade locomotora pode mudar e os sons podem induzir reações específicas como o reflexo acústico, congelamento e orientação (Voipio et al., 2006).**

**Cada espécie emite vocalizações com energia em faixas de frequência compatíveis com suas habilidades auditivas (Portfors, 2007). Os roedores emitem um repertório diverso de vocalizações ultra-sônicas em diferentes contextos sociais, como por exemplo as vocalizações de 22 kHz e 50 kHz são emitidas em diferentes situações sociais e a ocorrência de cada tipo depende das demandas físicas e psicológicas da situação ambiental. Além disso, evidências recentes sugerem que essas vocalizações representam diferentes estados afetivos do animal (Portfors e Perkel, 2014; Brudzynski, 2015).**

Chumbinho e colaboradores (2012) concluíram em seus estudos que as principais atividades realizadas pelos camundongos em biotérios são de repouso (quando estão em torno da 4ª semana de vida), explorar o ambiente e buscar o alimento quando amadurecem e tornam-se adultos (8ª semana de vida). Apresentam constante atividade de auto-higienização e de contato físico durante toda sua vida. Porém devemos observar as diferenças entre os

agrupamentos, pois cada um apresenta um perfil peculiar e diferenciado de prevalência das atividades.

### 1.3.2 Testes de comportamento

Medo e ansiedade formam a primeira linha de defesa, fazendo parte de um mecanismo de sobrevivência, fruto de todo um processo evolutivo (Kin e Gorman, 2005). Estes fatores, quando percebidos pelos animais e humanos, impedem a realização de diversas atividades ou induzem a comportamentos inesperados e repentinos.

Gouveia e Hurst (2017) publicaram sobre a influência de estressores ambientais no desempenho dos animais de laboratório em testes comportamentais. Isso ocorre porque a performance de um animal durante o teste é determinada pelo seu comportamento, que por sua vez é suscetível às diferentes variáveis presentes no ambiente e que são potencialmente estressoras. Assim, podem ser criados vieses consideráveis na replicação de respostas entre lotes de animais, experimentos e laboratórios, uma vez que o estresse ou a ansiedade em decorrência de estímulos presentes no ambiente são suscetíveis de deslocar a atenção do animal de um determinado teste, prejudicando a sua capacidade de aprender e/ou resolver tarefas específicas. Isto pode prejudicar a confiabilidade da pesquisa, pois embora os resultados pareçam ser consistentes, eles refletem uma interação inadequada com o teste ao invés de uma medida de desempenho que o teste foi projetado para avaliar.

Modelos comportamentais para avaliar o estresse e a ansiedade estão bem estabelecidos em camundongos, dentre eles os testes campo aberto (*Open Field Test*) e claro-escuro (*Light/Dark Box Test*) são dois tipos clássicos. Especificamente, o teste campo aberto é potencialmente sensível tanto à atividade quanto à exploração, e também à emocionalidade, que tende a suprimir a expressão da primeira. Os índices mais utilizados para avaliar a emocionalidade, como a ansiedade, são o tempo de permanência no centro e a locomoção (Walsh e Cummins, 1976; Carola et al., 2002). O teste claro-escuro baseia-se no conflito entre as propriedades aversivas do compartimento claro e a tendência a explorar um novo ambiente. Portanto, está positivamente correlacionado com o tempo gasto no compartimento iluminado e negativamente com o número de entradas no compartimento escuro (Crawley e Goodwin, 1980; Heredia et al., 2014).

#### 1.4 Estresse

Segundo recomendações da Felasa (1994), dor, angústia e sofrimento são termos que basicamente descrevem os estados da percepção da mente humana ou suas experiências. É difícil transferir as definições de “estados da mente” para estados comparáveis aos animais de laboratório. No entanto, os pesquisadores devem estar familiarizados com as dificuldades nos conceitos de dor, angústia e sofrimento e saber como reconhecer, avaliar, controlar e, de preferência, evitar essa experiência em seus animais.

No que se refere ao estresse, ele pode ser definido como um estímulo ambiental sobre um indivíduo que sobrecarrega seus sistemas de controle e reduz sua adaptação, ou parece ter potencial para tanto. Todo fator exógeno que provoca um estresse é denominado estressor (calor, frio, **ruído**, umidade, fome, sede, infecções, esforços corporais, infestações parasitárias, dor, elevada densidade populacional, isolamento, medo, ansiedade, etc). A interação entre estímulo (estressor) e resposta ao estímulo (somatório das reações não específicas ao estressor), manifesta-se na forma de uma síndrome (Síndrome de Adaptação Geral), com o qual o organismo tenta evitar ou reduzir os efeitos do estressor (Broom, 1993).

Os animais adaptam-se a situações previsíveis por meio de modificações fisiológicas e comportamentais, uma vez que seus ambientes não são estáticos. Os componentes não previsíveis promovem o chamado “estágio de emergência”, que resulta em mudanças nos parâmetros endócrinos e metabólicos de um organismo (Möstl e Palmer, 2002). Um grande número de hormônios (ACTH, glicocorticoides, catecolaminas e prolactina) está envolvido nas respostas ao estresse (Moberg e Mench, 2000) (**Figura 2**). As glândulas adrenais têm um papel primordial nas respostas hormonais ao estresse, agindo, por exemplo, no eixo hipotalâmico-pituitário (hipófise)-adrenal, que é altamente sensível a estressores psicológicos resultantes da percepção de perigo ou ameaça, novidade ou incerteza do ambiente (Carlstead e Brown, 2005). Situações adversas desencadeiam respostas das adrenais, resultando em um aumento da secreção de glicocorticóides e/ou catecolaminas. Este é o primeiro mecanismo de defesa do organismo contra as condições estressantes (Moberg e Mench, 2000).

Embora o estresse seja parte integrante da vida do animal, sua duração é de fundamental relevância quando se considera o seu impacto nos indivíduos. Existem muitas diferenças na maneira como os fatores de estresse agudo (curto prazo) e crônico (longo prazo) afetam a fisiologia e o comportamento (Bowers et al., 2008). Durante um curto período de estresse, os glicocorticoides podem facilitar a mobilização energética e alterar o



comportamento. Muitos tipos de agentes estressores agudos podem acarretar um aumento geral da excitação, que, por sua vez, tem o potencial de trazer benefícios fisiológicos e psicológicos para o animal. Entretanto, o estresse crônico ou o estresse intermitente podem acarretar em altos custos biológicos (Bowers et al., 2008), como diminuição da aptidão individual por imunossupressão e atrofia de tecidos, diminuição da capacidade reprodutiva (Peel et al., 2005) e alterações comportamentais, também conhecidas como estereotípias (Carlstead et al., 1992; Mc Bride e Cuddelford, 2001).

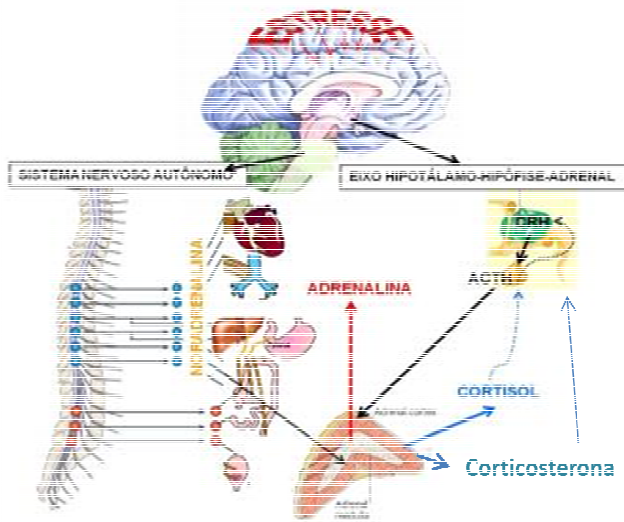


Figura 2: Resposta ao estresse: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e sistema nervoso autônomo. Fonte: Adaptado de Ulrich-Lai e Herman (2009).

O impacto fisiológico e comportamental de um agente estressor é altamente dependente da percepção e do tipo de resposta comportamental do indivíduo. A resposta ao estresse envolve uma ampla gama de mecanismos fisiológicos, incluindo o metabolismo e a resposta imune, que serão úteis para superar a condição de desequilíbrio desencadeada pela resposta primária ao estresse. Desta forma, o animal tenta evitar situações perigosas com risco de vida, preservando sua integridade corporal e, quando exposto ao estímulo estressor tenta reintegrar o equilíbrio em todos os sistemas fisiológicos para recuperar a homeostase. Em determinadas situações, embora o organismo se empenhe para enfrentar o desafio, a

reorganização metabólica pode afetar a eficiência de certas funções, como por exemplo, o sistema imunológico e a resistência a patógenos (Puzserova e Bernatova, 2016).

### ***1.5 Fundamentos do som e sua medição***

A propagação da energia sonora se faz pelo movimento vibratório das moléculas e/ou partículas que compõem um meio material elástico. Esse meio sofre repetidas compressões e expansões moleculares que se propagam em forma de ondas a partir da fonte sonora, sempre em torno de sua posição de equilíbrio original. As compressões e expansões do meio causam flutuações de pressão. Como essas flutuações ocorrem devido à propagação de um som, recebem a denominação de pressão sonora (Cavalcante, 2009).

Com relação ao som, ele é caracterizado principalmente com base na amplitude e na frequência. A amplitude é o deslocamento máximo da partícula em relação a sua posição de equilíbrio, o período é o tempo decorrido em uma oscilação completa e a frequência é o número de vezes que a partícula vibra em um segundo. A amplitude refere-se à "intensidade" de um som e é medida em uma escala de decibéis (dB). Uma medida de decibéis é determinada tomando-se a medida de unidade para a amplitude da pressão sonora, o pascal (Pa), e convertendo este número para uma escala de decibéis usando o nível de pressão sonora (NPS). A unidade usual para a pressão sonora é o Newton por metro quadrado ( $N/m^2$ ) ou Pascal (Pa). O NPS é uma escala logarítmica que permite a medição de uma ampla gama de variações de pressão detectáveis pelo ouvido humano (Rasmussem et al., 2009).

Quanto à medição da percepção do nível de pressão, o nível de ruído ponderado A, abreviado como dB(A), é uma curva única que representa a soma energética do ruído (som), ajustada pela frequência (isto é, tendo em conta o conteúdo espectral). A curva de ponderação de frequência (ponderação A) representa o nível sonoro que cobre toda a gama de frequências baseadas na audição humana. Contudo, embora grande parte dos medidores de ruído e a literatura façam uso da curva de ponderação em "A", em experimentos com animais, isso pode levar a um viés, uma vez que os efeitos da sensibilidade auditiva específica da espécie não estão sendo levados em consideração (Voipio et al., 2006). Portanto, o nível de pressão sonora medido no ambiente é freqüentemente maior que o nível sonoro próximo ao animal (Voipio et al., 2006; Di e Xu, 2016), desta forma, em biotérios é recomendado que se utilize a curva de ponderação em "Z" com ajuste linear, pois representa a leitura geral da medição e o

seu valor global é a soma de todas as variações de pressão sonora detectadas pelo microfone (Hughes, 2007).

Li e colaboradores (2015) sugerem que o cálculo do NPS deve estar baseado no ciclo circadiano, de forma a ser adicionado 10 dB ao valor encontrado no período em que ocorre o descanso. Assim, pelo fato do camundongo ser uma espécie de hábitos noturnos (descansam na fase clara e permanecem ativos no período escuro) ocorre uma maior influência do ruído no período diurno. Desta forma, nas medições realizadas neste período deveria ser acrescentado 10 dB ao valor encontrado.

### 1.6 Ruídos em biotérios

Visando a reprodutibilidade e a qualidade dos resultados experimentais, os animais de laboratório são avaliados periodicamente tendo em vista a certificação genética e sanitária das colônias. Adicionalmente, é realizada a supervisão constante da aplicação correta das técnicas de manejo e o monitoramento periódico das condições de saúde e de ambiente recomendadas para cada espécie a fim de se propiciar bem-estar ao animal de forma a não interferir em seu equilíbrio fisiológico, biológico e comportamental (**Figura 3**). Além disso, o emprego de práticas e procedimentos padronizados com a finalidade de barreiras de proteção, destinados a evitar a contaminação do macro e microambientes e dos animais, também são considerados nestas instalações (Ferreira et al., 2005; Majerowicz, 2005; National Research Council, 2010).

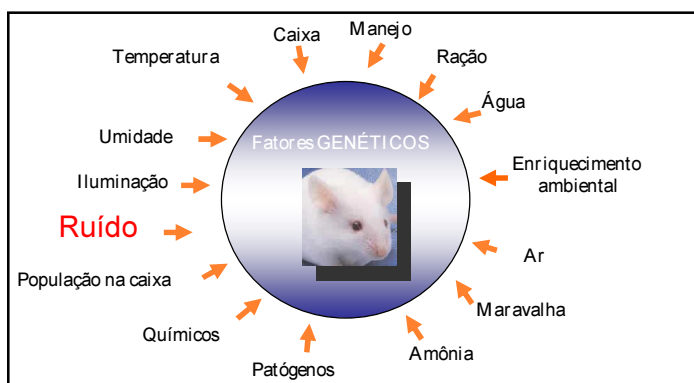


Figura 3: Fatores externos que interferem no equilíbrio fisiológico, biológico e comportamental de camundongos. Fonte: Modificada de Lapchik et al., 2010, pág 519.

Neste contexto, refinar o ambiente e o bem-estar dos animais de laboratório é o maior desafio da Ciência em Animais de Laboratório. O ambiente deve estar baseado nas necessidades de cada espécie: ser seguro, confortável e enriquecedor e, ao mesmo tempo padronizado (Voipio et al., 2006). Em biotérios, os roedores são expostos a um grande número de variáveis ambientais originadas do micro e macroambiente como, densidade populacional, odores, iluminação, umidade, temperatura, tipo de conduta adotada pelo corpo técnico, dentre outras (Sales et al., 1988; Turner et al., 2005; Jensen et al., 2010). O monitoramento do registro de algumas destas variáveis é normalmente realizado de forma rigorosa nestes ambientes. No entanto, pouca atenção é dada à paisagem sonora, apesar da grande evidência de que o som é considerado um dos fatores que tem grandes efeitos sobre os animais afetando significativamente uma variedade de sistemas (Turner et al., 2005; Lauer et al., 2009; Reynolds et al., 2010).

O ruído pode ser definido como qualquer som presente no ambiente (Turner et al., 2005) e, em biotérios é um fator que pode variar diariamente, sendo inevitável a manutenção em um mesmo nível (Peterson, 1980). The *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 2010) preconiza que o controle de ruídos deve ser considerado tanto no projeto de instalação dos animais quanto na sua execução. De uma forma geral, na construção de biotérios é utilizado concreto em paredes e pisos e o acabamento de tetos e paredes é feito com tinta epóxi. Embora esses materiais facilitem a higienização de superfícies e minimizem o acúmulo de poeira, eles acentuam o ruído no ambiente, uma vez que fornecem pouca absorção do som e aumentam seu tempo de reverberação (Carlton e Richards, 2002; Turner et al., 2005). Assim, o ambiente acústico em biotérios foi estudado e caracterizado por vários grupos (Turner et al., 2005; Lauer et al., 2009; Reynolds et al., 2010) e a paisagem sonora encontrada é composta por ruídos de fundo provenientes de sistemas elétricos e mecânicos, além de sons intermitentes atribuídos a várias fontes, principalmente a atividade humana. Milligan e colaboradores (1993) e Lauer e colaboradores (2009) demonstraram que as práticas de criação adotadas em biotérios, bem como os equipamentos tipicamente encontrados nestas instalações, produzem sons em frequências superiores às que os seres humanos conseguem ouvir (20 Hertz e 20 kilohertz), porém dentro da faixa de audição dos camundongos (1 a 100 kilohertz). Turner e colaboradores (2005) apontaram três fontes básicas de geração de ruído: dispositivos técnicos (ar condicionado, exaustor, racks ventilados, estantes ventiladas, sistema elétrico, além de outros equipamentos utilizados), manejo dos animais (abrir/fechar portas e mini-isoladores,

carrinhos, comunicação entre os técnicos e usuários) e os próprios animais (atividades realizadas, vocalização). Voipio e colaboradores (2006) ressaltam ainda que os ruídos gerados podem variar de acordo com o processo de trabalho executado, com o estilo de trabalho e com os materiais utilizados. Portanto, esta variável deve ser controlada rigorosamente nas instalações de animais (Voipio et al., 2006; Turner et al., 2007).

Os níveis de pressão sonora variam entre o período claro e o período escuro e entre dias de semana e finais de semana sendo que os sons com altos níveis de pressão sonora são produzidos especialmente durante a rotina de trabalho com os animais (Milligan et al., 1993, Sales et al., 1993; Voipio et al., 2006). Em estudos realizados por Peterson (1980) o ruído de fundo nas salas de animais é inferior a 50 dB (A) durante a noite, contudo durante o horário de trabalho pode exceder 100 dB (A) (Voipio et al., 2006). Vários procedimentos de rotina realizados em biotérios produzem sons com frequências e níveis de pressão sonora variados, contudo dentro da faixa auditiva de camundongos (1 a 100 kHz). Embora muitas atividades sejam de curta duração, elas são repetidas constantemente, podendo ter uma maior relevância para o bem-estar animal que os sons produzidos acidentalmente. Segundo Turner e colaboradores (2005) atenção especial deve ser dada ao ambiente acústico em biotérios devido à preponderância de sons de alta frequência acima do limiar auditivo humano.

### ***1.7 Espectro da frequência auditiva de camundongos***

Diferenças fisiológicas entre os animais faz com que os mesmos interajam diferentemente com o ambiente. Seus aparelhos receptores e geradores de sinais acústicos captam e geram ondas mecânicas cujas faixas de frequências são diferentes da capacidade perceptiva do aparelho auditivo humano (Cavalcante, 2009). A orelha dos mamíferos apresenta características morfológicas variadas, adaptadas às propriedades acústicas do meio ambiente e ao tipo de som que cada espécie necessita ouvir para sobreviver. Em mamíferos de vida terrestre, o tamanho, formato e mobilidade do pavilhão auditivo são variáveis nestas espécies. Na orelha média, a membrana timpânica é delgada e cada ossículo pode vibrar de modo independente. O giro basal da cóclea tem a mesma largura do giro apical, a lâmina espiral óssea é pouco desenvolvida e a membrana basilar é larga e espessa (Heffner et al., 2001). Os mamíferos localizam a fonte de som por meio de três fontes de sinalização. Os dois primeiros sinais de localização são as duas orelhas separadas pela largura da cabeça. Um som vindo da esquerda chega ligeiramente antes e mais alto ao ouvido esquerdo que ao direito. O

cérebro utiliza o tempo de atraso e a diferença de volume sonoro para localizar a fonte do som no espaço no plano esquerda-direita. O terceiro tipo envolve o ouvido externo (pavilhão), responsável por localizar o som no espaço nos planos de frente para trás e de cima para baixo (De Ávila, 2012).

A sensibilidade auditiva varia entre as diferentes espécies (**Figura 4**), de forma que os camundongos possuem percepção auditiva em frequências ultrassônicas com alcance entre 1 e 100 kHz, enquanto que a faixa detectada por humanos está entre 20 Hz e 20 kHz, tornando sua percepção auditiva diferente da de camundongos. Além disso, as análises de audiogramas realizados em camundongos mostram que existe uma maior sensibilidade auditiva na faixa próxima a 16 kHz, enquanto que em humanos é de 4 kHz (Reynolds et al., 2010). Essa diferença na audição coloca a maior parte do alcance de percepção sonora de camundongos acima do que é audível por humanos e torna os sons na extremidade inferior do intervalo humano inaudível para os camundongos. Frequências de som acima da percepção auditiva humana são definidas como ultrassônicas e as frequências abaixo infrassônicas (Turner et al., 2005).

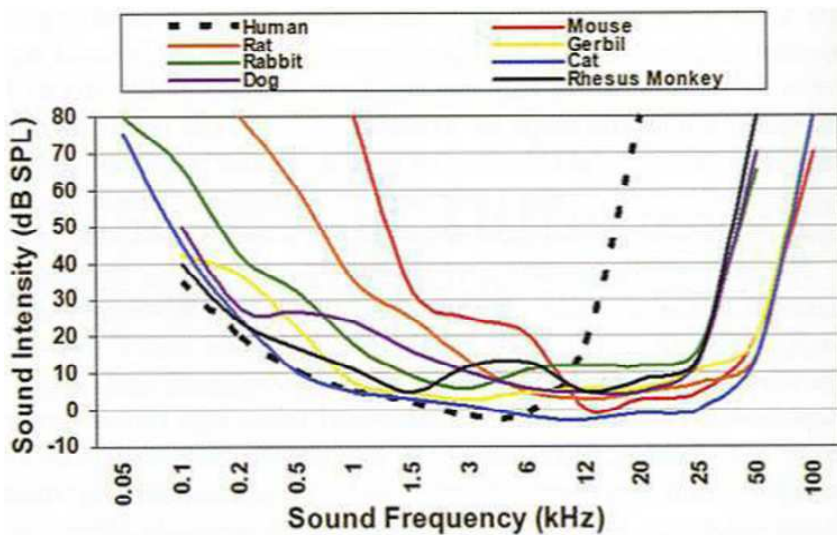


Figura 4: Sensibilidade auditiva de humanos e das principais espécies de animais utilizadas na pesquisa biomédica. Fonte: Turner et al., 2005.

É importante mencionar ainda sobre a grande variabilidade da sensibilidade auditiva entre as linhagens de camundongos (**Tabela 2**) (Turner et al., 2007; Mineur et al., 2009). Algumas linhagens comumente utilizadas desenvolvem patologias graves do sistema auditivo. A linhagem DBA/2 demonstra uma perda auditiva substancial a partir de duas semanas de idade que progride rapidamente até completa surdez com cerca de oito a nove meses de idade. Além disso, o ruído súbito pode causar convulsões fatais nesta linhagem durante um período crítico (3ª e a 4ª semana de vida). A suscetibilidade às convulsões audiogênicas é maior no sistema auditivo imaturo e a exposição a altos ruídos por apenas alguns segundos durante um período crítico no início da vida pode causar desde convulsões resistentes até o desenvolvimento pronunciado da suscetibilidade ao som. As linhagens C57BL/6 e BALB/c utilizadas como background para outras linhagens em estudos genéticos, também mostram uma perda auditiva precoce progressivamente determinada. No entanto, a perda auditiva nestas linhagens progride mais lentamente (Turner et al., 2005).

Tabela 2: Perda auditiva em algumas das linhagens de camundongos mais utilizadas na pesquisa biomédica.

<b>Linhagem</b>	<b>Perda auditiva evidente</b>
BALB/c	2 meses, progressão lenta no próximo ano
C57BL/6	2 meses, progressão lenta no próximo ano
A/J	2 meses, pouca progressão adicional
DBA/2	1 mês, progride rapidamente, camundongos surdos aos 8 a 9 meses de idade
129	3 meses

Fonte: Modificado de Turner et al., 2005.

### ***1.8 Efeitos auditivos e não auditivos do ruído***

O estresse é considerado um fator de risco associado ao desenvolvimento de várias doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, distúrbios mentais, tumores malignos, diabetes mellitus, obesidade, síndrome metabólica, doenças inflamatórias e autoimunes e outros (Puzserova e Bernatova, 2016). Neste contexto, o ruído tem sido considerado um estímulo estressor para os animais e possui um importante componente psicológico, se tornando assim uma possível fonte potencial para o desenvolvimento do medo (Kight e Swaddle, 2011).

No que se refere ao estresse crônico, o ruído tem demonstrado gerar fatores de risco cardiovascular, como aumento da pressão arterial e dislipidemia, aumento da viscosidade sanguínea e glicose no sangue e ativação de fatores de coagulação sanguínea em modelos animais (Muenzel et al., 2017).

Vazzana e colaboradores (2017) publicaram que a resposta ao estresse envolve uma ampla gama de mecanismos fisiológicos, incluindo o metabolismo e a resposta imune, que serão úteis para superar a condição de desequilíbrio desencadeada pela resposta estressante ou primária ao estresse. Com estas respostas, o animal tenta evitar situações de perigo e também situações que colocam em risco a própria vida ou a integridade corporal e, conseqüentemente, lidar com a carga alostática produzida pelo estressor e reintegrar o equilíbrio em todos os sistemas fisiológicos para recuperar a homeostase.

Embora níveis de pressão sonora abaixo de 85dB (A) sejam considerados seguros, níveis mais elevados ( $\geq 100$  dB (A)) demonstraram ser prejudiciais à cóclea e podem levar à perda auditiva. Assim, efeitos vasculares como a disfunção endotelial observados em outros estudos em resposta a níveis de ruído extremamente elevados ( $> 100$ dB (A)) e longos períodos de exposição (2-4 semanas) podem ser secundários aos efeitos diretos do ruído no sistema auditivo. Em contraste, efeitos não-auditivos foram relatados por longos períodos de exposição ao ruído com intensidades substancialmente menores (70 e 85dB (A)), levando a níveis aumentados de corticosterona, parâmetros alterados das glândulas endócrinas, da função cardíaca e de marcadores de estresse oxidativo (Muenzel et al., 2017).

Neste contexto, o ruído pode provocar estresse e afetar significativamente os animais de laboratório alterando parâmetros fisiológicos, imunológicos e comportamentais, comprometendo seus bem-estar e, conseqüentemente, a resistência a patógenos (Vazzana et al., 2017) e os resultados experimentais (Rasmussem et al., 2009).

Importante mencionar que durante a vida precoce dos mamíferos, o sistema nervoso central sofre progressivo desenvolvimento estrutural e funcional e pode ser mais suscetível a fatores ambientais como o ruído (Cheng et al., 2001).

Com relação aos roedores, o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 2010) preconiza que a exposição a ruídos acima de 85dB pode acarretar no desenvolvimento de efeitos auditivos e não auditivos. Estas mudanças são determinadas por características inerentes à espécie e linhagem; pelo nível de ruído intensidade, duração, previsibilidade e outras especificações do som; e ainda pela história do animal e o contexto de exposição ao ruído. Contudo, sons abaixo de 85dB podem parecer não



ser importantes, uma vez que não causam perda auditiva ou desencadeiam uma severa reação ao estresse, mas, a exposição crônica a níveis de pressão sonora moderados pode alterar a forma como o som é processado, modificando a percepção de sons biologicamente relevantes, podendo desencadear alterações fisiológicas, imunológicas e comportamentais.

Estudos relacionaram o ruído com a estimulação do sistema neuroendócrino de resposta ao estresse (Muenzel et al., 2017). Por meio da estimulação crônica ou crônica-intermitente deste sistema, estressores audiogênicos têm sido associados a alterações fisiológicas como hipertensão, hipertrofia cardíaca, alteração do metabolismo eletrolítico, alterações nas respostas imunes, ciclos de estro alterados, diminuição da fertilidade e aumento no número de gestações prematuramente terminadas (Turner et al., 2005; Turner et al., 2007). Cui e colaboradores (2016) demonstraram em seu trabalho que a exposição ao ruído crônico induz alterações persistentes na regulação da glicose, acompanhadas por modificações na microbiota intestinal e respostas imunes do hospedeiro.

Importante mencionar ainda que o padrão de sono é alterado tanto pela exposição aguda quanto pela exposição crônica ao ruído (Abou-Ismaïl et al., 2007). O sistema auditivo pode influenciar estruturas do sistema nervoso central relacionadas com a regulação do sono e assim, contribuir com a homeostase do ciclo sono-vigília (Febinger et al., 2014). Rabat (2007) afirma em seu estudo que o padrão de sono é mais afetado pelos ruídos intermitentes que pelos ruídos contínuos e que os ruídos ambientais são extremamente deletérios ao sono. Acrescenta ainda que animais expostos cronicamente ao ruído em biotérios podem desenvolver diferentes patologias, no entanto pouco se sabe sobre o aparecimento de doenças induzidas pelo ruído. Vários sistemas estão empenhados em enfrentar o desafio e a reorganização metabólica, afetando assim a eficiência de outras funções, incluindo o sistema imunológico. Esta é uma característica comum da resposta ao estresse que pode afetar transitoriamente o sistema imunológico e, conseqüentemente, a resistência a patógenos (Vazzana et al., 2017).

## ***1.9 Herpes simplex-1***

### *1.9.1 Infecção experimental e bem-estar animal*

Com relação aos animais experimentais, um dos estímulos estressores diz respeito à sua condição de saúde prejudicada, uma vez que além de todas as variáveis presentes no

ambiente, alguns são ainda infectados pelo patógeno de interesse. Neste sentido é sabido que o bem-estar de um animal doente é mais pobre que o bem-estar de um animal saudável, porém, muito ainda há de ser estudado sobre a magnitude dos efeitos de doença sobre o bem-estar, já que pouco se sabe sobre o grau de sofrimento associado a muitas doenças (Broom e Molento, 2004). Neste contexto, o vírus *Herpes simplex* tipo I (HSV-1), é um agente infeccioso humano com distribuição em todo o mundo e tem sido foco de muitos estudos em modelos murinos (Mansur et al., 2005; Lima et al., 2010; Zolini et al., 2014; Lucinda et al., 2017).

### 1.9.2 HSV-1

A nomenclatura oficial estabelecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) denomina o vírus *Herpes simplex*-1 (HSV-1) como *Human herpesvirus 1* (HHV-1). No entanto, a comunidade científica internacional utiliza o nome *Herpes simplex* vírus 1 (HSV-1). O HSV-1 é integrante da família *Herpesviridae*, dentro da subfamília *Alphaherpesvirinae* e do gênero *Simplexvirus*. Os herpesvírus (família *Herpesviridae*) estão amplamente distribuídos na natureza e compreendem um grupo abundante de vírus de DNA com distinta arquitetura do vírion. Além disso, apresentam uma vasta variedade de espécies hospedeiras e propriedades biológicas variadas, a partir das quais estes vírus são classificados nas subfamílias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (Pellett e Roizman, 2013).

Os herpesvírus são conhecidos por causarem uma ampla variedade de doenças em humanos e, assim como todos os membros do grupo, compartilham uma característica fundamental da família *Herpesviridae*, a habilidade de estabelecer latência em humanos (Zolini, 2012). Eles incluem os vírus do herpes labial e genital (HSV 1 e 2, respectivamente), gênero *Simplexvirus*; e do varicela-zóster (HHV 3), gênero *Varicellovirus*, na subfamília *Alphaherpesvirinae*; o vírus Epstein-Barr (HHV 4), gênero *Lymphocryptovirus*, e o vírus do sarcoma de Kaposi (HHV 8), gênero *Rhadnovirus*, na subfamília *Gammaherpesvirinae*; e o citomegalovírus (HHV 5), gênero *Cytomegalovirus*, e os vírus do exantema súbito infantil (HHV 6 e 7), gênero *Roseolovirus*, na subfamília *Betaherpesvirinae*. Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, inclusive o HSV-1, apresentam ciclo de multiplicação relativamente curto, rápida disseminação em cultura de tecidos, destruição eficiente das células infectadas (Pellet e Roizman, 2013; Roizman et al., 2013).

Os herpesvírus são vírus grandes (100-200 nm) compostos de quatro elementos: cerne, tegumento, capsídeo e envelope, possui fita dupla de DNA variando de 120 a 230 Kpb, que codifica 84 proteínas.

A infecção inicia-se com a ligação de suas glicoproteínas aos receptores de superfície da célula hospedeira. Várias glicoproteínas estão envolvidas na entrada do HSV-1, já tendo sido evidenciado que a ausência destas glicoproteínas impede que o vírus infecte as células (Roizman et al., 2013). O mecanismo de entrada adotado pela partícula viral pode se dar de duas formas ou mediante fusão do envelope do vírus com a membrana plasmática da célula ou por endocitose (Campadelli-Fiume et al., 2012).

Após a entrada na célula, o tegumento e o nucleocapsídeo são então liberados no citoplasma celular sendo transportados através de microtúbulos para o núcleo da célula. Quando a partícula viral atinge o núcleo, o capsídeo se liga ao poro nuclear e o DNA é então liberado no interior do núcleo. Todo o processo desde a ligação até a liberação dos novos vírions dura entre 18 e 20 horas (Roizman et al., 2013).

### 1.9.3 Patogênese e Epidemiologia

Aproximadamente 70% das pessoas já tiveram contato com o *Herpes simplex virus* tipo 1 (HSV-1). HSV-1 é o agente etiológico de herpes labial, herpes cutâneo, lesões oftalmológicas, ceratite, cerato-conjuntivite e, nos imunossuprimidos podem ocorrer sérias lesões oculares e também lesões no sistema nervoso central e até mesmo infecções sistêmicas. Além disso, há o fenômeno de latência e recorrência, com os vírus ficando latentes em um determinado gânglio, por exemplo, no nervo trigêmeo (Lima et al., 2010). Em razão das infecções por estes herpesvírus serem raramente fatais e devido à capacidade de latência destes vírus, acredita-se que cerca de 90% das pessoas no mundo sejam soropositivas para um ou ambos herpesvírus e, portanto, sendo capazes de transmiti-los durante episódios de infecção produtiva (Roizman et al., 2013; Lucinda, 2017).

A patogênese em humanos depende do contato pessoal íntimo de um indivíduo susceptível com alguém que esteja eliminando o vírus. Após a infecção primária, geralmente na mucosa oral, ocorre a primeira multiplicação do vírus nesse local e posterior infecção das terminações nervosas deste tecido, e o vírus é então transportado para os gânglios nervosos, através de fluxo axonal retrógrado (**Figura 5**). O gânglio trigêmeo (GT) torna-se colonizado e passa a abrigar o DNA do vírus latente. A infecção sistêmica é rara. Este evento, apesar de

incomum, pode ocorrer principalmente em infecções neonatais e em pacientes imunodeprimidos. Recorrências ocorrem quando o vírus latente é reativado, sendo transportado, mais comumente, por fluxo axonal anterógrado até a região da infecção primária. Mas em alguns casos, principalmente em pacientes imunossuprimidos, o HSV-1 pode ser reativado e direcionar-se ao sistema nervoso central causando assim um quadro de encefalite. A reativação está normalmente associada a fatores como estresse, variações hormonais, exposição à luz ultravioleta e imunossupressão (Zolini, 2012).

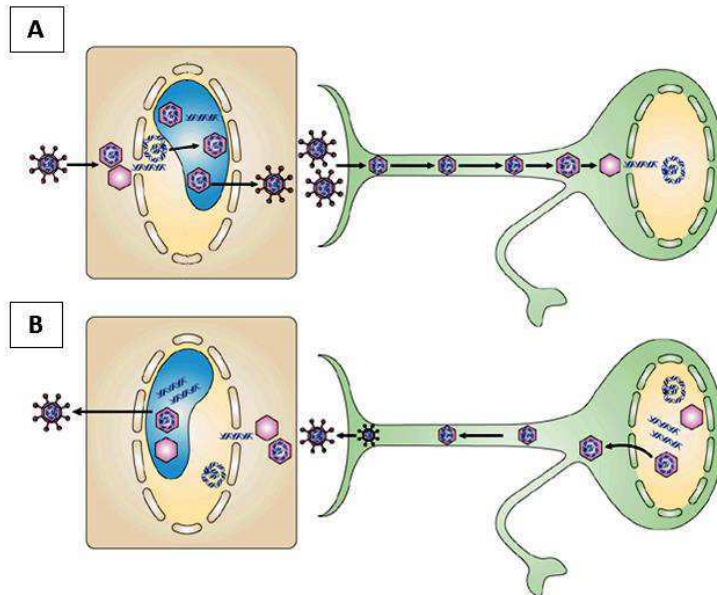


Figura 5: Patogênese da infecção por HSV-1. (A) A infecção de células epiteliais na superfície mucosa, sítio primário de infecção, dá origem a uma infecção produtiva. A progênie viral produzida pode se espalhar para as células epiteliais vizinhas e atingir terminações nervosas. Desta forma, os nucleocapsídeos virais são levados por transporte retrógrado pelos axônios até os gânglios sensoriais, sítio secundário da infecção. O DNA viral é liberado no núcleo neuronal, circulariza e transcritos associados a latência são expressos, estabelecendo o estado latente do vírus. (B) Após a reativação, a expressão de genes líticos é iniciada, com a formação de novos nucleocapsídeos que são conduzidos por transporte anterógrado até às células epiteliais, onde novamente há infecção produtiva. Fonte: Zolini, 2012.

#### 1.9.4 Aspectos gerais da imunidade do hospedeiro

Nas infecções por HSV-1 em modelo murino, receptores Toll-like (TLRs) são responsáveis por reconhecer moléculas associadas a patógenos e, TLR2 e TLR9 juntos, são responsáveis pela defesa de vertebrados contra este vírus (Lima et al., 2010; Zolini et al., 2014; Lucinda, et. al., 2017). Camundongos C57BL/6 produzem citocinas contra o HSV-1 e são resistentes a esse vírus, sobrevivendo à infecção. No entanto, camundongos *knockout* Tlr2/Tlr9 produzem uma quantidade menor de citocinas pró-inflamatórias e são suscetíveis à infecção de maneira dose-dependente. Além disso, pouco se sabe sobre a alteração genética feita no animal e a propensão ao desenvolvimento do estresse auditivo associado a uma infecção experimental. A infecção primária por HSV-1 induz a uma resposta inflamatória intensa no sítio de infecção. Esta resposta leva à infiltração de células, principalmente linfócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e natural killer (NK), bem como, à produção de citocinas variadas, por exemplo, os interferons (IFNs) do tipo I e tipo II. Os IFNs do tipo I ativam macrófagos e células NK, os quais atuam matando células infectadas enquanto as DCs fazem a apresentação de antígenos. Mediante a apresentação de antígenos, os linfócitos T têm suas funções efetoras ativadas, sendo a atividade de células T CD8+ importante para o combate à infecção. Assim, em cooperação, componentes da imunidade inata e adaptativa agem em conjunto no controle da infecção por HSV-1 (Lucinda et al., 2017).

Desta forma, até a maturação da resposta imune adaptativa, caracterizada pela produção de anticorpos neutralizantes e ativação da atividade efetora de linfócitos T CD4+ e CD8+, a imunidade inata torna-se a primeira barreira no combate à infecção viral. Este fato é especialmente evidente durante infecções primárias onde não há uma resposta “montada” para combater o vírus. Por esta razão, têm sido crescentes os relatos que destacam o papel da imunidade inata diante de infecções por HSV-1, especialmente por meio da ativação dos TLRs (Lima et al., 2010; Zolini et al., 2014).

O propósito deste trabalho foi avaliar se a exposição crônica de camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup>, não infectados (controle) e infectados por HSV-1 com baixa multiplicidade de infecção (m.o.i.), a diferentes níveis de ruído em biotério de experimentação, promove impactos em testes fisiológicos, de resposta imune e comportamentais. Mesmo em ambientes padronizados como os biotérios, os animais estão expostos a uma grande variedade de ruídos durante a rotina diária e a procedimentos experimentais como a inoculação dos patógenos de interesse, podendo assim comprometer

seu bem-estar, o que pode levar a alterações de parâmetros fisiológicos, comportamentais e de resposta imune. Desta forma, este estudo poderá auxiliar na promoção do sucesso da manutenção destes animais experimentais em cativeiro, uma vez que a exposição contínua a níveis de ruídos moderados poderia resultar em efeitos que não são avaliados a longo prazo, contudo de grande importância no bem-estar dos animais. Além disso, a avaliação de camundongos geneticamente modificados se torna relevante, pois não é conhecido se a percepção do ruído por estes animais tem alguma alteração em decorrência da manipulação genética, uma vez que não se sabe ao certo todas as implicações da deleção de um gene no organismo. Adicionalmente, este trabalho poderá contribuir com ações que promovam o bem-estar animal e, conseqüentemente, trazer melhorias para o resultado das pesquisas que utilizam o modelo animal, fortalecendo assim a Ciência em Animais de Laboratório no país.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral*

Verificar se a exposição crônica a ambientes com níveis de ruídos distintos no biotério de experimentação altera parâmetros comportamentais, fisiológicos e de resposta imune em camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> não infectados e experimentalmente infectados com baixa multiplicidade de infecção (m.o.i.) por HSV-1, comprometendo assim o bem-estar dos animais.

### 2.2 *Objetivos Específicos*

Levantar e monitorar o nível de ruído nas salas de animais do biotério de experimentação nas frequências audíveis aos camundongos (1 kHz a 100 kHz) para posterior seleção das salas mais ruidosa e mais silenciosa;

Avaliar parâmetros fisiológicos, de resposta imune e comportamentais, em camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> não infectados e experimentalmente infectados com baixa m.o.i. por HSV-1;

Avaliar o peso corporal dos animais antes e 15 após o a infecção por HSV-1 e a concomitante exposição aos ruídos;

Avaliar a atividade locomotora e exploratória dos camundongos, bem como o nível de ansiedade por meio dos testes comportamentais campo aberto (*Open Field Test*) e claro/escuro (*Light/Dark Box Test*);

Determinar a contagem global de leucócitos, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, hematócrito, índices hematimétricos e número de plaquetas presentes no sangue dos camundongos;

Determinar a concentração de colesterol e glicose no sangue dos camundongos;

Determinar a concentração de corticosterona presente nas fezes dos camundongos;

Determinar a produção das citocinas TNF alfa, IFN gama, IL2 e IL4 no gânglio trigêmeo dos camundongos.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Levantamento dos níveis de ruído no biotério

Inicialmente, um estudo dos níveis de ruído usualmente encontrados em quatro salas diferentes (ruídos antropogênicos e ruídos provenientes de equipamentos) foi realizado no biotério de experimentação (BIOTEX) do Instituto René Rachou (IRR)/FIOCRUZ Minas Gerais, com o propósito de selecionar a sala que apresentava o menor nível de ruído e a sala com o maior nível de ruído. A composição interna de cada sala é variável contendo: somente estantes abertas de ferro e/ou racks ventilados de aço inox e/ou estantes ventiladas (PVC rígido, polipropileno e alumínio) e/ou módulo de troca de camundongos. O número de usuários e bioteristas também varia em cada sala. Importante salientar que todas as salas estavam localizadas em um mesmo dentro do biotério e que o acabamento da pintura das paredes e teto era em tinta epóxi que, embora facilite a limpeza e desinfecção é altamente reflexiva ao som.

A faixa de frequência selecionada para medição dos níveis de ruído foi de 1kHz a 100kHz, uma vez que este é o espectro auditivo de camundongos. Contudo, também serão apresentados dados na frequência auditiva humana (20 Hz a 20 kHz) em  $L_{Aeq}$  (humana - A) e  $L_{Zeq}$  (linear - Z) com o propósito de comparação, já que em muitos trabalhos os resultados são expressos nas curvas A ou Z.

Os ruídos foram medidos diariamente em diferentes períodos durante todo o dia por quatro semanas, durante o expediente de trabalho e fora dele. O período da manhã compreendeu o horário de 6 às 12h, o da tarde de 12 às 18h e o da noite de 18 às 06h do dia seguinte. Durante o expediente foram feitos dois tipos de registros de acordo com o tráfego de pessoas: (1) somente com a presença dos funcionários do biotério e (2) com a presença dos usuários e dos funcionários do biotério. Todos os registros tiveram a duração de 10 minutos. Os microfones foram colocados em seis pontos diferentes em cada sala e, a média destes pontos foi utilizada para o cálculo dos níveis de ruído por sala e posterior definição da sala com menor nível de ruído ("Silêncio") e maior nível de ruído ("Ruído").

### 3.2 Gravação dos níveis de ruído e configuração dos medidores

A gravação dos níveis de ruído foi feita utilizando dois medidores: Bruel & Kjaer tipo 2270 (B&K2270) (**Figura 6**) e AR125 da Binary Technology Acoustic (AR125BAT) (**Figura 7**). O medidor de nível sonoro B&K2270 é capaz de medir o nível contínuo equivalente durante o intervalo de tempo determinado pelo operador nas frequências entre 20 Hz e 20 kHz nas curvas de ponderação em A, C e Z que podem ultrapassar 100 dB. Ele é capaz de registrar a cada um segundo os resultados de até doze diferentes descritores medidos simultaneamente, possibilitando o pós-tratamento dos dados das medições e construção de gráficos da variação dos níveis de ruído no tempo. Este instrumento também possui analisadores seriais em faixas de frequência com microfone capacitivo de 1/2" e analisador de terças de oitava. Para este trabalho, o descritor  $L_{eq}$  (nível equivalente) foi utilizado nas curvas A (usada para humanos) e Z (linear - apropriada para animais). Este equipamento foi configurado também para a escala de 1 a 20 kHz em Z, que será denominado de LZespecial ( $L_{Zesp}$ ). A proposta deste descritor é a realização de uma análise mais apropriada da percepção do ruído por camundongos feita por este equipamento. Para ajuste do medidor de nível sonoro foi utilizado um calibrador sonoro modelo B&K 4231, também de classe I. Como este medidor possui um alcance de até 20 kHz, AR125BAT foi utilizado para captação e gravação das frequências em ultrassom (20 kHz a 100 kHz). Este equipamento emprega um elemento ultrassônico direcional e de banda larga em conjunto com uma tecnologia de conversão fluxo ultrassônico para digital. Esta conversão produz um fluxo acústico de 16-bit, de alta qualidade e com uma amostragem de frequências definidas e este fluxo é injetado diretamente em um laptop, desktop ou gravador. O AR125BAT tem uma faixa de frequência de 1 a 125 kHz na curva de ponderação em "Z", em até 90 dB. O software Raven Pro 1.5 software foi utilizado para análise dos dados (Raven Pro 1.5, The Cornell Lab of Ornithology, USA).



Figura 6: Medidor de nível sonoro B&K 2270. Fonte: Bruel & Kjaer



Figura 7: Medidor de nível sonoro AR125 Binary Technology Acoustic. Fonte: Binary Technology Acoustic

Os medidores foram posicionados da seguinte forma: corpo do medidor B&K2270 fora do mini-isolador com o microfone posicionado dentro; corpo e microfone do medidor AR125BAT dentro do mini-isolador confeccionado em polisulfona (**Figura 8**). Na tentativa de simular ao máximo o ambiente em que o animal vive, manteve-se a grade e a maravalha na caixa. Em decorrência da colocação do medidor AR125BAT na grade, não foi possível manter o bebedouro com água e a ração que, contudo, foram preliminarmente medidos e apresentaram pouco efeito na medição do som (<1 dB). O posicionamento do mini-isolador

na estante de ferro ou rack (de acordo com a sala) seguiu o valor encontrado no ponto mais próximo à média, representando toda a sala. Desta forma, as caixas foram colocadas na área central da sala e no meio da estante ou rack ventilado e, neste caso, conectados à válvula de insuflamento de ar.

A metodologia empregada para a determinação do período e do tempo de gravação foi a mesma utilizada no **Item 3.1 Levantamento dos níveis de ruído no biotério.**



Figura 8: Medidor es posicionados dentro do mini-isolador.

### **3.3 Considerações éticas**

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ) com número de Licença LW-20/15. Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais seguiram a Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA do CONCEA e a legislação vigente - Lei 11.794/2008, bem como as resoluções normativas preconizadas por este Conselho.

### 3.4 Camundongos

Os camundongos C57BL/6 foram obtidos do Instituto René Rachou / FIOCRUZ MG (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e os camundongos *knockouts* para Tlr2/Tlr9 foram gentilmente cedidos por Alan Sher do National Institutes of Health (NIH, EUA). Os camundongos Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> foram construídos em background C57BL/6. Desta forma, foram utilizados três casais de cada linhagem (C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>) por sala (“Silêncio” e “Ruído”) para acasalar e gerar os animais estudados. Após a infecção e antes de iniciar os testes comportamentais, fisiológicos e imunológicos (até 15 dias após a infecção), nos grupos C57BL/6 infectados e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> infectados da sala “Ruído”, houve mortalidade de 1 e 2 animais, respectivamente, que não foram contabilizados em nenhuma das análises de dados. Desta forma, um total de 51 camundongos machos foram utilizados, 27 da linhagem C57BL/6 e 24 da linhagem Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>. Os animais foram mantidos em grupos de 2-3 animais após o desmame (realizado com 4 semanas) e distribuídos da seguinte forma: C57BL/6 (7 controles e 7 infectados na sala "Silêncio" e 7 controles e 6 infectados na sala "Ruído"); Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> (6 controles e 7 infectados na sala "Silêncio" e 6 controles e 5 infectados na sala "Ruído"). Machos foram utilizados devido a maior disponibilidade deste sexo no biotério. Os camundongos foram expostos, a partir do nascimento, por seis semanas (exposição crônica) aos ruídos encontrados nas salas "Silêncio" ou "Ruído" do biotério e, ao final deste período, foi realizada a infecção por HSV-1. A escolha por este período de exposição diz respeito ao tempo em que geralmente os animais permanecem no biotério em experimentação. Quinze dias após a infecção foram avaliados os parâmetros fisiológicos, de resposta imune e comportamentais dos animais.

Os animais foram mantidos no BIOTEX com temperatura variando entre 20 e 24°C, umidade entre 40 e 60%, iluminação cíclica controlada por timer com fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro (7:00 às 19:00) e sistema de ar condicionado central em todas as salas. Com relação às salas onde os animais foram mantidos, a sala "Silêncio" possui somente estantes abertas de aço e acesso de somente um usuário, por outro lado a sala "Ruído" possui dois racks ventilados, uma estante ventilada, um módulo de troca e acesso de aproximadamente oito usuários.

Todos os animais do estudo foram mantidos em mini-isoladores (37cm x 24,2cm x 24cm), a fim de minimizar qualquer interferência externa ao microambiente em seu comportamento, como por exemplo, os odores e feromônios presentes no ambiente. Para

prover o bem-estar dos animais algodão hidrófobo e papel toalha foram alternados e colocados em todos os mini-isoladores como itens de enriquecimento ambiental. O manejo foi realizado duas vezes por semana por um único técnico no período da tarde. Todos os animais possuíam livre acesso à água e ração (Nuvilab CR1 Autoclavable, Quimtia, Brasil).

### **3.5 Vírus**

Para a infecção dos animais, foi utilizado o isolado HSV-1 EK, denominado neste trabalho como HSV-1. Esta amostra é um isolado clínico do vírus, proveniente de herpes labial em adulto saudável, que foi isolado em células Vero (ATCC) no Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (Nogueira et al., 1998).

#### **3.5.1 Titulação por contagem de placas**

Para a verificação do título viral do estoque mantido no laboratório,  $2 \times 10^6$  células Vero (rim de macaco verde africano) por poço foram implantadas em placas de seis poços com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*) com 5% de SFB (Soro Fetal Bovino) e incubadas por 24 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Diluições seriadas do vírus (em meio DMEM sem SFB) em base exponencial de 10 foram adsorvidas por uma hora e homogeneizadas a cada quinze minutos. Um poço foi utilizado para controle e, por isso, recebeu apenas meio DMEM sem SFB. Após a adsorção foram adicionados 3 ml de DMEM com 2% de SFB contendo 1,5% de Carboxi-metilcelulose (CMC) (Gibco) e incubados novamente a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 72 horas a monocamada foi fixada com formaldeído a 3,7% em PBS e corada com cristal violeta a 1%. O número de placas foi contado na diluição que apresentou entre 30 e 300 placas de lise. O título foi expresso em unidades formadoras de placa por mililitro (p.f.u./mL).

#### **3.6 Avaliação do ganho de peso**

Anteriormente à infecção, com o auxílio de uma balança semi analítica (BS3000A/3000g -0,1 g, Bioprecisa, Brasil), os camundongos foram pesados e, 15 dias após a infecção eles foram novamente pesados.

### 3.7 Anestesia

Após as seis semanas de exposição ao ruído, o animal foi anestesiado com a combinação dos fármacos cloridrato de quetamina 10% (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/Kg), via intraperitoneal, quadrante lateral inferior direito, utilizando-se agulha 25 x 5 mm. Após a anestesia, foi feita a infecção por HSV-1 e, em seguida, os animais retornaram para suas salas de origem "Silêncio" ou "Ruído", onde permaneceram por mais 15 dias.

### 3.8 Infecção por *Herpes simplex-1*

A infecção dos camundongos por HSV-1 teve como objetivo avaliar se a presença do patógeno de forma subclínica comprometeria o bem-estar dos animais em decorrência da exposição a diferentes níveis de ruído. Desta forma, previamente ao experimento foram feitos testes com diferentes titulações do vírus a fim de se avaliar o quadro clínico do animal e a resistência à infecção por um período de 30 dias. Cada titulação foi testada em seis camundongos machos das linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>. Foram testadas as seguintes titulações  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$  e  $2 \times 10^2$  p.f.u. do vírus. Partiu-se desta titulação por meio de experiência prévia do nosso grupo, uma vez que Lima e colaboradores (2010) demonstraram que na infecção com  $10^6$  p.f.u do vírus ocorre mortalidade de 10% dos camundongos C57BL/6 e 100% dos camundongos Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> de cinco a seis dias após a infecção. Importante mencionar que houve mortalidade dos camundongos Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> até a titulação  $2 \times 10^3$  p.f.u do vírus, sendo de 33% nesta última, em até uma semana após a infecção. Por esta razão foi utilizada uma baixa multiplicidade de infecção (m.o.i) de  $2 \times 10^2$  p.f.u. do vírus, pois além da sobrevivência dos animais após 15 dias da infecção (exposição crônica), com este título os camundongos apresentaram ausência de sinais clínicos para a doença, de forma a garantir que não houvesse um viés nos testes de comportamento. Os sinais clínicos característicos são piloereção, arqueamento do dorso, paralisia das patas, diminuição do comportamento exploratório.

### 3.8.1 Infecção Intranasal

O vírus foi inoculado por via intranasal com  $2 \times 10^2$  p.f.u., em um volume final de 5  $\mu$ L. Já os camundongos controles foram inoculados por via intranasal com 5  $\mu$ l PBS (Tampão fosfato-salino).

Após a infecção dos animais com seis semanas, os mesmos retornaram à sua sala de origem onde permaneceram por mais duas semanas. Ao término do período de exposição aos ruídos com a infecção, o animal foi novamente pesado. Em seguida, foram feitos os testes de comportamento em dois dias e, após, foi realizada a coleta de sangue acompanhada pela eutanásia dos animais para retirada do gânglio trigêmeo.

### 3.9 Testes de comportamento

Quinze dias após a infecção dos camundongos foram realizados os testes de comportamento sempre pela manhã, quando os animais completaram oito semanas de vida e de exposição concomitante aos diferentes níveis de ruído. Para este fim foi escolhida uma sala vazia no BIOTEX com características ambientais (luminosidade, temperatura, umidade) similares às que os animais foram mantidos durante todo o experimento, com exceção do ruído. Os animais foram ambientados por um período de uma hora antes do início de cada teste. Primeiramente foi realizado o teste campo aberto (*Open Field Test*) (Walsh e Cummins, 1976; Carola et al., 2002) e, no dia seguinte, o teste claro-escuro (*Light/Dark Box Test*) (Crawley e Goodwin, 1980; Heredia et al., 2014), pelo fato deste último ser um teste pouco influenciado por outros. A ordem dos testes está de acordo com Crawley e Paylor (1997) e McIlwain et al. (2001).

Pesquisas anteriores estabeleceram que o manejo de camundongos usando um túnel ou a mão em forma de concha é uma forma não aversiva de manipulação do animal, reduzindo a ansiedade em comparação com o método tradicional de suspensão pela cauda (Gouveia e Hurst, 2017). Desta forma, todos os animais foram introduzidos na caixa durante os testes com a mão em forma de concha.

O teste campo aberto foi realizado em uma arena quadrada fabricada em acrílico bem iluminada (68 cm  $\times$  68 cm) com paredes de 30 cm de altura e dividida em 16 quadrantes (17 cm  $\times$  17 cm). O animal foi colocado no quadrante central com posição e orientação padrão e os seus comportamentos foram registrados por uma câmera durante 10 minutos. Entre cada



teste foi realizada a desinfecção da caixa com álcool 70% e deixado o mesmo evaporar como uma forma de impedir que o cheiro do animal anterior interferisse na exploração do animal seguinte. Neste teste foram avaliados a distância total percorrida pelo animal, o número de entradas no centro e o tempo de permanência no centro.

Para a realização do teste claro-escuro foi feita uma adaptação na arena utilizada para a realização do teste de campo aberto. Desta forma, metade do compartimento permaneceu bem iluminada (34 cm x 68 cm) e a outra metade escura (34 cm x 68 cm). Todo o compartimento escuro também foi fabricado em acrílico e à prova de luz. Os compartimentos foram separados por uma divisória com uma abertura (7 cm x 7 cm) no centro ao nível do chão, de forma a permitir o livre deslocamento do animal de um compartimento para outro. No momento do teste, o animal foi colocado no centro do compartimento iluminado com a cabeça voltada para o lado oposto à abertura do compartimento escuro e os seus comportamentos foram também registrados por uma câmera durante 10 minutos. A distância percorrida no compartimento claro, o número de entradas no compartimento escuro, bem como o tempo de permanência neste compartimento foram analisados. Entre cada teste foi realizada a desinfecção da caixa com álcool 70% e deixado o mesmo evaporar como uma forma de impedir que o cheiro do animal anterior interferisse na exploração do animal seguinte.

As gravações foram feitas com o auxílio de uma câmera de vigilância e, em seguida, analisadas com o software ANY-maze Behavioural tracking software (ANY-maze Behavioral Tracking Software, Stoelting Co, USA).

### ***3.10 Coleta de sangue***

O procedimento de coleta de sangue foi sempre realizado no período da manhã, a fim de se evitar variações nos parâmetros. Inicialmente foi feita a anestesia dos animais conforme descrito no **Item 3.7 Anestesia**, onde a profundidade da anestesia foi avaliada pela ausência do reflexo podal e, em seguida foi realizada a punção cardíaca de acordo com Hoff (2000).

A identificação do local da punção é de 10 a 30° acima do abdômem, lateralmente à cartilagem xifóide. O volume total de sangue coletado foi de aproximadamente 500 µL. As amostras de sangue coletadas foram utilizadas para os procedimentos de avaliação dos parâmetros hematológicos.

### **3.11 Eutanásia e coleta do gânglio trigêmeo**

Quando o procedimento de sangria total não levou o animal ao óbito, o mesmo foi submetido à eutanásia por overdose de Tiopental, sendo a dosagem de três a quatro vezes maior que a dose anestésica (50 mg/Kg), ou seja, 150 mg/Kg ou 200 mg/Kg. A verificação do óbito dos animais foi realizada pela ausência de sinais vitais como batimentos cardíacos e movimentos respiratórios.

O órgão alvo do estudo (gânglio trigêmeo) foi retirado de forma asséptica, processado imediatamente em solução de PBS contendo inibidores de protease (cOmplete, Mini, EDTA-free - La Roche, USA) com o auxílio de um homogeneizador de tecidos e, em seguida, armazenado a -70°C para posterior realização da quantificação de citocinas.

### **3.12 Determinação de parâmetros hematológicos**

Os perfis hematológicos foram determinados por meio da realização de hemogramas, onde foi utilizado o contador hematológico de células semi-automático ABX Micros ABC Vet (Micros ABC Vet, Horiba ABX, USA), apropriado para mensuração de parâmetros hematológicos veterinários. O equipamento utiliza métodos baseados na variação da impedância gerada pela passagem das células diluídas em um diluente eletrolítico através de micro-orifícios calibrados (parâmetros de contagem das células e determinação do hematócrito) e na determinação espectrofotométrica após a lise das células vermelhas com diluente contendo ferricianeto e cianeto de potássio (parâmetros de dosagem de hemoglobina).

Desta forma, do volume total de sangue coletado de cada animal, aproximadamente 50 µL foram retirados e acondicionados em eppendorfs de 1,5 mL, previamente identificados, contendo 5 µL de EDTA (Etilenodiaminotetracético) como anticoagulante. Os parâmetros avaliados foram: global de leucócitos, contagem de eritrócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina, índices hematimétricos e número de plaquetas. Para verificar a calibração do equipamento foi utilizado o sangue controle ABX Minotrol 16 alto (H), normal (N) e baixo (L) previamente ao início de cada experimento.

### **3.13 Concentração de colesterol e glicose**

Anteriormente a coleta de sangue para a determinação do perfil bioquímico, os animais ficaram em jejum por um período entre 8 e 12 horas. Foram coletados 200 µL de sangue de cada animal em eppendorfs de 1,5 mL, previamente identificados e centrifugados a 4.750 g por 10 minutos a temperatura ambiente para obtenção do soro. Posteriormente, o soro foi rapidamente coletado e congelado a -70°C e as amostras que apresentaram hemólise excessiva foram descartadas.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas por meio de espectrofotometria, utilizando-se o analisador bioquímico semi-automático Bioplus-200 (Bio-200, Bio Plus, Brazil). Foram dosados os parâmetros Colesterol Total e Glicose. A programação de todas as químicas foi inserida no equipamento utilizado conforme pré-estabelecido pelo fabricante dos kits. O volume mínimo de amostra para realização dos testes é de 10 µL e o volume de aspiração da cubeta é de 150 µL. Desta forma, em ambas as químicas foi utilizado 10 µL de soro e 1mL do reagente.

A leitura das químicas de cada indivíduo seguiu a seguinte ordem: branco, controles normal e patológico, calibradores (quando aplicável), amostras (única). A fim de se verificar a reprodutibilidade dos testes, foi escolhida aleatoriamente uma amostra/dia para ser lida novamente no dia seguinte. Para verificação do controle interno de qualidade dos ensaios foi utilizado o reagente Controlab Labtest Diagnóstica (dosagens normal e patológica) previamente às amostras de soro de animais de cada parâmetro.

Os kits das químicas utilizados para a realização dos ensaios foram adquiridos da Labtest Diagnóstica (Labtest, Labtest Diagnóstica Lagoa Santa, Brazil) e sua utilização foi realizada de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante ([www.labtest.com.br](http://www.labtest.com.br)).

### **3.14 Concentração de corticosterona**

As fezes de cada animal foram imediatamente coletadas com o auxílio de uma pinça após a defecação nos testes de comportamento. As amostras foram armazenadas em tubos eppendorfs de 1,5 mL, misturadas e estocadas a -20°C no intervalo máximo de 4 horas após a defecação, a fim de evitar a possível degradação dos metabólitos por enzimas bacterianas. Os esteróides fecais foram extraídos por diluição das fezes em metanol segundo o protocolo recomendado por Palme (2005). As amostras foram pesadas e homogeneizadas com metanol

80% em vortex durante 2 minutos. A quantidade de metanol foi de 1 mL para amostras pesando 0,05 g. A seguir os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 5.200 rpm em centrífuga (Microcentrifuge 5415R, Eppendorf, USA). O sobrenadante foi armazenado a -20°C até a realização dos ensaios de dosagem. As dosagens foram realizadas com o kit comercial para ELISA (Corticosterone ELISA Kit, Enzo Life Science, USA), seguindo instruções do fabricante.

### **3.15 Avaliação da produção de citocinas por Cytometric Beads Array**

Ensaio citofluorométrico com microesferas fluorescentes (*Cytometric Beads Array* – CBA, BDPharmingen, USA) foram realizados para dosar os níveis de TNF, IFN gama, IL2 e IL4 no gânglio trigêmeo de animais C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> infectados e não infectados. Nestes ensaios empregou-se uma mistura de microesferas recobertas com anticorpos específicos, com distintas intensidades de fluorescência, que combinada à citometria de fluxo permitiram a medida das citocinas de interesse.

Assim, para a realização destes ensaios foi utilizados os gânglios trigêmeos (GTs) que foram extraídos e imediatamente homogeneizados em solução de PBS contendo inibidores de protease (cOmplete, Mini, EDTA-free - La Roche, USA). Posteriormente, para separação dos debris celulares, os homogenatos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C (Microcentrifuga Eppendorf 5415R, Sigma-Aldrich, USA). Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e procedeu-se com a dosagem utilizando o *Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit* (CBA, BD Pharmingen, USA), de acordo com as orientações do fabricante. A leitura das amostras foi feita no equipamento BD FACScan (BD FACScan, BD Biosciences, USA).

### **3.16 Análise estatística dos dados**

As análises estatísticas foram feitas usando o programa GraphPad Prism 6 (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA*). Os grupos amostrais foram avaliados e considerados não paramétricos ou paramétricos, de acordo com o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Na comparação feita em cada sala entre as quatro semanas de gravação dos ruídos, o teste Mann Whitney foi utilizado. Para as análises dos níveis de ruído foram feitas comparações utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido da comparação múltipla de Dunn ou usando o teste Mann Whitney. Para avaliar os efeitos da infecção e do ruído, ANOVA *two-way* (análise de

variância entre dois fatores) foi utilizado, seguido pelo pós-teste de Tukey. No pós-teste as seguintes comparações foram feitas em camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>: (S-controle (S = “Silêncio”) x R-controle (R= “Ruído”); S-controle x S-infectado; R-controle x R-infectado; S-infectado x R-infectado) e entre linhagens (S-controle x S-controle; R-controle x R-controle; S-infectado x S-infectado; R-infectado x R-infectado). O intervalo de confiança foi definido como 95% ( $p < 0,05$ ). Dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) para dados paramétricos e mediana  $\pm$  intervalo interquartil (IQR) para dados não paramétricos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Níveis de ruído no biotério

Com relação ao levantamento dos níveis de ruído encontrados no BIOTEX, foram feitas gravações em diferentes períodos do dia (manhã, tarde e noite) nos descritores ( $L_{Aeq}$ ,  $L_{Zeq}$  e  $L_{Zesp}$ ) em diferentes frequências (1kHz a 100kHz). Importante mencionar que no medidor B&K2270 foram feitas as seguintes medições:  $L_{Aeq}$  e  $L_{Zeq}$  - 20Hz a 20kHz e  $L_{Zesp}$  - 1kHz a 20kHz. No medidor AR125BAT foram feitas medições na curva de ponderação Z - 1kHz a 100kHz. Quatro salas foram analisadas e em todos os experimentos, o registro do ruído foi realizado três vezes ao dia durante quatro semanas e a mediana obtida em cada um dos diferentes ambientes foi: sala 1  $L_{Aeq}$  63,40 dB,  $L_{Zeq}$  87,70 dB; sala 2  $L_{Aeq}$  54,63 dB,  $L_{Zeq}$  82,49 dB; sala 3  $L_{Aeq}$  56,15 dB,  $L_{Zeq}$  83,07 dB; sala 4  $L_{Aeq}$  58,86 dB,  $L_{Zeq}$  84,04 dB. Na comparação feita em cada sala entre as quatro semanas de gravação de ruído não houve diferença. Em seguida, foram definidas as salas "Silêncio" ( $L_{Aeq}$  54,63 dB e  $L_{Zeq}$  82,49 dB) e "Ruído" ( $L_{Aeq}$  63,40 dB e  $L_{Zeq}$  87,70 dB). Nas análises feitas pelo medidor B&K2270, conforme a **Figura 9A**, a sala menos ruidosa em que há somente estantes abertas e acesso de somente um usuário e bioteristas, denominada neste trabalho como "Silêncio", apresentou diferença significativa entre os períodos manhã e tarde e manhã e noite (ambos  $p < 0,0001$ ) em  $L_{Aeq}$  e  $L_{Zesp}$ . No descritor  $L_{Zeq}$ , os períodos manhã e noite ( $p < 0,0001$ ) e tarde e noite ( $p < 0,001$ ) apresentaram diferença significativa. Nesta sala é possível verificar que o período da manhã apresenta um maior nível de ruído em todas as curvas de ponderação. Já a sala mais ruidosa (**Figura 9B**) que possui racks e estantes ventiladas, bem como módulo de troca de animais e acesso de aproximadamente oito usuários e bioteristas, denominada neste trabalho como "Ruído", apresentou diferença significativa entre os períodos manhã e tarde e entre tarde e noite (ambos  $p < 0,0001$ ) em  $L_{Aeq}$  e  $L_{Zesp}$ . No descritor  $L_{Zeq}$  houve diferença significativa somente entre tarde e noite ( $p < 0,001$ ). Na sala "Ruído" o maior nível de ruído ocorreu no período da tarde em todos os descritores. É possível ainda perceber a ocorrência de ruído de fundo constante em ambas as salas que pode ser verificado pelos resultados do período noturno (**Figura 9A e B e Tabela 3**).

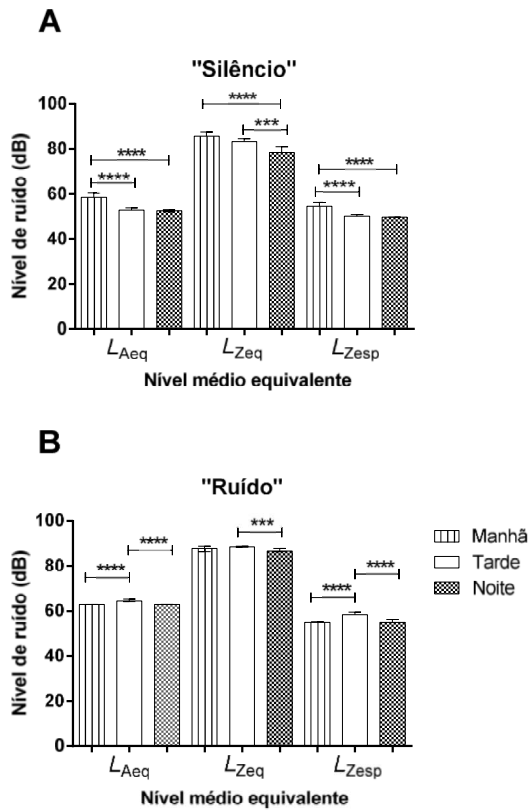


Figura 9A e B: Nível de ruído encontrado nas salas "Silêncio" e "Ruído" utilizando o medidor B&K2270. Comparação dos períodos do dia (manhã, tarde e noite) nos descritores  $L_{Aeq}$ ,  $L_{Zeq}$  e  $L_{Zesp}$ . Os resultados destacam os valores da mediana e interquartis (25% e 75%). Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido da comparação múltipla de Dunn, onde \*\*\* representa  $p < 0,001$  e \*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ .  $L_{Aeq}$  (nível médio equivalente ponderado em "A"),  $L_{Zeq}$  (nível médio equivalente ponderado em "Z") e  $L_{Zesp}$  (nível médio equivalente ponderado em "Zespecial").

A Tabela 3 apresenta os valores encontrados para a mediana e interquartis (25% e 75%) dos níveis de ruído para cada descritor ( $L_{Aeq}$ ,  $L_{Zeq}$  e  $L_{Zesp}$ ) e período do dia (manhã, tarde e noite) nas salas "Silêncio" e "Ruído", utilizando o medidor B&K2270.

Tabela 3: Mediana e valores interquartis (25% e 75%) do nível de ruído, utilizando o medidor B&K2270, encontrados nas salas "Silêncio" e "Ruído" em  $L_{Aeq}$  (nível médio equivalente ponderado em "A"),  $L_{Zeq}$  (nível médio equivalente ponderado em "Z") e  $L_{Zesp}$  (nível médio equivalente ponderado em "Zespecial") nos períodos da manhã (6 às 12h), tarde (12 às 18h) e noite (18 às 6h).

Sala/ Período	$L_{Aeq}$ (dB)	$L_{Zeq}$ (dB)	$L_{Zesp}$ (dB)
<b>"Silêncio"</b>			
Manhã	58,5	85,72	54,55
	56,7 - 60,47	82,66 - 87,66	53,17 - 56,17
Tarde	52,83	83,27	50,11
	52,16 - 53,98	81,31 - 84,56	49,18 - 50,81
Noite	52,57	78,48	49,67
	51,78 - 52,57	78,48 - 81,01	49,54 - 49,67
<b>"Ruído"</b>			
Manhã	62,84	87,95	55,03
	62,0 - 62,90	86,43 - 88,8	54,71 - 55,29
Tarde	64,44	88,5	58,39
	64,17 - 65,34	88,34 - 88,83	57,38 - 59,63
Noite	62,9	86,67	55,03
	62,84 - 63,03	86,43 - 87,95	54,71 - 56,19

$L_{Aeq}$ : nível médio equivalente ponderado em "A",  $L_{Zeq}$ : nível médio equivalente ponderado em "Z",  $L_{Zesp}$ : nível médio equivalente ponderado em "Zespecial", dB: decibél

Na análise comparativa entre as salas (**Figura 10A, B e C e Tabela 3**) utilizando o medidor B&K2270 foi possível verificar diferença significativa em todos os períodos do dia avaliados (manhã, tarde e noite). Com relação ao período da manhã (**Figura 10A**), a sala "Ruído" apresenta um maior nível de ruído que a sala "Silêncio" nos descritores  $L_{Aeq}$  ( $p < 0,001$ ) e  $L_{Zeq}$  ( $p < 0,01$ ). Já nos períodos da tarde e noite a sala "Ruído" apresenta maior nível de ruído que a sala "Silêncio" em todos os níveis os descritores utilizados, com valor de  $p < 0,0001$  (**Figura 10 B e C**).



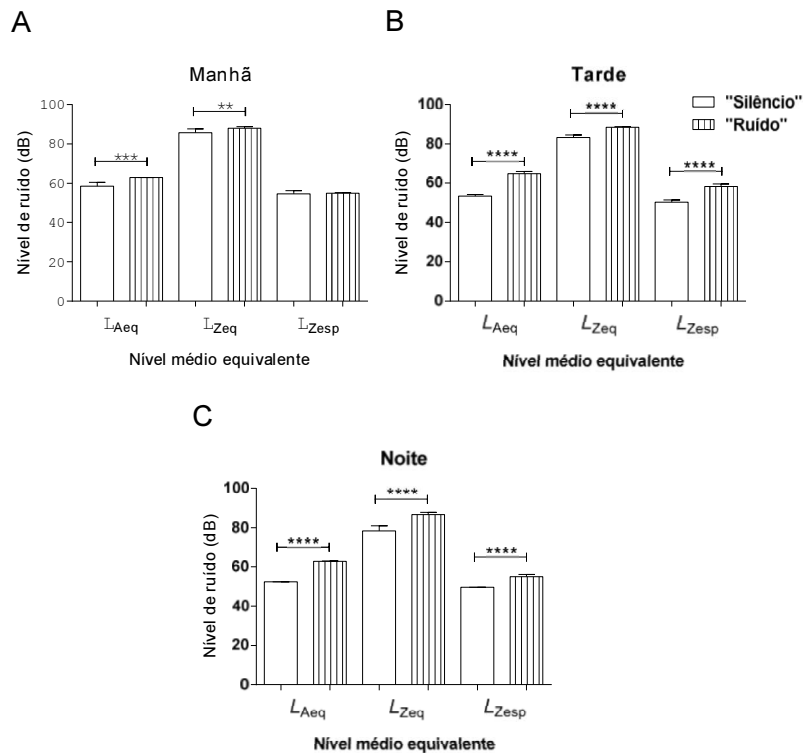


Figura 10A, B e C: Comparação do nível de ruído entre as salas "Silêncio" e "Ruído", utilizando o medidor B&K2270, nos descritores  $L_{Aeq}$ ,  $L_{Zeq}$  e  $L_{Zesp}$ . (A) Manhã, (B) Tarde e (C) Noite. Os resultados destacam os valores da mediana e interquartis (25% e 75%). Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando o Teste Mann-Whitney, onde \*\* representa  $p < 0,01$ , \*\*\* representa  $p < 0,001$  e \*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ .  $L_{Aeq}$  (nível médio equivalente ponderado em "A"),  $L_{Zeq}$  (nível médio equivalente ponderado em "Z") e  $L_{Zesp}$  (nível médio equivalente ponderado em "Zespecial").

Na análise comparativa dos níveis de ruído entre as salas "Silêncio" e "Ruído" na curva de ponderação Z feita pelo medidor AR125BAT nas diferentes frequências do espectro auditivo de camundongos (**Figura 11**) houve diferença significativa nas frequências 1, 10, 20, 30 e 50 kHz com valor de  $p < 0,0001$ , 60 e 70 kHz com valor de  $p < 0,05$  e 100 kHz com valor de  $p < 0,01$ . Na frequência de 1 kHz são encontrados os maiores valores de nível de ruído, com

uma diferença de aproximadamente 20 dB entre as salas. O nível de ruído diminui a partir das frequências ultrassônicas (20 kHz), apresentando valores de aproximadamente 20dB.

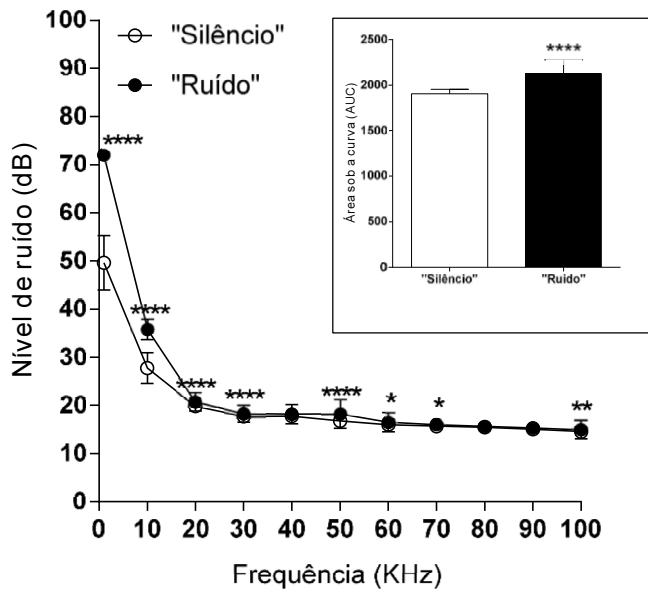
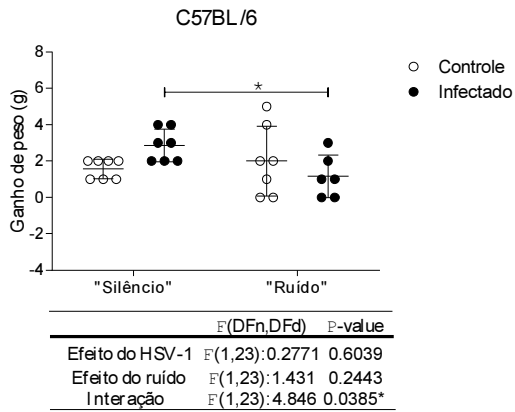


Figura 11: Nível de ruído encontrado nas salas "Silêncio" e "Ruído" utilizando o medidor AR125BAT. Comparação entre as salas nas frequências do espectro auditivo de camundongos na curva de ponderação Z. Os resultados destacam os valores da mediana e interquartis (25% e 75%). Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando o Teste Mann-Whitney, onde \* representa  $p < 0,05$ , \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\*\* representa  $p < 0,000$ .

#### 4.2 Avaliação do ganho de peso

Após o registro do peso dos animais antes e 15 dias após a infecção por HSV-1 foi calculado o ganho de peso dos mesmos e, como pode ser observado na **Figura 12 A e B**, houve interação entre infecção e ruído da linhagem C57BL/6 ( $F(1,23)=4.846$ ;  $p < 0.05$ ) e, no pós-teste, foi verificado que os animais do grupo "Silêncio" infectado (média  $\pm$  SD:  $2,9 \pm 0,8756$ ) obtiveram um maior ganho de peso que os animais do grupo "Ruído" infectado ( $1,167 \pm 1,169$ ). Na linhagem Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> os efeitos da infecção e do ruído não foram significativos. Quando comparadas as linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> (**Figura 13**) não foram encontradas diferenças significativas.

A



B

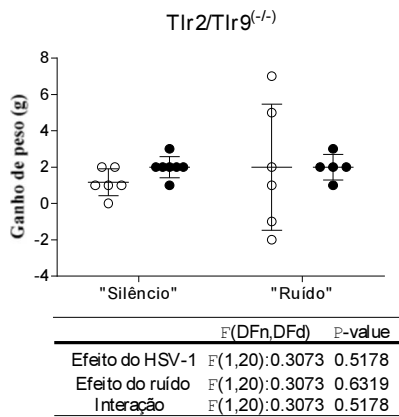


Figura 12: Ganho de peso. Camundongos C57BL/6 (A) e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> (B) controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído em cada linhagem, seguido pelo pós-teste de Tukey. \*representa  $p < 0,05$ . DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

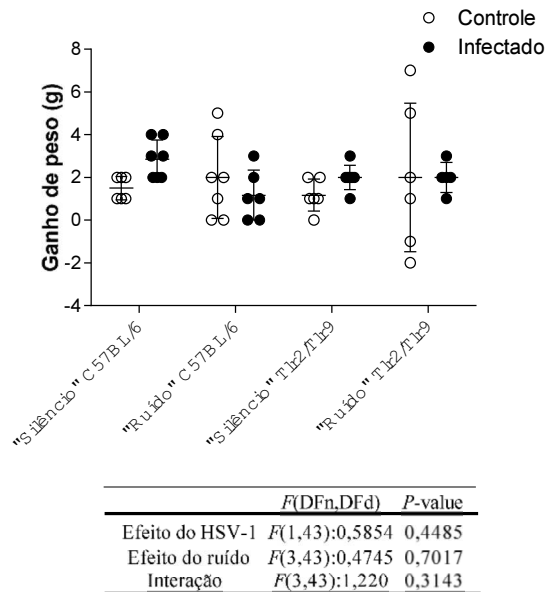


Figura 13: Comparação do ganho de peso entre linhagens. Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído entre as linhagens. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

#### 4.3 Teste campo aberto (Open Field Test)

Na avaliação da atividade locomotora e exploratória de camundongos machos das linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> pelo teste campo aberto foram analisados os parâmetros distância total percorrida, número de entradas no centro e o tempo de permanência no centro, 15 dias após a infecção por HSV-1. Não houve efeito significativo da infecção e do ruído em nenhum dos parâmetros analisados nos grupos de C57BL/6 e nos grupos de Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> (Figura 14) e, ainda, quando comparadas as duas linhagens entre si (Figura 15).

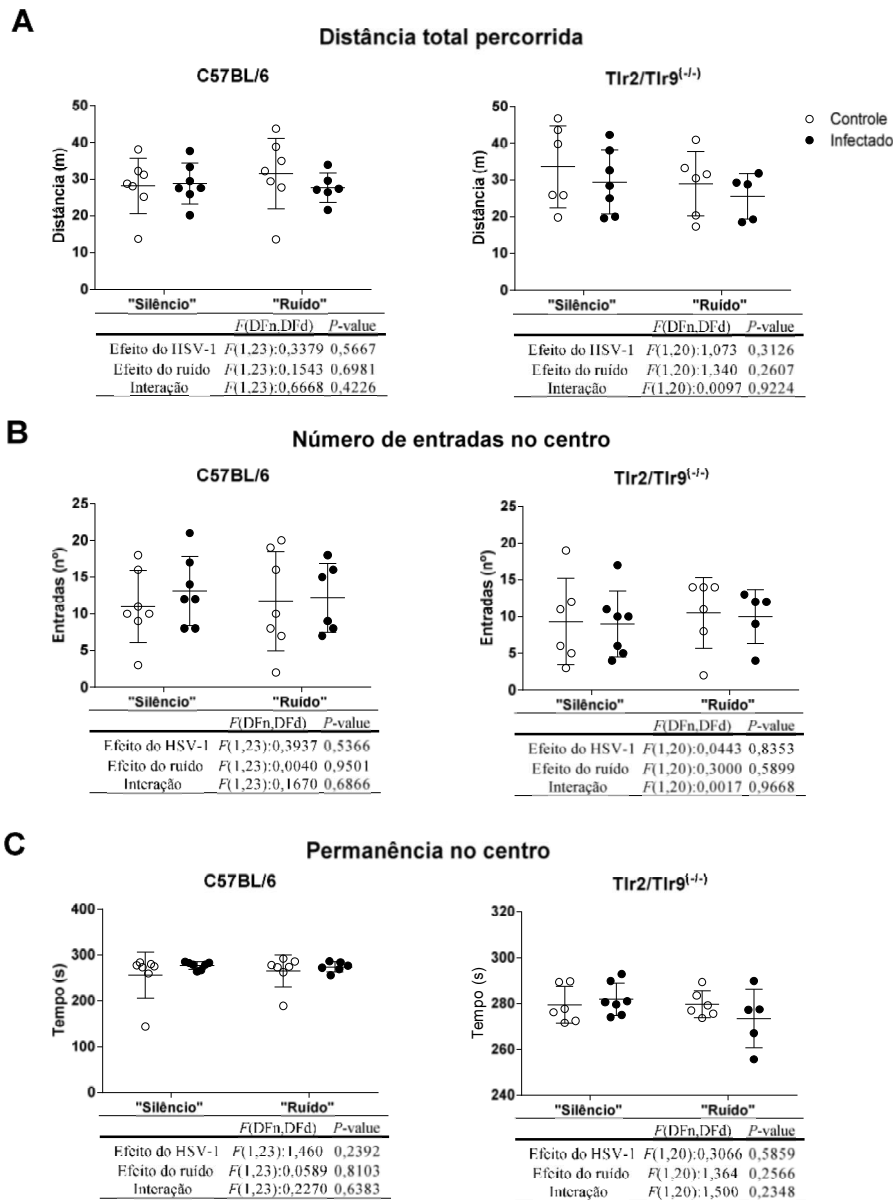


Figura 14: Teste campo aberto (Open Field Test). Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". (A) Distância

total percorrida por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9<sup>(+/+)</sup>; (B) Número de entradas no centro por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9<sup>(+/+)</sup>; (C) Tempo de permanência no centro por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9<sup>(+/+)</sup>. Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído em cada linhagem. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

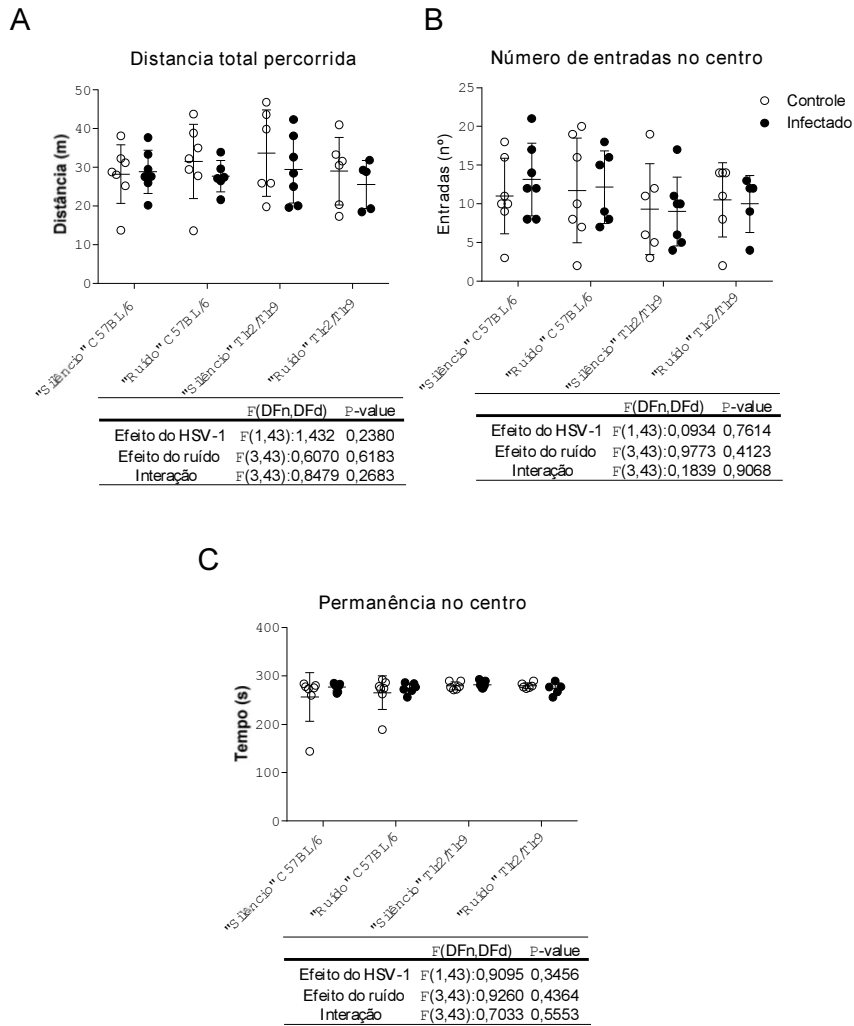


Figura 15: Comparação do teste campo aberto (Open Field Test) entre as linhagens. Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". A: Distância total percorrida; B: Número de entradas no centro; C: Tempo de permanência no centro. Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído entre as linhagens. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

#### 4.4 Teste claro/escuro (Light/Dark Box Test)

Na avaliação da atividade locomotora e exploratória de camundongos machos das linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(+/+)</sup> pelo teste claro/escuro foram analisados os parâmetros tempo de permanência no compartimento escuro, número de entradas no compartimento escuro e a distância percorrida no compartimento claro, 15 dias após a infecção por HSV-1. Não foi verificado efeito significativo da infecção e do ruído em nenhum dos parâmetros analisados nos grupos de C57BL/6 e nos grupos de Tlr2/Tlr9<sup>(+/+)</sup> (**Figura 16**). Quando comparada as duas linhagens (**Figura 17**), houve efeito significativo da infecção no tempo de permanência no compartimento escuro ( $F(3,43)=3,704$ ;  $p < 0,05$ ) e efeito significativo do ruído no número de entradas no compartimento escuro ( $F(1,43)=5,608$ ;  $p < 0,01$ ). No pós-teste de Tukey não foram encontradas diferenças significativas.



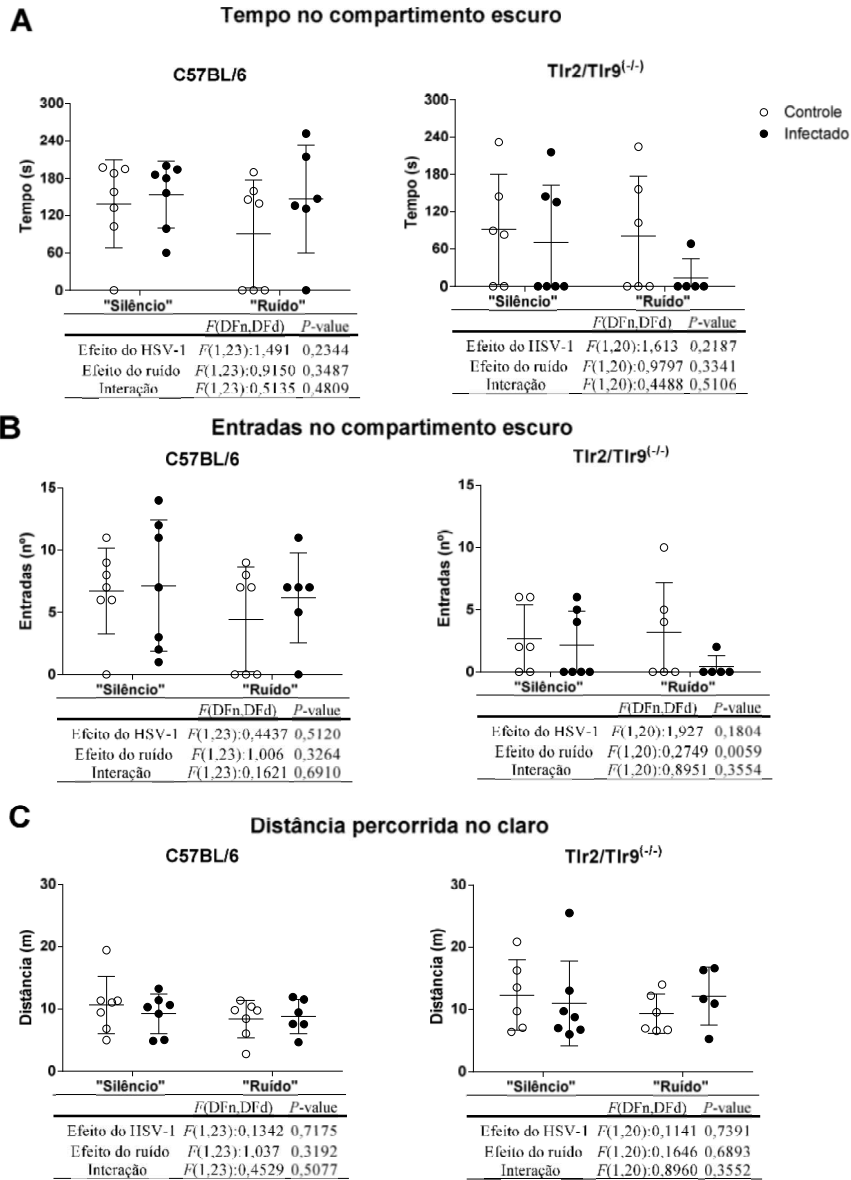


Figura 16: Teste claro/escuro (Light/Dark Box Test). Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído".

(A) Tempo de permanência no compartimento escuro por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9<sup>(+/+)</sup>; (B) Número de entradas no compartimento escuro por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9<sup>(+/+)</sup>; (C) Distância percorrida no compartimento claro por C57BL/6 e por Tlr2/Tlr9<sup>(+/+)</sup>. Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído em cada linhagem. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

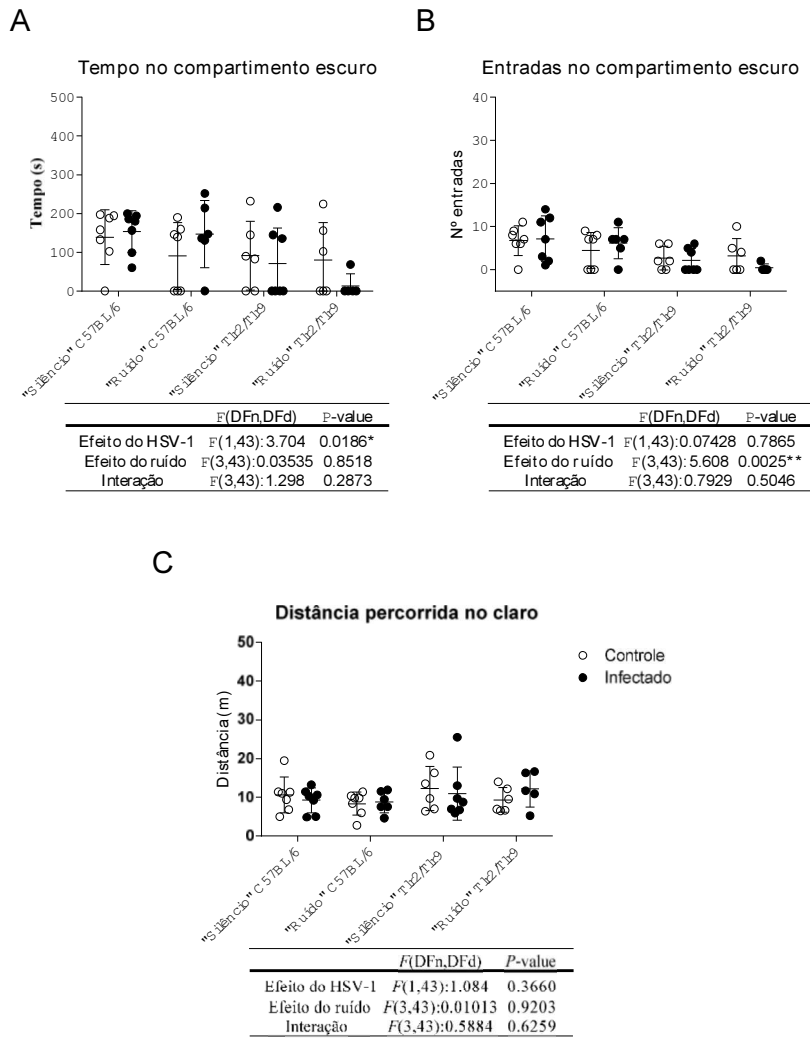


Figura 17: Comparação do teste claro/escuro entre as linhagens. Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(+/+)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". (A): Tempo de permanência no compartimento escuro; (B): Número de entradas no compartimento escuro; (C): Distância percorrida no compartimento claro. Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído entre as linhagens, seguido pelo pós-teste de Tukey. \*representa  $p < 0,05$ ; \*\*representa  $p < 0,01$ . DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

#### 4.5 Determinação de parâmetros hematológicos

A determinação de parâmetros hematológicos foi realizada em amostras de sangue de camundongos machos das linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> 15 dias após a infecção por HSV-1. Na série vermelha foram avaliados os parâmetros HGB, RBC, HCT, MCV, MCH e MCHC. Foram analisadas ainda a contagem global de WBC e PLT.

Com relação à análise do hemograma de camundongos da linhagem C57BL/6 (**Tabela 4a**), houve efeito significativo da infecção ( $F(1,23)=6,965$ ;  $p<0,05$ ) na determinação de WBC, no entanto, o pós-teste não apresentou significância. Houve diferença estatística também na interação ( $F(1,23)=8,121$ ;  $p<0,01$ ) entre infecção e ruído na quantificação de PLT e, após o pós-teste foi verificado aumento no grupo “Silêncio” infectado (média  $\pm$  SD:  $853,7 \pm 67,49$ ) em relação ao grupo “Silêncio” controle ( $749,7 \pm 31,52$ ) e uma redução no grupo “Ruído” infectado” ( $778,7 \pm 107,1$ ) quando comparado ao grupo “Silêncio” infectado.

Na análise do hemograma de camundongos da linhagem Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> (**Tabela 4b**) houve efeito significativo do ruído nos parâmetros WBC ( $F(1,20)=7,949$ ;  $p<0,05$ ), RBC ( $F(1,20)=6,749$ ;  $p<0,05$ ), HGB ( $F(1,20)=4,481$ ;  $p<0,01$ ) e HCT ( $p<0,05$ ), no entanto, no pós-teste não foi encontrada significância. Na análise dos índices hematimétricos houve efeito significativo da infecção no parâmetro MCH ( $F(1,20)=15,45$ ;  $p<0,001$ ) e, no pós-teste, o grupo “Silêncio” infectado (média  $\pm$  SD:  $16,37 \pm 0,639$ ) apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo “Ruído” infectado ( $15,88 \pm 1,105$ ). O mesmo ocorreu em MCHC onde houve significância do efeito da infecção ( $F(1,20)=10,98$ ;  $p<0,01$ ) e, no pós teste, o grupo “Silêncio” infectado (média  $\pm$  SD:  $37,53 \pm 1,412$ ) apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo “Ruído” infectado ( $35,42 \pm 2,648$ ).

Tabela 4: Efeitos da infecção e do ruído no hemograma de camundongos a) C57BL/6 e b) T1r2/T1r9<sup>(-/-)</sup> após oito semanas de exposição ao ruído e 15 dias pós inoculação de HSV-1 ou Phosphate-Buffered Saline - PBS (controle).

a) C57BL/6	Grupos				p-valor / F (DFn,DFd)					
	S-ctrl	R-ctrl	S-infectado	R-infectado	Efeito da infecção	F(1,23)	Efeito do ruído	F(1,23)	Interação	F(1,23)
WBC (10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup> )	5,26±1,17	5,17±1,05	4,57±1,5	4,03±0,80	0,0408*	6,965	0,4660	0,1486	0,5960	0,8920
RBC (10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> )	7,84±0,57	8,27±0,65	7,77±1,23	8,06±0,53	0,6677	0,05342	0,2644	0,5302	0,8373	1,252
HGB (g/dL)	13,54±0,88	14,04±0,91	13,43±2,00	14,03±0,78	0,8982	0,5468	0,2719	0,4866	0,9134	0,5888
HCT (%)	34,79±2,69	36,59±2,97	36,4±2,90	35,97±2,27	0,6420	0,2220	0,5240	0,4186	0,3014	1,118
PLT (10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup> )	749,7±31,52	779,4±37,7	853,7±67,49 <sup>§</sup>	750,2±90,90 <sup>#</sup>	0,1248	2,556	0,1295	2,490	0,0096**	8,121
MCV (fm <sup>3</sup> )	44,43±0,53	44,14±0,69	44,6±0,52	44,4±0,55	0,1580	2,129	0,2681	1,288	0,8726	0,0268
MCH (pg)	17,27±0,44	16,99±0,36	17,43±0,44	17,42±0,42	0,2069	1,687	0,7212	0,1305	0,1516	2,200
MCHC (g/dL)	38,97±1,25	38,41±0,75	39,13±1,11	39,08±0,85	0,6472	0,2151	0,8751	0,0252	0,1874	1,846

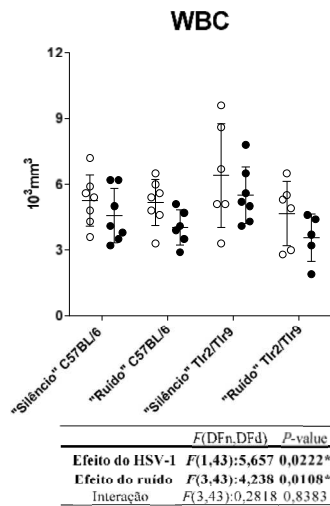
Dados são expressos como média ± S.D. Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando ANOVA two-way para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído na linhagem C57BL/6. \* representa  $p < 0,05$ ; \*\* representa  $p < 0,01$ ; <sup>§</sup> representa diferença após o pós-teste de Tukey quando comparado ao grupo S-Ctrl; <sup>#</sup> representa diferença após o pós-teste de Tukey quando comparado ao grupo S-infectado. Comparações feitas entre os grupos S-ctrl x R-ctrl; S-ctrl x S-infectado; R-ctrl x R-infectado; S-infectado x R-infectado. S-Ctrl – “Silêncio” controle, S-infectado – “Silêncio” infectado, R-Ctrl – “Ruído” controle, R-infectado – “Ruído” infectado, WBC = leucócitos, RBC = eritrócitos, HGB = hemoglobina, HCT = hematócrito, PLT = plaquetas, MCV = volume corpuscular médio, MCH = hemoglobina corpuscular média, MCHC = concentração de hemoglobina corpuscular média. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

b) Tlr2/Tlr9 <sup>(+/+)</sup>	Grupos				p-valor / F (DFn,DFd)					
	S-ctrl	R-ctrl	S-infectado	R-infectado	Efeito da infecção	F(1,20)	Efeito do ruído	F(1,20)	Interação	F(1,20)
WBC (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	5,88±0,80	4,67±1,47	6,4±2,37	3,56±1,08	0,6880	1,280	0,0114*	7,949	0,2727	0,1665
RBC (10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	7,94±0,50	7,58±0,50	8,38±0,42	7,75±0,36	0,1263	2,557	0,0177*	6,749	0,4999	0,4731
HGB (g/dL)	13,82±0,94	13,02±1,00	13,78±0,43	12,32±1,20	0,3550	0,7919	0,0084**	4,481	0,3997	0,05962
HCT (%)	35,73±2,48	33,78±2,41	36,27±1,26	34,72±1,28	0,3846	0,8988	0,0477*	8,640	0,3846	0,7421
PLT (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	747,0±29,72	882,3±96,7	789,8±172,60	865,5±128,20	0,8110	0,05901	0,6252	3,887	0,5845	0,3108
MCV (fm <sup>3</sup> )	45,17±0,41	44,67±0,82	43,57±1,51	45,00±1,23	0,1755	1,972	0,3138	1,068	0,0443	4,607
MCH (pg)	17,38±0,38	17,18±0,66	16,37±0,64	15,88±1,11#	0,0008***	15,45	0,2542	1,378	0,6261	0,2449
MCHC (g/dL)	38,63±0,83	38,57±1,03	37,53±1,41	35,42±2,65#	0,0035**	10,98	0,1055	2,874	0,1272	2,533

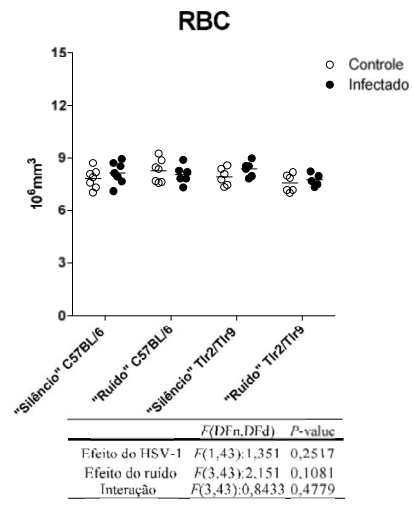
Dados são expressos como média ± S.D. Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando ANOVA two-way para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído na linhagem Tlr2/Tlr9<sup>(+/+)</sup>. \* representa p < 0,05; \*\* representa p < 0,01; # representa diferença após o pós-teste de Tukey quando comparado ao grupo S-Ctrl; # representa diferença após o pós-teste de Tukey quando comparado ao grupo S-infectado. Comparações feitas entre os grupos S-ctrl x R-ctrl; S-ctrl x S-infectado; R-ctrl x R-infectado; S-infectado x R-infectado. S-Ctrl – “Silêncio” controle, S-infectado – “Silêncio” infectado, R-Ctrl – “Ruído” controle, R-infectado – “Ruído” infectado, WBC = leucócitos, RBC = eritrócitos, HGB = hemoglobina, HCT = hematócrito, PLT = plaquetas, MCV = volume corpuscular médio, MCH = hemoglobina corpuscular média, MCHC = concentração de hemoglobina corpuscular média. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

Quando comparadas as linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> (Figura 18) houve efeito significativo da infecção ( $F(1,43)=5,657$ ;  $p<0,05$ ) e do ruído ( $F(3,43)=4,238$ ;  $p<0,05$ ) em WBC, contudo no pós teste a significância não estava nos pares de interesse. Em HGB houve efeito significativo do ruído ( $F(3,43)=5,329$ ;  $p<0,01$ ), contudo no pós teste a significância também não estava nos pares de interesse. Na quantificação de PLT, embora tenha sido encontrado efeito significativo do ruído ( $F(3,43)=3,090$ ;  $p<0,05$ ), no pós teste não foi encontrada significância. Nos índices hematimétricos houve interação entre infecção e ruído ( $F(3,43)=4,055$ ;  $p<0,05$ ) em MCV, no entanto no pós teste a significância não estava nos pares de interesse. Já no índice MCH houve interação ( $F(3,43)=6,293$ ;  $p<0,01$ ) e efeito da infecção ( $F(1,43)=8,860$ ;  $p<0,01$ ) e do ruído ( $F(3,43)=4,137$ ;  $p<0,05$ ) e, no pós teste, camundongos C57BL/6 do grupo “Ruído” infectado (média  $\pm$  SD:  $17,42 \pm 0,4167$ ), apresentaram valores superiores aos camundongos Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> deste mesmo grupo ( $15,88 \pm 1,105$ ). Em MCHC também houve interação ( $F(3,43)=4,741$ ;  $p<0,01$ ) e efeito da infecção ( $F(1,43)=7,441$ ;  $p<0,01$ ) e do ruído ( $F(3,43)=5,176$ ;  $p<0,01$ ) e, no pós teste, camundongos C57BL/6 do grupo “Ruído” infectado (média  $\pm$  SD:  $39,08 \pm 0,8472$ ), apresentaram valores superiores aos camundongos Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> deste mesmo grupo ( $35,42 \pm 2,648$ ).

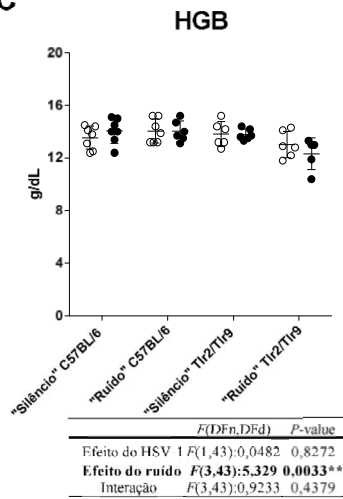
A



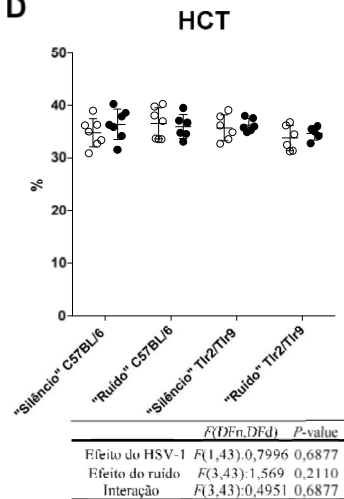
B



C



D





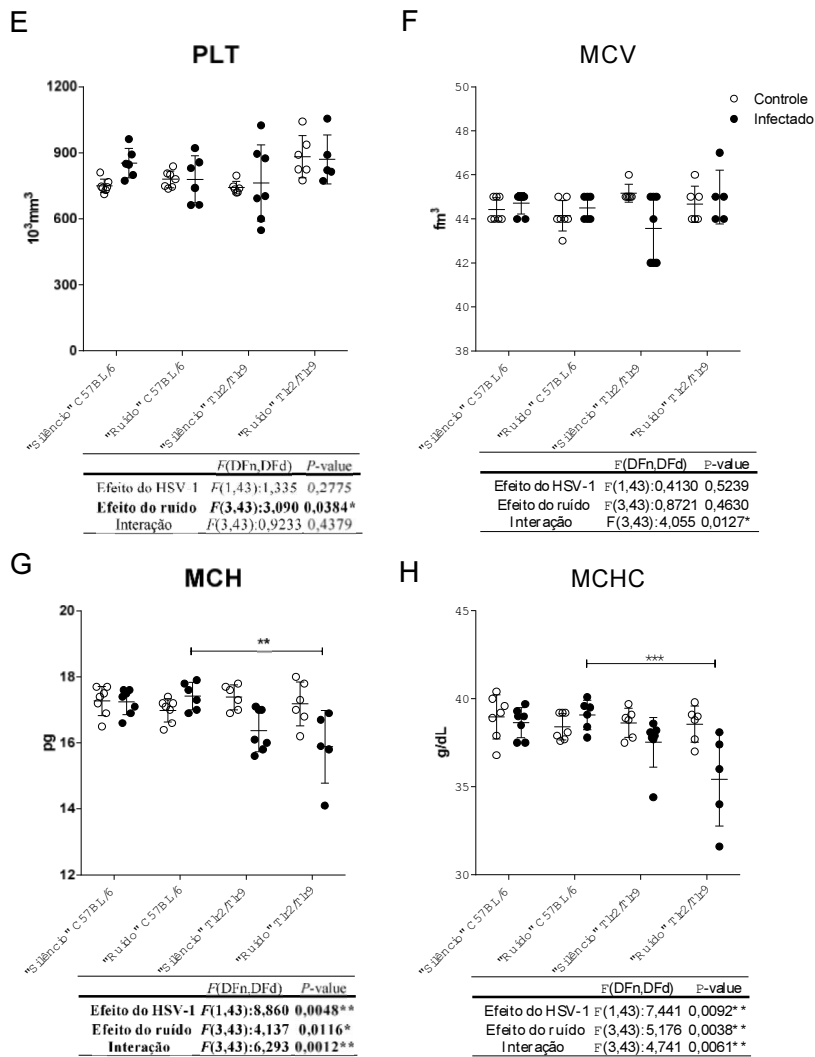


Figura 18: Comparação do hemograma entre as linhagens. Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". A: glóbulos brancos (WBC), B: glóbulos vermelhos (RBC), C: hemoglobina (HGB), D: hematócrito (HCT), E: plaquetas (PLT) e índices hematimétricos F: volume corpuscular médio (MCV), G: hemoglobina corpuscular média (MCH) e H: concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC). Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído entre as

linhagens, seguido pelo pós-teste de Tukey. \* representa  $p < 0,05$ ; \*\* representa  $p < 0,01$ . DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

#### 4.6 Concentração de colesterol e glicose

A determinação dos parâmetros bioquímicos colesterol e glicose foi realizada em amostras de soro de camundongos machos das linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> 15 dias após a infecção por HSV-1.

Com relação à análise de colesterol em camundongos das linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> (Figura 19), não houve efeito significativo da infecção e do ruído em nenhum dos grupos avaliados em cada linhagem. O mesmo ocorreu na comparação entre animais das linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> (Figura 20), onde também não foi encontrada diferença significativa.

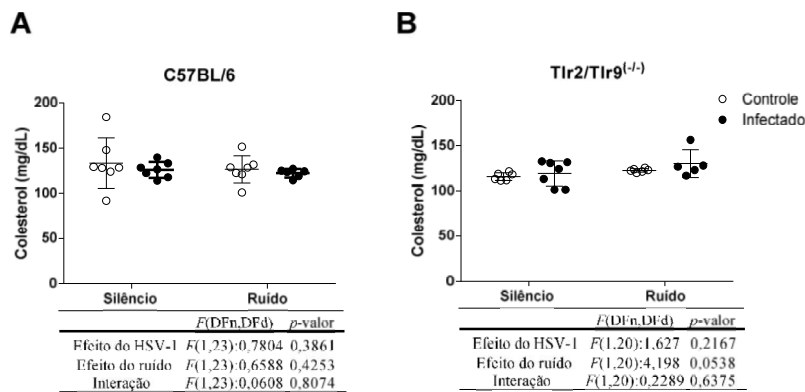


Figura 19: Concentração de colesterol em soro. Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído em cada linhagem. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

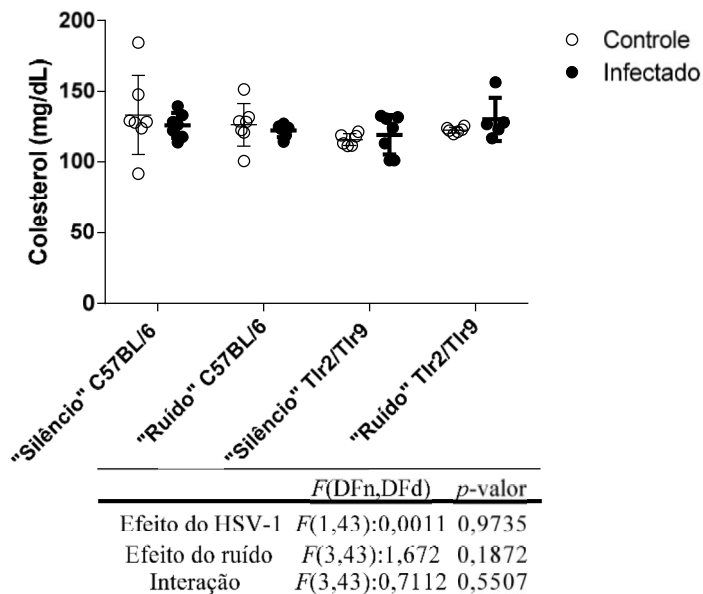


Figura 20: Comparação da concentração de colesterol entre as linhagens. Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído entre as linhagens. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

Com relação à análise de glicose em camundongos da linhagem C57BL/6 (Figura 21), não houve efeito significativo da infecção e do ruído em nenhum dos grupos avaliados. Na linhagem Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> (Figura 21) houve efeito significativo do ruído ( $F(1,20)=5,600$ ;  $p<0,05$ ), contudo, no pós-teste de Tukey esta diferença foi encontrada na comparação entre os grupos "Silêncio" infectado e "Ruído" controle que, neste trabalho não possuem relevância. Quando comparadas as linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> (Figura 22), houve efeito significativo do ruído ( $F(3,43)=3,881$ ;  $p<0,05$ ) e, no pós teste camundongos Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> do grupo "Ruído" controle (média  $\pm$  SD:  $216,4 \pm 67,40$ ) apresentaram valores superiores em relação aos camundongos C57BL/6 deste mesmo grupo ( $144,2 \pm 34,23$ ).

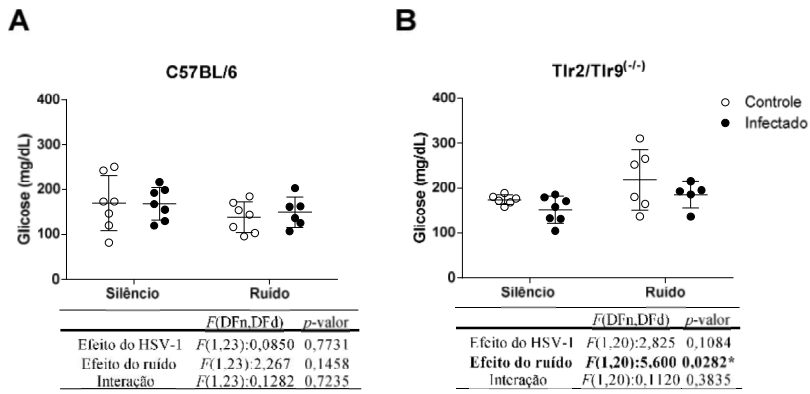


Figura 21: Concentração de glicose em soro. Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído em cada linhagem, seguido pelo pós-teste de Tukey. \* representa  $p < 0,05$ . DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

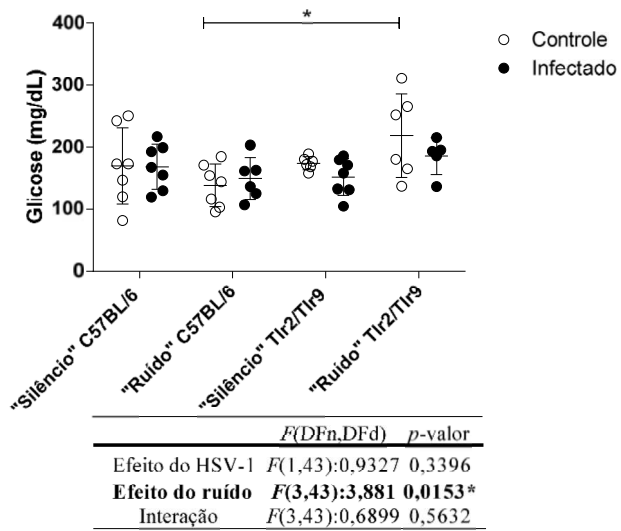


Figura 22: Comparação da concentração de glicose em soro entre as linhagens. Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído entre as linhagens, seguido pelo pós-teste de Tukey. \* representa  $p < 0,05$ . DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

## 4.7 Concentração de corticosterona

A determinação da dosagem de corticosterona foi realizada em amostras de fezes de camundongos machos das linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> 15 dias após a infecção por HSV-1. Não foi constatada diferença significativa nos grupos de C57BL/6 (Figura 23) e nos grupos de Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> (Figura 23) e, também quando animais das duas linhagens são comparados (Figura 24). Foram encontrados valores considerados basais, entre 13 e 19 ng/mL.

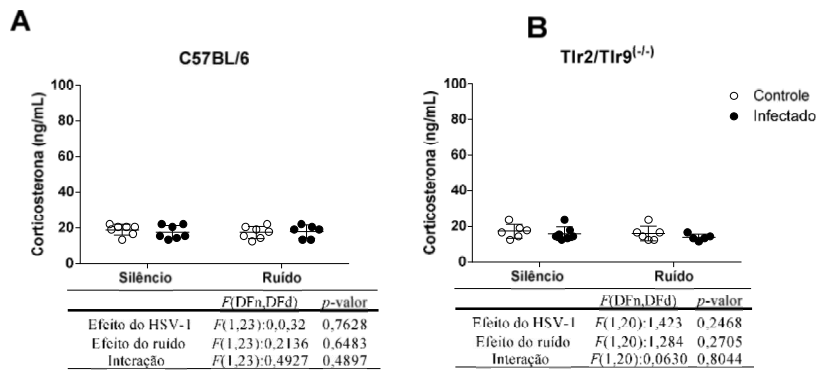


Figura 23: Concentração de corticosterona em fezes. Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído em cada linhagem. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

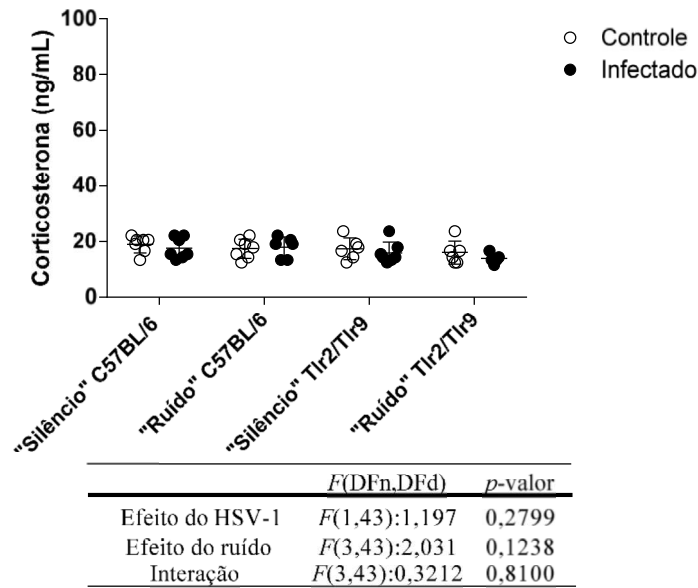


Figura 24: Comparação da concentração de corticosterona em fezes entre as linhagens. Camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído entre as linhagens. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

#### 4.8 Avaliação da produção de citocinas por Cytometric Beads Array

A produção das citocinas TNF alfa, IFN gama, IL2 e IL4 em gânglio trigêmeo de camundongos machos das linhagens C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>, 15 dias após a infecção por HSV-1, foi realizada por meio da análise citométrica por arranjo de beads (CBA). Com exceção da citocina IL2, todas estavam abaixo do limite teórico de detecção (6,3 pg/mL para TNF alfa, 2,5 pg/mL para IFN gama e 5 pg/mL para IL2 e IL4) e, desta forma, foi feita a interpolação dos dados com as curvas para aquisição do 4º parâmetro logístico, de acordo com instruções do fabricante.

Com relação à produção de citocinas na linhagem C57BL/6 houve efeito significativo na infecção ( $p < 0,05$ ) e na interação ( $p < 0,01$ ) entre infecção e ruído em IFN gama (Tabela 5a) e, no pós-teste, houve um aumento ( $p < 0,05$ ) no grupo "Silêncio" infectado quando comparado ao grupo "Silêncio" controle. Houve um aumento ( $p < 0,05$ ) ainda no grupo "Ruído" controle quando comparado ao grupo "Silêncio" controle.

Já na linhagem Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> (Tabela 5b) não foi verificada diferença significativa.



Tabela 5: Efeitos da infecção e do ruído na produção das citocinas TNF alfa, IFN gama, IL2 e IL4 no gânglio trigêmeo de camundongos a) C57BL/6 e b) Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> após oito semanas de exposição ao ruído e 15 dias pós inoculação de HSV-1 ou Phosphate-Buffered Saline - PBS (controle).

a) C57BL/6	Grupos				p-valor / F (DFn,DFd)					
	S-ctrl	R-ctrl	S-infectado	R-infectado	Efeito da infecção	F (1,23)	Efeito do ruído	F (1,23)	Interação	F (1,23)
TNF alfa (pg/mL)	3.89±1.02	4.28±1.02	4.49±0.80	4.08±0.68	0.3476	0.9232	0.6846	0.1697	0.1459	2.281
IFN gama (pg/mL)	3.23±0.19	3.59±0.26 <sup>#</sup>	3.57±0.28 <sup>&amp;</sup>	3.53±0.13	0.0213*	6.196	0.3613	0.8711	0.0053**	9.681
IL2 (pg/mL)	7.00±0.67	7.31±0.98	6.70±0.65	7.04±1.74	0.4284	0.6522	0.3611	0.8719	0.8688	0.02885
IL4 (pg/mL)	3.80±0.25	3.87±0.19	3.91±0.18	3.94±0.16	0.1781	1.942	0.7791	0.08075	0.6529	0.2082

b) Tlr2/Tlr9 <sup>(-/-)</sup>					F (1,20)		F (1,20)		F (1,20)	
TNF alfa (pg/mL)	4.42±0.57	4.08±0.74	4.28±1.45	4.08±0.83	0.8608	0.03155	0.5216	0.4255	0.8608	0.03156
IFN gama (pg/mL)	3.53±0.21	3.69±0.22	3.50±0.28	3.80±0.40	0.7285	0.1239	0.0624	3.894	0.5623	0.3472
IL2 (pg/mL)	6.41±0.36	6.44±0.36	6.26±0.99	7.00±1.29	0.5615	0.3487	0.2812	1.227	0.3279	1.006
IL4 (pg/mL)	3.91±0.11	3.98±0.27	4.04±0.10	4.14±0.28	0.0767	3.484	0.3190	1.045	0.8912	0.01920

Dados são expressos como média ± S.D. Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando ANOVA two-way para verificar os efeitos da infecção por HSV-1 e do ruído nas linhagens a) C57BL/6 e b) Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>. \* representa  $p < 0,05$ ; \*\* representa  $p < 0,01$ ; & representa diferença após o pós-teste de Tukey quando comparado ao grupo S-Ctrl; # representa diferença após o pós-teste de Tukey quando comparado ao grupo S-Ctrl. Comparações feitas entre os grupos S-ctrl x R-ctrl; S-ctrl x S-infectado; R-ctrl x R-infectado; S-infectado x R-infectado. S-Ctrl – “Silêncio” controle, S-infectado – “Silêncio” infectado, R-Ctrl – “Ruído” controle, R-infectado – “Ruído” infectado. DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

Na comparação entre as linhagens (Figura 25), houve interação entre infecção e ruído na produção de IFN gama ( $F(3,43)=3,218$ ;  $p<0,05$ ), no entanto no pós teste a significância não estava nos pares de interesse.

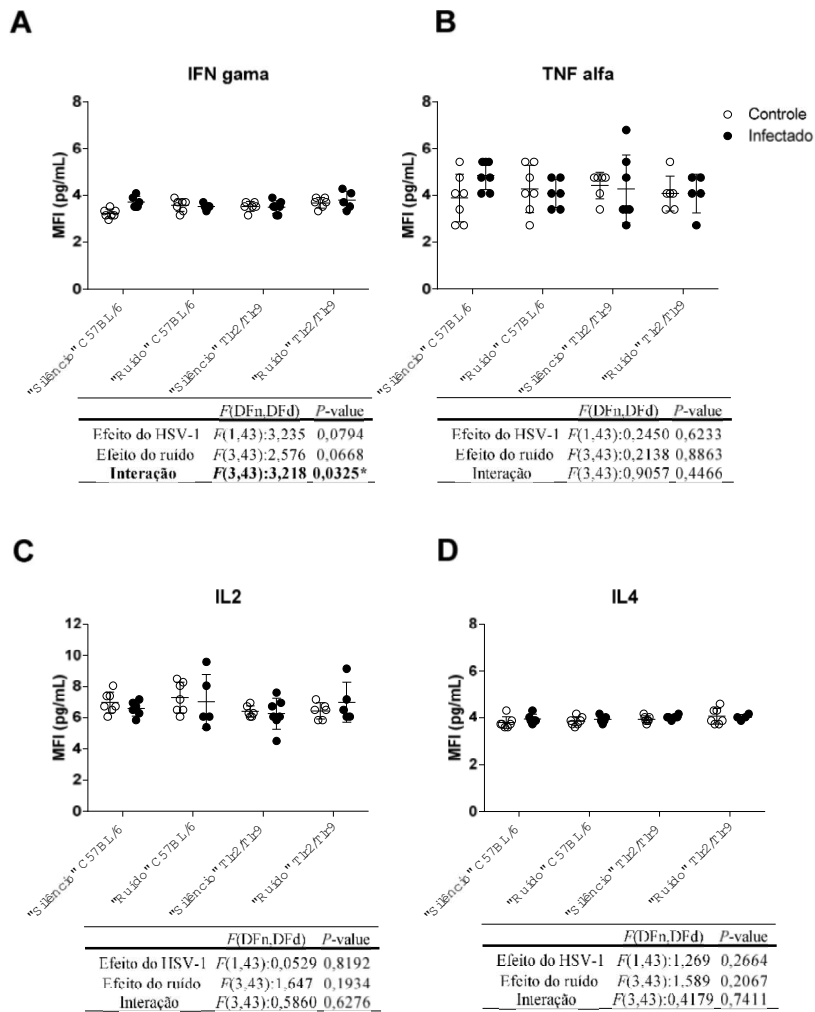


Figura 25: Produção de citocinas em gânglio trigêmeo. TNF alfa (A), IFN gama (B), IL2 (C) e IL4 (D) em camundongos C57BL/6 e Tlr2/Tlr9<sup>-/-</sup> controles e infectados, 15 dias após a infecção por HSV-1, mantidos na sala "Silêncio" ou "Ruído". Os resultados expressam os valores de cada animal avaliado, a média e o desvio padrão. ANOVA two-way foi utilizada para verificar os efeitos da

infecção por HSV-1 e do ruído entre as linhagens. \* representa  $p < 0,05$ . DFn: graus de liberdade no numerador, DFd: graus de liberdade no denominador.

## 5 DISCUSSÃO

Mesmo em ambientes padronizados e controlados como os biotérios, os animais são expostos a uma grande variedade de sons durante a rotina diária. Estes sons apresentam variações de acordo com o período do dia e dia da semana. A paisagem sonora nestes ambientes é composta por ruídos de fundo provenientes de sistemas elétricos e mecânicos e de ruídos intermitentes atribuídos a diversas fontes, como as atividades antropogênicas. Neste trabalho foram avaliados os níveis de ruído de duas salas com características e composições distintas do biotério de experimentação do IRR com o objetivo de verificar o bem-estar de camundongos infectados com baixa m.o.i por Herpes simplex-1 e seus controles nestes ambientes. O HSV-1 por ser um agente infeccioso com ampla distribuição mundial e alta prevalência entre a população humana tem sido objeto de estudo de muitos trabalhos (Lima et al., 2010; Zolini et al., 2014; Lucinda, 2017).

Apesar das diretrizes brasileiras (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal/CONCEA), ver Resolução Normativa nº 15, <http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/Resolucao-Normativa-CONCEA-15-de-16.12.2013-DOU-de-18.12.2013-Secao-I-Pag.-9.pdf>) preconizarem que o limite de 85 dB seja aceitável em biotérios, estabelece ao mesmo tempo que "A exposição a padrões uniformes de ruído pode levar a uma perda auditiva mais rápida, enquanto que a exposição a padrões irregulares está mais propensa a causar transtornos, devido a uma ativação repetida do sistema neuroendócrino". Castelhana-Carlos e Baumans (2009) acrescentam ainda que sons significativos com níveis de intensidade relativamente baixa podem ter um impacto considerável sobre a fisiologia e o comportamento dos animais, envolvendo estruturas límbicas e centros superiores envolvidos na determinação do contexto e do significado. Além disso, os animais podem demonstrar uma aparente adaptação aos sons após repetidos estímulos, no entanto sua memória é de curta duração e a adaptação ao mesmo tipo de som faz com que haja uma resposta comportamental semelhante (Voipio et al., 2006; De Ávila, 2012). Desta forma, se torna relevante o monitoramento constante do ruído nestes ambientes, a fim de se verificar uma possível interferência na saúde e bem-estar dos animais. Neste contexto, em nosso trabalho foram monitorados os sons entre 20 Hz e 100 kHz em diferentes curvas de ponderação para efeito comparativo, uma vez que em muitos estudos os resultados são expressos nas curvas de ponderação A (humanos) ou Z (linear). De uma forma geral é adotada a curva de ponderação Z, já que em uma leitura linear são incluídas todas as frequências no nível de ruído final. O descritor LZespecial ( $L_{Zesp}$ )

adotado neste trabalho para medição de frequências entre 1 e 20 kHz, teve como intuito a exclusão das frequências que não são audíveis aos camundongos pelo medidor B&K2270 de forma a refinar nossas análises aproximando os nossos resultados da realidade. Contudo, uma vez que este medidor tem um alcance de 20 kHz, foi utilizado adicionalmente o AR125BAT para a medição de ultrassom (20 a 100 kHz).

Neste contexto, os resultados deste trabalho demonstraram que os níveis de ruído podem variar significativamente no biotério em diferentes períodos do dia, assim como demonstrado anteriormente por outros autores (Milligan et al., 1993; Voipio et al., 2006, Lauer et al., 2009), especialmente nas frequências audíveis para humanos e camundongos. Foi possível verificar também que o nível de ruído variou entre as salas em um mesmo biotério. Quando o nível de ruído total é analisado utilizando o B&K2270, a sala "Silêncio" apresentou um menor nível de ruído no período noturno, caracterizado por conter apenas o ruído de fundo da própria sala, sem presença humana, enquanto na sala "Ruído" os períodos da manhã (M) e noite (N) foram semelhantes. Neste caso, isso pode ter ocorrido devido à presença de equipamentos elétricos (racks ventilados e estante ventilada) na sala que podem ter mascarado o som do baixo tráfego de pesquisadores pela manhã. As diferenças encontradas para o ruído de fundo entre as salas foram de aproximadamente 10 dB em  $L_{Aeq}$ , 6 dB em  $L_{Zeq}$  e 6 dB em  $L_{Zesp}$  (isto significa que a percepção da pressão sonora na sala "Ruído" foi o dobro daquela observada na sala "Silêncio"). Em geral, no período diurno com o tráfego de pesquisadores e técnicos é possível observar que houve um aumento do nível de ruído em ambas as salas, no entanto, a diferença entre as salas foi menos expressiva quando comparada ao ruído de fundo (período noturno). O estudo de Lauer e colaboradores (2009) avaliou somente o descritor  $L_{Zeq}$  e nossos resultados corroboram o achado desses autores. Com relação aos animais mantidos na sala "Ruído", eles foram expostos a níveis de ruído um pouco acima de 85 dB (88 dB) no descritor  $L_{Zeq}$  com picos de até 119,2 dB (dados não mostrados). Embora Lauer e colaboradores (2009) tenham encontrado picos com maior nível de ruído no descritor Z, em nosso trabalho foi possível verificar que picos acima deste valor se encontravam nas frequências abaixo de 1 kHz, ou seja, fora da percepção auditiva de camundongos. Quando foram excluídos os valores abaixo de 1 kHz e proposto o descritor  $L_{Zesp}$ , os picos apresentaram valores de até 70,9 dB. Quando os descritores  $L_{Aeq}$  e  $L_{Zesp}$  de ambas as salas são analisados, assim como  $L_{Zeq}$  da sala "Silêncio", os animais foram continuamente expostos a níveis de ruído abaixo de 85 dB. Na análise individual da frequência utilizando o AR125BAT houve uma grande diferença de aproximadamente 20 dB

em 1 kHz e, nas frequências acima de 20 kHz, o nível de ruído variou de 15 a 25 dB em ambas as salas em todo o período de gravação. Tamura e colaboradores (2012) demonstraram que a exposição de camundongos a níveis de ruído moderados (70 dB) de baixa frequência (0,5 kHz) causou comprometimento morfológico do vestibulo sóleo e cerebelo, prejudicando o equilíbrio locomotor do animal. É importante mencionar que o nível de ruído encontrado neste estudo pode ter sido ainda maior, uma vez que a presença do observador e dos medidores pode ter interferido no comportamento de pesquisadores e técnicos do biotério de experimentação.

Em nosso estudo, a infecção por HSV-1 e o nível de ruído foram avaliados como fontes potenciais de estresse para camundongos. A nomenclatura "estressor" é frequentemente utilizada para definir os estímulos ambientais que levam a um desequilíbrio da homeostase e, as respostas de estresse correspondem às reações de defesa de um animal, com o cérebro desempenhando o papel central de relacionar os estressores com as respostas (Möstl e Palme, 2002). As respostas incluem alterações no comportamento e no sistema imunológico e ainda, ativação do sistema neuroendócrino (eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal [HPA]) e do sistema nervoso autônomo (Moberg e Mench, 2000; Palme, 2012). Desta forma, o aumento da produção de corticosterona após a exposição a um estímulo ambiental é interpretado como uma resposta ao estresse (Kight e Swadle, 2011).

A medição de respostas de estresse fisiológico em roedores de laboratório, particularmente camundongos, é um desafio. Métodos padrão de coleta de sangue para quantificar glicocorticóides são limitados nesta espécie devido aos próprios métodos de coleta que são estressores significativos devido ao seu pequeno tamanho, não permitindo coletas frequentes ou a longo prazo. Assim, utilizando-se amostras coletadas de forma não invasiva, como por exemplo, por meio de metabólitos fecais, esta limitação encontra-se solucionada, uma vez que a quantificação de corticosterona por este método está validada (Jensen et al., 2010). Os resultados encontrados em nosso trabalho para os níveis desse hormônio foram considerados basais (< 20 ng/mL) para todos os grupos (Fortes et al., 2017; Viollet et al., 2017). Acreditamos que, embora os animais estivessem continuamente expostos a ruídos próximos a 85 dB em LZeq em ambas as salas, eles foram expostos desde o nascimento e isso poderia de alguma forma ter contribuído para a ausência de estimulação do eixo HPA e posterior liberação de corticosterona no local no tempo da nossa dosagem (oito semanas após o nascimento). Alguns animais, devido à intensa exposição a estressores, podem tornar-se patologicamente não responsivos; isto é, seu eixo HPA não responde, embora eles estejam

percebendo a situação como estressante. Portanto, recomendamos que, no caso de exposição aguda a esses ruídos, uma nova avaliação seja feita.

O peso corporal, o ganho de peso e o peso adrenal também são indicadores úteis de bem-estar animal (Leach et al., 2008; Hawkins et al., 2011; Buijs et al., 2015). Com relação à avaliação do ganho de peso, nos camundongos C57BL/6 o grupo infectado mantido na sala "Silêncio" obteve maior ganho de peso quando comparado ao grupo infectado mantido na sala "Ruído", corroborando dados disponíveis na literatura (Van Raaij et al., 1996; Abou Ismail, 2007, Kim et al., 2013). No entanto, os grupos controle de C57BL/6 e os grupos controle e infectado de Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup> de ambas as salas não apresentaram diferença significativa no ganho de peso. Segundo Kight e Swaddle (2011), a diminuição do ganho de peso em relação à exposição a ruídos aversivos pode ser justificada pela necessidade de maior vigilância por parte do animal e também por permanecer escondido ou recuado, reduzindo o tempo destinado ao forrageamento. Embora o nível de corticosterona não tenha aumentado em nenhum dos grupos, sugerindo um ambiente não estressante no momento da medição, atenção especial poderia vir a ser dada em experimentos com HSV-1, uma vez que nossos resultados sugerem que o ruído pode interferir no ganho de peso de animais infectados por este vírus e estas alterações podem comprometer a reprodutibilidade dos experimentos (Hawkins et al., 2011).

Tem sido demonstrado que o estresse crônico e o ruído podem gerar fatores de risco cardiovasculares, como aumento da pressão arterial e dislipidemia, aumento da viscosidade sanguínea e glicemia, e ativação de fatores de coagulação sanguínea em modelos animais (Munzel et al., 2017). O aumento dos corticosteróides plasmáticos na resposta primária ao estresse tem uma ampla gama de efeitos metabólicos, como a modulação de como os carboidratos são metabolizados pela gliconeogênese (Cui et al., 2016; Vazzana, 2017). Em nossos resultados em relação aos glicocorticóides, não encontramos diferenças significativas nas dosagens de colesterol e glicose nas diferentes salas nos dois grupos de camundongos (controles e infectados). A ausência de estimulação do eixo HPA e posterior liberação de corticosterona no momento de nossa mensuração pode também ter contribuído para a falta de mudança nos níveis de glicose e colesterol. Além disso, os valores encontrados para C57BL/6 na literatura estão de acordo com o intervalo de referência estabelecido para machos desta linhagem (Almeida et al., 2008; Spinelli et al., 2012). Embora não haja dados disponíveis na literatura para esses parâmetros em camundongos Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>, os resultados encontrados

estão próximos à C57BL/6, seu background e, portanto, acreditamos estar dentro dos valores de referência estabelecidos.

Na avaliação do hemograma dos camundongos, a contagem de plaquetas em C57BL/6 foi menor nos animais infectados da sala “Ruído” que na sala “Silêncio”, ao contrário dos achados de Toukh e colaboradores (2014) que demonstraram que o ruído induzido pela construção causou aumento da coagulação sanguínea em ratos. No entanto, de acordo com estes autores, os estudos são inconclusivos quanto ao efeito do estresse no perfil de coagulação. O estresse pode induzir um tempo prolongado de tromboplastina parcial ativada e trombina e encurtamento do tempo de lise do euglobulina atribuído ao aumento da atividade fibrinolítica, sem alteração no tempo de protrombina e sem diminuição prolongada dos níveis plasmáticos de fibrinogênio, mas também pode promover disfunção plaquetária e trombocitopenia. Em nossos estudos, camundongos C57BL/6 infectados apresentaram maior contagem de plaquetas que seus controles na sala “Silêncio”, o que pode ser explicado pela resposta à infecção viral com cascatas inflamatórias e de coagulação interconectadas (Marshall et al., 2016). No entanto, todos os valores para plaquetas encontrados nas salas “Silêncio” e “Ruído” estão dentro do intervalo de referência estabelecido para C57BL/6, de acordo com o trabalho realizado anteriormente por Araújo e colaboradores (2015), em que foram estabelecidos valores de referência para parâmetros hematológicos. Embora não haja dados disponíveis na literatura para o hemograma de Tlr2/Tlr9<sup>(-/-)</sup>, os resultados encontrados estão próximos ao seu background C57BL/6 e, portanto, acreditamos estar dentro dos valores de referência estabelecidos.

As citocinas são moléculas importantes envolvidas tanto na imunidade quanto no estresse, sendo produzidas pelas células imunes em resposta a qualquer desequilíbrio da homeostase, como lesões, inflamação e infecções (Pagliarone e Sforzin, 2009). Em nosso estudo, foram encontradas diferenças apenas na produção de IFN gama de C57BL/6, com aumento nos animais infectados da sala “Silêncio” e animais controles da sala “Ruído” quando comparados aos animais controles da sala “Silêncio”. É importante mencionar que o aumento dessa citocina é esperado na infecção pelo HSV-1. Assim, atenção deve ser dada aos estudos com HSV-1 e a produção de IFN gama, já que, com os resultados encontrados, acreditamos que o ambiente “Silêncio” possa ter contribuído para uma resposta imunológica mais efetiva por camundongos C57BL/6.

Com relação ao comportamento dos camundongos, no teste campo aberto, a distância percorrida na arena é tipicamente interpretada como uma medida semelhante à atividade.



Além disso, a tendência que os camundongos tem de evitar a área central é um indicador de níveis semelhantes à ansiedade, sob a suposição de que a área central é mais ameaçadora para os roedores que a área periférica (Carola et al., 2002; Tye et al., 2011). No teste de claro/escuro, a ansiedade está positivamente correlacionada com o tempo gasto no compartimento iluminado e negativamente com o número de entradas no compartimento escuro (Crawley e Goodwin, 1980; Heredia et al., 2014). No presente estudo, indicadores de ansiedade e comportamento de exploração, como os testes utilizados, não mostraram diferenças significativas entre os camundongos controles e infectados das salas “Silêncio” e “Ruído”.

#### 5.1. Potenciais limitações do estudo

A avaliação dos efeitos do ruído no estresse pode ser afetada por fatores como a posição da gaiola. Aqui, os microfones foram colocados em seis pontos diferentes em cada sala. A média desses pontos foi usada para determinar a localização das gaiolas dos animais na sala, descartando diferenças significativas. Outro fator que poderia afetar a exposição aos ruídos é o posicionamento das gaiolas em diferentes alturas, no entanto, todas as gaiolas foram posicionadas em uma mesma altura do chão.

Além disso, existem outros fatores associados ao ruído, como vibração, odores e presença humana, que não podem ser controlados em biotérios. No entanto, como forma de minimizar essas interferências, os animais foram mantidos em mini-isoladores e o manuseio foi sempre realizado por um único técnico.

## 6 CONCLUSÃO

Nossos resultados forneceram informações particularmente relevantes relacionadas aos níveis de ruído em biotérios experimentais quando consideramos o efeito potencial do ruído sobre o comportamento, fisiologia e resposta imune de animais infectados por HSV-1. A presença de equipamentos elétricos aliada ao grande tráfego de pesquisadores na sala "Ruído" causou diferenças nas medidas dos níveis de ruído em todos os descritores avaliados. No entanto, os ruídos encontrados apresentaram baixo impacto em todos os grupos de camundongos, de acordo com os parâmetros avaliados. Assim, o presente estudo contribuiu com a literatura para as pesquisas realizadas em biotério experimental, uma vez que nossos resultados indicaram que a exposição a níveis moderados de ruído nesses ambientes não alterou o bem-estar dos camundongos avaliados. Embora ruídos moderados e intermitentes estivessem presentes, eles não foram suficientes para causar estresse crônico nos animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-ISMAIL, U.A., et al. Can sleep behaviour be used as an indicator of stress in group-housed rats (*Rattus norvegicus*). *Animal Welfare*, v. 16, n. 2, p. 185-188, 2007
- ALMEIDA, A.S., et al. Reference values for blood-based biochemical parameters in BALB/c and C57BL/6 wild-type mice. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 44, n. 6, p. 429-432, 2008.
- ANDRADE, A., PINTO, S.C., OLIVEIRA, R.S (Orgs.). *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. Editora FIOCRUZ, 2002.
- ARAÚJO, F.T.M., et al. Establishment of reference values for hematological and biochemical parameters of mice strains produced in the animal facility at Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz - Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira em Ciencia de Animais de Laboratório*, v. 3, n. 2, p. 95-102, 2015.
- BALCOMBE, J.P, et al. Laboratory routines cause animal stress. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, v. 43, n. 6, p. 42-51, 2004.
- BALCOMBE, J.P. Laboratory environments and rodents's behavioural needs: a review. *Laboratory Animals*, v. 40, n. 3, p. 217-235, 2006.
- BAPTISTA, R.I.A.A., et al. Indicadores do bem-estar em suínos. *Ciência Rural*, v. 41, n. 10, p. 1823-1831, 2011.
- BAUMANS, V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Revue Scientifique Et Techique*, v. 24, n. 2, p.503-513, 2005.
- BOWERS, S.L., et al. Stressor specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain Behavior and Immunity*, v. 22, n. 1, p. 105-113, 2008.
- BRANDÃO, J.L.M.V., MAYER, J. Behavior of rodents with an emphasis on enrichment. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v. 20, n. 4, p. 256-269, 2011
- BROOM, D.M. Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*, v. 142, n. 6, p. 524-526, 1986.
- BROOM, D.M., JOHNSON, K.G. *Stress and Animal Welfare*. Springer Netherlands, 1º ed., 1993.
- BROOM, D.M. A usable definition of animal welfare. *The Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, v. 6, n. 2, p. 15-25, 1993.
- BROOM, D.M., MOLENTO, C.F.M. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas - revisão. *Archives of Veterinary Science*, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.
- BROOM, D.M. Animal welfare: concepts, study methods and indicators. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 24, n. 3, p. 306-321, 2011.

- BRUDZYNSKI, S.M. Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. *Current Neuropharmacology*, v. 13, n. 2, p. 180-192, 2015.
- BUIJS, S., et al. Behaviour, wounds, weight loss and adrenal weight of rabbit does as affected by semi-group housing. *Applied Animal Behavior Science*, v. 172, p. 44-51, 2015.
- CAMPADELLI-FIUME, G., et al. Viral and cellular contributions to HSV entry into the cell. *Current Opinion in Virology*, v. 2, n. 1, p. 28-36, 2012.
- CAVALCANTE, K.V.S.M. Avaliação acústica ambiental de habitats de passeriformes expostos a ruídos antrópicos em Minas Gerais e São Paulo [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.
- CARLSTEAD, K., et al. Validation of a urinary cortisol radioimmunoassay for non-invasive monitoring of adrenal activity in domestic and non-domestic fields. *Zoo Biology*, v. 11, p. 165-176, 1992.
- CARLSTEAD, K., BROWN, J.L. Relationships between patterns of fecal corticoid excretion and behavior, reproduction, and environmental factors in captive black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceros. *Zoo Biology*, v. 24, p. 215-232, 2005.
- CARLTON, D.L., RICHARDS, W. Affordable noise control in a laboratory animal facility. *Lab Animal*, v. 31, n. 1, p. 47-80, 2002.
- CAROLA, V., et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, 2002.
- CASTELHANO-CARLOS, M.J., BAUMANS, V. The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. *Laboratory Animals*, v. 43, n. 4, p. 311-327, 2009.
- CHENG, L., et al. Moderate noise induced cognition impairment of mice and its underlying mechanisms. *Physiology & Behavior*, v. 104, n. 5, p. 981-988, 2001.
- CHUMBINHO, L.C., et al. Etograma de camundongos em biotério: Quais são as principais atividades deste animal dentro da gaiola? *Revista da Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório*, v. 1, n. 3, p. 25-31, 2012.
- COIMBRA, F.C., et al. Enriquecimento físico afeta parâmetros indicadores de bem estar em camundongos (*Mus musculus*). *Revista da Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório*, v. 2, n. 3, p. 195-205, 2013.
- CRAWLEY, J., GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, v. 13, n. 2, p. 167-70, 1980.
- CUI, B., et al. Effects of chronic noise on glucose metabolism and gut microbiota- host inflammatory homeostasis in rats. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1-8, 2016.

DAWKINS, M.S. Using behaviour to assess animal welfare. *Animal Welfare*, v. 13, n. 1, p. 3-7, 2004.

DE ÁVILA, V.P.F. Efeito dos ruídos gerados por atividade humana em ratos wistar: avaliação da natimortalidade e desenvolvimento ponderal de neonatos [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.

DE LUCCA, R.R., et al. Manual para técnicos em bioterismo. COBEA, FINEP, 2º ed., 1996.

DI, G., XU, Y. Influences of combined traffic noise on anxiety in mice. *Science of the Total Environment*, v. 579, p. 1439-1445, 2017.

FAWC (Farm Animal Welfare Council). Report on Priorities for Animal Welfare Research and Development. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1993.

FEBINGER, H.Y., et al. Effects of housing condition and cage change on characteristics of sleep in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 53, n. 1, p. 29-37, 2014.

FELASA. Working Group on Pain and Distress. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory Animals*, v. 28, n. 2, p. 97-112, 1994.

FERREIRA, L.M., et al. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 20, n. 2, p. 23-34, 2005.

FILICIOTTO, F., et al. Behavioural and biochemical stress responses of *Palinurus elephas* after exposure to boat noise pollution in tank. *Marine Pollution Bulletin*, v. 84, n. 1-2, p. 104-114, 2014.

FINLAYSON, K., et al. Facial indicators of positive emotions in rats. *PLoS One*, v. 11, n. 11, p. 1-24, 2016.

FORTES, P.M., et al. Social instigation and repeated aggressive confrontations in male Swiss mice: analysis of plasma corticosterone, CRF and BDNF levels in limbic brain areas. *Trends in Psychiatry and Psychother*, v. 39, n. 2, p. 98-105, 2017.

FRAJBLAT, M., et al. Ciência em Animais de Laboratório. *Ciência e Cultura*, v. 60, n. 2, p. 44-60, 2008.

GILIOLI, R. Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2003.

GOUVEIA, K., HURST, J.L. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: the major role of non-aversive handling. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1-12, 2017.

HAWKINS, P., et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFWA Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals*, v. 45, n. 1, p. 1-13, 2011.

- HEDRICH, H.J. (Ed). *The Laboratory Mouse*. Academic Press, 2004.
- HEFFNER, R.S., et al. Audiograms of five species of rodents: implications for the evolution of hearing and the perception of pitch. *Hearing Research*, v. 157, n. 1-2, p. 138-152, 2001.
- HEREDIA, L., et al. Assessing anxiety in C57BL/6J mice: a pharmacological characterization of the open-field and light/dark tests. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 69, n. 2, p. 108-114, 2014.
- HOFF, J. Methods of Blood Collection in the Mouse. *Laboratory Animals*, v. 29, n. 10, p. 47-53, 2000.
- HUGHES, L.F. The fundamentals of sound and its measurements. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 46, p. 14-19, 2007.
- HURNIK, J.F. Behaviour. In: PHILLIPS, C., PIGGINS, D. *Farm animals and the environment*. C.A.B. International, 1992.
- JENSEN, K., et al. Vacuum-cleaner noise and acute stress responses in female C57BL/6 mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 49, n. 3, p. 300-306, 2010.
- KAISER, S., SACHSER, N. The effects of prenatal social stress on behaviour: mechanisms and function. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 2, p. 283-294, 2005.
- KIGHT, C.R., SWADDLE, J.P. How and why environmental noise impacts animals: an integrative, mechanistic review. *Ecology Letters*, v. 14, n. 10, p. 1052-1061, 2011.
- KIM, J., GORMAN, J. The psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*, v. 4, n. 5-6, p. 335-347, 2005.
- KIM, J.G., et al. Basal blood corticosterone level is correlated with susceptibility to chronic restraint stress in mice. *Neuroscience Letters*, v. 555, p. 137-142, 2013.
- LANGFORD, D.L., et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, v. 7, n. 6, p. 447-449, 2010.
- LAPCHIK, V.B.V., et al (Orgs.). *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. Atheneu, 1º ed., 2010.
- LAPCHIK, V.B.V., et al (Orgs.). *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. Atheneu, 2º ed., 2017.
- LAUER, A.M., et al. Analysis of environmental sound levels in modern rodent housing rooms. *Lab Animal (NY)*, v. 38, n. 5, p. 154-160, 2009.
- LEACH, M.C., et al. Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. *Animal Welfare*, v. 17, n. 2, p. 161-170, 2008.

LI, R., et al. Circadian clock gene plays a key role on ovarian cycle and spontaneous abortion. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 37, n. 3, p. 911-920, 2015.

LIMA, G.K., et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. *American Journal of Pathology*, v. 177, n. 5, p. 2433-2445, 2010.

LUCINDA, N. Células dendríticas, macrófagos, natural killer e linfócitos t CD8+ desempenham papel fundamental no controle do HSV-1 no gânglio trigêmeo produzindo IL-1 beta, iNOS e granzima B / [Tese]. Belo Horizonte: Instituto René Rachou, FIOCRUZ; 2017.

LUCINDA, N., et al. Dendritic cells, macrophages, NK and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B. *Virology Journal*, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2017.

MAJEROWICZ, J. Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do laboratório de experimentação animal (LAEAN) de Biomanguinhos [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ; 2005.

MAJEROWICZ, J. Boas Práticas em Biotérios e Biossegurança. *Inter ciência*, 2008.

MANSUR, D.S., et al. Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with Herpes simplex virus 1. *American Journal of Pathology*, v. 166, n. 5, p. 1419-1426, 2005.

MANTECA, X., et al. Bem-estar animal: conceitos e formas práticas de avaliação dos sistemas de produção de suínos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 6, p. 4.213-4.229, 2013.

MARSHALL, W.J., et al. *Bioquímica clínica: Aspectos clínicos e metabólicos*. Elsevier, 2016.

MATTARAIA, V.G.M., OLIVEIRA, G.M. Comportamento de camundongos em biotério. *Polo Gráfica*, 1<sup>ª</sup> ed., 2012.

MAZZACCARA, C., et al. Age-related reference intervals of the main biochemical and hematological parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains. *PLoS ONE*, v. 3, n. 11, p. 1-7, 2008.

MC BRIDE, S.D., CUDDLEFORD, D. The putative welfare reducing effects of preventing equine stereotypic behaviour. *Animal Welfare*, v. 10, p. 173-189, 2001.

MCILWAIN, K.L., et al. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiology & Behavior*, v. 73, n. 5, p. 705-17, 2001.

MILLIGAN, S.R., et al. Sound levels in rooms housing laboratory animals: an uncontrolled daily variable. *Physiology & Behavior*, v. 53, n. 6, p. 1067-1076, 1993.

- MINEUR, Y.S., CRUSIO, W.E. Behavioral effects of ventilated micro-environment housing in three inbred mouse strains. *Physiology & Behavior*, v. 97, n. 3-4, p. 334-340, 2009.
- MOBERG, G.P., MENCH, J.A (Eds). *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, 2000.
- MOLENTO, C.F.M. Medicina veterinária e bem-estar animal. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 28/29, p. 15-20, 2003.
- MÖSTL, E., PALME, R. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 23, n. 1-2, p. 67-74, 2002.
- MUNZEL, T., et al. Environmental stressors and cardio-metabolic disease: part I-epidemiologic evidence supporting a role for noise and air pollution and effects of mitigation strategies. *European Heart Journal*, v. 38, n. 8, p. 550-556, 2017.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. *Guide for the care and use of laboratory animals*. The National Academies Press, 8<sup>o</sup> ed., 2010.
- NOGUEIRA, M.L., et al. Diagnosis of mucocutaneous herpetic infections by PCR without DNA extraction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, n. 2, p. 213-214, 1998.
- NORDQUIST, R.E., et al. Mutilating Procedures, Management Practices, and Housing Conditions that May Affect the Welfare of Farm Animals: Implications for Welfare Research. *Animals*, v. 7, n. 2, p. 1-22, 2017.
- PAGLIARONE, A.C., SFORCIN, J.M. Estresse: revisão sobre seus efeitos no sistema imunológico. *Biosaúde*, v. 11, n. 1, p. 57-90, 2009.
- PALME, R. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare*, v. 21, n. 3, p. 331-337, 2012.
- PEEL, A.J., et al. Noninvasive fecal hormone analysis and behavioral observations for monitoring stress responses in captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Zoo Biology*, v. 24, n. 5, p. 431-445, 2005.
- PELLETT, P.E., ROIZMAN, B. Herpesviridae. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M (Eds.). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, 6<sup>o</sup> ed., 2013.
- PETERSON, E.A. Noise and laboratory animals. *Laboratory Animal Science*, v. 30, p. 422-439, 1980.
- PIZZUTTO, C.S., et al. Reduction of Abnormal Behaviour in Gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) through Social Interaction with human beings. *Laboratory Primate Newsletter*, v. 47, n. 3, p. 6-10, 2007.
- PIZZUTTO, C.S., et al. Bem-Estar no cativeiro: Um desafio a ser vencido. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 11, n. 2, p. 6-17, 2013.



- POOLE, T. Happy animals make good science. *Laboratory Animals*, v. 31, n. 2, p. 116-124, 1997.
- PORTFORS, C.V. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 46, n. 1, p. 28-34, 2007.
- PORTFORS, C.V., PERKEL, D.J. The role of ultrasonic vocalizations in mouse communication. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 28, p. 115-120, 2014.
- PUZSEROVA, A., BERNATOVA, I. Blood pressure regulation in stress: focus on nitric oxide-dependent mechanisms. *Physiological Research*, v. 65, n. 3, p. 309-342, 2016.
- RABAT, A. Extra-auditory effects of noise in laboratory animals: focusing on the relationship between noise and sleep. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 46, n. 1, p. 35-41, 2007.
- RASMUSSEN, S., et al. Construction noise decreases reproductive efficiency in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 48, n. 4, p. 363-370, 2009.
- REYNOLDS, R.P., et al. Noise in a laboratory animal facility from the human and mouse perspectives. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 49, n. 5, p. 592-597, 2010.
- ROIZMAN, B., et al. *Fields Virology Herpes simplex viruses*. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M (Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, 6<sup>o</sup> ed., 2013.
- HURNIK, J.F. Behaviour. In: PHILLIPS, C., PIGGINS, D. *Farm animals and the environment*. C.A.B. International, 1992.
- RUSSELL, W.M.S., BURCH, R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, 1959.
- SALES, G.D., et al. Environmental ultrasound in laboratories and animal houses: a possible cause for concern in the welfare and use of laboratory animals. *Laboratory Animals*, v. 22, n. 4, p. 369-375, 1988.
- SALES, G.D., et al. The acoustic environment and its effects on laboratory animals. In: *Welfare and Science, Proceedings of the Fifth FELASA Symposium 8-11 June 1993*(Bunyan J, ed). Royal Society of Medicine Press, 1993.
- SALGADO, A.R. *Transferência ovariana como alternativa para a restauração das funções reprodutivas em fêmeas de camundongos irradiadas com radiação gama de 60 CO [Dissertação]*. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.
- SANDERS, S., FEIJÓ, A.G.S. Uma reflexão sobre animais selvagens cativos em zoológicos na sociedade atual. In: *Congresso Internacional Transdisciplinar Ambiente e Direito*, Porto Alegre: PUC RS, 2007.

- SNOWDON, C.T. O significado da pesquisa em comportamento animal. *Estudos de Psicologia*, v. 4, n. 2, p. 365-373, 1999.
- SPINELLI, M.O., et al. Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. *Scientia Plena*, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2012.
- TAMURA, H., et al. Chronic exposure to low frequency noise at moderate levels causes impaired balance in mice. *PLoS One*, v. 7, n. 6, p.1-7, 2012.
- TOUKH, M., et al. Construction noise induces hypercoagulability and elevated plasma corticosteroids in rats. *Clinical and Applied Thrombosis Hemostasis*, v. 20, n. 7, p. 710-715, 2014.
- TURNER, J.G., et al. Hearing in laboratory animals: strain differences and nonauditory effects of noise. *Comparative Medicine*, v. 55, n. 1, p. 12-23, 2005.
- TURNER, J.G., et al. Noise in animal facilities: why it matters. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 46, n. 1, p. 10-13, 2007.
- TYE, K.M., et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, v. 471, n. 7338, p. 358-362, 2011.
- ULRICH-LAI, Y.M., HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, n. 6, p. 397-409, 2009.
- VAN RAAIJ, M.T.M., et al. Time-dependent differential changes of immune function in rats exposed to chronic intermittent noise. *Physiology & Behavior*, v. 60, n. 6, p. 1527-1533, 1996.
- VAZZANA, M., et al. Noise elicits hematological stress parameters in Mediterranean damselfish (*Chromis chromis*, perciformes): A mesocosm study. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 62, p. 147-152, 2017.
- VIOLLET, C., et al. Somatostatin-IRES-Cre mice: Between Knockout and Wild-Type? *Frontiers in Endocrinology*, v. 8, p. 1-8, 2017.
- VOIPIO, H.M., et al. Role of cage material, working style and hearing sensitivity in perception of animal care noise. *Laboratory Animals*, v. 40, n. 4, p. 400-409, 2006.
- WALSH, R.N., CUMMINS, R.A. The Open-Field Test: a critical review. *Psychological Bulletin*, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.
- WEBSTER, J. Critical control points in the delivery of improved animal welfare. *Animal Welfare*, v. 21, n. 1, p. 117-123, 2012.
- WEBSTER, J. Animal Welfare: Freedoms, Dominions and “A Life Worth Living”. *Animals*, v. 6, n. 35, p. 1-7, 2016.
- YOUNG, R.J. *Environmental Enrichment for Captive Animals*. Oxford: Blackwell Science, 1<sup>o</sup> ed., 2003.

ZOLINI, G.P., et al. Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. *Journal of neuroinflammation*, v. 11, p. 1-12, 2014.

ZOLINI, G.P.P. Ativação da resposta imune inata mediada por receptores do tipo Toll na infecção com Vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) em modelo murino. [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.

## ANEXO



Ministério de Saúde  
 FIOCRUZ  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Vice-presidência de Pesquisa e  
 Laboratórios de Referência



Comissão de Ética  
 no Uso de Animais

## LICENÇA

LW-20/15

Certificamos que o protocolo (P-83/14-2), intitulado "Resposta à infecção por Herpes simplex virus tipo 1 em modelo murino", sob a responsabilidade de MARCO ANTONIO DA SILVA CAMPOS, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 27/04/2019 e inclui o uso total de :

**Mus musculus**

- 168 Machos de C57BL/6, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

**Mus musculus**

- 48 Machos de B6;129 TLR2 tm, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

**Mus musculus**

- 48 Machos de B6;129 TLR9 tm, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

**Mus musculus**

- 48 Machos de TLR2/TLR9 KO, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

**Mus musculus**

- 48 Machos de MYD-J-, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 27 de abril de

Octavio Augusto França Presgrave  
 Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
 Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manginhos - Rio de Janeiro / RJ  
 Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br