

EFEITO DE MÚSICA CLÁSSICA E DE PULSATILLA NA
ANSIEDADE DE RATOS WISTAR NA FASE DE DESMAME

Andressa Mott



Erica Cristina Bueno do Prado Guirro, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.
Katherinne Maria Spercoski, Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina.
Trabalho de Conclusão de Curso.

Resumo

Milhões de ratos são produzidos anualmente em biotérios para servirem de modelo animal em pesquisas científicas. Antes do envio aos laboratórios de experimentação, os filhotes passam pelo desmame, que é um importante agente estressor capaz de gerar altos níveis de ansiedade. O enriquecimento ambiental com música já se mostrou efetivo na redução da ansiedade em animais de produção. O medicamento homeopático Pulsatilla otimiza o bem-estar animal e vem sendo utilizado para diminuir a ansiedade, com a vantagem de poder ser diluído na água. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de música clássica e de Pulsatilla sobre a ansiedade de filhotes de ratos Wistar na fase de desmame. Para tanto, foram utilizados 50 filhotes, de seis diferentes ninhadas. Os filhotes foram mantidos junto das mães até o 21º dia de vida (D21), quando foi realizado o desmame, seguido da separação dos filhotes por sexo. As ninhadas de ratos foram aleatoriamente distribuídas em GC (grupo controle): os filhotes receberam água e não houve uso de Pulsatilla e nem de música; GM (grupo com música): os filhotes foram submetidos ao enriquecimento ambiental com música clássica (50 dB) por 8 horas diárias (das 20h00 às 04h00); ou GPM (grupo Pulsatilla e música): os filhotes receberam 15 gotas de Pulsatilla 200CH em 300 ml de água do bebedouro e foram submetidos ao enriquecimento ambiental com música clássica (50 dB) por 8 horas diárias (das 20h00 às 04h00). O nível de ansiedade foi avaliado em D28 e D49 a partir do uso do labirinto em cruz elevado. Verificou-se que a música clássica e a Pulsatilla reduziram os parâmetros de ansiedade avaliados, em especial em D28. Conclui-se que o uso de música clássica e/ou de Pulsatilla reduzem a ansiedade de filhotes de ratos Wistar na fase de desmame.

Palavras-chave: bem-estar, comportamento, enriquecimento ambiental, estresse, homeopatia.

Abstract

Effect of classical music and Pulsatilla on the anxiety of Wistar rats in the weaning phase

Millions of mice are produced annually in bioterium to serve as animal models in scientific research. Before sending to experimentation laboratories, puppies undergo weaning, which is an important stressor capable of generating high levels of anxiety. The environmental improvement with music has already been shown to be effective in

reducing anxiety in farm animals. The homeopathic medicine Pulsatilla optimized or animal welfare and has been used to reduce anxiety, with the advantage that it can be diluted in water. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of classical music and Pulsatilla on the anxiety of Wistar rat puppies during weaning. For this purpose, 50 puppies from six different litters were used. The puppies were kept with their mothers until the 21st day of life (D21), when weaning was carried out, followed by the separation of the puppies by sex. The litters of rats were randomly distributed in GC (control group): the puppies received water and there was no use of Pulsatilla or music; GM (group with music): the puppies were subjected to environmental enrichment with classical music (50 dB) for 8 hours daily (from 8:00 pm to 4:00 am); or GPM (Pulsatilla and music group): the puppies received 15 drops of Pulsatilla 200CH in 300 ml of drinking water and were subjected to environmental enrichment with classical music (50 dB) for 8 hours daily (from 8:00 pm to 4:00 am). The level of anxiety was assessed at D28 and D49 using the elevated plus maze. It was found that classical music and Pulsatilla reduced the parameters of anxiety evaluated, especially in D28. It is concluded that the use of classical music and/or Pulsatilla reduces the anxiety of puppies of Wistar rats during the weaning phase.

Keywords: behaviour, environmental enrichment, homeopathy, stress, welfare.

INTRODUÇÃO

Os ratos são amplamente utilizados em pesquisas científicas e, para atender a demanda dos pesquisadores, milhões de filhotes são produzidos anualmente. É padrão fazer o desmame dos filhotes de ratos aos 21 dias de vida, quando também é realizada a separação por gênero (SANTOS, 2002). Alguns estudos apontam que o desmame pode gerar grande nível de estresse e isso pode refletir em ansiedade nesses animais, inclusive na vida adulta (CALDIJ *et al.*, 2000; KANARI *et al.*, 2005; ITO *et al.*, 2006).

O enriquecimento ambiental é uma técnica que visa tornar o ambiente do animal cativo mais dinâmico, complexo e menos previsível (NEWBERRY, 1995). Para isso, pode-se aplicar enriquecimento ambiental do tipo alimentar, cognitivo, físico, sensorial e social (NEWBERRY, 1995). Uma das possibilidades, é o emprego de música, que visa estimular a audição dos animais e pode reduzir seu estado de ansiedade (WELLS, 2009).

Algumas terapias também podem reduzir o nível de estresse e de ansiedade dos animais. Dentre as possibilidades, estão as terapias integrativas, que incluem homeopatia, florais, acupuntura, dentre outras possibilidades. A Pulsatilla é um medicamento homeopático utilizado para tratar a sensação de abandono, dentre outras indicações (CASALI *et al.*, 2009).

A possibilidade de reduzir a ansiedade dos filhotes de ratos no processo de desmame e, talvez, minimizar a ansiedade e melhorar o bem-estar desses animais na vida adulta pode contribuir com a qualidade de vida desses animais nos biotérios. Obviamente, é preciso considerar que a técnica empregada não interferira em pesquisas futuras. O uso de enriquecimento ambiental e de homeopatia talvez venha a atender esse propósito, mas é preciso fazer um estudo controlado para verificar os reais efeitos sobre a ansiedade dos filhotes de ratos.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi verificar o efeito de música clássica e de Pulsatilla sobre a ansiedade de filhotes de ratos Wistar na fase de desmame.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O bem-estar é um termo empregado para animais, incluindo-se o ser humano (BROOM & MOLENTO, 2004) e é definido como o estado de um indivíduo em relação as suas tentativas de adaptar-se ao seu ambiente (BROOM, 1986). Refere-se às características individuais do animal e não às características proporcionadas pelo homem (BROOM & MOLENTO, 2004).

Broom e Molento (2004) afirmam que o bem-estar deve ser definido de forma que permita relação com as necessidades, liberdades, felicidade, adaptação, controle, capacidade de previsão, sentimentos, sofrimento, dor, ansiedade, medo, tédio, estresse e saúde. É fundamental atentar que o bem-estar é influenciado por doenças, traumatismos, fome, estimulação benéfica, interações sociais, condições de alojamento, tratamento inadequado, manejo, transporte, procedimentos laboratoriais, mutilações variadas, tratamento veterinário e alterações genéticas.

O nível de bem-estar é variável e é fundamental haver conhecimento prévio da biologia da espécie a ser estudada. O bem-estar pode ser avaliado a partir de indicadores fisiológicos ou comportamentais, que devem ser interpretados com cuidado (BROOM & MOLENTO, 2004).

O estresse é uma resposta inespecífica a uma ameaça ou estímulos nocivos, podendo resultar em desconforto ou consequências danosas (OKU *et al.*, 2015). No início do século XX, dois médicos fisiologistas pioneiros, Walter Bradford Cannon (1871-1945) e Hans Hugo Selye (1907-1982), estabeleceram a base inicial para o campo da pesquisa do estresse. Dr. Selye elucidou o papel endócrino dos glicocorticoides na fisiologia do estresse e observou que eventos estressantes poderiam levar à síndrome de adaptação e possíveis patologias (SELYE, 1956), atualmente mais bem elucidadas, como por exemplo, o efeito do estresse como desencadeador de desequilíbrios na estrutura e função da barreira hematoencefálica (WELCOMEA & MASTORAKIS, 2020). Tendo em vista que o bem-estar se refere a uma escala no estado de um animal, desde muito bom até muito ruim, sempre que há estresse o bem-estar será prejudicado (BROOM & KIRKDEN, 2004). O estresse refere-se a situações em que há deficiência de adaptação, enquanto o bem-estar ruim se refere ao estado de um animal (BROOM & KIRKDEN, 2004).

Uma das espécies mais utilizadas na pesquisa é o *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar. Essa espécie é um atraente modelo para pesquisa devido ao seu pequeno porte, ciclo biológico curto, baixo custo de criação e grau de similaridade genética com seres humanos (MATTARAIA & MOURA, 2012). Para que os ratos utilizados nas pesquisas sejam saudáveis, a criação ocorre em um ambiente apropriado, denominado biotério. Há diferentes categorias de biotérios, sendo a maior parte deles caracterizada como convencional, na qual preconiza-se a sanidade, mas não há nenhum tipo de barreira sanitária especial.

Para atender a demanda das pesquisas, nos biotérios de criação ocorre a reprodução dos animais. Após o acasalamento, a gestação da rata leva de 19 a 21 dias, quando geralmente nascem de 7 a 12 filhotes por matriz. Aos 21 dias de vida, ocorre o desmame dos filhotes (separação materno-filial), sexagem e separação dos filhotes machos das fêmeas (SANTOS, 2002).

Um dos eventos mais importantes na fase inicial da vida é o desmame. Pesquisas apontam que episódios no estágio inicial da vida tem influências duradouras no comportamento dos indivíduos adultos (CALDIJ *et al.*, 2000). Durante o período neonatal, a mãe-rato exerce comportamentos intensos como cuidar e lambar os filhotes (ITO *et al.*, 2006). A privação materna durante os 10 primeiros dias de vida dos filhotes

aumenta os comportamentos relacionados à ansiedade na idade adulta (ITO *et al.*, 2006). O desmame precoce aumenta as respostas autonômicas relacionadas ao estresse, como alterações na frequência cardíaca e na temperatura corporal, além de aumentar os níveis de ansiedade tanto em respostas comportamentais quanto em respostas endócrinas (ITO *et al.*, 2006).

Caldij *et al.* (2000) compararam efeitos do manuseio ou separação materna a partir do 2º ao 14º dia de vida dos filhotes nas respostas comportamentais à novos ambientes e nos níveis de GABA_A e receptor central de benzodiazepina (medicamento usado para tratamento de ansiedade) nos ratos. Como resultado dos testes comportamentais, o manuseio pós-natal diminuiu o medo na presença de novidade e, quando adultos, os ratos manifestaram maior exploração em novos ambientes em relação aos grupos onde houve a separação materna. Além disso, os animais não manipulados revelaram níveis reduzidos de receptores GABA_A e receptores de benzodiazepina. O complexo receptor GABA_A e a ligação do agonista benzodiazepina estão associados ao aumento da inibição do medo e da ansiedade. Os resultados sugerem que os eventos iniciais da vida influenciam na expressão do medo na idade adulta e que, por sua vez, influenciam nas respostas comportamentais ao estresse.

Kanari *et al.* (2005) também demonstraram que ratos desmamados precocemente apresentaram aumento na taxa de comportamento relacionado à ansiedade na idade adulta. Em conjunto, os estudos sugerem que o desmame tem um impacto considerável no desenvolvimento dos filhotes, principalmente no que diz respeito aos comportamentos ligados ao estresse e a ansiedade.

A possibilidade de reduzir a ansiedade dos filhotes de ratos no processo de desmame e, talvez, minimizar a ansiedade desses animais na vida adulta pode contribuir com a qualidade de vida desses animais nos biotérios. Obviamente, é preciso considerar que a técnica empregada não interferirá em pesquisas futuras.

No ambiente natural, os animais são expostos a uma variedade de estímulos sensoriais. O ambiente cativo, por outro lado, é comumente mais pobre em termos de estímulos sensoriais (WELLS, 2009). Na tentativa de melhorar o bem-estar animal em sistemas cativos pode-se implementar o enriquecimento ambiental, que envolve técnicas que visam tornar o meio de criação mais complexo, dinâmico e interessante para o animal (NEWBERRY, 1995). As estratégias de enriquecimento devem incentivar os

padrões de comportamentos naturais das espécies, aumentar a capacidade de lidar com desafios ou reduzir comportamentos estereotipados para promover melhoria na qualidade de vida (WELLS, 2009). Há diferentes técnicas de enriquecimento ambiental que podem ser divididas em cinco grandes grupos: alimentar, cognitivo, físico, sensorial e social (NEWBERRY, 1995).

No enriquecimento ambiental do tipo sensorial são utilizadas técnicas que estimulem os sentidos. No que tange a audição, uma forma possível é o emprego de música, a qual pode ser chamada de musicoterapia. Em geral, se utiliza música clássica para promover bem-estar para os animais (WELLS, 2009). A música é uma linguagem universal, que promove alterações hormonais e neurofisiológicas em seres humanos e animais, capaz de interferir no controle da dor, gerar sensação de bem-estar e diminuir a fadiga e a ansiedade (NUÑES *et al.*, 2002). Trabalhos desenvolvidos com animais humanos e não-humanos comprovaram que a música pode alterar significativamente a qualidade de vida dos envolvidos, proporcionando sensações de relaxamento, conforto e minimização do estresse. Em ambientes clínicos e hospitalares, a música foi capaz de diminuir os níveis de estresse e ansiedade em seres humanos, induzindo-os ao relaxamento (YAMASAKI *et al.*, 2012). Os resultados são decorrentes de avaliação de parâmetros fisiológicos como frequência cardíaca e respiratória, pressão arterial e mensuração de cortisol (CALAMITA *et al.*, 2016).

Há um crescente número de investigações dirigidas à exploração do impacto da estimulação sonora como um método de enriquecimento ambiental para animais de cativeiro, de laboratórios e para algumas espécies de animais de produção. Os estímulos auditivos podem oferecer benefícios aos animais rompendo o silêncio monótono do espaço, conhecido por afetar o desenvolvimento de habilidades cognitivas normais em um ambiente agradável e mais produtivo ou reduzindo ruídos repentinos que são potencialmente estressantes aos animais (CRUZ *et al.*, 2011; CALAMITA *et al.*, 2016).

A música pode facilitar a redução da resposta ao estresse. Um estudo demonstrou que a música reduziu o estresse e beneficiou o sistema imunológico de ratos e, conseqüentemente, houve diminuição do desenvolvimento tumoral (NUÑES *et al.*, 2002). A utilização da música na terapêutica e produção animal apresentou resultados significativos. Houve diminuição do estresse no manejo, tempo de ordenha e aumento na produção leiteira, tornando vacas menos reativas aos estímulos externos

(CALAMITA *et al.*, 2016). A música também influenciou no comportamento de porcas gestantes, fornecendo maior relaxamento e redução de comportamentos estereotipados, relacionados a um melhor bem-estar (SILVA *et al.*, 2017). Jonge *et al.* (2008) investigaram se a música pode facilitar o comportamento lúdico em leitões após o desmame. No experimento, a música foi apresentada como um contexto associado ao acesso a uma sala de jogos e os resultados confirmaram que a música facilitou o comportamento e reduziu significativamente a incidência de injúrias entre os animais.

Os estudos sugerem que a música está se tornando um importante recurso terapêutico na abordagem interdisciplinar da saúde e da doença. Deve-se considerar que a música apresenta flutuações nos níveis de som, frequência e tempo, capazes de induzir mudanças fisiológicas e comportamentais (CRUZ *et al.*, 2011).

A *Pulsatilla nigricans* é uma planta pertencente à família Ranunculaceae. O medicamento homeopático Pulsatilla tem inúmeras indicações (LATHOUD, 2017), como para tratar questões ligadas à reprodução (BOERICKE, 1997), sensações de tristeza, abandono e carência de afeto (CASALI *et al.*, 2009). Há relatos isolados de que o uso de Pulsatilla diminui o estresse e a ansiedade de filhotes separados de suas mães por diferentes razões e, ainda, reduz o número de casos de rejeição materna. Todavia, não se encontrou estudos controlados que tenham verificado essa possibilidade.

Há diversos aparatos que são utilizados para avaliar a ansiedade de roedores, com destaque ao labirinto em cruz elevado (LCE), que foi proposto por File e colaboradores, modificado por Montgomery (MONTGOMERY, 1858) e chegou ao seu modelo atual, validado por Handley e Mithani (1984). Tais autores descreveram a avaliação do comportamento de ansiedade de roedores usando a razão entre o tempo gasto nos braços abertos e o tempo gasto nos braços fechados, considerando a propensão dos roedores para espaços escuros e fechados (abordagem) e um medo incondicional de altura e de espaços abertos (prevenção). Assim, no LCE, a ansiedade é expressa pelo tempo de permanência nos braços fechados (PELLOW *et al.*, 1985) e, então, o LCE é amplamente empregado em testes pré-clínicos que avaliam protocolos potencialmente ansiolíticos ou ansiogênicos (OJO & MOUZON, 2016). Segundo Treit *et al.* (1993), o labirinto em cruz elevado não atua como agente ansiogênico, mas sim como um aparato eficiente para verificar a ansiedade em estudos com ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi previamente aprovado pelo Departamento de Ciências Veterinárias, pelo Comitê Setorial de Pesquisa do Setor Palotina e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina, o qual recebeu o registro de número 201936091.

O modelo biológico utilizado foi o *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, oriundo da produção do Biotério Experimental de Roedores do Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná. Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno de 49x31x21 cm, forradas com cama de maravalha, que foi trocada duas vezes por semana. Os animais receberam água *ad libitum*, sendo que o bebedouro foi trocado diariamente. Houve fornecimento livre de ração comercial peletizada, que atendia às recomendações do NRC (1995) e NIH (2002) para a espécie.

Foram utilizados 50 filhotes de ratos Wistar, provenientes de 6 ninhadas. Houve sorteio para selecionar duas ninhadas para cada grupo experimental, sendo que eles ficaram divididos como GC (controle), formado com 18 filhotes, GM (música), com 16 filhotes e GPM (Pulsatilla e música), com 16 filhotes. Independente do grupo, foi mantido o manejo higiênico-sanitário e nutricional supracitado e foi realizado desmame no 21º dia de vida dos filhotes (D21), sendo que nesse momento também houve a separação dos filhotes conforme gênero. Os grupos experimentais incluíram:

- GC (controle): de D19 a D49 não houve nenhum tipo de manejo de enriquecimento ambiental ou medicamentoso;
- GM (música): de D19 a D28, os filhotes foram submetidos ao enriquecimento ambiental com música clássica (50 dB) por oito horas diárias (das 20h00 às 04h00) e, posteriormente, de D29 a D49, houve apenas manejo convencional;
- GPM (Pulsatilla e música): de D19 a D28, os filhotes foram submetidos ao enriquecimento ambiental com música clássica (50 dB) por oito horas diárias (das 20h00 às 04h00) e receberam 15 gotas de Pulsatilla 200CH em 300 ml de água nos bebedouros e, posteriormente, de D29 a D49 houve apenas manejo convencional.

Em D28 e D49, foi realizada avaliação do nível de ansiedade dos filhotes, utilizando-se o labirinto em cruz elevado. Esse aparato consiste numa estrutura em formato de cruz, elevada a 50 cm do chão. Essa cruz é formada por dois braços abertos e dois braços fechados lateralmente. Os filhotes foram colocados no centro do labirinto,

com a cabeça voltada para um dos braços abertos e, durante cinco minutos, foram avaliados: o tempo de permanência nos braços abertos (seg.); o tempo de permanência nos braços fechados (seg.); número de entradas nos braços abertos; número de entradas nos braços fechados; frequência de *grooming* (comportamento de autolimpeza) nos braços abertos; frequência de *grooming* nos braços fechados; frequência de *rearing* (animal em pé nas duas patas traseiras em uma postura vertical) nos braços abertos; frequência de *rearing* nos braços fechados.

As comparações entre a idade dos animais (D28 x D49) e entre os tipos de braços (aberto x fechado) foram submetidas ao teste t, com $p < 0,05$. As comparações entre os grupos (GC x GM x GPM) foram submetidas à ANOVA de uma via, seguido por Tukey, com $p < 0,05\%$.

RESULTADOS

Ao considerar o tempo de permanência nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado, verificou-se que a idade dos filhotes teve interferência, sendo que em D28 os animais permaneceram mais tempo nos braços abertos que em D49, independente do grupo (Tabela 1). Quanto ao efeito do protocolo de desmame, observou-se que os filhotes submetidos ao desmame convencional permaneceram menos tempo nos braços abertos quando comparados aos filhotes que receberam música e/ou Pulsatilla (Tabela 2), comprovando que essas novas propostas de modelo de desmame podem reduzir a ansiedade dos ratos. Em relação ao tipo de braço do aparato, notou-se que os filhotes permaneceram mais tempo nos braços fechados que nos braços abertos (Tabela 3), independentemente da idade e do protocolo de desmame, o que é esperado para a espécie.

Tabela 1 - Efeito da idade sobre o tempo de permanência (média \pm desvio padrão), em segundos, nos braços abertos ou fechados do labirinto em cruz elevado apresentado por filhotes de ratos Wistar submetidos ao desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM).

		D28	D49	p
Braços Abertos	GC	78,9 \pm 12,7 ^a	30,8 \pm 6,1 ^b	0,032
	GM	90,6 \pm 35,6 ^a	43,5 \pm 22,8 ^b	0,027

	GPM	90,8 ± 23,2 ^a	52,5 ± 38,9 ^b	0,039
Braços	GC	221,1 ± 12,7 ^b	262,9 ± 8,6 ^a	0,047
	GM	209,4 ± 35,6 ^b	256,5 ± 22,8 ^a	0,041
Fechados	GPM	209,2 ± 23,2 ^b	247,5 ± 38,9 ^a	0,045

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

Tabela 2 - Efeito do desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM) sobre o tempo de permanência (média ± desvio padrão), em segundos, nos braços abertos ou fechados do labirinto em cruz elevado apresentado por filhotes de ratos Wistar.

		GC	GM	GPM	p
D28	Braços abertos	78,9 ± 12,7 ^b	90,6 ± 35,6 ^a	90,8 ± 23,2 ^a	0,040
	Braços fechados	221,1 ± 12,7 ^a	209,4 ± 35,6 ^b	209,2 ± 23,2 ^b	0,048
D49	Braços abertos	30,8 ± 6,1 ^b	43,5 ± 22,8 ^{ab}	52,5 ± 38,9 ^a	0,033
	Braços fechados	262,9 ± 8,6 ^a	256,5 ± 22,8 ^{ab}	247,5 ± 38,9 ^b	0,037

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

Tabela 3 – Efeito do braço aberto ou fechado do labirinto em cruz elevado sobre o tempo de permanência (média ± desvio padrão), em segundos, apresentado por filhotes de ratos Wistar submetidos ao desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM).

		Braços abertos	Braços fechados	p
GC	D28	78,9 ± 12,7 ^b	221,1 ± 12,7 ^a	0,019
	D49	30,8 ± 6,1 ^b	262,9 ± 8,6 ^a	0,012
GM	D28	90,6 ± 35,6 ^b	209,4 ± 35,6 ^a	0,022
	D49	43,5 ± 22,8 ^b	256,5 ± 22,8 ^a	0,028
GPM	D28	90,8 ± 23,2 ^b	209,2 ± 23,2 ^a	0,026
	D49	52,5 ± 38,9 ^b	247,5 ± 38,9 ^a	0,031

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

Ao verificar a frequência de entradas nos braços abertos ou fechados do labirinto em cruz elevado, observou-se que a idade dos filhotes não causou interferência no grupo de filhotes submetido ao desmame convencional, todavia nos animais submetidos ao

desmame com música com ou sem Pulsatilla houve redução na frequência de entradas em D49 (Tabela 4), evidenciando que ao entrar em um dos braços os animais permaneciam mais tempo nos mesmos. Quanto ao protocolo de desmame, em D28 não se verificou diferenças, mas em D49 a frequência de entradas nos braços abertos de GC foi maior que GPM, enquanto nos braços fechados GM foi maior que GPM (Tabela 5). Em relação ao tipo de braço do labirinto, não houve diferença na frequência de entradas independentemente do grupo ou idade (Tabela 6).

Tabela 4 - Efeito da idade sobre a frequência de entradas (média \pm desvio padrão) nos braços abertos ou fechados do labirinto em cruz elevado apresentada por filhotes de ratos Wistar submetidos ao desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM).

		D28	D49	p
Braços Abertos	GC	6,2 \pm 1,2 ^a	5,5 \pm 0,8 ^a	0,061
	GM	6,8 \pm 2,5 ^a	4,8 \pm 2,5 ^b	0,047
	GPM	6,6 \pm 1,9 ^a	3,9 \pm 2,8 ^b	0,042
Braços Fechados	GC	6,3 \pm 0,8 ^a	4,9 \pm 1,6 ^a	0,058
	GM	6,9 \pm 2,4 ^a	5,2 \pm 2,6 ^b	0,048
	GPM	6,6 \pm 2,0 ^a	4,3 \pm 2,7 ^b	0,045

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

Tabela 5 - Efeito do desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM) sobre a frequência de entradas (média \pm desvio padrão) nos braços abertos ou fechados do labirinto em cruz elevado apresentada por filhotes de ratos Wistar.

		GC	GM	GPM	p
D28	Braços abertos	6,2 \pm 1,2 ^a	6,8 \pm 2,5 ^a	6,6 \pm 1,9 ^a	0,112
	Braços fechados	6,3 \pm 0,8 ^a	6,9 \pm 2,4 ^a	6,6 \pm 2,0 ^a	0,136
D49	Braços abertos	5,5 \pm 0,8 ^a	4,8 \pm 2,5 ^{ab}	3,9 \pm 2,8 ^b	0,042
	Braços fechados	4,9 \pm 1,6 ^{ab}	5,2 \pm 2,6 ^a	4,3 \pm 2,7 ^b	0,044

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

Tabela 6 – Efeito do braço aberto ou fechado do labirinto em cruz elevado sobre a frequência de entradas (média \pm desvio padrão) apresentada por filhotes de ratos Wistar

submetidos ao desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM).

		Braços abertos	Braços fechados	p
GC	D28	6,2 ± 1,2 ^a	6,3 ± 0,8 ^a	0,204
	D49	5,5 ± 0,8 ^a	4,9 ± 1,6 ^a	0,189
GM	D28	6,8 ± 2,5 ^a	6,9 ± 2,4 ^a	0,202
	D49	4,8 ± 2,5 ^a	5,2 ± 2,6 ^a	0,178
GPM	D28	6,6 ± 1,9 ^a	6,6 ± 2,0 ^a	0,320
	D49	3,9 ± 2,8 ^a	4,3 ± 2,7 ^a	0,266

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

A frequência de *grooming* não variou em relação à idade dos animais (Tabela 7), protocolo de desmame (Tabela 8) ou tipo de braço do labirinto em cruz elevado (Tabela 9).

Tabela 7 - Efeito da idade sobre a frequência de *grooming* (média ± desvio padrão) nos braços abertos ou fechados do labirinto em cruz elevado apresentada por filhotes de ratos Wistar submetidos ao desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM):

		D28	D49	p
Braços Abertos	GC	0 ^a	0,1 ± 0,3 ^a	0,980
	GM	0 ^a	0 ^a	1,0
	GPM	0 ^a	0,1 ± 0,5 ^a	0,922
Braços Fechados	GC	0,5 ± 0,7 ^a	0,2 ± 0,4 ^a	0,768
	GM	0,8 ± 0,7 ^a	0,3 ± 0,4 ^a	0,844
	GPM	1,1 ± 1,0 ^a	0,8 ± 1,3 ^a	0,692

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

Tabela 8 - Efeito do desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM) sobre a frequência de *grooming* (média ± desvio padrão) nos braços abertos ou fechados do labirinto em cruz elevado apresentada por filhotes de ratos Wistar.

	GC	GM	GPM	p
--	----	----	-----	---

D28	Braços abertos	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,0
	Braços fechados	0,5 ± 0,7 ^a	0,8 ± 0,7 ^a	1,1 ± 1,0 ^a	0,641
D49	Braços abertos	0,1 ± 0,3 ^a	0 ^a	0,1 ± 0,5 ^a	0,855
	Braços fechados	0,2 ± 0,4 ^a	0,3 ± 0,4 ^a	0,8 ± 1,3 ^a	0,810

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

Tabela 9 – Efeito do braço aberto ou fechado do labirinto em cruz elevado sobre a frequência de *grooming* (média ± desvio padrão) apresentada por filhotes de ratos Wistar submetidos ao desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM).

		Braços abertos	Braços fechados	p
GC	D28	0 ^a	0,5 ± 0,7 ^a	0,860
	D49	0,1 ± 0,3 ^a	0,2 ± 0,4 ^a	0,799
GM	D28	0 ^a	0,8 ± 0,7 ^a	0,844
	D49	0 ^a	0,3 ± 0,4 ^a	0,736
GPM	D28	0 ^a	1,1 ± 1,0 ^a	0,912
	D49	0,1 ± 0,5 ^a	0,8 ± 1,3 ^a	0,891

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

A frequência de *rearing* não variou em relação à idade dos animais (Tabela 10) ou protocolo de desmame (Tabela 11). Entretanto, a frequência de *rearing* foi significativamente maior nos braços fechados (Tabela 12).

Tabela 10 - Efeito da idade sobre a frequência de *rearing* (média ± desvio padrão) nos braços abertos ou fechados do labirinto em cruz elevado apresentada por filhotes de ratos Wistar submetidos ao desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM).

		D28	D49	p
Braços Abertos	GC	0,1 ± 0,3 ^a	0 ^a	0,866
	GM	0,2 ± 0,4 ^a	0 ^a	0,680
	GPM	0,6 ± 0,8 ^a	0,2 ± 0,5 ^a	0,745
Braços Fechados	GC	21,1 ± 4,0 ^a	17,6 ± 3,4 ^a	0,078
	GM	25,6 ± 9,6 ^a	20,8 ± 6,4 ^a	0,114

GPM $23,7 \pm 5,1^a$ $21,1 \pm 8,3^a$ 0,058

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

Tabela 11 - Efeito do desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM) sobre a frequência de *rearing* (média \pm desvio padrão) nos braços abertos ou fechados do labirinto em cruz elevado apresentada por filhotes de ratos Wistar.

		GC	GM	GPM	p
D28	Braços abertos	$0,1 \pm 0,3^a$	$0,2 \pm 0,4^a$	$0,6 \pm 0,8^a$	0,350
	Braços fechados	$21,1 \pm 4,0^a$	$25,6 \pm 9,6^a$	$23,7 \pm 5,1^a$	0,444
D49	Braços abertos	0^a	0^a	$0,2 \pm 0,5^a$	0,816
	Braços fechados	$17,6 \pm 3,4^a$	$20,8 \pm 6,4^a$	$21,1 \pm 8,3^a$	0,654

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

Tabela 12 – Efeito do braço aberto ou fechado do labirinto em cruz elevado sobre a frequência de *rearing* (média \pm desvio padrão) apresentada por filhotes de ratos Wistar submetidos ao desmame convencional (GC), com música (GM) ou com música e Pulsatilla (GPM).

		Braços abertos	Braços fechados	p
GC	D28	$0,1 \pm 0,3^b$	$21,1 \pm 4,0^a$	0,028
	D49	0^b	$17,6 \pm 3,4^a$	0,042
GM	D28	$0,2 \pm 0,4$	$25,6 \pm 9,6^a$	0,029
	D49	0^b	$20,8 \pm 6,4^a$	0,045
GPM	D28	$0,6 \pm 0,8^b$	$23,7 \pm 5,1^a$	0,027
	D49	$0,2 \pm 0,5^b$	$21,1 \pm 8,3^a$	0,019

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$). Fonte: O autor (2020).

DISCUSSÃO

Os resultados revelaram que a idade dos filhotes interferiu no tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo que em D28 os animais permaneceram mais tempo nos braços abertos que em D49, independentemente do grupo. É correto dizer que o aumento da idade favorece o aumento nos níveis de

comportamentos associados a ansiedade, caracterizado pela diminuição dos índices de atividade motora, evidenciada pela diminuição de entradas e permanência nos braços abertos e fechados (PINTO *et al.*, 2012).

Os resultados do experimento sugerem que os novos protocolos de desmame foram eficazes para reduzir os comportamentos associados a ansiedade dos ratos, visto que os filhotes que receberam música clássica e/ou Pulsatilla permaneceram mais tempo nos braços abertos quando comparados aos filhotes submetidos ao desmame convencional. Pellow *et al.* (2005) afirmam que o aumento no tempo e número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado indica que estímulos ansiolíticos são eficientes para bloquear respostas de medo e ansiedade.

Animais mais ansiosos evitam entradas frequentes nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação aos animais menos ansiosos (PINTO *et al.*, 2012). Treit *et al.* (1993) observaram que os ratos submetidos a tratamento com ansiolítico apresentam significativamente mais atividade nos braços abertos quando comparados aos animais não tratados.

Os filhotes permaneceram mais tempo nos braços fechados que nos braços abertos, independentemente da idade e do protocolo de desmame, concordando com Montgomery (1958), Treit *et al.* (1993) e Estanislau (2012), que demonstraram que quando expostos a um labirinto elevado, os ratos preferem explorar ambientes fechados a ambientes abertos, independentemente do grau de ansiedade dos animais. Esse comportamento demonstra que a exposição a novos estímulos pode evocar o impulso de medo e minimizar o impulso exploratório (MONTGOMERY, 1958) desencadeado pelo evento de “conflito de aproximação-esquiva” do animal diante do ambiente desconhecido somado a tendência natural de esquiva em relação a regiões abertas (PINTO *et al.*, 2012) e portanto, há mais comportamento de prevenção aos braços abertos.

Um experimento realizado com 969 animais demonstrou que, mesmo diante da variabilidade entre linhagens e espécies de ratos estudadas, 57% do total dos animais buscou braços fechados como primeiro sítio de escolha após o início do teste, enquanto 34% do total buscou primeiro os braços abertos e o restante, 6% do total, permaneceu na área central por todo o período de latência do teste (PINTO *et al.*, 2012).

A idade, o protocolo de desmame e o tipo de braço do labirinto em cruz elevado não interferiram na frequência de *grooming* dos animais. O comportamento de autolimpeza tem função de cuidar e proteger o corpo, porém, sua ocorrência pode ser mais bem explicada quando considerado o contexto em que os animais se encontram (ESTANISLAU, 2012). De acordo com Nin *et al.* (2012) e Estanislau (2012), a avaliação de *grooming* é uma ferramenta valiosa para detectar comportamentos ansiosos em ratos, sendo que animais tratados com ansiolíticos desenvolvem menos comportamentos de higiene.

O *grooming* pode ser induzido pela exposição a novidade ou agentes estressores, visto que os ratos apresentam mais atividades de limpeza em relação ao controle (ESTANISLAU, 2012). Da mesma forma, há mais atividade de limpeza em ratos que apresentam baixa exploração nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (ESTANISLAU *et al.* 2011). No entanto, nem todos os autores relacionam *grooming* e ansiedade, o que é possível observar em Cruz *et al.* (1994) e Setem *et al.* (1999), os quais não observaram diferenças significativas em nenhum de seus experimentos. Não obstante, Song *et al.* (2016) sugerem que o *grooming* ocorre em condições normais como um comportamento de manutenção, que pode se tornar mais longo ou mudar sob condições de estresse relativamente leve e pode ser inibido por estados de estresse extremo. É difícil atribuir significado a esse fator, visto que não foi afetado em nenhuma das variáveis.

A frequência de *rearing* não variou em relação a idade e protocolo de desmame dos animais. No entanto, aumentou significativamente nos braços fechados em relação aos braços abertos. O *rearing* é considerado um comportamento exploratório (ESPEJO, 1997) e um marcador de novidade (HO *et al.* 2002) e tem sido utilizado como um indicador de ansiedade (ENNACEUR, 2014). Reduções no número de *rearing* tem sido interpretadas como respostas ao aumento nos níveis de ansiedade e ocorre principalmente nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (ENNACEUR, 2014).

No experimento de Cruz *et al.* (2010), a exposição de camundongos à música clássica não diferiu estatisticamente no tempo de permanência e entradas nos braços abertos e fechados, não caracterizando efeito ansiolítico. No entanto, houve uma diminuição significativa no tempo de permanência nos braços fechados e no tempo de permanência no quadrante central do labirinto e uma diminuição nos eventos de

grooming e atividade exploratória. Já no estudo de Cruz *et al.* (2011), a exposição à música proporcionou aos ratos um melhor enfrentamento de situações aversivas e uma redução nos níveis de ansiedade dos animais.

Um estudo investigou a influência da Sonata de Mozart no comportamento de ratos em desenvolvimento e concluiu que seu efeito interferiu de forma positiva nos animais. A presença da música influenciou no tempo de permanência dos braços abertos do LCE, com diferença significativa para a variável idade (SAMPAIO, 2015), o que corrobora com os dados do presente estudo. Além disso, um estudo mostrou que ratos Wistar expostos à Sonata de Mozart desde o início da vida tiveram aumento significativo no conteúdo de fator neurotrófico do cérebro (MARZBAN *et al.*, 2011). O fator neurotrófico do cérebro possui papel fundamental na sobrevivência neural, diferenciação e organização do cérebro e formação e atividade sináptica (LEE & SON, 2009), onde atua como estimulador de aprendizagem e processo de memória (ARANCIO & CHAO, 2007). Na investigação de Morais *et al.* (2018) os estímulos auditivos aumentaram os níveis de dopamina e de serotonina dos ratos Wistar, ambos ligados ao prazer, recompensa e controle motor.

Em humanos, a apreciação musical está bem documentada (CRUZ *et al.*, 2011) e seu uso terapêutico tem crescido devido ao seu benefício (UGUR *et al.*, 2016). Em idosos, a música é capaz de aumentar o sentimento de independência e o incremento de autoconfiança (UGUR *et al.*, 2016), além de reduzir escores de depressão (CHAN *et al.*, 2009). A exposição à música de harpa pode reduzir significativamente os níveis de cortisol de neonatos prematuros mantidos em Unidade de Terapia Intensiva (CALAMITA *et al.*, 2016). Em recém nascidos prematuros mantidos em incubadoras, a exposição à música auxilia na estabilização dos níveis de saturação de oxigênio e na redução da perda de peso, reforça o aprendizado do ato de sugar e contribui para a redução de dias de hospitalização (JÚNIOR, 2018). Em autistas, a música contribui com a capacidade de concentração e de interação com outras pessoas, promovendo o desenvolvimento de habilidades sociais e de comunicação (WAN *et al.*, 2010). No cérebro, pode induzir ondas alfa que causam relaxamento e levam à liberação de endorfina, que está associada com a diminuição da frequência cardíaca e da pressão arterial (BERNATZKY *et al.*, 2011). Em procedimentos médicos como cirurgias, que

causam estresse e ansiedade, a música pode ser utilizada como um coadjuvante para reduzir a percepção da dor (BERNATZKY *et al.*, 2011).

A música pode atuar como adjuvante para melhorar a eficácia de tratamentos de ansiedade. Embora a apreciação musical esteja bem documentada em humanos, há divergências significativas na literatura sobre ela se estender a outros indivíduos do reino animal (CRUZ *et al.*, 2011). O trabalho para responder essa questão mal começou. Considerando o enorme potencial que a música oferece, há uma necessidade de desenvolver mais estudos que repliquem os protocolos de trabalhos existentes para investigar melhor seus efeitos sobre os comportamentos ansiosos dos animais.

Observou-se que os resultados dos grupos tratados com música com ou sem Pulsatilla mantiveram a mesma tendência, com exceção da frequência de entradas nos braços do labirinto em D49. Esse achado sugere que a Pulsatilla tenha sido efetiva para reduzir a ansiedade de filhotes de ratos Wistar submetidos ao desmame, corroborando PRABHU *et al.* (2012) que verificaram que a Pulsatilla reduziu a ansiedade de camundongos ao ser comparada com um fármaco ansiolítico padrão. Por outro lado, em um estudo retrospectivo, Pilkington *et al.* (2006) não encontraram evidências suficientes para afirmar que esse medicamento homeopático pudesse beneficiar pacientes com transtornos de ansiedade.

CONCLUSÕES

A música clássica e a Pulsatilla reduzem a ansiedade de filhotes de ratos Wistar submetidos ao desmame. Todavia, mais estudos com música clássica e com Pulsatilla devem ser realizados para determinar novos protocolos que melhorem ainda mais o bem-estar de filhotes de ratos Wistar na fase de desmame, a fim de que o rato adulto não seja influenciado por fatores de estresse vividos na primeira infância.

REFERÊNCIAS

ARANCIO, O.; CHAO, M. V. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 17, n. 3, p. 325-330, 2007.

BERNATZKY, G.; PRESCH, M.; ANDERSON, M.; PANKSEPP, J. Emotional foundations of music as a non-pharmacological pain management tool in modern medicine. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 1-11, 2011.

BOERICKE, W. Pulsatilla. In: _____ **Manual de Matéria Médica Homeopática**. São Paulo: Robe Editorial, 1997. p. 336-338.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, London, v. 142, p. 524-526, 1986.

BROOM, D. M.; KIRKDEN, R. D. Welfare, stress, behaviour and pathophysiology. In: DUNLOP, R. H.; MALBERT, C. H. **Veterinary Pathophysiology**, Ames: Blackwell. p. 337-369, 2004.

BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Animal welfare: concept and related issues – Review. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.

CALAMITA, S. C.; SILVA, L. P.; CARVALHO, M. D.; COSTA, A. B. L. A música e seus diversos impactos sobre a saúde e bem-estar dos animais. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 14, n. 3, p. 6-11, 2016.

CALDJI, C.; FRANCIS, D.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. The effects of early rearing environment on the development of GABA_A and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. **Neuropsychopharmacology**, New York, v. 22, n. 3, p. 219-229, 2000.

CASALI, V. W. D.; ANDRADE, F. M. C.; DUARTE, E. S. M. Pulsatilla. In: _____ **Acológia de Altas Diluições**. Viçosa: Editora da UFV, 2009. p. 406-410.

CHAN, M. F.; CHAN, E. A.; MOK, E.; TSE, F. Y. K. Effect of music on depression levels and physiological responses in community-based older adults. **International Journal of Mental Health Nursing**, v. 18, p. 285-294, 2009.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethnopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 171-176, 1994.

CRUZ, J. G. P. da; MAGRO, D. D. D.; CRUZ, J. N. da. Efeitos da música clássica como elemento de enriquecimento ambiental em *Mus musculus* em cativeiro (Rodentia: Muridae). **Biotemas**, Santa Catarina, v. 23, n. 2, p. 191-197, 2010.

CRUZ, J. N. da; LIMA, D. D. de; MAGRO, D. D. D.; CRUZ, J. G. P. da. The power of classic music to reduce anxiety in rats treated with simvastatin. **Basic and Clinical Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 5-11, 2011.

ENNACEUR, A. Unconditioned tests of anxiety. **Physiology and Behavior**, no p., 2014. ESPEJO, E. D. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 86, p. 105-112, 1997.

ESPEJO, E. F. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural brain research**, v. 86, p. 105-112, 1997.

ESTANISLAU, C. Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. **Psychology and Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 105-112, 2012.

ESTANISLAU, C.; RAMOS, A. C.; FERRARESI, P. D.; COSTA, N. F.; CARVALHO, H. M. C. P. de; BATISTELA, S. Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. **Behavioural Processes**, v. 86, p. 46-51, 2011.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear motivated. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HO, Y.; EICHENDORFF, J; SCHWARTING, R. K. W. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, v. 136, p. 1-12, 2002.

ITO, A.; KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats. **Behavioural Brain Research**, Tokyo, v. 171, p. 87-93, 2006.

JANUS, K. Early Separation of young rats from the mother and the development of play fighting. **Physiology and Behavior**, v. 39, p. 471-476, 1987.

JONGE, F. H. de; BOLEIJ, H.; BAARS, A. M.; DUDINK, S.; SPRUIJT, B. M. Music during playtime: using context conditioning as a tool to improve welfare in piglets. **Applied Animal Behavior Science**, v. 115, p. 138-148, 2008.

JÚNIOR, H. de A. Música para além dos seus ouvidos: uma revisão de sua viabilidade terapêutica. **Revista de Investigação e Ensino de Artes**, v. 21, no p., 2018. Disponível em: <<http://convergencias.esart.ipcb.pt/?p=article&id=292>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

KANARI K.; KIKUSUI T.; TAKEUCHI Y.; MORI Y. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. **Behavioural Brain Research**, Tokyo, v. 156, p. 45-52, 2005.

LATHOUD, J. A. Pulsatilla nigricans. In: _____ **Estudos de Matéria Médica Homeopática**. 3ª ed. São Paulo: Editora Organon, 2017. p. 937-956.

LEE, E.; SON, H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. **BMB Reports**, v. 42, n. 5, p. 239-244, 2009.

MARZBAN, M.; SHAHBAZI, A.; TONDAR, M.; SOLEIMANI, M.; BAKHSHAYESH, A. M.; SADATTI, M.; ZENDEHROOD, S. A.; JOGHATAEI, M. R. Effect of Mozart on hippocampal content of BDNF in postnatal rats. **Basic and Clinical Neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 21-26, 2011.

MATTARAIA, V. G. de M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1490-1496, 2012.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1958.

MORAIS, M. M.; RABELO, P. C. R.; PINTO, V. A.; PIRES, W.; WANNER, S. P.; SZAWKA, R. E.; SOARES, D. D. Auditory stimulation by exposure to melodic music increases dopamine and serotonin activities in rat forebrain areas linked to reward and motor control. **Neuroscience Letters**, v. 673, p. 73-78, 2018.

NEWBERRY, R. C. Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. **Applied Animal Behavior Science**, Canada, v. 44, p. 229-243, 1995.

NIN, M. S.; COUTO-PEREIRA, N. S.; SOUZA, M. F.; AZEREDO, L. A.; FERRI, M. K.; DALPRÁ, W. L.; GOMEZ, R.; BARROS, H. M. T. Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. **European Journal of Pharmacology**, v. 684, p. 95-101, 2012.

NUÑES, M. J.; MAÑA, P.; LIÑARES, D.; RIVEIRO, M. P.; BALBOA, J.; SUÁRES-QUINTANILLA, J.; MARACCHI, M.; MÉNDEZ, R.; LÓPEZ, J. M.; FREIRE-GABARAL, M. Music, immunity, and cancer. **Life Sciences**, v. 71, p. 1047-1057, 2002.

OJO, J. O.; MOUZON, B.; ALGAMAL, M.; LEARY, P.; LYNCH, C.; ABDULLAH, L.; EVANS, J.; MULLAN, M. BACHMEIER, C.; STEWART, W.; CRAWFORD, F. Chronic repetitive mild traumatic brain injury results in reduced cerebral blood flow, axonal injury, gliosis, and increased T-Tau and Tau Oligomers". **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 75, p. 636-655, 2016.

OKU, A. O.; OWOAIE, E. T.; OKU, O. O.; IKPEME, B. M. Prevalence of stress, stressors, and coping strategies among medical students in a Nigerian medical school. **African Journal of Medical and Health Sciences**, v. 14, p. 29-34, 2015.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. 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, p. 149-167, 1985.

PILKINGTON, K.; KIRKWOOD, G.; RAMPES, H.; FISHER, P.; RICHARDSON, J. Homeopathy for anxiety and anxiety disorders: a systematic review of the research. **Homeopathy**, v. 95, p. 151-162, 2006.

PINTO, W. B. V. de R.; KO, G. M.; VALERO-LAPCHIK, V. B.; ARIZA, C. B.; PORCIONATTO, M. Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátrica em modelos animais. **Rebscal**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 102-120, 2012.

PRABHU, R. L.; VENKATESAN, D.; MADHUSUDHANAN, N., PAVITHRA, R. Anxiolytic effect of homeopathic preparation of *Pulsatilla nigricans* in Swiss albino mice. **Homeopathy**, v. 101, p. 171-174, 2012.

SAMPAIO, W. C. M. **Influência da musicoterapia no comportamento de animais em desenvolvimento**. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

SANTOS, B. D. dos. Criação e manejo de ratos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. p. 119-121.

SELYE, H. What is stress? **Metabolism**, v.5, n.5, p.525-530, 1956.

SETEM, J.; PINHEIRO, A. P.; MOTTA, V.A.; MORATO, S.; CRUZ, A. P. M. Ethnopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 62, p. 515-521 1999.

SILVA, F. R. S.; MIRANDA, K. O. da S.; PIEDADE, S. M. de S.; SALGADO, D. de A. Effect of auditory enrichment (music) in pregnant sows' welfare. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering**, Piracicaba, v. 37, n. 2, p. 215-225, 2017.

SONG, C.; BERRIDGE, K.; KALUEFF, A. 'Stressing' rodent self-grooming for neuroscience research. **Nature Reviews Neuroscience**, no p., 2016.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, vol. 44, p. 463-469, 1993.

UGUR, H. G.; AKTAS, Y. Y.; ORAK, O. S.; SAGLAMBILEN, O.; AVCI, I. A. The effect of music therapy on depression and physiological parameters in elderly people living in Turkish nursing home: a randomized-controlled trial. **Journal Aging and Mental Health**, v. 21, p. 1280-1286, 2016.

WAN, C. Y.; DEMAINE, K.; ZIPSE, L.; NORTON, A., SCHLAUG, G. From music making to speaking engaging the mirror neuron system in autism. **Brain Research Bulletin**, v. 82, p. 161-168, 2010.

WELCOME, M. O.; MASTORAKIS, N. E. Stress-induced blood brain barrier disruption: molecular mechanisms and signaling pathways. **Pharmacological Research**, v. 157, no p., 2020.

WELLS, D. L. Sensory stimulations as environmental enrichment for captive animals: a review. **Applied Animal Behaviour Science**, Belfast, v. 118, p. 1-11, 2009.

YAMASAKI, A.; BROOKER, A.; KAPUR, V.; TILT, A.; NIESS, H.; LILLEMOW, K. D.; WARSHAW, A. L.; CONRAD, C. The impact of music on metabolism. **Nutrition**, New York, v. 28, n. 11-12, p. 1075-1080, 2012.