

ESTUDO DOS EFEITOS DE ESTÍMULOS DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA DIMINUIÇÃO DO ESTRESSE EM RATOS WISTAR

Study of the effects of environmental enrichment stimuli on the reduction of stress in Wistar rats

Pamela Caroline de Carvalho Pittori¹; Daniele de Oliveira Moura Silva¹; Guilherme Batista do Nascimento¹; Ana Carolina Basílio Palmieri¹

¹Departamento de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Adamantina, Campus II, CEP 17800-000, Adamantina – SP, Brasil.

Resumo

Introdução: O enriquecimento ambiental consiste em mudanças no ambiente de animais que ampliam sua qualidade de vida e bem-estar. O enriquecimento do ambiente utilizado em pesquisas pode conceder o comportamento natural dos animais, diminuindo o nível de estresse e aumentando o bem-estar podendo influenciar positivamente nas respostas durante um experimento. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental na diminuição do estresse em ratos Wistar por meio da dosagem de cortisol fecal e do monitoramento de comportamentos. **Metodologia:** Inserção de objetos e atividades e dosagem do cortisol por meio de amostras fecais. Os animais foram separados em grupos de acordo com o tipo de enriquecimento ambiental oferecido: alimentar, cognitivo, físico, sensorial e social, além dos grupos controle, controle social e estresse. Em cada grupo havia uma gaiola com animais machos e outra com as fêmeas. Antes e depois dos estímulos foram coletadas amostras de fezes das gaiolas para a dosagem de cortisol. **Resultados:** Dentre os tratamentos não houve diferença significativa nos níveis de cortisol, dos animais controle e enriquecidos, porém entre os tratamentos de socialização houve diminuição significativa do hormônio (diferença de 69,94%) nos animais que experimentaram a socialização. **Conclusão:** Há necessidade de novas pesquisas com número amostral maior para melhor compreensão do efeito do enriquecimento ambiental em animais de laboratório.

Palavras-chave: Bem-estar animal; Cortisol; Enriquecimento ambiental; Estresse; Wistar.

Introduction: Environmental enrichment consists of changes in the environment of animals that increase their quality of life and well-being. The enrichment of the environment used in research can grant the natural behavior of the animals, reducing the level of stress and increasing the well-being, which can positively influence the responses during an experiment. **Objective:** To evaluate the effects of environmental enrichment on reducing stress in Wistar rats by measuring fecal cortisol. **Methodology:** Insertion of objects and activities and cortisol dosage through fecal samples. The animals were separated into groups according to the type of environmental enrichment offered: food, cognitive, physical, sensory and social, in addition to the control, social control and stress groups. In each group there was a cage with male animals and another with females. Before and after the stimuli, feces samples were collected from the cages for cortisol dosage. **Results:** Among the treatments, there was no significant difference in cortisol levels, in the control and enriched animals, but among the socialization treatments there was a significant decrease in the hormone (69.94% difference) in the animals that experienced socialization. **Conclusion:** There is a need for further research with a larger sample size to better understand the effect of environmental enrichment on laboratory animals.

Keywords: Animal welfare; Cortisol; Environmental enrichment; Stress; Wistar.

Recebido em: 11-07-2023

Publicado em: 31-07-2024

Autor correspondente

Pamela Caroline de Carvalho Pittori

Endereço: Rua Gênova, 491.

Parque Veneza, Lucélia – SP, Brasil

E-mail: pamelacarvalhopittori@gmail.com

Telefone de contato: (18) 99148-6687

1. Introdução

O início da experiência com o enriquecimento ambiental (EA) deu-se por volta da década de 1960, com estudos introdutórios acerca da capacidade de aprendizagem e plasticidade cerebral como efeitos do ambiente enriquecido¹. Na seguinte década, zoológicos iniciaram

programas de enriquecimento com o intuito de restabelecer comportamentos naturais e reprimir problemas comportamentais de animais em cativeiro². Atualmente, a ciência do bem-estar animal (BEA) junto às ideias do enriquecimento, também se estendeu em uma diversidade de situações para animais de laboratório e de fazendas de

produção³, e mais proximamente em animais domesticados⁴.

Quando se trata de enriquecimento, estão incluídas neste contexto, mudanças no ambiente físico e social de animais que em conjunto com seus comportamentos naturais e o habitat, ampliam sua qualidade de vida e de bem-estar⁵. Existem diversas formas que os enriquecimentos podem ser ofertados aos animais, como, por exemplo, a introdução de objetos diferentes (cordas, pedaços de madeira, pneus, escadas, túneis e/ou folhas), a mudança na alimentação oferecida (em horários diferentes, escondidas, congeladas e/ou penduradas), o estímulo dos órgãos sensoriais por meio de novidades (brinquedos, ervas e/ou gustação) e o contato direto ou indireto com outros seres^{3,6,7}.

É possível dividir o EA em cinco grupos. O alimentar, que manipula a alimentação oferecida de maneira diferente, como alterações de horário, frequência, na dieta e disposição, elevando a dificuldade de obter o alimento; O cognitivo que estimula a capacidade intelectual do animal com desafios de concentração, coordenação motora, memória e raciocínio em que são desenvolvidos

problemas para acesso a uma recompensa; O físico que introduz mudanças nos elementos ou estrutura que constituem o alojamento do animal, propondo exploração e manipulação; O sensorial que promove estímulos sensoriais por recursos ou situações, por meio de novos sons, texturas e cheiros e o enriquecimento social que abrange a socialização e/ou contato direto e indireto com seres da mesma espécie ou não, o convívio social estimula constantemente questões cognitivas e oportuniza relações diferentes⁸.

É de extrema importância ter muito cuidado na escolha do EA, apesar de não existir um consenso sobre um método único capaz de avaliá-lo. Adequar a complexidade do ambiente enriquecido à cada espécie e ao número de animais alojados, seus comportamentos e interações é primordial para bons resultados⁹. Mediante estudos sobre comportamentos específicos e espontâneos há a capacidade de adquirir conhecimentos acerca das preferências e necessidades dos animais. A construção, manejo, conteúdo e manutenção de gaiolas e alimentação são fatores ambientais que influenciam e determinam o comportamento desses seres. O EA

tem sido uma conduta importante para melhoria no isolamento animal¹⁰.

A diminuição de comportamentos anormais e estereotipados e a manifestação de comportamentos típicos são os principais critérios utilizados como indicadores de eficácia do EA⁹. Estimular a complexidade e introduzir elementos novos são componentes básicos para a atenuação de comportamentos indesejados, do mesmo modo que mudanças estruturais, de rotina e socialização podem melhorar o estado psicológico e o bem-estar¹¹. A semelhança com o ambiente natural do animal demonstra maior inclinação para a expressão de comportamentos característicos e uma ampliação na reprodução¹².

Apesar de citar vários experimentos com resultados promissores, ainda é impossível determinar quais fatores são diretamente melhorados com o enriquecimento, pois a individualidade dos animais deve ser considerada nas alterações nos estudos de enriquecimento^{13,14}.

O estresse pode causar uma série de mudanças no desempenho dos sistemas corpóreo, como os sistemas nervoso, imunológico e endócrino. Em situações de estresse, a liberação

de glicocorticoides (GCs), como o cortisol e catecolaminas é aumentada, resultando em altas mudanças de energia permitindo ao organismo se adaptar à nova situação estressante. O estresse crônico tem potencial patológico, pois altera os níveis séricos de diversos hormônios e outros biomarcadores séricos, levando a uma série de alterações na homeostase corporal^{15,16}. Conforme o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) é ativado por estímulos estressores há um aumento considerável nos níveis de GCs¹⁷.

A dosagem do cortisol pode ser obtida por meio da análise de amostras de sangue, fezes, urina, pelos e saliva¹⁸. A coleta sanguínea é um procedimento invasivo, uma vez que o deslocamento, o alojamento em local diferenciado, a contenção e o nível que esses animais estão habituados com o contato humano são situações distintas que contribuem com oscilações hormonais e, conseqüentemente, o comprometimento da amostra. Portanto, a medição por métodos não invasivos, como a concentração de metabólitos de cortisol nas fezes é uma possibilidade de acompanhar a atividade endócrina e o monitoramento fisiológico com

chances menores de prejudicar os resultados^{19,20}.

Isso posto, torna-se o objetivo principal desta pesquisa avaliar os efeitos de diferentes tipos de enriquecimentos ambientais em Wistars, por meio da dosagem de cortisol e do monitoramento de comportamentos, com a finalidade de promover o bem-estar e diminuir níveis de estresse.

2. Metodologia

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animal em Experimentação (CEUA) do Centro Universitário de Adamantina (FAI) sob o protocolo N° 22008. O estudo foi realizado no Biotério Central do Centro Universitário de Adamantina.

Neste estudo, foram utilizadas 32 ratas, conhecidas popularmente como ratos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas (n=16/16) mantidas após a fase de desmame e fornecidos pelo biotério do Centro Universitário

de Adamantina (FAI). Os animais ficaram alojados em gaiolas padronizadas, dispostas em prateleiras. Todos os animais seguiram a rotina e condições normais do biotério, com alimentação e água a livre demanda, limpeza e troca de maravalha das gaiolas semanalmente, temperatura regulada em ± 22 °C, umidade e ciclos de claro e escuro (12 horas cada) padronizados de acordo com normas do biotério (**FIGURA 1**). Os animais foram divididos em oito grupos experimentais de quatro animais cada, e cada grupo foi separado por sexo, um par de machos e um par de fêmeas acondicionados em cada gaiola (**FIGURA 1**): grupo I: submetido a estresse; grupo II e III: controle e controle social; grupo IV, V, VI, VII e VIII: submetidos aos diferentes tipos de enriquecimento (alimentar, cognitivo, físico, sensorial e social, respectivamente).

No **QUADRO 1** é apresentada a divisão e agrupamento dos animais, assim como as especificidades de cada EA aplicado na pesquisa.



FIGURA 1 – A: Disposição e organização das gaiolas nas prateleiras. B: Demonstração da divisão dos grupos. Na imagem à esquerda, a caixa da dupla de machos do grupo EA cognitivo (EACM) E à direita, a caixa das fêmeas do mesmo grupo (EACF). C: Dupla de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*).

QUADRO 1 - Descrição dos grupos de animais

Grupo	Agrupamento	Enriquecimento	Itens inseridos
I	ESTM/ESTF (n=2/2)	ESTRESSE	Contensor (30 min)
II	CM/CF (n=2/2)	CONTROLE	—
III	CSoM/CSoF (n=2/2)	CONTROLE SOCIAL	Movimentados junto com o EASo
IV	EAAM/EAAF (n=2/2)	ALIMENTAR	Varal de legumes + Tenébrio
V	EACM/EACF (n=2/2)	COGNITIVO	Tronco + Cano recompensa
VI	EAFM/EAFF (n=2/2)	FÍSICO	Tubo de PVC + Corda trançada
VII	EASeM/EASeF (n=2/2)	SENSORIAL	Manjeriçã
VIII	EASoM/EASoF (n=2/2)	SOCIAL	Socialização dos dois grupos (por 1H)

Legenda: ESTM: Estresse machos; ESTF: Estresse fêmeas; CM: Controle machos; CF: Controle fêmeas; CSoM: Controle social machos; CSoF: Controle social fêmeas; EAAM: EA alimentar machos; EAAF: EA alimentar fêmeas; EACM: EA cognitivo machos; EACF: EA cognitivo fêmeas; EAFM: EA físico machos; EAFF: EA físico fêmeas; EASeM: EA sensorial machos; EASeF: EA sensorial fêmeas; EASoM: EA social machos; EASoF: EA social fêmeas.

Grupo Estresse (ESTM/ESTF)

A contenção manual pode provocar riscos, se realizada de maneira incorreta. Dessa forma, adota-se um dispositivo de contenção que pretende aumentar a facilidade de manuseio e a segurança, além de evitar a fuga e acidentes, como arranhões e mordidas²¹. Apesar de ser um método facilitador para muitos pesquisadores, a contenção pode ser estressante ao animal, sobretudo se for realizada em um tempo exacerbadamente longo e se os animais não estiverem habituados ao toque humano, acarretando oscilações de substâncias que podem comprometer estudos.

Cada animal foi retirado de sua caixa e colocado sobre uma bancada plana, onde o contensor encontrava-se aberto, para que pudesse entrar espontaneamente (**FIGURA 2**). Seguidamente, após a entrada do animal, fechou-se o dispositivo, limitando seus movimentos. Todos os animais

permaneceram durante 30 minutos durante três dias na semana no equipamento e, em seguida, foram devolvidos às suas caixas.

Grupo Controle e Controle social (CM/CF) e (CSoM/CSoF)

O chamado grupo controle é sucintamente uma variável manipulada com a intenção de ser neutralizada e não influenciar na relação entre as outras variáveis estudadas²². Pode-se concluir que a utilização de um grupo de referência é necessária para uma melhor comparação, principalmente se os valores analisados no estudo parecerem divergir dos valores considerados referência, sejam estes na literatura ou no laboratório onde aconteceu a análise²³.

No caso do presente estudo, houve a divisão de dois grupos controle. O primeiro grupo controle (C) permaneceu durante todo o período da pesquisa em suas caixas e manteve a rotina normal do biotério

sem que houvesse nenhum estímulo inédito aos seus alojamentos. O segundo grupo (CSO) manteve a rotina habitual do biotério, porém suas caixas eram movimentadas junto ao grupo do EA social, mas os animais não eram retirados desta.

Grupo EA Alimentar (EAAM/EAAF)

Trata-se da introdução de um varal de legumes e de proteína animal (tenébrio) nas caixas dos roedores com o intuito de modificar a dieta e a forma de oferta dos alimentos (**FIGURA 2**). O varal de legumes consiste em uma corda fina de sisal com pedaços de legumes (cenoura, abobrinha e brócolis) transpassados, amarrada nas extremidades das caixas, de maneira a instigar a procura pelo alimento e modificar a dieta habitual do biotério. A oferta de tenébrio era realizada sobre a maravalha das caixas e pretendia estimular a procura e novas sensações, devido à consistência seca do alimento, por ser desidratado. Em todos os dias ativos da pesquisa, os alimentos eram repostos.

Grupo EA Cognitivo (EACM/EACF)

Consistiu na inserção de dois dispositivos, denominados cano e tronco surpresa (**FIGURA 3**), nos

alojamentos dos animais que permitiam a introdução de alimentos (mix de sementes) em seu interior de maneira que os animais tivessem que desenvolver uma maneira de abri-los e, conseqüentemente, tiveram dificultada a nova oferta de alimento. Todos os dispositivos foram retirados e completados nos dias ativos da pesquisa.

Grupo EA Físico (EAFM/EAFF)

Inclusão de um tubo de PVC (10 cm x 25 cm) e de uma corda grossa de sisal (4 cm x 50 cm), com aparência trançada no ambiente dos ratos (**FIGURA 2**). O tubo foi colocado para que fosse utilizado como uma toca/ninho e a corda para um comportamento típico dos roedores, o de roer.

Grupo EA Sensorial (EASeM/EASeF)

Consistiu na incorporação de manjeriço (*Ocimum basilicum*) desidratado na maravalha da caixa (**FIGURA 2**) dos animais com o propósito de estimular a capacidade sensorial e possibilitar um aumento no comportamento de forrageamento. Em todos os dias ativos da pesquisa, o manjeriço foi repostado nas caixas.

Grupo EA Social (EASoM/EASoF)

Na presente pesquisa, machos e fêmeas do grupo foram soltos nos dias ativos em uma gaiola maior e distanciada dos outros animais durante o período de uma hora, depois esses animais voltavam para suas respectivas caixas (FIGURA 4).

A gaiola consiste em uma estrutura de arame $\varnothing 3,4$ mm e $\varnothing 2,5$ mm

soldados e acabamento em epóxi atóxica branca. Desenvolvida essencialmente para o alojamento de até dois coelhos, a gaiola possui medidas de 100 cm x 55 cm x 47 cm, em seu interior possui plataforma, rampa e casinha em madeira e é equipada com porta grande e bandeja de plástico com abas laterais.



FIGURA 2 – A: Grupo ESTM durante contenção. B: Grupo EA alimentar. Varal de legumes na parte inferior da imagem. C: Grupo EA físico. D: Grupo EA sensorial. Manjeriço visível na parte inferior da imagem.



FIGURA 3 – A: Grupo EA cognitivo. B: Cano e tronco surpresa abertos. C: Cano e tronco surpresa fechados.



FIGURA 4 – A: Grupo EA social. Demonstração do interior da gaiola utilizada. B: Demonstração dos animais juntos no mesmo espaço.

Durante quatro semanas, todos os animais, exceto os grupos controle, foram estimulados pelo enriquecimento ou sujeitos a estresse por contenção mecânica, no caso do grupo I. Os objetos, alimentos e movimentações dos animais foram alterados durante três vezes na semana (segundas, quartas e sextas-feiras).

Os animais foram observados durante 10 minutos após a adição dos EAs em seus alojamentos e o início das estimulações social e da contenção.

Procedimento e dosagem de cortisol

Para as análises de cortisol, foram coletadas fezes das manhãs seguintes à troca de maravalha no início da semana. Todas as amostras foram coletadas diretamente das

caixas dos roedores e todo o procedimento de coleta foi realizado o mais rápido possível, de maneira que não durasse mais que dez minutos em cada alojamento. Por se tratar de recintos com uma dupla, foram coletadas duas amostras de cada gaiola para cada análise, resultando em uma média dos dois valores obtidos no final (**FIGURA 5**).

Em cada análise, as duas amostras fecais (mínimo de 1g cada) foram depositadas em coletores universais de polipropileno, adequadamente identificados, e armazenadas em uma caixa térmica de isopor dentro da faixa ideal de temperatura (entre 2 e 8°C). O material foi encaminhado ao TECSA

(Belo Horizonte –MG) para a dosagem do cortisol fecal pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA).

Após a primeira coleta fecal (23 de novembro de 2022), os objetos e alimentos que enriqueceram o ambiente dos grupos selecionados (IV, V, VI e VII) foram dispostos nas gaiolas, os animais do grupo I foram contidos durante 30 minutos no contenedor mecânico e o grupo do enriquecimento social foi solto durante 1 hora na gaiola particular. Todos esses procedimentos foram realizados durante três vezes na semana durante um mês, e ao final do experimento foram coletadas novamente outras amostras fecais.



FIGURA 5 – A: Coleta fecal. B: Armazenamento das amostras antes do envio ao laboratório.

Descrição da estatística aplicada aos dados

A análise descritiva da variável "cortisol" foi realizada considerando os valores de média e desvio-padrão. O efeito do fator sexo e tratamento foi obtido por meio da análise de variância com dois fatores independentes (ANOVA-twoway), os contrastes dentro dos fatores obtidos foram por meio do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. A multicolinearidade dos fatores foi verificada por meio do fator de

inflação da variância (VIF). Os resíduos padronizados do modelo foram considerados normais pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade atendida segundo o teste de Levene. Os dados com resíduos padronizados superiores a três vezes o intervalo interquartil foram considerados *outliers* e retirados das análises. O tamanho do efeito, ou seja, o quanto da variância da variável resposta é devido ao tratamento, foi obtido por meio do Eta ao quadrado (η^2) - razão

entre a variância do tratamento e a variância total. A interpretação do tamanho do efeito é similar ao coeficiente de determinação, e valores de 0,10 a 0,30 são como baixo efeito, 0,31 a 0,50 de efeito moderado e maior que 0,51 grande efeito²⁴. Todas as análises foram realizadas no Software R²⁵, foi adotado um nível de significância igual a 5%.

3. Resultados

Dosagem do cortisol

Os valores médios e os desvios padrão da dosagem de cortisol em amostras fecais dos animais obtidas antes da fase do enriquecimento e após quatro semanas de ambiente enriquecido estão representados na TABELA 1 e TABELA 2.

TABELA 1 - Análise descritiva da dosagem de cortisol (pg/mL) através de amostras fecais de *Rattus norvegicus* antes e depois em ambos os sexos nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Sexo	Antes	Depois	Delta
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
C	Fêmea	11,48 ± 6,97	7,88 ± 5,97	-3,6 ± 1,00 ^{A,a}
	Macho	3,32 ± 1,73	10,36 ± 8,11	7,04 ± 9,84 ^{A,a}
EAA	Fêmea	14,79 ± 1,62	14,19 ± 1,87	-0,6 ± 0,25 ^{A,a}
	Macho	2,40 ± 0,37	3,42 ± 0,5	1,02 ± 0,88 ^{A,a}
EAC	Fêmea	14,77 ± 0,63	16,2 ± 0,21	1,43 ± 0,42 ^{A,a}
	Macho	6,02 ± 0,57	9,24 ± 10,16	3,22 ± 9,59 ^{A,a}
EAF	Fêmea	12,32 ± 0,24	15,77 ± 0,76	3,45 ± 1,00 ^{A,a}
	Macho	2,08 ± 0,25	9,55 ± 8,51	7,46 ± 8,27 ^{A,a}
EASe	Fêmea	16,69 ± 0,93	16,05 ± 0,99	-0,64 ± 0,06 ^{A,a}
	Macho	4,05 ± 1,24	9,11 ± 8,99	5,06 ± 7,74 ^{A,a}
EST	Fêmea	16,47 ± 0,79	11,57 ± 7,52	-4,9 ± 8,32 ^{A,a}

Macho 5,80 ± 3,20 3,47 ± 1,87 -2,33 ± 5,07^{A,a}

DP: Desvio-padrão; **Delta:** diferença entre a média depois e antes de cada sexo em cada tratamento. Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos; Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos sexos dentro de cada tratamento.

TABELA 2 - Análise descritiva da dosagem de cortisol (pg/mL) através de amostras fecais antes e depois em ambos os sexos nos diferentes tratamentos de socialização.

Tratamento	Sexo	Antes	Depois	Delta
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
CSo	Fêmea	14,95 ± 1,56	14,3 ± 1,31	-0,64 ± 2,86 ^{A,a}
	Macho	2,49 ± 0,68	2,22 ± 0,58	-0,27 ± 1,26 ^{A,a}
EASo	Fêmea	15,12 ± 1,24	4,16 ± 0,81	-10,96 ± 0,43 ^{B,a}
	Macho	7,85 ± 0,3	2,97 ± 0,51	-4,88 ± 0,81 ^{B,a}

DP: Desvio-padrão; **Delta:** diferença entre a média depois e antes de cada sexo em cada tratamento. Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos; Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos sexos dentro de cada tratamento.

Análise estatística

O Eta ao quadrado (η^2) do sexo da **TABELA 1** foi de 15,05%. Ou seja, 15,05% da variação do delta (verifica a diferença significativa na diferença de cortisol entre os tratamentos) do cortisol foi devido à diferença entre os sexos dos animais e 23,24% da variação do delta do cortisol foi devido à diferença entre os tratamentos ofertados. No entanto,

nenhum dos fatores teve diferença significativa ($p < 0,05$).

O Eta ao quadrado (η^2) do sexo da **TABELA 2** foi de 13,12%. Ou seja, 13,12% da variação do delta do cortisol foi devido à diferença entre os sexos dos animais e 69,94% da variação do delta do cortisol foi devido à diferença entre os tratamentos de socialização. No entanto, apenas o tratamento teve diferença significativa.

Efeitos do enriquecimento sobre o comportamento dos animais

Grupo Estresse (ESTM/ESTF)

Ambos os grupos de animais estressados apresentaram

inquietação durante a contenção, os machos defecaram e as fêmeas urinaram durante o processo de estresse (FIGURA 6).

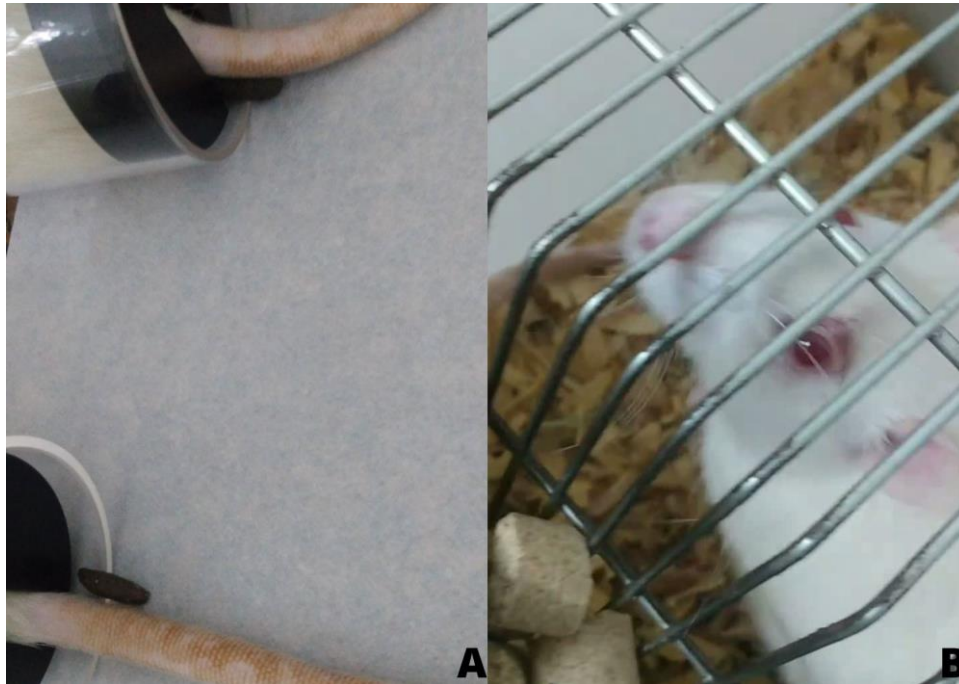


FIGURA 6 – A: Fezes durante a contenção de ratos machos. B: Lesão no olho esquerdo de um rato macho estressado.

Grupo EA Alimentar (EAAM/EAAF)

As fêmeas deste grupo interagiram imediatamente com o varal de legumes quando colocado em suas caixas, enquanto os machos demonstraram pequeno atraso na interação durante os três primeiros dias. Seguente ao sétimo dia do

procedimento, as fêmeas apresentaram exploração no local onde o varal era amarrado, quando o sisal antigo fora retirado para colocação do novo, antes mesmo que este fosse colocado no lugar. Os machos apresentaram o mesmo comportamento depois do oitavo dia (FIGURA 7).



FIGURA 7 – Rato fêmea explorando local onde o varal de legumes era posicionado. Destaque em vermelho para a corda de sisal desgastada que seria trocada por uma nova.

Grupo EA Cognitivo (EACM/EACF)

Os animais deste grupo apresentaram rápida interação com o enriquecimento e rápida descoberta da recompensa. Particularmente, as fêmeas apresentaram intensa

territorialidade, em comparação com os machos, permanecendo principalmente sobre o tronco no momento de retirada desses objetos para troca das recompensas (**FIGURA 8**).



FIGURA 8 – A: Rato no momento que conseguiu abrir o cano recompensa. B: Visão de duas fêmeas junto ao tronco surpresa.

Grupo EA Físico (EAFM/EAFF)

Os machos deste grupo permaneceram pouco dentro do tubo de PVC e roeram mais a corda em

comparação com as fêmeas. As duas, por outro lado, apresentaram alta frequência de permanência no tubo, a partir do segundo dia (FIGURA 9).



FIGURA 9 – Visão de duas fêmeas dentro do tubo de PVC.

Grupo EA Sensorial (EASeM/EASeF)

Ambos apresentaram alta frequência de forrageamento dentro dos alojamentos, principalmente logo

após a inserção de novas folhas de manjeriço. As fêmeas apresentaram comportamento de agarrar-se às grades da parte superior da caixa e balançar-se para trás (**FIGURA 10**).



FIGURA 10 – Rato agarrando-se a grade da caixa e movimentando o corpo para trás.

Grupo EA Social (EASoM/EASoF)

Durante o primeiro dia do experimento, todos os quatro animais permaneceram grande parte do tempo sob o local coberto da gaiola recém utilizada. No terceiro dia, os animais passaram a explorar a área descoberta por mais tempo e os machos subiram a plataforma presente na nova gaiola pela primeira vez. No quarto dia, ambos os ratos,

exploraram as grades laterais e superiores do local, agarrando-se e escalando pelos lados da gaiola. No quinto dia, as fêmeas subiram, pela primeira vez, na plataforma. Esses animais apresentaram também comportamentos de vocalização e mordedura nas grades e nas partes de madeira da gaiola.

Houve uma tentativa bem-sucedida de escapar da caixa padrão por uma

das fêmeas, durante o momento de introduzi-las na gaiola maior. Além disso, no momento de volta às caixas padrão, depois de terminado o tempo

de experimentação, os ratos tentavam escapar pelas laterais ou esconder-se na parte coberta da gaiola (FIGURA 11).



FIGURA 11 – A: Grupo EA Social juntos abaixo da parte coberta da gaiola. B: Momento em que os machos do grupo EA Social sobem na plataforma. C: Rato explorando a lateral da gaiola. D: Momento em que uma das fêmeas do grupo EA Social sobem na plataforma pela primeira vez.

4. Discussão

A análise hormonal de animais cativos e humanos é geralmente realizada por meio de mensurações plasmáticas, em razão da facilidade e frequência de ser realizada uma coleta sanguínea. Porém, em outros animais, como, por exemplo, animais selvagens, essas condições são incontestavelmente estressantes, capazes de alterar os valores hormonais rapidamente, em especial os relacionados ao estresse. Além disso, a colheita de sangue pode desencadear outras ocorrências,

como traumas durante a contenção, acesso de coleta restrito e volume insuficiente de sangue. Dessa maneira, tem-se recomendado como forma substituta a mensuração hormonal pelas excreções, como fezes, urina e saliva, em razão da facilidade e segurança na obtenção²⁶⁻²⁸.

As validações específicas dos métodos de dosagens são essenciais na verificação de que se a substância dosada está relacionada ao hormônio a ser analisado ou se há a interferência de reações cruzadas, em

razão da presença de uma diversidade de metabólitos hormonais nas excreções e na eventualidade de condições influenciarem nos resultados²⁹.

As interferências durante uma pesquisa devem ser mínimas em uma avaliação fisiológica ou comportamental, de modo que as variáveis externas sejam quase insignificantes. O cortisol pode ser aferido e quantificado por diversas substâncias e, na presente pesquisa, escolheu-se a análise da concentração do hormônio dos animais nas fezes. Os metabólitos encontrados nas fezes são resultado de agrupamentos hormonais que o animal tem durante a digestão, refletindo o nível plasmático de 12 a 24 horas nas fezes expelidas³⁰.

A ansiedade é uma resposta adaptativa de sobrevivência que desencadeia uma série de sinais e sintomas, o denominado estresse^{31, 32}. Fisiologicamente, estímulos estressores são eficientes em ativar o hipotálamo, que por sua vez secreta CRF (fator liberador de corticotrofina) e AVP (arginina vasopressina). O CRF circulante atua na hipófise e estimula a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH),

endorfinas e encefalinas. O ACTH alcança as glândulas adrenais pela corrente sanguínea, onde atua na liberação de GCs (cortisol e/ou corticosterona), estes viabilizam alterações sistêmicas e na resposta imunológica. Essas mudanças induzidas pelo cortisol são necessárias na preparação do corpo para uma situação de luta ou fuga. Apesar de sua importância na adaptação de organismos às situações de perigo, o sistema nervoso central exerce um controle negativo acerca da liberação de CRF e ACTH baseado nos efeitos do cortisol no hipotálamo e na hipófise, visto que a manutenção contínua de níveis altos de cortisol é prejudicial aos organismos³³.

Estímulos estressores, ao ativar o eixo HPA, provocam um aumento considerável nos níveis de GCs. Segundo Pauli, Leme, Crespilho, Mello e Rogatto³⁴ atividades físicas têm potencial de modular a secreção de hormônios associados ao estresse, e como pode ser confirmado por vídeos no estudo de Moncek, Dunck, Johansson e Jezova³⁵ os ratos em ambientes estimulados pelo enriquecimento são mais ativos, manuseando e escalando, em comparação com animais criados em alojamento padrão.

No presente estudo, de maneira geral, os grupos IV, V, VI e VII, em que os animais estavam sendo estimulados por novos objetos e novas situações, expressaram aumento nos níveis fecais de cortisol. Dessa forma, é possível correlacionar as informações expostas com o experimento de Moncek, Dunck, Johansson e Jezova³⁵ em que associaram o aumento do GC estudado, a corticosterona, estimulado pelo EA com uma ampliação nas atividades físicas.

Exercícios em alta intensidade são capazes de promover alterações bifásicas em leucócitos circulantes, aumentando de 50 a 100% o número de leucócitos, principalmente linfócitos e neutrófilos, após realizado. Essas mudanças sofrem influência da secreção de epinefrina e cortisol, que se elevam de forma aguda durante atividades de alta intensidade e aumentam a expressão de receptores para os hormônios citados. Logo após a movimentação, os níveis de epinefrina diminuem e os níveis de cortisol permanecem altos por mais duas horas³⁶⁻³⁸. No trabalho de Dahlborn, Van Gils e Van de Weerd³⁹ foi constatado o aumento da proporção entre a corticosterona e a creatinina em amostras de urina de

camundongos, presumivelmente consequência do aumento de atividades promovidas pelo enriquecimento. Neste estudo, foram avaliadas outras constantes, porém as diferenças não foram significativas.

File, Junior, Sanders e Mabbutt⁴⁰ em sua pesquisa afirmaram que ratos machos submetidos a odor de gato (corporal) possuem níveis plasmáticos de corticosterona maiores que ratos em ambiente com odor neutro. Correlacionando, os machos do grupo VII (EASeM) do presente estudo apresentaram aumento significativo de cortisol (**TABELA 1**) quando expostos a um odor inédito e diferente. Sob outra perspectiva, Roy, Belzung, Delarue e Chapillon⁴¹ criou camundongos machos em gaiolas com odor de gato (fezes) estimulados pelo EA e estes apresentaram níveis mais baixos de corticosterona que aqueles criados em ambiente padrão.

Em contrapartida há experimentos em que o estímulo do EA diminui os níveis hormonais relacionados ao estresse. Pauli, Leme, Crespilho, Mello e Rogatto³⁴ também sustentam que o exercício físico em situações de estresse pode promover respostas favoráveis, como no estudo

de Rocha, Nascimento, Rocha, Kashiwabara e Pinto⁴² em que foram observados níveis menores de cortisol em ratos submetidos à natação, apesar de passarem por estresse de contenção.

No trabalho de Zeeni, Bassil, Fromentin, Chaumontet, Darcel e Rome⁴³, ratos em ambiente enriquecido associado a uma dieta palatável (rica em carboidratos/cafeína) apresentaram redução nos níveis de ACTH e corticosterona. Os ratos do grupo IV, receberam alimentos novos e diferentes da alimentação habitual, porém os resultados, de modo geral, foi um pequeno aumento do GC estudado nos machos e uma redução mínima nas fêmeas.

O número de animais laboratoriais por alojamento é identificado como um fator importante que pode influenciar em questões fisiológicas, imunológicas e comportamentais⁴⁴. A densidade populacional das gaiolas deve ser considerada ao interpretar os dados de um estudo, visto que o estresse causa alterações em várias funções biológicas importantes. Peng, Lang, Drozdowicz e Ohlsson-Wilhelm⁴⁵ estudaram grupos de dois, quatro e

oito camundongos, e os resultados mostraram que o agrupamento de quatro indivíduos leva a um estresse menor quando comparado com os outros grupos.

Ao manter hamsters submetidos a estresse por imobilização, porém também submetidos a interação social foi constatada uma melhor cicatrização e níveis mais baixos de cortisol que os animais mantidos em isolamento social mostrando, dessa forma, que manter os animais individualmente pode deixá-los mais suscetíveis ao estresse⁴⁶. À vista disso, é possível relacionar os animais do grupo VIII, que alojados em um grupo de quatro indivíduos apresentaram redução nas dosagens hormonais de cortisol depois dos estímulos sociais e 69,94% da variação do delta devido à diferença entre os tratamentos.

Segundo o trabalho de De Boer, Slangen e Van Der Gugten⁴⁷ quando os animais são expostos continuamente ao estresse, pode suceder em uma adaptação dos níveis de corticosterona plasmática, decorrente de um mecanismo inibitório de secreção do hormônio por feedback, em razão do elevado nível circulante. No estudo de

Moncek, Dunck, Johansson e Jezova³⁵ foi verificado também uma reduzida liberação de cortisol, acetilcolina (ACh) e adrenalina pela intervenção de estresse agudo em animais que viviam em ambiente enriquecido, foi relatado que, provavelmente, por serem estimulados constantemente ocasionando em uma liberação contínua de cortisol, esses seres sofriam menor variação e uma adaptação melhor ao estresse súbito.

A fase do desenvolvimento do animal submetido a pesquisas deve ser pensada na avaliação de comportamentos, quando expostos a estresse crônico, por exemplo, durante a infância podem acarretar mudanças na anatomia e na plasticidade hipocampal^{48, 49}. O isolamento social é um tipo de estresse que se mostra indutor de comportamentos do tipo ansioso⁵⁰. Nos resultados do estudo de Chavatte⁵¹ grupos de ratos que foram submetidos a interação com EA demonstraram menos comportamentos antissociais, como a redução de comportamentos agressivos e maior frequência de exploração no alojamento. A restrição social utilizada neste trabalho, como forma de estresse, mostrou que mesmo individualizados e

enriquecidos, os animais apresentaram menos comportamentos sociais quando comparados com a socialização, o que tornou possível relacionar com o grupo VIII, em que os roedores apresentaram sinais sociais e de exploração.

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste de claro/escuro (TCE) são utilizados normalmente na etologia para avaliação do comportamento ansioso. O LCE consiste em uma plataforma elevada do solo em formato de cruz, com dois braços abertos e os outros dois braços fechados, onde os animais são posicionados no centro da cruz e, geralmente, câmeras gravam todos os movimentos executados⁵². Tem-se como medida etológica que quanto maior a frequência de entrada nos braços abertos do LCE, menos ansioso e mais exploratório o animal é, e consequentemente o oposto acerca de uma frequência maior de entrada nos braços fechados. Uma medida complementar muito utilizada também, é o mergulho de cabeça (do inglês *head-dipping*), que compreende movimentos de cabeça e/ou membros anteriores nas extremidades do LCE, de maneira a mergulhar a cabeça abaixo do nível

do labirinto e está inversamente relacionado à ansiedade⁵³. O TCE corresponde a outro teste de avaliação do comportamento ansioso: uma câmara é dividida em dois espaços diferentes, uma área clara (incidência luminosa) e uma área escura (restrição da penetração da luz) ligados por uma abertura que permite a circulação. Um tempo de permanência maior dentro da área escura, reflete em um animal ansioso⁵⁴. Muitos estudos como o de Pritchard, Van Kempen e Zimmerberg⁵⁵ evidenciaram uma menor frequência de comportamentos do tipo ansioso em ratos criados em ambiente enriquecido, observando e constatando resultados clássicos e complementares do LCE.

Ainda correlacionando o grupo VIII, os testes LCE e TCE evidenciam comportamentos presentes no grupo, como a permanência abaixo da parte coberta da gaiola durante o primeiro momento (assemelhando-se à área escura do TCE) demonstrando, provavelmente, ansiedade e medo da nova alocação, a gradativa tendência exploratória dos ratos também podem ser relacionadas com a exploração no LCE e os pulos na

plataforma da gaiola e tentativas de fuga dos animais podem ser comparadas com o comportamento de mergulho de cabeça, visto que a parte superior da gaiola estava distanciada do solo.

Comportamentos anormais e estereotipados podem ser observados em roedores quando submetidos a estímulos estressantes constantes. Os comportamentos impulsivos apresentam-se em repetições sem propósito evidente ou na exibição de comportamentos distintos para um mesmo fim^{56, 57}. É descrito que estes estereótipos acontecem de motivações fracassadas em desenvolver comportamentos naturais⁵⁸.

Durante a presente pesquisa foi constatada uma estereotipia sobre as fêmeas do grupo VII, elas agarravam-se à grade da gaiola, esse comportamento também foi observado em fêmeas de camundongos do estudo de Deguchi, Bones e Molento⁵⁹. Os autores, ainda, informam que o EA pode ajudar na redução de estereotipias, principalmente logo após a fase de desmame, pois os efeitos podem ser mantidos mesmo sem enriquecimento posteriormente^{60, 61}, o

que não aconteceu no presente grupo com enriquecimento do tipo sensorial.

5. Conclusão

Na literatura, é possível encontrar uma variedade de procedimentos experimentais que resultam em dados discordantes, consequentemente reforçando a indispensabilidade de estudos maiores e mais específicos acerca da temática do enriquecimento ambiental para animais experimentais. Novos estudos com um número amostral maior, por grupo experimental, poderão ajudar a desconstruir os desvios padrão altos encontrados no presente ensaio. Estudos envolvendo a individualidade entre os sexos dos animais laboratoriais também podem mostrar-se importantes no entendimento de diversas situações, como comportamentos, saúde animal e bioquímica (hormônios).

Declaração de conflito de interesses:

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos: Ao Centro Universitário de Adamantina – FAI e a Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pelo apoio financeiro e

pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

6. Referências

1. VAN DE WEERD, Heleen A.; DAY, Jon EL. A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 116, n. 1, p. 1-20, 2009.
2. SHEPHERDSON, DJ. Tracing the path of environmental enrichment in zoos. In: Shepherdson DJ, Mellen JD, Hutchins M. **Second Nature: environmental enrichment for captive animals**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1998. p.1-12.
3. RICCI, Gisele Dela; TITTO, Cristiane Gonçalves; DE SOUSA, Rafael Teixeira. Enriquecimento ambiental e bem-estar na produção animal. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 3, p. 324-331, 2017.
4. HENZEL, M. **O enriquecimento ambiental no bem-estar de cães e gatos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2014.
5. BOERE V. Behavior and environmental enrichment. In: FOWLER ME & CUBAS ZS. 2001. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa: Iowa State Press University. p. 263-267.
6. BLOOMSMITH, M. A.; BRENT, L. Y.; SCHAPIRO, S. J. Guidelines for developing and managing an environmental enrichment program for nonhuman-primates. **Laboratory Animal Science**, v. 41, p.327-7, 1991.
7. OLIVEIRA, Ana Paula Guedes; COSTA, Weliton Menário; ALMEIDA, Rafael Nunes de; COSTA, Willian

Moreira da; DIAS, Natália Caroliny da Silva; VIEIRA, Bárbara de Cássia Ribeiro et al. Uso de enriquecimentos ambientais como mitigadores de comportamentos anormais: uma revisão. **PUBVET**, v. 8, p. 0697-0829, 2014.

8. MARTINS, Thais Veronez de Andrade. **Avaliação da preferência pelo tipo de enriquecimento ambiental utilizado por camundongos swisswebster em biotério através do sistema de gaiolas interligadas (SGI)**. 2017. Tese de Doutorado. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/29276>>. Acesso em: 22 mai. 2022.

9. PIZZUTTO, C. S.; SGAI, M. G. F. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V. O enriquecimento ambiental como ferramenta para melhorar a reprodução e o bem-estar de animais cativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 3, p. 129-138, 2009.

10. MEDINA, Marcelo Pizzio. **Efeitos do enriquecimento ambiental no comportamento e bem-estar de animais de laboratório convencionais**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Curso de Medicina Veterinária. 2012.

11. COE, Jon C. Design and perception: Making the zoo experience real. **Zoo Biology**, v. 4, n. 2, p. 197-208, 1985.

12. MAPLE, Terry L.; STINE, Wm Wren. Environmental variables and great ape husbandry. **American Journal of Primatology**, v. 3, n. S1, p. 67-76, 1982.

13. DIAMOND, Marian C. Response of the brain to enrichment. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 2, p. 211-220, 2001.

14. LEGGIO, Maria Giuseppa; MANDOLESI, Laura; FEDERICO, Francesca; SPIRITO, Francesca; RICCI, Benedetta; GELFO, Francesca et. al. **Environmental enrichment promotes improve spatial habilities and enhanced dendritic growth in the rat**. **Behavioral Brain Research**, v. 163, p. 78-90. 2005.

15. NASCIMENTO, Elizabeth do; LEANDRO, Carol Virginia Góis; AMORIM, Marco Antônio Fidalgo; PALMEIRA, América; FERRO, Taisy Cavalcante, CASTRO, Célia Maria Machado Barbosa de. et al. Effects of acute restraint stress, chronic swim stress and glutamine administration on the release of superoxide from alveolar macrophages of rats. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 27, n. 4, Jul/Ago. 2007.

16. BISINOTO, Larissa Daiane Lima. **Perfil bioquímico de ratos wistar submetidos à exposição contínua em gaiola metabólica associada ao enriquecimento ambiental**. 2020. 45 f. TCC (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Barra do Garças, 2020.

17. PAGLIARONE, Ana Carolina; SFORCIN, José Maurício. Estresse: revisão sobre seus efeitos no sistema imunológico. **Biosaúde**, v. 11, n. 1, p. 57-90, 2009.

18. CASTRO, Margaret; MOREIRA, Ayrton C. Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 358-367, 2003.

19. FARO, André; PEREIRA, Marcos Emanuel. Medidas do estresse: Uma revisão narrativa. **Psicologia, Saúde e doenças**, v. 14, n. 1, p. 101-124, 2013.

20. ABÁIGAR, Teresa; DOMENÉ, Miguel A.; PALOMARES, Francisco. Effects of fecal age and seasonality on steroid hormone concentration as a reproductive parameter in field studies. **European Journal of Wild Life Research**, v. 56, p. 781-787, 2010.
21. NL, Souza. Comportamento, contensão e sexagem das espécies convencionais de laboratório. Luca RR, Alexandre SR, Marquest T, Merusse JLB, Neves SP. **Manual para técnicos em bioterismo**. São Paulo: WinnerGraph, 1996.
22. KÖCHE, José Carlos. **Fundamentos de metodologia científica: teoria da ciência e iniciação à pesquisa**. Edição digital. Petrópolis, RJ: Vozes, 2011.
23. BRAVIN, Jussara Simmer, MACIEL-MAGALHÃES, Magno; PINHEIRO, Yasmin da Silva Gomes; GONÇALVES, Miguel Ângelo Brück; FERRARIS, Fausto Klabund; AMENDOEIRA, Fábio Coelho et al. Importância da inserção de grupo controle em ensaios utilizando animais de laboratório. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, v. 9, n. 1, p. 117-122, 2021.
24. TOMCZAK, Maciej; TOMCZAK, Ewa. The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size. **Trends in Sport Sciences**, v. 21, n. 1, 2014.
25. TEAM, R. **Development Core. A language and environment for statistical computing**. <http://www.R-project.org>, 2009.
26. MÖSTL, E.; MAGGS, J.L.; SCHRÖTTER, G.; BESENFELDER, U.; PALME, R. 2002. Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. **Vet Res Commun**, 26: 127-139.
27. STEWART, M.; WEBSTER, A.L.; COOK, N.J.; SCOOT, S.L. 2005. Infrared thermography as a noninvasive tool to study animal welfare. **Anim Welfare**, 14: 319-325.
28. RUSHEN, J.; BUTTERWORTH, A. AND SWANSON, J.C. 2011. Animal behavior and well-being symposium: farm animal welfare assurance: science and application. **Journal Animal Science**, 89: 1219-1228.
29. FUJIHARA, Caroline Junko. **Validação de método não-invasivo para análise de hormônios ligados ao estresse em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)**. 2008. 94 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.
30. DE CASTRO, Letícia Simões. **Influências do enriquecimento ambiental no comportamento e nível de cortisol em felídeos silvestres**. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
31. BECK, Aaron T. Theoretical perspectives on clinical anxiety. In: Tuma AH, Maser JD, editors. *Anxiety and the anxiety disorders*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Inc; 1985. pp. 183-196.
32. MORENO-RIUS J. The cerebellum in fear and anxiety-related disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 85: 23-32, 2018.
33. SMITH SM, VALE WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to

stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, 8(4): 383–395, 2006.

34. PAULI, J. R.; LEME, J.; CRESPILOHO, D.; MELLO, M. A.; ROGATTO, G. et al. Influence of physical training on hypothalamo-pituitary-adrenal axis parameters on rats administered with dexamethasone. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto, Porto**, v. 5, p. 143-152, 2005.

35. MONCEK, F.; DUNCKO, R.; JOHANSSON, B. B.; JEZOVA, D. Effects of environmental enrichment on stress related systems in rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 16, p. 423-431, 2004.

36. MAISEL, A. S.; HARRIS, T.; REARDEN, C. A.; MICHEL, M. C. Beta-adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise. **Alterations in normal individuals and patients with congestive heart failure. Circulation**, v. 82, n. 6, p. 2003-2010, 1990.

37. NIEMAN, David C.; NEHLSSEN-CANNARELLA, Sandra L. The immune response to exercise. In: **Seminars in Hematology**. 1994. p. 166-179.

38. COSTA ROSA, Luiz Fernando Pereira Bicudo; VAISBERG, Mauro W. Influências do exercício na resposta imune. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, p. 167-172, 2002.

39. DAHLBORN, K.; VAN GILS, B. A. A.; VAN DE WEERD, H. A. ICLAS proceedings: Evaluation of long-term environmental enrichment in the mouse. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science. Supplement (Denmark)**, v. 23, n. 1, p. 97-106, 1996.

40. FILE, Sandra E.; JUNIOR, Helio Zangrossi; SANDERS, Fiona L.; MABBUTT, P. S. Dissociation between behavioral and corticosterone

responses on repeated exposures to cat odor. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 6, p. 1109-1111, 1993.

41. ROY, V.; BELZUNG, C.; DELARUE, C.; CHAPILLON, P. Environmental enrichment in BALB/c mice. Effects in classical test of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 3, p. 313-320, 2001.

42. ROCHA, L.L.V.; NASCIMENTO, R.D.; ROCHA, L.H.L.; KASHIWABARA, T.B.; PINTO, M.V.M. Avaliação do benefício do exercício físico moderado na resposta imunológica de ratos submetidos ao estresse de contenção. **Motricidade**, v. 8, n. 2, p. 1055-1064, 2012.

43. ZEENI, N.; BASSIL, M.; FROMENTIN, G.; CHAUMONTET, C.; DARCEL, N.; ROME, D. et al. Environmental enrichment and cafeteria diet attenuate the response to chronic variable stress in rats. **PhysiolBehav**, v. 139, p. 41-9, Feb 2015. ISSN 0031-9384.

44. UEZ, Fabiana. Cicatrização de feridas cutâneas e níveis séricos de corticosterona em ratos wistar submetidos ao enriquecimento ambiental. 2005.

45. PENG, X.; LANG, C. M.; DROZDOWICZ, C. K.; OHLSSON-WILHELM, B.M. Effect of cage population density on plasma corticosterone and peripheral lymphocyte populations of laboratory mice. **Laboratory Animals**, v. 23, n. 4, p. 302-306, 1989.

46. DETILLION, Courtney E.; CRAFT, Tara K. S.; GLASPER, Erica R.; PRENDERGAST, Brian J.; COURTNEY DEVRIES, A. Social facilitation of wound healing. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 8, p. 1004-1011, 2004.

47. DE BOER, S. F.; SLANGEN, J. L.; VAN DER GUGTEN, J. Adaptation of plasma catecholamine and corticosterone responses to short-term repeated noise stress in rats. **Physiology & Behavior**, v. 44, n. 2, p. 273-280, 1988.
48. HALL, F. Scott. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. **Critical Reviews™ in Neurobiology**, v. 12, n. 1-2, p. 129-62, 1998. ISSN 0892-0915 (Print)0892-0915.
49. MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, n. 1-2, p. 172-189, Dec 15 2000. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993.
50. IYOMASA, Daniela Mizusaki. **Avaliação dos efeitos do estresse crônico sob a ansiedade e a sensibilidade nociceptiva em ratos mantidos em ambiente enriquecido**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
51. CHAVATTE, Gabriela Barreto. Efeitos da convivência social e da restrição social sobre o comportamento de brincar em ratos. In: **Psicologia**. 2016.
52. PELLOW, Sharon; CHOPIN, Philippe; FILE, Sandra E.; BRILEY, Mike. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985. ISSN 0165-0270.
53. ALBRECHET-SOUZA, Lucas; BORELLI, Karina G.; BRANDAO, Marcus L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **Journal of neuroscience methods**, v. 169, n. 1, p. 109-18, Mar 30 2008. ISSN 0165-0270 (Print)0165-0270.
54. BOURIN, Michael; HASCOET, Martine. The mouse light/dark box test. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 55-65, Feb 28 2003. ISSN 0014-2999 (Print)B 0014-2999.
55. PRITCHARD, L. M.; VAN KEMPEN, T. A.; ZIMMERBERG, B. Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. **Neuroscience Letters**, v. 536, p. 47-51, Mar 1 2013. ISSN 0304-3940.
56. KEELING, L.; JENSEN, P. Behavioral disturbances, stress and welfare. In: Jensen, P. (Ed.). **The ethnology of Domestic Animals: An Introductory Text**. Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI Publishing: 2002. p. 79-98.
57. MARASHI, Vera; BARNEKOW, Angelika; OSSENDORF, Edith; SACHSER, Norbert. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 2, p. 281-292, 2003.
58. WÜRBEL, H. The motivational basis of caged rodents' stereotypies. In: MASON, G.; RUSHEN, J. (Eds.). **Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare**. Cambridge, MA, CAB International: 2006. p. 86-120.
59. DEGUCHI, Bernardo Graça Fatori; BONES, Vanessa Carli; MOLENTO, Carla Forte Maiolino. Diagnóstico de bem-estar em camundongos e ratos de biotérios no estado do Paraná. **Archive Vet Science**, v. 23, n. 4, 2018.
60. JONES, Megan Anne; MASON, Georgia; PILLAY, Neville. Early

environmental enrichment protects captive-born striped mice against the later development of stereotypic behaviour. **Applied Animal Behaviour Science**, v.135, n.1-2, p.138-145, 2011.

61. GROSS, Alexandra N.; RICHTER, S. Helene; ENGEL, A. Katarina J.; WURBEL, Hanno. Cage induced stereotypies, perseveration and the effects of environmental enrichment in laboratory mice. **Behavioural Brain Research**, v.234, n.1, p.61-68, 2012.