

ETOGRAMA DE CAMUNDONGOS EM BIOTÉRIO: QUAIS SÃO AS PRINCIPAIS ATIVIDADES DESTES ANIMAIS DENTRO DA GAIOLA?

Lucianne Cardoso Chumbinho¹, Luiz Cesar C. Pereira da Silva², Caroline Corrêa Pizzini¹, Wanderson Silva Batista¹, Fabio Souza de Oliveira³, Gabriel Melo de Oliveira¹

1. Laboratório de Biologia Celular – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro
2. Centro de Experimentação Animal - Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro
3. Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Biofilmes - Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro.

Autor para correspondência:

Gabriel Melo de Oliveira

Email: gmoliveira@ioc.fiocruz.br

Recebido para publicação: 16/01/2012

Aceito para publicação: 20/08/2012

O comportamento de camundongos em biotérios é uma importante área da ciência de animais de laboratório. Apesar da literatura descrever inúmeros modelos de estudo comportamentais com diversas abordagens (depressão, ansiedade, agressividade e outros), estes modelos caracterizam-se por induzir o fenótipo comportamental desejado. Em nosso trabalho, buscamos determinar o padrão de comportamento sadio de camundongos desde o seu desmame até a idade adulta. Baseamos nossa metodologia na observação de agrupamentos, mantendo suas interações, sem induzir ou interferir na dinâmica social. Estruturamos um etograma através das atividades prevalentes como: exploração do ambiente, busca por alimento, auto-higienização, contato físico e repouso. Quantificamos a incidência destas atividades demonstradas por cada indivíduo em seu agrupamento durante o período de 60 minutos. Nossos resultados demonstram maior incidência de repouso em camundongos jovens. No entanto, na idade adulta, a exploração do ambiente e a busca por alimento são atividades mais prevalentes. Outro ponto importante foi a mudança do perfil de atividade entre as idades, cada agrupamento apresenta uma incidência de atividades diferente, sendo peculiar a cada dinâmica do agrupamento. Desta maneira, podemos concluir que estes parâmetros são importantes para o estabelecimento de padrões sadios de comportamento e para a avaliação das alterações observadas no modelo experimental deve ser relevada as características de cada idade e agrupamento. CEUA LW 5/12.

Palavras-chave: Camundongos. Comportamento animal., Etograma.

RESUMO

1 INTRODUÇÃO

O camundongo usado em biotérios é um mamífero da família *Muridae*, sub-família *Murinae*, da ordem *Rodentia* e gênero *Mus*. O seu nome científico é *Mus musculus*^{1,2}. Apresenta um corpo fusiforme e flexível, permitindo a sua passagem em pequenos espaços. Seus pelos podem apresentar diversas colorações (da albina a preta) são geralmente finos, retos e com padrão de distribuição uniforme por todo o corpo. Cauda e orelhas relativamente grandes permanecem descobertas de pelos

durante toda a sua vida. O seu pequeno tamanho e sua área de superfície por grama de peso corpóreo relativamente grande suscetibilizam o animal as alterações das condições ambientais. A temperatura corporal (35,2 a 37,9°C) é facilmente afetada por pequenas oscilações, modificando gravemente a fisiologia do animal. Também possui maior sensibilidade à perda de água e desidratação devido ao seu alto metabolismo (batimentos cardíacos: 500 a 780 bpm, em atividade; frequência respiratória de 163 por minuto) e o mecanismo de regulação térmica. Sua expectativa de vida média, dois anos, pode chegar a alguns casos até quatro anos^{2,3}.

A ciência de animais de laboratório é uma especialidade, dentro de campo medicina veterinária, direcionada para o desenvolvimento de modelos experimentais pelo uso de animais de laboratório que promova conhecimento capaz de melhorar a qualidade de vida do ser humano e do próprio animal⁴. Dentre outras atividades, está relacionada com a busca para elaboração e aplicação de metodologias que minimizem a dor e o desconforto dos animais durante a investigação científica^{4,5}. O camundongo é amplamente utilizado nos ensaios biomédicos por apresentar características anatômicas, genéticas e fisiológicas bem definidas⁶. Contudo, se este modelo possui a capacidade de reproduzir aspectos patológicos das doenças de forma semelhante ao ser humano, faz-se necessário também que haja o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e acompanhamento semelhantes ao utilizado no ser humano. Além disso, consideramos que o comportamento reprodutivo e social do camundongo é intensamente subestimado. Este fato advém da dificuldade de observação, avaliação e interpretação dos padrões comportamentais pelo manipulador. Porém consideramos esta espécie com característica e emoções individualizadas e complexas, assim como um repertório amplo de comportamentos. O fato de não conseguirmos observar (ou entender) não nos dá a convicção que sensações, emoções e hábitos não existam⁷.

Os ensaios pré-clínicos definem-se como ensaios *in-vitro* (em laboratório) e *in-vivo* (em animais), que visam definir o perfil farmacológico e toxicológico de novos medicamentos. A farmacocinética não favorável, toxicidade do composto, eficácia não comprovada, aparecimento de efeitos adversos são os principais problemas detectados nos testes pré-clínicos e responsáveis pelo insucesso no desenvolvimento de medicamentos⁸. Segundo o OECD - *Guidelines for testing of chemicals*, em relação aos ensaios de toxicidade aguda, recomenda-se (após a administração do fármaco) realizar uma criteriosa observação de sinais de intoxicação em pele e pêlos, olhos e mucosas. Descreve também a observação de sinais alterados no sistema respiratório, circulatório,

nervoso autonômico e central. Dentre alguns exemplos de alterações são destacados: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Ressaltamos que, segundo o respectivo manual, as alterações nos padrões comportamentais também devem ser observadas, porém não especificam qual (quais) parâmetro (s) deve (m) ser (em) utilizado (s)^{9,10}.

Nosso principal objetivo neste trabalho foi determinar quais são as principais atividades comportamentais de um camundongo macho, sadio, alojado num biotério de experimentação. Estruturamos um etograma e realizamos a qualificação e a quantificação de atitudes como exploração do ambiente, busca por alimentos, auto-limpeza e o ato do animal “subir” num outro indivíduo. Avaliamos os agrupamentos por sessenta minutos (após a substituição da gaiola) e a cada semana até a idade adulta.

Destacamos esta frase do manual OECD: *Animals found in a moribund condition and animals showing severe pain or enduring signs of severe distress should be humanely killed*.⁹ Acreditamos que a importância deste trabalho foi fornecer parâmetros para a determinação de quais as alterações comportamentais podem ser observadas durante um ensaio pré-clínico. Ainda, avaliar com precocidade sinais de dor, desconforto e estresse no animal. Assim poderemos realizar a finalização humanitária do animal sem que o mesmo evolua para um estado moribundo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Camundongos da linhagem Swiss Webster ($n=100$), machos, com três semanas de vida, procedentes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/Fiocruz) e mantidos no Setor de Experimentação Animal do Laboratório de Biologia Celular (SEA/LBC) do Instituto Oswaldo Cruz. A manutenção dos camundongos foi realizada de acordo com os parâmetros descritos no

“Cuidado e Manejo de Animais de Laboratório”¹¹ e sob a licença LW 5/12 da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA/Fiocruz). Todos os ensaios foram realizados em ambiente controlado em relação a ruído (< 60 decibéis), temperatura (22°C ± 2°C) e luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuridão).

2.2 Agrupamento

Os camundongos foram divididos, na terceira semana de idade, em grupos de até dez animais. Foram formados 10 grupos discriminados de A1 a A10. Estes animais foram identificados individualmente por um sistema de cor e posição corporal. Além disso, foi oferecido água e ração *ad libitum* para todos os agrupamentos. Todas as análises foram realizadas imediatamente após a troca da gaiola e maravalha de pinus, usada como cama.

2.3 Etograma

Estruturamos nossa análise comportamental pela avaliação dos principais atividades realizadas pelos camundongos nos seus respectivos agrupamentos. Podemos destacar qualitativamente as seguintes atividades: a) Exploração do ambiente (*EA*): esta atividade consiste no levantamento vertical com ou sem apoio das patas dianteiras na parede da gaiola. b) Procura de alimento (*PA*): determinamos esta atividade pela busca de alimento revirando a maravalha pelas patas dianteiras. c) Auto-higienização (*AH*): ato de o animal lambe-se ou limpar-se. d) Repouso ou descanso (*RE*): caracteriza-se pela atitude de deitar-se ou dormir durante a observação. e) Montagem (*Mo*): esta atividade está relacionada a atitude de apoiar as patas dianteiras ou traseiras no dorso de outro animal.

2.4 Quantificação das Atividades

Uma vez a cada semana, entre a 4^a, 6^a e a 8^a semana de vida (sdv) realizamos a análise quantitativa através da filmagem de cada grupo (vista superior) com uma câmera Canon PowerShot SX20 IS® (Lake Success, NY - EUA) por 60 mi-

nutos contínuos. Após a captação do material, dividimos a filmagem de cada grupo em intervalos de 5 minutos e “congelamos” a imagem no respectivo intervalo. Nesta imagem fixada contamos o número de animais, demonstrando as respectivas atividades descritas no etograma. Desta maneira, conseguimos avaliar os seguintes dados: a) Dinâmica e tipificação das atitudes do animal durante o tempo de 60 minutos, desde a infância até a idade adulta; b) Prevalência dos tipos de atividade observada nos grupos de camundongos; c) Prevalência destas atividades em relação a idade; d) Diferença, entre cada agrupamento, do perfil prevalente de atividades.

3 RESULTADOS

Analizamos as principais atividades dos camundongos em biotério. Nossos resultados demonstram que após a substituição da gaiola, principalmente da maravalha, os animais apresentam uma dinâmica caracterizada pela mudança proporcional dos tipos de atividades observadas. Na figura 1, até os primeiros 15 minutos, 25 a 30% dos animais encontram-se concentrados na atividade de explorar o ambiente (*EA*); 40% estão realizando a procura de alimentos (*PA*); 20% realizam a sua auto-higienização (*AH*); 1 a 10% estão em repouso (*RE*) e 5% estão em atitude de contato físico pela “montagem” de outro animal (*Mo*). Este perfil demonstra significativa mudança entre o 20º e o 35º minuto de observação. Em relação a *EA* encontramos uma variação entre decrescente de 20 a 15% da prevalência dos animais na realização desta atitude; observamos também a queda entre 40 a 35% dos animais realizando a atitude de *PA*. Não houve variação entre as atitudes de *AH* e *Mo* mantendo os valores de 15 e 5%, respectivamente. Contudo, a atitude de *RE* apresentou um aumento entre 10 a 30% do número de animais. Ao final, com 60 minutos de observação, observamos 13% dos animais em *EA*, aproximadamente 29% dos animais em *PA*; 13% em *AH*; 41% em *RE* e 4% em *Mo*.

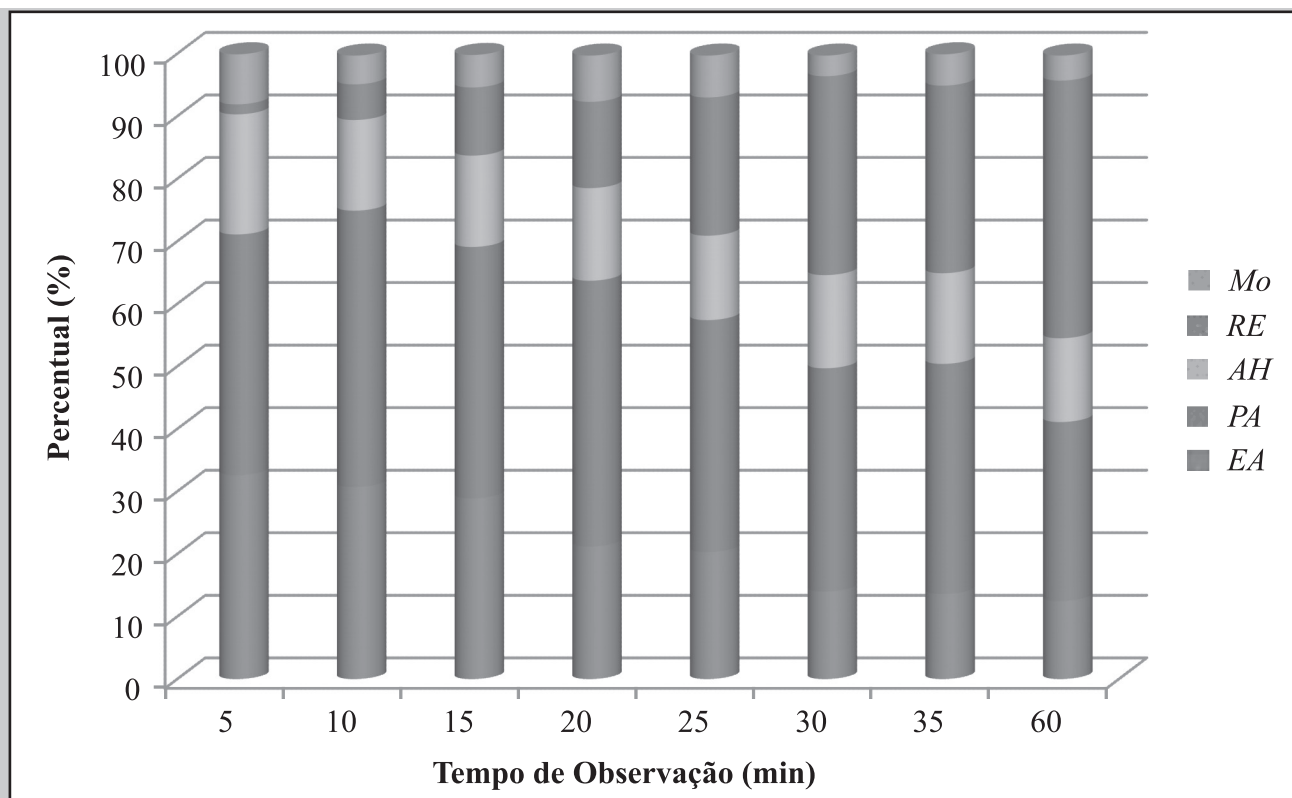


Figura 1: Tipificação da atividade de camundongos em relação ao tempo: observação num período de 60 minutos da dinâmica das atividades em relação ao tempo. Em escala percentual (0 a 100%), prevalência dos tipos de atividade exercida pelos camundongos: exploração do ambiente (EA); procura de alimentos (PA); auto-higienização (AH); atividade de repouso (RE); atividade de montagem (Mo).

Considerando as três semanas de observação, podemos descrever que a proporção média do tipo de atividades realizadas pelos animais num tempo total de 60 minutos foi a seguinte: PA, atividade realizada por um maior número de animais quando estão em suas gaiolas em biotério, aproximadamente 39% estavam envolvidos nesta atividade. Logo após, EA, realizada por 22% dos animais. A AH e o RE foram realizadas por 19 e 14% dos animais, respectivamente. Apenas 6% dos animais foram observados em atitude de Mo durante os 60 minutos de observação (Fig. 2).

Contudo este perfil não foi fixo em relação a cada idade observada (Fig. 3). Os camundongos com 4 semanas de vida (Fig. 3A) apresentaram maior prevalência de indivíduos em RE (39%); PA (21%); EA (17%); AH (16%) e Mo (7%). Este mesmo grupo de animais entre a 6ª (Fig. 3B) e a

8ª semanas de vida (Fig. 3C) apresentaram uma significativa alteração no seu perfil de atividade com maior prevalência de animais realizando as seguintes atitudes: PA: (6ª sdv, 53% e 8ª sdv, 47%); EA: (24 e 27%, respectivamente); AH (16 e 9%); RE (2 a 13%) e Mo 5% nas respectivas semanas.

Na fig. 4, nossos resultados demonstraram claramente que, além da variação do perfil de incidência dos tipos de atividades, durante seu amadurecimento, também houve significativas variações dos tipos de atitudes estudadas entre os próprios agrupamentos. Entre as idades (4ª sdv: A a C; 6ª sdv: D a F e 8ª sdv: G a I) houve a similaridade do perfil, onde observamos maior prevalência de animais em RE na 4ª semana de vida e conforme o amadurecimento, uma alteração prevalecendo a PA e EA. Ressalta-se que o Agrupamento 3 (A3) demonstrou um perfil constante em todas as ida-

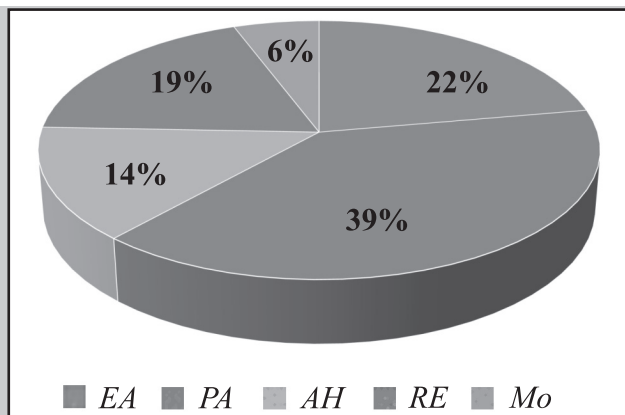


Figura 2: A incidência das atividades no agrupamento de camundongos: três semanas de observação, média da incidência (em percentual – 0 a 100%) de atividades exercidas pelos animais. A procura de alimentos (PA): atividade de maior incidência. Exploração do ambiente (EA); auto-higienização (AH) e o repouso (RE) apresentam incidência semelhante. O contato físico, pela montagem (Mo) entre os indivíduos, atividade de menor incidência.

des, prevalecendo PA e EA desde a 4ª semana de vida. Então em relação aos agrupamentos (A1: A a G; A2: B e H; A3: C e I) podemos observar que cada um destes apresentaram perfis de atividades semelhantes, com prevalência de PA e EA, porém o número de animais exercendo estas atividades foi diferente entre cada agrupamento. Desta maneira, apesar de atividades prevalentes semelhantes, cada agrupamento apresentou um perfil peculiar e diferenciado.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O camundongo é uma espécie, extremamente ativa, que se empenha em altos níveis nas interações sociais e recíprocas^{12,13}. Também apresenta marcantes comportamentos de nidificação, acasalamento, maternidade, marcação territorial e agressividade (principalmente entre machos em idade adulta)^{14,15,16,17}. Grande variedade de ensaios sociais foram descritos na literatura para o estudo de comportamentos individuais^{18,19,20}. Os

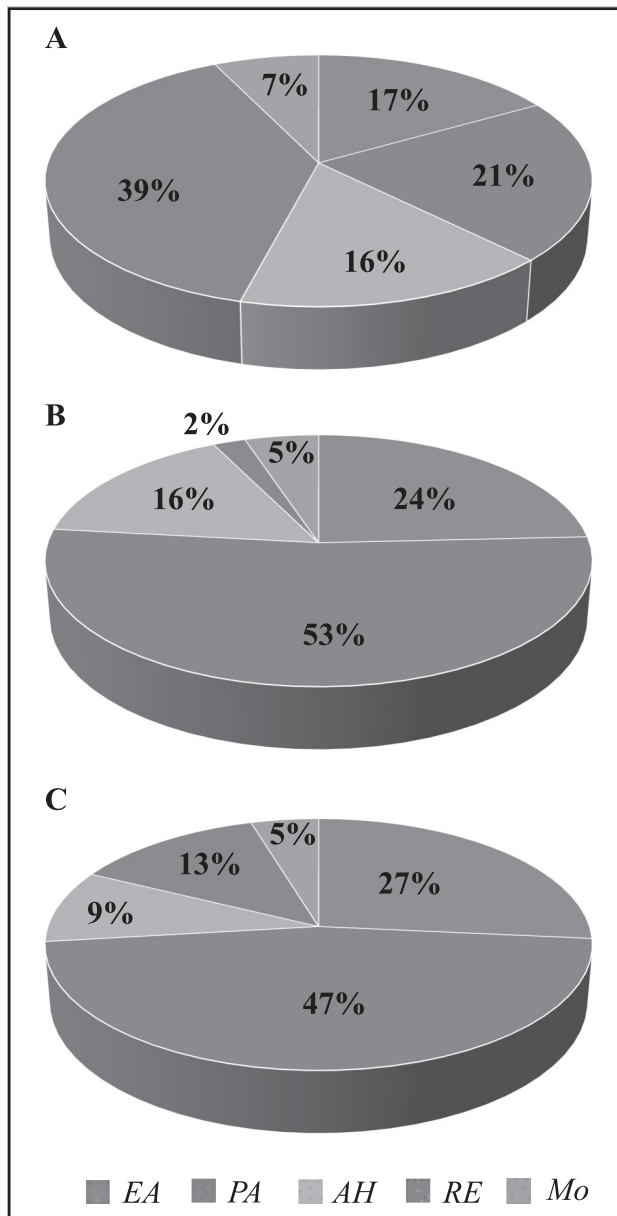


Figura 3: Incidência de atividades em relação a idade: as atividades de exploração do ambiente (EA), procura de alimentos (P), auto-higienização (AH), repouso (RE) e (Mo) apresentaram diferentes percentuais de incidência de tipos de atividade em relação a 4ª (A), 6ª (B) e 8ª (C) de vida.

exemplos a seguir foram concebidos e descritos para evidenciar a relevância dos tipos de déficits em interações sociais, mais especificamente para serem usados como modelos de autismo. Dentre estes ensaios podemos destacar: a) avaliação das interações sociais recíprocas, e b) avaliação refi-

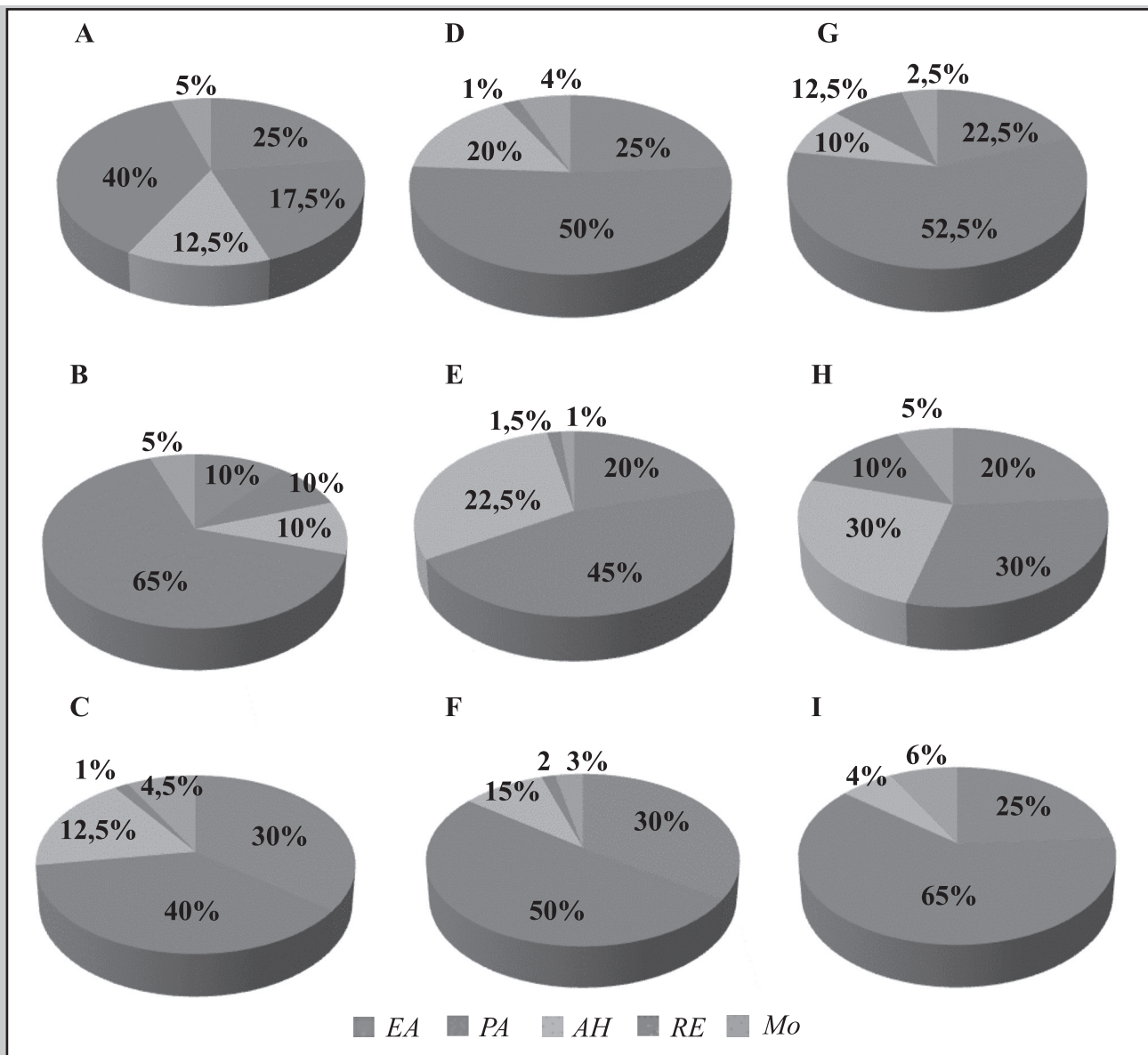


Figura 4: Diferença dos tipos de atividade em relação aos agrupamentos: diferenças do perfil de atividade entre as idades, diferença entre os agrupamentos na mesma idade. O agrupamento A1 (A a G) e A2 (B a H) aproximam-se do perfil médio, onde na 4ª semana de vida (A a C) prevalece a atividade de repouso (RE) com maior incidência. Nesta mesma semana, o A3 (C a I) apresentou a procura de alimentos (PA – vermelho) com maior incidência. Na 6ª semana (D a F), houve semelhança entre a prevalência das atividades, porém o percentual de incidência entre os indivíduos demonstrou sutil diferença. Na 8ª semana (G a I), houve variação na atividade de auto-higienização (AH) entre os grupos. As atividades de montagem (Mo) manteve sua baixa incidência entre todos os grupos e também entre as idades.

nada das interações entre pares (jovens ou adultos) em gaiola padrão ou arenas especializadas²⁰.

Contudo, segundo Haller & Mano²¹, aproximadamente 80% dos estudos comportamentais em camundongos empregaram testes tradicionais,

considerados “clássicos”. Estes testes: i) Campo aberto, ii) Labirinto em cruz elevada, iii) Teste da suspensão da cauda, iv) Caixa claro/escuro e v) Interação social²¹, avaliam o indivíduo isolado da sua interação social, ou seja apenas as carac-

terísticas individuais. Além disso, questionamos não a validade destes testes, mas a aplicabilidade destes testes. Todas estas metodologias isolam ou induzem o animal a um comportamento específico em um local diferente do qual está sendo mantido. Importantes informações são adquiridas por estes testes como a característica de ansiedade e depressão dos animais, mas não são capazes de descrever o comportamento individual dos camundongos em seu agrupamento, sua dinâmica social, a diferença do perfil de comportamento entre os grupos, entre as idades e outros.

Em nosso estudo nos propomos a identificar quais são as principais atividades e a sua prevalência apresentadas pelo camundongos (machos) em seu agrupamento no biotério²². Estruturamos uma metodologia que tivesse mínima interferência no ambiente do animal (sua gaiola) e não induzindo as alterações individuais ou interações sociais. Acreditamos que a filmagem a distância e a análise do etograma através dos filmes alcançaram este objetivo. Observamos que a incidência dos tipos de atividade assim como sua prevalência demonstra interessantes diferenças durante o amadurecimento dos animais e entre os agrupamentos. Um número maior de animais recém desmamados (4ª semana de vida, ou seja infantis) mantêm-se em repouso. Conforme amadurecem a curiosidade demonstrada pela *EA* e a necessidade da busca pela

alimentação, descrita pela atividade (*PA*), torna-se mais prevalente entre os indivíduos dos grupos. A prevalência de *AH* é relativamente constante para cada indivíduo e para cada agrupamento, porém sempre presente. A *Mo* apresentou intensidade muito reduzida durante todo ensaio, porém constante. Possivelmente pela rápida movimentação dos animais da gaiola.

Podemos concluir que as principais atividades realizadas pelos camundongos em biotérios são de repouso quando são infantis (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.

5 AGRADECIMENTOS

À Dr^a Maria de Nazaré Corrêa Soeiro, Chefe do Laboratório de Biologia Celular / IOC pelo apoio logístico para os ensaios e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro.

ETHOGRAM OF MICE: WHAT ARE THE MAIN ACTIVITIES OF THESE ANIMALS IN THE CAGE?

The behavior of mice in laboratory animal houses is an important area of science of laboratory animals. Although the literature describing numerous behavioral study models with different approaches (depression, anxiety, aggressiveness, etc...), these models are characterized by inducing the required behavioral phenotype. In our study, we determined the pattern of behavior of healthy mice since their weaning to adulthood. We based our methodology on the observation of a group, maintaining their interactions, without inducing or interfere with social dynamics. Structured an

ABSTRACT

ABSTRACT

ethogram through activities prevalent as: exploitation of the environment, finding food, self-hygiene, physical contact and repose. Quantify the incidence of these activities demonstrated by each individual in your group during the 60 minutes. Our results demonstrate a higher incidence of sleep in young mice. However, in adulthood, the exploitation of the environment and search for food activities are more prevalent. Another important point is that in addition to changing the profile of activity during the ages, each group presents a profile of incidence of different activities, and the peculiar dynamics of each group. Thus, we conclude that these parameters are important for establishing healthy patterns of behavior and to evaluate the changes observed in the experimental model in relief should be the characteristics of each age and group.

Keywords: Mice. Animal Behaviour. Ethogram.

REFERÊNCIAS

1. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2002.387p.
2. Ko GM, De Luca RR. Camundongo. In Lapchik V, Mattaraia V, Ko GM, editores. Cuidados e manejos de animais de laboratório. São Paulo: Editora Ateneu; 2009. p.137-67.
3. Fox GM, Cohen JB, Franklin ML. Laboratory animal medicine. Academic Press; 1984. p.1-10.
4. Canadian Council on Animal Care. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. 1,2, 2a edição, 1998.
5. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals .8nd ed, Washington: National Academy Press; 2010.
6. Araújo-Jorge and De Castro. Araújo-Jorge, TC. (ORG). *Doença de Chagas: Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz / Instituto Oswaldo Cruz; 2000. 368p.
7. Oliveira GM. Comportamento Social de Camundongos em Biotérios de Experimentação. In Mattaraia VM, Oliveira GM, editores. Comportamento de Camundongos em Biotério. 1ª ed. São Paulo: Editora Poploprint; 2012. p.137-67.
8. Roche Labs. 2012. Fase pré-clínica. [Citado em maio 2012]. Disponível em: <http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/investigacao/fase-pre-clinica/>
9. OECD guidelines. 2012. [Citado em maio 2012]. Disponível em: <http://www.oecdguidelines.nl/guidelines/science-technology/>.
10. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen. 2000;35(3):206-21.
11. Ko GM, Damy SB. Controle do macro e microambiente. In: Lapchik VV, Mattaraia VM, Ko GM, editores. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu Editora; 2009. p.273-93.
12. Anderson PK. Density, social structure, and nonsocial environment in housemouse populations and the implications for rejuilation of numbers. Trans N 1 Acad Sci 1961;11:23 (5).
13. Bisazza A. Social organization and territorial behaviour in three strains of mice. Boll Zoo. 1988;48:157-67.
14. Crowcroft P. Territoriality in mild house mice, *Mus musculus*. J Hlammal. 1955; 36:299-301.
15. Mondragon R, Mayagoitia L, Lopez-Lujan A, Diaz JL. Social structure features in three inbred strains of mice C57BI/6J, BALB/cJ and NIH: Comparative study. Behav Neural Biol. 1987;47:384-91.
16. Hilakivi LA, Lister RG, Duncan MJ, Oath, Eskey R, Mefford I, et al. Behavioral, hormonal and neurochemical characteristics of aggressive alpha mice. Brain Res. 1989;502:158-66.
17. Mattaraia VGM. Enriquecimento ambiental. In Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM, editores. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p.537-47.
18. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology. 1987;92:180-5.
19. Malatynska E, Knapp RJ. Dominant-submissive behavior as models of mania and depression. Neurosci Biobehav Rev. 2005;29 (4-5):715-37.
20. Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. Nat Rev Neurosci. 2010 July;11(7):490-502.
21. Haller J, Mano A. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. Curr Opin Psychiat. 2011;25:59-64.
22. Terranova ML, Laviola G. Scoring of social interactions and play in mice during Adolescence. New Jersey:Wiley; 2005.