

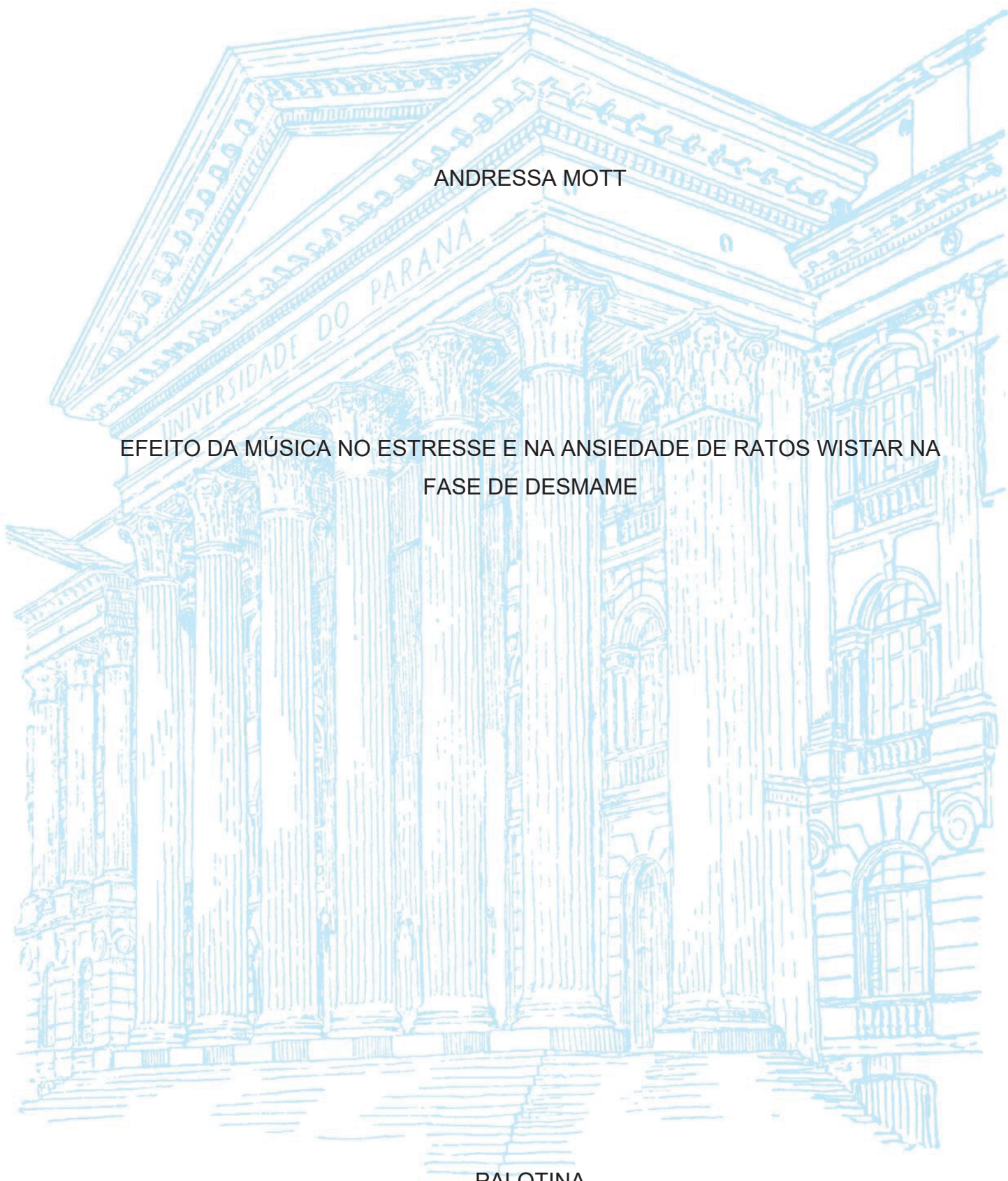
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA MOTT

EFEITO DA MÚSICA NO ESTRESSE E NA ANSIEDADE DE RATOS WISTAR NA  
FASE DE DESMAME

PALOTINA

2023



ANDRESSA MOTT

EFEITO DA MÚSICA NO ESTRESSE E NA ANSIEDADE DE RATOS WISTAR NA  
FASE DE DESMAME

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, na linha de pesquisa Biotecnologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erica Cristina Bueno do Prado Guirro

PALOTINA

2023

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

M921 Mott, Andressa  
Efeito da música no estresse e na ansiedade de ratos Wistar  
na fase de desmame / Andressa Mott. – Palotina, PR, 2023.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.  
Orientadora: Profa. Dra. Erica Cristina Bueno do Prado Guirro.

1. Bem-estar. 2. Enriquecimento ambiental. 3. Musicoterapia.  
I. Guirro, Erica Cristina Bueno do Prado. II. Universidade Federal  
do Paraná. III. Título.

CDU 604

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANDRESSA MOTT** intitulada: **EFEITO DA MÚSICA NO ESTRESSE E NA ANSIEDADE DE RATOS WISTAR NA FASE DE DESMAME**, sob orientação da Profa. Dra. ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 20 de Junho de 2023.

Assinatura Eletrônica

07/07/2023 15:17:52.0

ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/07/2023 14:51:42.0

NEI MOREIRA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/07/2023 16:24:49.0

VANIA MARIA MORAES FERREIRA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

Assinatura Eletrônica

07/07/2023 15:27:04.0

KATHERINNE MARIA SPERCOSKI  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho a todos os professores e divulgadores científicos, minhas fontes de inspiração. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, que me incentiva a realizar sonhos.

A todos os professores que passaram pela minha trajetória, pela dedicação, inspiração e conhecimento.

À Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, que desde a graduação me proporcionou educação de qualidade e abriu portas para novas oportunidades.

A minha orientadora, Professora Doutora Erica Cristina Bueno do Prado Guirro, pelo apoio, orientação e competência fundamentais para a minha trajetória acadêmica.

Ao Biotério Experimental de Roedores do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, pela infraestrutura necessária para a realização desse trabalho.

À equipe do Biotério, por toda ajuda e conhecimento compartilhado.

A Professora Doutora Katherinne Maria Spencoski, pela experiência, conhecimento e dias alegres no laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de aprimorar os meus conhecimentos no universo da pesquisa.

À Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

A todos que me acompanharam e me ajudaram de alguma forma durante esse trajeto, o meu muito obrigada.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

Todos os anos são produzidos milhões de ratos em biotérios para servirem como modelo animal em pesquisas científicas. Antes de serem encaminhados aos laboratórios para experimentação, os filhotes passam pelo processo de desmame, amplamente conhecido como um gerador de estresse e de ansiedade. Estudos mostraram que o enriquecimento ambiental com música é eficaz na redução do estresse e da ansiedade em seres humanos e em animais. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o enriquecimento ambiental com música e diferentes tempos de exposição poderiam minimizar o estresse e a ansiedade de ratos Wistar na fase do desmame. Para isso, foram utilizados noventa filhotes que permaneceram com as mães até o 21º dia de vida (D21), quando ocorreu o desmame, seguido da separação dos filhotes por sexo. As ninhadas foram aleatoriamente distribuídas em três grupos: Controle (C), onde os filhotes receberam somente manejo convencional; Música 4h (M4), onde os filhotes foram expostos à música (50 dB) por quatro horas diárias (19h00 às 23h00); e Música 8h (M8), onde os filhotes foram expostos à música (50 dB) por oito horas diárias (19h00 às 03h00). Os níveis de estresse foram avaliados através da análise das fezes dos ratos utilizando a técnica ELISA enquanto a ansiedade foi avaliada por meio do labirinto em cruz elevado nos dias D28 e D42. Os resultados indicaram que a exposição à música durante quatro horas diárias foi eficaz na redução dos níveis de estresse durante a fase de desmame ( $p=0,0941$ ), enquanto a exposição por oito horas diárias foi mais efetiva a partir do 28º dia de vida ( $p=<0,0001$ ). Além disso, a música mostrou-se efetiva na redução da ansiedade, sendo que a exposição por oito horas diárias apresentou vantagens em relação a quatro horas diárias de música no 28º dia de vida, mas ambos os tempos tiveram efeitos similares no 42º dia de vida. Concluiu-se que o uso da música como enriquecimento ambiental mostrou-se eficaz para reduzir o estresse e a ansiedade em filhotes de ratos Wistar durante o desmame, com efeitos que se estendem até a fase adulta.

Palavras-chave: Ansiedade. Bem-estar. Enriquecimento ambiental. Metabólitos de glicocorticoides. Musicoterapia. Separação materno filial.

## ABSTRACT

Every year millions of rats are produced in bioteriums to serve as animal models in scientific research. Before they are being sent to laboratories for experimentation, puppies go through the weaning process, widely known as a generator of stress and anxiety. Studies have shown that environmental enrichment with music is effective in reducing stress and anxiety in humans and animals. In this context, the aim of this study was to evaluate whether environmental enrichment with music and different exposure times could minimize stress and anxiety in Wistar rats during the weaning phase. For this, ninety pups were used, which remained with their mothers until the 21st day of life (D21), when the weaning occurred, followed by pups' separation by sex. Litters were randomly distributed into three groups: Control (C), where the pups received only conventional handling; the second group named Music 4h (M4), where the pups were exposed to music (50 dB) for four hours a day (7:00 pm to 11:00 pm); the third group called Music 8h (M8), where the pups were exposed to music (50 dB) eight hours per day (7:00 pm to 3:00 am). Stress levels were assessed by analyzing fecal corticoids by enzyme immunoassay (ELISA) technique, while anxiety was assessed by means of the elevated plus maze on days D28 and D42. Results indicated that exposure to music for four hours a day was effective in reducing stress levels during the weaning phase ( $p=0,0941$ ), while exposure for eight hours a day was more effective after the 28th day of life ( $p=<0,0001$ ). Furthermore, music proved to be effective in reducing anxiety, and exposure for eight hours a day had advantages over four hours a day of music on the 28th day of life, but both times had similar effects on the 42nd day of life. It was concluded that the use of music as an environmental enrichment was effective in reducing stress and anxiety in Wistar rat pups during weaning, which effects extend into adulthood.

Keywords: Anxiety. Welfare. Environmental enrichment. Glucocorticoid metabolites. Music therapy. Filial maternal separation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Leitor de placas de absorvência utilizado para avaliar o nível de estresse através da corticosterona fecal das fezes de ratos Wistar.....	21
FIGURA 2 - Teste do labirinto em cruz elevado utilizado para avaliar o nível de ansiedade em ratos Wistar.....	22
FIGURA 3 - Níveis de corticosterona fecal apresentados por ratos Wistar submetidos ao desmame convencional (C), com música por 4h (M4) e com música por 8h (M8) .....	24
FIGURA 4 - Efeito do manejo convencional (C), com música por 4h (M4) e com música por 8h (M8) sobre o tempo de permanência nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado apresentado por ratos Wistar.....	25
FIGURA 5 - Efeito do manejo convencional (C), com música por 4h (M4) e com música por 8h (M8) sobre o número de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado apresentado por ratos Wistar.....	26
FIGURA 6 - Efeito do manejo convencional (C), com música por 4h (M4) e com música por 8h (M8) sobre a frequência de <i>rearing</i> nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado apresentado por ratos Wistar.....	27
FIGURA 7 - Efeito do manejo convencional (C), com música por 4h (M4) e com música por 8h (M8) sobre a frequência de <i>grooming</i> nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado apresentado por ratos Wistar.....	27
FIGURA 8 - Efeito do manejo convencional (C), com música por 4h (M4) e com música por 8h (M8) sobre a frequência de defecação no labirinto em cruz elevado apresentado por ratos Wistar.....	28

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Avaliação do estresse por meio da mensuração de corticosterona fecal (média±desvio padrão) de fezes de ratos Wistar submetidos ao manejo convencional (C), com música por 4h (M4) e com música por 8h (M8) .....	23
TABELA 2 - Avaliação da ansiedade apresentada por ratos Wistar submetidos ao labirinto em cruz elevado submetidos ao manejo convencional (C), com música por 4h (M4) e com música por 8h (M8).....	24

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 OBJETIVOS.....	12
1.2 JUSTIFICATIVA.....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1 A UTILIZAÇÃO DE RATOS WISTAR EM PESQUISAS CIENTÍFICAS .....	13
2.2 DESMAME.....	13
2.3 ESTRESSE E ANSIEDADE .....	14
2.4 BEM-ESTAR ANIMAL .....	15
2.5 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL .....	16
2.5.1 Enriquecimento sensorial com música .....	17
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
3.1 COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA INSTITUCIONAL.....	19
3.2 MODELO ANIMAL .....	19
3.3 GRUPOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	20
3.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE E DA ANSIEDADE .....	20
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE.....	22
4.2 AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE .....	24
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
5.1 CORTICOSTERONA FECAL .....	29
5.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO .....	30
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os ratos desempenham um papel fundamental para o avanço científico e, para suprir a demanda dos pesquisadores, milhões de filhotes são produzidos todos os anos. É padrão realizar o desmame dos filhotes de ratos aos 21 dias de vida, juntamente com a separação por sexo (SANTOS, 2002). Estudos têm indicado que o desmame pode gerar altos níveis de estresse e isso pode resultar em ansiedade nesses animais, inclusive na vida adulta (CALDIJ *et al.*, 2000; DÍAZ *et al.*, 2022).

O enriquecimento ambiental é uma técnica que busca tornar o ambiente de animais cativos mais dinâmico, complexo e menos previsível (NEWBERRY, 1995) e essa estratégia têm sido associada a melhorias no bem-estar animal, na função cognitiva e na capacidade de lidar com o estresse (CASTRO, 2022). Para isso, podem ser aplicadas técnicas de enriquecimento ambiental do tipo alimentar, cognitivo, físico, sensorial e social (NEWBERRY, 1995). Uma das possibilidades é o emprego da música, que tem como objetivo estimular a audição dos animais e potencialmente reduzir seus níveis de estresse e de ansiedade (WELLS, 2009).

A possibilidade de reduzir o estresse e a ansiedade nos filhotes de ratos durante o processo de desmame e, talvez, minimizar o estresse e a ansiedade e melhorar o bem-estar desses animais na vida adulta pode contribuir para a qualidade de vida nos biotérios. É importante ressaltar que a técnica empregada não interferirá em futuras pesquisas. O uso de enriquecimento ambiental pode ser uma abordagem promissora para alcançar esse objetivo, mas é fundamental realizar estudos controlados para avaliar os efeitos reais sobre o estresse e a ansiedade nos filhotes.

### 1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo foi avaliar se o enriquecimento ambiental com música minimiza o estresse e a ansiedade de filhotes de ratos Wistar na fase do desmame.

Para isso, definiu-se os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar se a música minimiza o estresse e a ansiedade dos filhotes de ratos Wistar na fase do desmame.
- b) Avaliar se o tempo de exposição dos ratos à música influencia no estresse e na ansiedade dos filhotes de ratos Wistar na fase do desmame.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A realização desse trabalho se justifica pela imensa quantidade de filhotes de ratos e camundongos que são produzidos todos os anos para serem utilizados em pesquisas científicas. Esses animais são desmamados antes de serem encaminhados aos laboratórios onde os estudos são desenvolvidos. A possibilidade de reduzir os efeitos deletérios ocasionados pelo estresse e pela ansiedade justifica-se por si só devido ao ganho de bem-estar desses milhões de indivíduos. Adicionalmente, pode-se beneficiar os resultados das futuras pesquisas nas quais esses indivíduos serão utilizados, pois sem alterações que potencialmente afetam as vias de neurotransmissão, os resultados dos estudos poderão ser mais fidedignos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A UTILIZAÇÃO DE RATOS WISTAR EM PESQUISAS CIENTÍFICAS

Uma das espécies mais utilizadas nas pesquisas científicas é o *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar. A espécie é um atraente modelo para a pesquisa devido ao seu pequeno porte, ciclo biológico curto, baixo custo de criação e alto grau de similaridade genética com os 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 se preconiza a sanidade, mas não há nenhum tipo de barreira especial (POLITI *et al.*, 2008).

Para atender a demanda das pesquisas, nos biotérios de criação ocorre a reprodução dos animais. Após o acasalamento, a gestação de uma fêmea leva de 19 a 21 dias, quando geralmente nascem de 7 a 12 filhotes por matriz. Aos 21 dias de vida, ocorre o desmame, quando os filhotes são separados das suas mães e, no momento, ocorre a sexagem para que seja possível separar os filhotes machos das fêmeas (SANTOS, 2002).

### 2.2 DESMAME

O desmame é um dos eventos mais importantes na fase inicial da vida e pode ter influências duradouras no comportamento dos indivíduos adultos (CALDIJ *et al.*, 2000; DÍAZ *et al.*, 2022). Durante o período neonatal, a mãe-rato exerce comportamentos intensos como cuidar e lambe os filhotes. A privação materna nos 10 primeiros dias dos filhotes está associada ao aumento de comportamentos relacionados à ansiedade na idade adulta. Além disso, o desmame precoce pode aumentar as respostas autonômicas relacionadas ao estresse, como alterações na frequência cardíaca e na temperatura corporal, além de aumentar os níveis de ansiedade em respostas comportamentais e endócrinas (CHAMPAGNE *et al.*, 2003; ITO *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2022).

Um estudo realizado por Caldij *et al.* (2000) demonstrou que o contato entre mãe e filhote de ratos recém nascidos reduziu o medo na presença de estímulos novos e, na vida adulta, esses animais apresentaram uma maior propensão para explorar novos ambientes em comparação aos grupos que foram separados de suas mães. Além disso, Kanari *et al.* (2005) constataram 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 significativo no desenvolvimento dos filhotes, principalmente no que se refere aos comportamentos relacionados ao estresse e a ansiedade. Os eventos iniciais da vida também podem influenciar na expressão do medo na idade adulta que, por sua vez, afetam as respostas comportamentais ao estresse.

### 2.3 ESTRESSE E ANSIEDADE

O estresse é uma resposta do organismo a uma ameaça ou estímulo nocivo que pode resultar em desconforto ou consequências danosas à saúde (CREEL, 2001; OKU *et al.*, 2015). No início do século XX, os médicos fisiologistas Walter Bradford Cannon (1871-1945) e Hans Hugo Selye (1907-1982) foram pioneiros ao tentar estabelecer as bases iniciais para o campo da pesquisa sobre o estresse. O 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). A resposta fisiológica ao estresse pode ser avaliada pelo aumento na secreção de hormônios esteroides, como o cortisol e a corticosterona,

que são glicocorticoides bem caracterizados (CREED, 2001). Em roedores, a corticosterona é o principal glicocorticoide e pode ser medida no sangue, fezes, urina ou saliva dos animais. Entre as técnicas disponíveis para essa avaliação, destaca-se o Enzyme Linked Immunone Sorbent Assay (ELISA), que se mostra eficaz na medição dos níveis de corticosterona (LEENAARS *et al.*, 2020).

A ansiedade é uma emoção semelhante ao medo, mas diferente dele, não se origina de uma ameaça definida (CAMPOS, 2013). Existe um potencial fator de risco para a ansiedade relacionado à exposição precoce ao estresse, como apontado por Lahdepuro *et al.* (2019). Essa condição pode se manifestar de forma psicológica, fisiológica ou comportamental (FREITAS, 2011). A ansiedade dos roedores pode ser avaliada por meio de diversos aparatos, 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). O aparelho é suspenso acima do nível do chão e é composto por dois braços fechados opostos perpendicularmente por dois braços abertos. Tais autores descreveram a avaliação do comportamento de ansiedade baseados na propensão dos roedores para espaços escuros e fechados e um medo incondicional de altura e de espaços desprotegidos. A permanência nos braços abertos induz sinais fisiológicos de estresse (aumento da defecação e dos níveis de corticosterona), enquanto animais menos ansiosos aumentam a exploração desses braços (PELLOW *et al.*, 1985; TREIT *et al.*, 1993, OJO & MOUZON, 2016).

O estresse e a ansiedade dos animais estão intimamente relacionados com o seu bem-estar. Broom e Kirkden (2004) afirmaram que situações estressantes podem prejudicar a capacidade do animal de se adaptar e, conseqüentemente, afetar negativamente o seu bem-estar.

## 2.4 BEM-ESTAR ANIMAL

Há um interesse cada vez maior da sociedade em relação ao bem-estar dos animais (MOTA-ROJAS *et al.*, 2018). A pesquisa com animais tem sido fundamental para o avanço científico, permitindo que as pessoas em todo o mundo desfrutem dos seus benefícios (FESTING & WILKINSON, 2007).

Diante dessa crescente conscientização, a comunidade científica mantém um compromisso com os Princípios de Russell-Burch (1959), também conhecidos como

Princípio dos 3R's (*Reduction, Refinement and Replacement*) (DISNER, 2019). Esses princípios são considerados importantes para todos os experimentos científicos envolvendo animais, pois visam reduzir, substituir e refinar o seu uso (STUART & ROBINSON, 2015). O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) estabelece normas relativas à utilização humanitária de animais para fins de ensino e pesquisa científica, bem como para a instalação e o funcionamento de centros de criação, biotérios e laboratórios de experimentação (SBCAL, 2022). A Resolução Normativa nº 49 de 2021, por exemplo, torna obrigatória a capacitação das pessoas envolvidas em atividades que utilizam animais a fim de se garantir seu bem-estar (BRASIL, 2021).

Ao longo dos anos, as diretrizes para avaliar o bem-estar animal passaram por diversas modificações (MELLOR, 2020). Historicamente, o bem-estar animal era avaliado com base nas cinco liberdades, que incluíam a garantia de que o animal estivesse (1) livre de fome e de sede, (2) livre de desconforto, (3) livre de dor, lesão ou doença, (4) livre para expressar seu comportamento natural e (5) livre de medo e angústia. Entretanto, novas estruturas foram desenvolvidas para melhorar o bem-estar animal, incluindo (1) oportunidade para uma dieta bem equilibrada, (2) oportunidade para automanutenção, (3) oportunidade para a saúde ideal, (4) oportunidade para expressar comportamentos específicos da espécie e (5) oportunidade para escolha e controle.

É importante ressaltar que a ausência de indicadores negativos de bem-estar não garante que ele esteja preservado. Além disso, há evidências que sugerem que a diversidade comportamental possa ser um indicador positivo de bem-estar animal e que esse bem-estar pode, complementarmente, ser avaliado por meio dos glicocorticoides (MELLOR, 2020; MILLER, 2020).

## 2.5 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

No ambiente natural, os animais são expostos a uma ampla variedade de estímulos sensoriais, mas em ambientes cativos, esses estímulos são comumente mais pobres (WELLS, 2009). Na tentativa de melhorar o bem-estar dos animais em ambientes cativos, pode-se implementar o enriquecimento ambiental, que consiste na utilização de técnicas que tornam o ambiente mais complexo, dinâmico e interessante para os animais (NEWBERRY, 1995). Essa estratégia tem sido associada a melhorias

no bem-estar animal, na função cognitiva e na resiliência ao estresse, impulsionadas por alterações moleculares, celulares e fisiológicas (CASTRO, 2022).

Diversos estudos têm demonstrado que o enriquecimento ambiental é benéfico em modelos animais de doença de Parkinson (JUNGLING *et al.*, 2017; WI *et al.*, 2018) oferecendo efeitos neuroprotetores contra estímulos nocivos (HORVATH *et al.*, 2013) e danos na retina (DORFMAN *et al.*, 2014; FLEITAS *et al.*, 2019). Além disso, pode prevenir o comprometimento cognitivo relacionado à idade e as consequências adversas do estresse pré-natal (PATTEN *et al.*, 2015). As técnicas de enriquecimento ambiental devem incentivar comportamentos naturais das espécies e aumentar a capacidade de lidar com desafios (WELLS, 2009). Essas técnicas podem ser divididas em cinco grandes grupos: alimentar, cognitivo, físico, sensorial e social (NEWBERRY, 1995).

### 2.5.1 Enriquecimento sensorial com música

No enriquecimento ambiental do tipo sensorial são utilizadas técnicas que estimulam os sentidos e, no que tange a audição, uma forma possível é o emprego de música (WELLS, 2009). O poder da música é conhecido há milênios, mas sua utilização como terapia surgiu após a primeira e segunda guerras mundiais, quando se descobriu que poderia diminuir sensações de medo e melhorar respostas fisiológicas como a pressão arterial dos soldados feridos. Posteriormente, em 1944, foi criado o primeiro programa formal de musicoterapia na Michigan State University e em 1950 foi fundada a National Association for Music Therapy (SACKS, 2007).

Estudos realizados com animais humanos e não-humanos demonstraram que a música pode ter um impacto significativo na qualidade de vida dos envolvidos, proporcionando sensações de relaxamento, conforto e redução do estresse (NUÑES *et al.*, 2002). Sabe-se que a música tem a capacidade de reduzir a atividade do córtex pré-frontal e do sistema límbico, tornando a audição mais agradável, o que pode levar a uma diminuição da ativação do giro cingulado anterior (MASATAKA & PERLOVSKY, 2012).

Em ambientes clínicos e hospitalares, a música tem sido utilizada com sucesso para reduzir níveis de estresse e ansiedade, pois promove relaxamento aos pacientes (YAMASAKI *et al.*, 2012). Em humanos, a apreciação musical está bem documentada (CRUZ *et al.*, 2011) e seu uso terapêutico tem aumentado devido aos seus benefícios

(UGUR *et al.*, 2016). Em idosos, a música foi capaz de aumentar o sentimento de independência e autoconfiança (UGUR *et al.*, 2016) e reduzir os escores de depressão (CHAN *et al.*, 2009). Em neonatos prematuros mantidos em Unidade de Terapia Intensiva, a exposição à música reduziu significativamente os níveis de cortisol (CALAMITA *et al.*, 2016) e auxiliou na estabilização dos níveis de saturação de oxigênio, redução da perda de peso e contribuiu para a redução de dias de hospitalização de bebês mantidos em incubadoras (JÚNIOR, 2018). Em autistas, a música foi utilizada para melhorar a concentração e a interação com outras pessoas, promovendo o desenvolvimento de habilidades sociais e de comunicação (WAN *et al.*, 2010). No cérebro, pode induzir ondas alfa que levam ao relaxamento e 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). Além disso, foi capaz de melhorar a saturação de oxigênio e reduzir significativamente a ansiedade de pacientes hospitalizados por COVID 19 (GIORADANO *et al.*, 2022).

Há um número crescente de investigações focadas na exploração do impacto da estimulação sonora como um método de enriquecimento ambiental para animais em cativeiro, em laboratórios e para algumas espécies de animais de produção. Os estímulos auditivos podem oferecer benefícios aos animais ao romperem o silêncio monótono do espaço ou reduzindo ruídos repentinos que são potencialmente estressantes aos animais (CRUZ *et al.*, 2011; CALAMITA *et al.*, 2016).

Estudos demonstraram que a música pode facilitar a redução da resposta ao estresse em animais, incluindo ratos, resultando em benefícios para o sistema imunológico e reduzindo o desenvolvimento tumoral (NUÑES *et al.*, 2002). A utilização da música na produção animal apresentou resultados significativos, como a 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 o comportamento de porcas gestantes, fornecendo maior relaxamento e redução de comportamentos estereotipados, também relacionados a um melhor bem-estar (SILVA *et al.*, 2017).

Estudos adicionais investigaram se a música pode facilitar o comportamento lúdico em leitões após o desmame, onde 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 (JONGE *et al.*, 2008). Além disso, a exposição de ratos Wistar à Sonata de Mozart desde o início da vida resultou em um aumento significativo do conteúdo de fator neurotrófico do cérebro (MARZBAN *et al.*, 2011), que tem papel fundamental na sobrevivência neural, diferenciação e organização do cérebro e formação de atividade sináptica (LEE & SON, 2009), que atua como estimulador de aprendizagem e processo de memória (ARANCIO & CHAO, 2007).

Na investigação de Morais *et al.* (2018) os estímulos auditivos também aumentaram os níveis de dopamina e serotonina em ratos Wistar, ambos ligados ao prazer, recompensa e controle motor. É importante considerar que a música apresenta flutuações nos níveis de som, frequência e tempo, capazes de induzir mudanças fisiológicas e comportamentais (CRUZ *et al.*, 2011).

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA INSTITUCIONAL**

Esse estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, sob protocolo número 21/2021.

#### **3.2 MODELO ANIMAL**

O modelo biológico utilizado foi o *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, oriundo da produção do Biotério Experimental de Roedores do Hospital Veterinário do Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná. Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno de 49x31x21cm, 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 atende às recomendações do NRC (1995) e NIH (2002) para a espécie.

### 3.3 GRUPOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 90 filhotes de ratos Wistar selecionados aleatoriamente para cada grupo experimental, sendo eles divididos em:

- C (controle, n=30): não houve nenhum tipo de manejo de enriquecimento ambiental;
- M4 (música por 4 horas, n=30): de D19 (19º dia de vida) a D42, os filhotes foram submetidos ao enriquecimento ambiental com música com ritmos suaves (50 dB) por quatro horas diárias (das 19h00 às 23h00);
- M8 (música por 8 horas, n=30): de D19 a D42, os filhotes foram submetidos ao enriquecimento ambiental com música com ritmos suaves (50 dB) por oito horas diárias (das 19h00 às 03h00).

Independentemente do grupo, foi mantido o manejo higiênico-sanitário e nutricional supracitado e foi realizado o desmame no 21º dia de vida dos filhotes (D21), sendo que nesse momento também houve a separação dos filhotes conforme o sexo.

### 3.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE E DA ANSIEDADE

Para avaliar o nível de estresse, de D19 a D42 foi realizada a coleta de fezes dos filhotes. Os *pellets* de fezes depositados nas caixas foram recolhidos, colocados em sacos plásticos, identificados de qual grupo e data eram provenientes e armazenados em freezer. Ao término de todas as coletas, foi verificado o nível de corticosterona fecal por meio da técnica ELISA.

FIGURA 1 - LEITOR DE PLACAS DE ABSORBÂNCIA UTILIZADO PARA AVALIAR O NÍVEL DE ESTRESSE POR MEIO DA CORTICOSTERONA FECAL DAS FEZES DE RATOS WISTAR



FONTE: O autor (2022).

Para a avaliação da ansiedade, nos dias D28 e D42, os filhotes foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE). 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 e fechados (segundos); número de entradas nos braços abertos e fechados; frequência de *rearing* (animal em pé nas duas pernas traseiras em uma postura vertical) nos braços abertos e fechados; frequência de *grooming* (comportamento de autolimpeza) nos braços abertos e fechados. Os parâmetros do teste foram gravados por uma câmera filmadora e, posteriormente, todas as sessões foram assistidas por três pesquisadores cegos ao experimento. O resultado de cada variável foi obtido a partir da média calculada com base nos dados dos três avaliadores.

FIGURA 2 - TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO UTILIZADO PARA AVALIAR O NÍVEL DE ANSIEDADE DE RATOS WISTAR



FONTE: O autor (2022).

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram submetidos aos testes de normalidade, homoscedasticidade e identificação de *outliers*. Posteriormente, os dados relativos ao estresse foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido por Tukey. Para a ansiedade, os dados relativos as comparações entre os grupos (C x M4 x M8) foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido por Tukey e as comparações entre as idades dos animais (D28 x D42) foram submetidas ao teste t, com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE

Observou-se diferença na concentração de corticosterona fecal. De forma geral, o grupo controle (C) mostrou diferença estatística em relação aos grupos com música (M4 e M8). Os grupos com música M4 e M8 também apresentaram diferenças estatísticas entre si (Tabela 1).

TABELA 1 - AVALIAÇÃO DO ESTRESSE POR MEIO DA MENSURAÇÃO DE CORTICOSTERONA FECAL (MÉIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO) DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO MANEJO CONVENCIONAL (C), COM MÚSICA POR 4h (M4) E COM MÚSICA POR 8h (M8)

Idade (dias)	C	M4	M8
D19	129 $\pm$ 32 <sup>Ab</sup>	126 $\pm$ 28 <sup>Aa</sup>	127 $\pm$ 37 <sup>Ab</sup>
D22	222 $\pm$ 66 <sup>Aa</sup>	127 $\pm$ 28 <sup>Ba</sup>	196 $\pm$ 40 <sup>Aa</sup>
D23	172 $\pm$ 50 <sup>Aab</sup>	114 $\pm$ 44 <sup>Ba</sup>	152 $\pm$ 40 <sup>Bab</sup>
D24	203 $\pm$ 48 <sup>Aab</sup>	127 $\pm$ 33 <sup>Ba</sup>	144 $\pm$ 50 <sup>Bab</sup>
D28	127 $\pm$ 56 <sup>Ab</sup>	143 $\pm$ 41 <sup>Aa</sup>	126 $\pm$ 21 <sup>Ab</sup>
D35	137 $\pm$ 71 <sup>Aab</sup>	154 $\pm$ 37 <sup>Aa</sup>	102 $\pm$ 31 <sup>Bb</sup>
D42	154 $\pm$ 58 <sup>Aab</sup>	165 $\pm$ 64 <sup>Aa</sup>	122 $\pm$ 42 <sup>Ab</sup>

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes representam diferença estatística entre as colunas. Letras minúsculas sobrescritas diferentes representam diferença estatística entre as linhas. FONTE: O autor (2023).

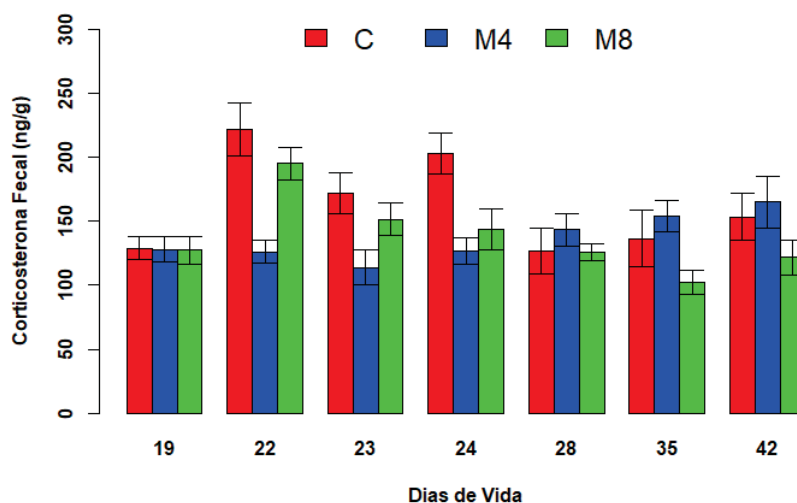
Ao considerar a idade dos filhotes, o nível de corticosterona fecal variou bastante em relação aos grupos experimentados. Na Figura 1 é possível observar que os filhotes tiveram concentrações de corticosterona semelhantes enquanto estavam aos cuidados da mãe.

Já aos 22 dias de vida (D22), dia seguinte ao desmame, os filhotes do grupo C e M8 obtiveram um aumento significativo dos níveis de corticosterona, reafirmando a grande resposta ao estresse provocada pela separação de mãe e filho. O grupo M4, no entanto, não apresentou nenhum aumento.

No grupo com música de 4h (M4) é possível notar que o nível de estresse é mais estável durante todos os dias, inclusive no dia do desmame, visto que não apresenta diferença estatística em nenhum dos dias avaliados.

No grupo com música por 8h (M8) é possível notar que também houve um pico de estresse no D22 com relação ao D19, mostrando que a música não foi capaz de amenizar o estresse após o desmame dos filhotes. No entanto, vale ressaltar que, diferente do grupo controle, a partir do D28 houve uma redução significativa do estresse em relação ao D22.

FIGURA 3 - NÍVEIS DE CORTICOSTERONA FECAL APRESENTADO POR RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO DESMAME CONVENCIONAL (C), COM MÚSICA POR 4h (M4) E COM MÚSICA POR 8h (M8)



FONTE: O autor (2023).

## 4.2 AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE

Ao avaliar a Tabela 2, é possível observar diferenças estatísticas entre os grupos e em relação aos dias de aplicação do LCE.

TABELA 2 - AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE APRESENTADA POR RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO APÓS MANEJO CONVENCIONAL (C), COM MÚSICA POR 4h (M4) E COM MÚSICA POR 8h (M8)

	Grupos	D28	D42	p
Permanência Braços Abertos	C	90±30 Aa	87±56 Aa	0,902
	M4	101±29 Aa	94±23 Aa	0,346
	M8	90±25 Aa	66±30 Ba	0,015
Permanência Braços Fechados	C	210±30 Aa	213±56 Aa	0,902
	M4	199±29 Aa	206±23 Aa	0,346
	M8	210±25 Ba	234±30 Aa	0,015
Entrada Braços Abertos	C	6,3±2 Aa	5,8±3,6 Aa	0,563
	M4	6,3±1,7 Aa	6,6±2,2 Aa	0,378
	M8	5,9±1,2 Aa	5,7±2,8 Aa	0,735
Entrada Braços Fechados	C	6,5±1,4 Aa	5,7±3,2 Aa	0,344
	M4	6,8±1,2 Aa	6,6±2 Aa	0,689
	M8	5,8±1,4 Aa	5,8±2,5 Aa	0,968
<i>Rearing</i> Braços Abertos	C	0,84±1,4 Aa	2±2,1 Aa	0,091
	M4	0,31±1,3 Aa	0,33±0,76 Ab	0,144
	M8	1,2±1,6 Aa	0,81±1,7 Ab	0,106
<i>Rearing</i> Braços Fechados	C	27±40 Aa	17±4 Aa	0,918
	M4	16±4,6 Aa	16±5,5 Aa	0,746
	M8	19±6 Aa	22±15 Aa	0,466
	C	0±0 Aa	0±0 Aa	1

<i>Grooming</i>	M4	0±0	Aa	0±0	Aa	1
Braços Abertos	M8	0±0	Aa	0±0	Aa	1
<i>Grooming</i>	C	1,5±0,76	Aa	0,94±0,91	Ba	0,034
Braços Fechados	M4	1,4±1,4	Aa	1±0,94	Aa	0,143
	M8	1,3±0,68	Aa	1,4±1,3	Aa	0,232
Defecação	C	2,4±1,9	Aa	0,75±1,7	Ba	0,028
Braços Abertos e	M4	1,8±1,8	Aa	1,2±1,8	Aa	0,218
Fechados	M8	3,3±2,4	Aa	0,5±0,97	Ba	0

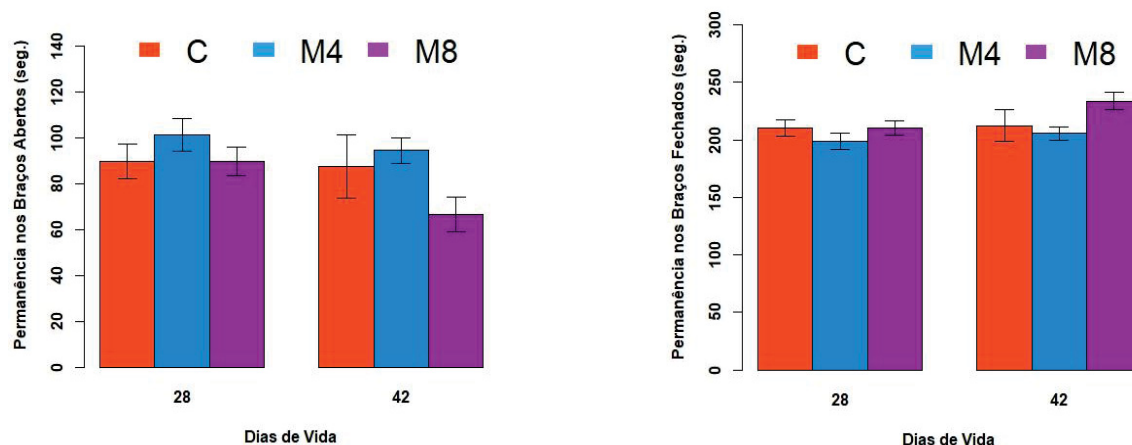
Letras maiúsculas sobrescritas diferentes representam diferença estatística entre as colunas. Letras minúsculas sobrescritas diferentes representam diferença estatística entre as linhas. FONTE: O autor (2023).

Ao considerar o tempo de permanência nos braços abertos (Figura 2), verificou-se que o protocolo de desmame não causou alterações em D28 e em D42. Quanto à idade, verificou-se que houve interferência no grupo M8, sendo que em D28 os animais permaneceram mais tempo nos braços abertos que em D42.

Nos braços fechados, o protocolo de desmame não causou alterações em D28 e em D42. Quanto à idade, verificou-se que houve interferência no grupo M8, sendo que em D28 os animais permaneceram menos tempo nos braços fechados que em D42.

Em relação ao tipo de braço do aparato, notou-se que os filhotes permaneceram mais tempo nos braços fechados que nos braços abertos, independentemente da idade e do protocolo de desmame, o que é esperado para a espécie.

FIGURA 4 – EFEITO DO MANEJO CONVENCIONAL (C), COM MÚSICA POR 4h (M4) E COM MÚSICA POR 8h (M8) SOBRE O TEMPO DE PERMANÊNCIA NOS BRAÇOS ABERTOS E FECHADOS DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO APRESENTADO POR RATOS WISTAR

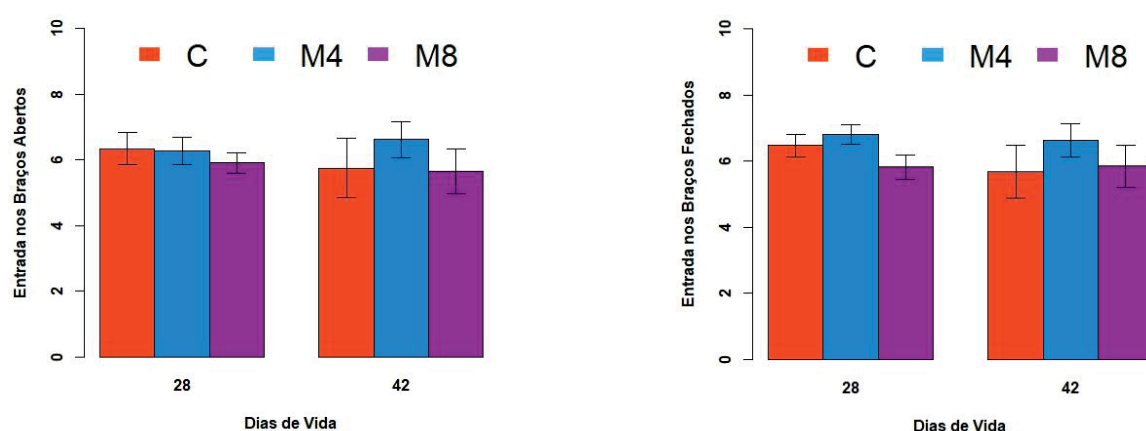


FONTE: O autor (2023).

Ao verificar a frequência de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado (Figura 3), observou-se que o protocolo de desmame e a idade não causaram diferenças significativas em D28 e em D42.

Em relação ao tipo de braço do labirinto, não houve diferença na frequência de entradas, independentemente do grupo ou idade.

FIGURA 5 - EFEITO DO MANEJO CONVENCIONAL (GC), COM MÚSICA POR 4h (M4) E COM MÚSICA POR 8h (M8) SOBRE O NÚMERO DE ENTRADAS NOS BRAÇOS ABERTOS E FECHADOS DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO APRESENTADO POR RATOS WISTAR



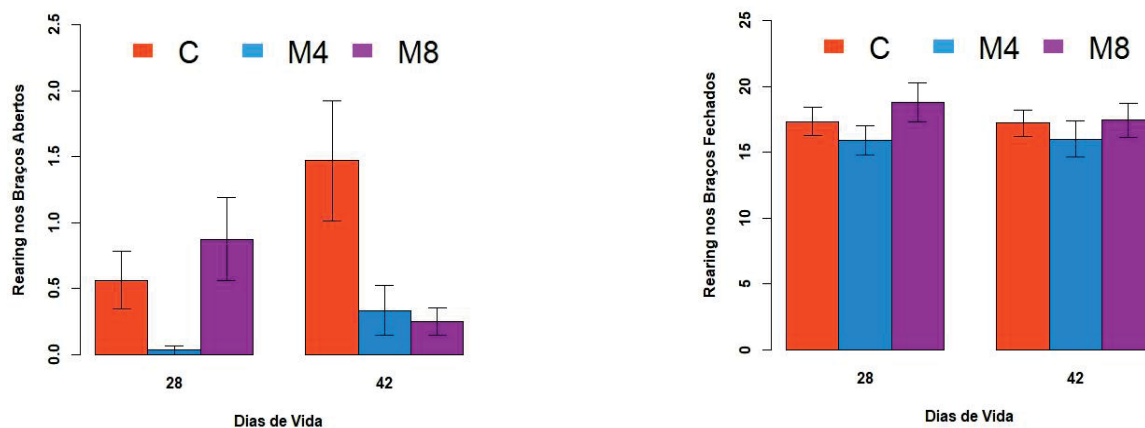
FONTE: O autor (2023).

Nos braços abertos, a frequência de *rearing* (Figura 4) não variou em relação ao protocolo de desmame em D28. Já em D42, o grupo C obteve frequência significativamente maior que M4 e M8. Quanto a idade, não se observaram alterações.

Entretanto, nos braços fechados o protocolo de desmame e a idade mantiveram-se iguais em D28 e em D42.

Quanto ao tipo de braço do LCE, notou-se que a frequência de *rearing* foi maior nos braços fechados que nos braços abertos, independentemente da idade e do protocolo de desmame.

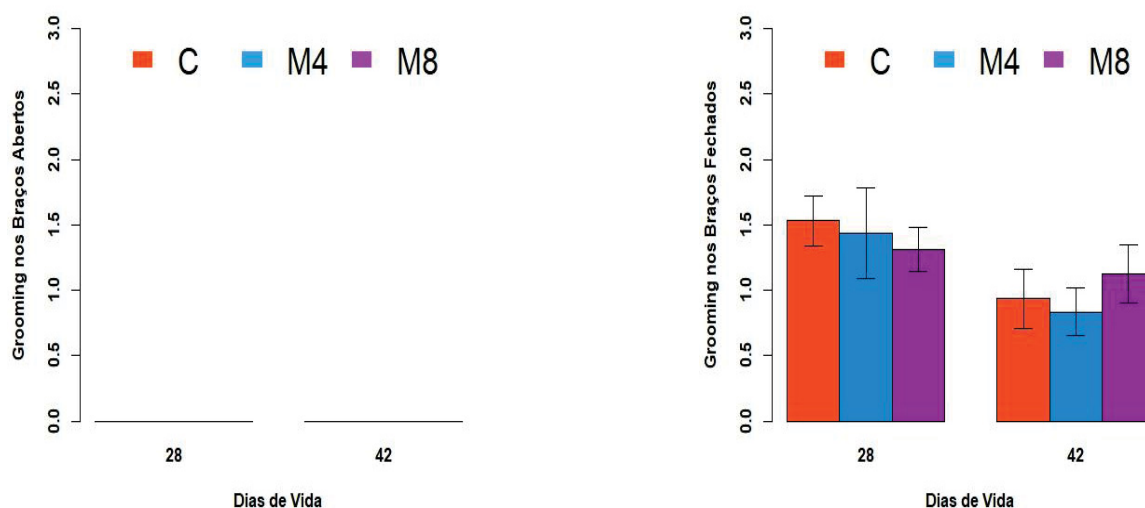
FIGURA 6 - EFEITO DO MANEJO CONVENCIONAL (GC), COM MÚSICA POR 4h (M4) E COM MÚSICA POR 8h (M8) SOBRE A FREQUÊNCIA DE *REARING* NOS BRAÇOS ABERTOS E FECHADOS DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO APRESENTADO POR RATOS WISTAR



FONTE: O autor (2023).

A frequência de *grooming* (Figura 5) não foi registrada nos braços abertos do LCE. Nos braços fechados, a frequência de *grooming* manteve-se igual em D28 e em D42. No entanto, a idade foi um fator relevante para o grupo C, visto que a frequência foi menor em D42.

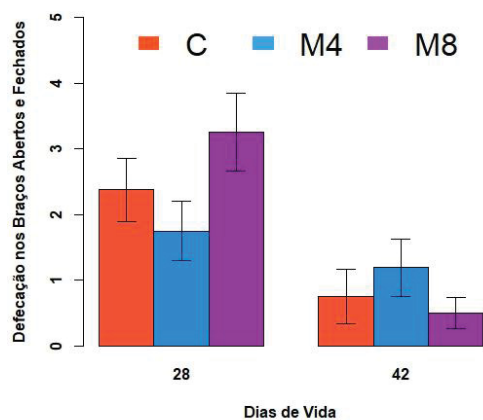
FIGURA 7 - EFEITO DO MANEJO CONVENCIONAL (GC), COM MÚSICA POR 4h (M4) E COM MÚSICA POR 8h (M8) SOBRE A FREQUÊNCIA DE *GROOMING* NOS BRAÇOS ABERTOS E FECHADOS DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO APRESENTADO POR RATOS WISTAR



FONTE: O autor (2023).

A respeito da defecação nos braços abertos e fechados do LCE (Figura 6), em D28 e em D42, o protocolo de desmame manteve-se igual entre os grupos. A idade dos animais, no entanto, variou no grupo C e M8 e manteve-se igual no grupo M4.

FIGURA 8 - EFEITO DO MANEJO CONVENCIONAL (GC), COM MÚSICA POR 4h (M4) E COM MÚSICA POR 8h (M8) SOBRE A FREQUÊNCIA DE DEFECÇÃO NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO APRESENTADO POR RATOS WISTAR



FONTE: O autor (2023).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 CORTICOSTERONA FECAL

A análise da corticosterona fecal revelou que, de forma geral, ambos os grupos expostos à música (M4 e M8) apresentam níveis significativamente mais baixos de estresse em relação ao desmame padrão dos biotérios representado pelo grupo controle (C), ou seja, sem música.

Foi observado, no entanto, que a resposta ao estresse varia bastante em relação à idade dos animais. Todos os grupos tiveram níveis de corticosterona fecal semelhantes enquanto estavam sob os cuidados da mãe, mas, após o desmame (D22), o grupo C apresentou um aumento significativo. Essa resposta é esperada devido a separação mãe-filho, visto que a privação materna aumenta os níveis de estresse e ansiedade dos filhotes (CALDIJ *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2006). Os filhotes do grupo M4 não tiveram alterações nos níveis de estresse no D22, evidenciando que a exposição à música durante 4h diárias é ideal para que os filhotes não sejam afetados pela separação materna. Por outro lado, os filhotes do grupo M8 também apresentaram aumento significativo, sugerindo que 8h diárias não são eficazes para diminuir a ansiedade dos filhotes após o desmame.

Com o passar dos dias, espera-se que o estresse retorne aos níveis normais e aumente gradativamente na idade adulta (PINTO *et al.*, 2012). Essa informação se confirmou no grupo C, uma vez que, após o pico de estresse no D22, o nível de corticosterona diminuiu gradativamente com o passar dos dias, tornando-se semelhante ao D19.

Já no grupo M4, é possível notar que o nível de estresse é mais estável durante todos os dias, visto que não apresenta diferença estatística em nenhum dos dias de avaliação. Vale perceber, no entanto, que o nível de estresse sobe lentamente conforme a idade dos filhotes avança. Esse dado sugere que, com o passar do tempo, 4h de exposição à música não são mais tão eficazes quanto no início.

No grupo M8 houve um pico de estresse no D22 com relação ao D19 assim como no grupo controle, mostrando que a música não foi capaz de amenizar o estresse após o desmame dos filhotes. Todavia, diferente do C e do M4, a partir do D28 houve uma redução significativa do estresse em relação ao D22, sugerindo que a partir dessa idade os filhotes adaptam-se melhor a 8h de exposição. Essa

descoberta é valiosa uma vez que sugere que no início da vida 4h de música são ideais, mas com o passar dos dias o tempo de exposição deve aumentar gradativamente para que os ratos tenham benefícios com a música desde filhotes até a vida adulta.

## 5.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Ao avaliar os efeitos do protocolo de desmame, observou-se que em D28 e em D42 o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto foi semelhante nos três grupos, indicando que o nível de ansiedade não sofreu alterações. Quanto a idade, o grupo M8 permaneceu mais tempo nos braços abertos do labirinto em D28 do que em D42.

Nos braços fechados, o protocolo de desmame não provocou alterações em D28 e em D42. Em relação a idade, verificou-se que o grupo M8 permaneceu menos tempo nos braços fechados em D28 do que em D42.

Esses resultados sugerem que a idade foi um fator relevante para o grupo M8 em relação a permanência nos braços do labirinto em cruz elevado. A diminuição do tempo de permanência nos braços abertos e, conseqüentemente, o aumento do tempo de permanência nos braços fechados do labirinto no 42º dia de vida indica que a exposição à música por 8h diárias é mais eficaz aos 28 dias de vida, visto que o aumento no tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos do LCE indica que estímulos ansiolíticos são eficaz para bloquear respostas de medo e ansiedade (PELLOW *et al.*, 2005).

Em relação ao tipo de braço do aparato, notou-se que os filhotes permaneceram mais tempo nos braços fechados que nos braços abertos, independentemente da idade e do protocolo de desmame, o que é esperado para a espécie (MONTGOMERY, 1958; TREIT *et al.*, 1993; ESTANISLAU, 2012).

A frequência de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado não variou em relação ao protocolo de desmame e a idade. Nos braços fechados, em D28, a frequência de entradas de M4 foi maior que de M8, embora mesmo entrando mais vezes, os ratos permaneceram menos tempo nos braços fechados, indicando que o novo protocolo pode evocar o impulso exploratório (MONTGOMERY, 1958). Quanto a idade, não houve diferenças em nenhum dos

grupos. Em relação ao tipo de braço do labirinto, não houve diferença na frequência de entradas independentemente do grupo ou idade.

Nos braços abertos, a frequência de *rearing* não variou em relação ao protocolo de desmame em D28. Já em D42, o grupo C obteve frequência maior que M4 e M8. Quanto a idade, não se observaram alterações. Nos braços fechados o protocolo de desmame e a idade se mantiveram iguais em D28 e em D42.

O *rearing* é considerado um comportamento exploratório (ESPEJO, 1997) e um marcador de novidade (HO *et al.* 2002) utilizado como indicador de ansiedade (ENNACEUR, 2014). Reduções no número de *rearing* têm sido interpretadas como respostas ao aumento nos níveis de ansiedade (ENNACEUR, 2014). Ainda assim, é difícil atribuir significado a esse fator, visto que nos braços fechados, onde ocorre mais comumente (ENNACEUR, 2014), não foi afetado em nenhuma das variáveis.

Quanto ao tipo de braço do LCE, notou-se que a frequência de *rearing* foi maior nos braços fechados que nos braços abertos independentemente da idade e do protocolo de desmame, de acordo com o esperado para a espécie (ENNACEUR, 2014).

O protocolo de desmame não interferiu na frequência de *grooming* dos animais nos braços fechados do labirinto em cruz elevado. No entanto, a idade foi um fator relevante para o grupo Controle, visto que a frequência foi menor em D42. A diminuição da frequência de *grooming* de D42 em relação ao D28 indica que o desmame com exposição à música pode reduzir a ansiedade dos ratos ao longo da vida, visto que os demais grupos não tiveram os níveis de ansiedade alterados com o passar do tempo. Isso porque pesquisadores como Nin *et al.* (2012) e Estanislau (2012) afirmaram que o *grooming* é uma ferramenta valiosa para detectar comportamentos ansiosos em ratos, sendo que animais mais ansiosos desenvolvem menos comportamentos de higiene. Da mesma forma, há mais atividade de limpeza em ratos que apresentam baixa exploração nos braços abertos do LCE (ESTANISLAU *et al.* 2011), o que explica a ausência de significância entre os grupos. Ou seja, não há diferença entre os grupos pois os ratos estavam explorando os braços abertos do LCE.

A defecação variou em relação a idade dos animais no grupo C e M8. Quanto ao protocolo de desmame, observou-se que os filhotes expostos à música por 8h depositaram mais fezes no LCE, sugerindo que, de forma geral, a exposição à 4h de música pode oferecer mais benefícios.

Esse estudo traz resultados que abrem portas para que os biotérios adotem esse novo protocolo de desmame, a fim de garantir o ganho de bem-estar desses milhões de indivíduos. Por ser uma ferramenta não farmacológica, a música atua como enriquecimento ambiental sem causar intervenções, não interfere nos procedimentos padronizados e possui baixo ou nenhum custo (GIORDANO *et al.*, 2022).

## **5 CONCLUSÃO**

A música minimiza o estresse e a ansiedade dos filhotes de ratos Wistar na fase de desmame e essa redução prolonga-se até fases mais tardias. O tempo de exposição deve ser considerado, uma vez que 4h diárias de música possui mais benefícios no início da vida enquanto 8h diárias mostra-se mais eficaz a partir do 28º dia de vida. Dessa forma, a introdução do manejo que insere a música como ferramenta de enriquecimento ambiental poderá melhorar o nível de bem-estar de milhões de roedores que são criados nos biotérios, pois é de baixo custo e garante maior qualidade de vida.

## REFERÊNCIAS

- ARANCIO, O.; CHAO, M. V. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 17, n. 3, p. 325-330, 2007.
- BERNALTZKY, 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.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **Resolução Normativa CONCEA nº 49, de 07.05.2021**. Publicada no D.O.U. de 10.05.2021, Seção I, Pág. 5.
- 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.
- 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<sub>A</sub> and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. **Neuropsychopharmacology**, New York, v. 22, n. 3, p. 219-229, 2000.
- CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; AGUIAR D. C.; GUIMARÃES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria.**; v. 35, p. 101-111, 2013.
- CASTRO, M. A. di; GAROFALO, S.; FELICE, E. de.; MENEGHETTI, N.; DI PIETRO, E.; MORMINO, A.; MAZZONI, A.; CALEO, M.; MAGGI, L.; LIMATOLA, C. Environmental enrichment counteracts the effects of glioma in primary visual cortex. **Neurobiology of disease**, v. 174, p. 1-12, 2022.
- CHAMPAGNE, F. A.; FRANCIS, D. D.; MAR, A.; MEANEY, M. J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359-371, 2003.
- 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.

CREEL, S. Social dominance and stress hormones. **Trends in Ecology & Evolution**, v.16, n. 9, p. 491-497, 2001.

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.

DÍAZ, V. I. M.; SOUZA, J. A. de; SOUSA, S. L. de. 2022. Effects of early weaning associated with alimentary stress on emotional and feeding behavior of female adult Wistar rats. **Behavioral Sciences** v. 12, n. 6 p. 1-12, 2022.

DISNER, G. R. Métodos alternativos à experimentação animal: aspectos éticos, históricos e legais no Brasil. **Evidência**, v. 19, n. 2, p. 259-274, 2019.

DORFMAN.; D., ARANDA, M. L.; GONZÁLEZ, M. F. F., CHIANELLI, M. S.; FERNANDEZ, D. C.; SANDE, P.H.; ROSENSTEIN, R. E. Environmental enrichment protects the retina from early diabetic damage in adult rats. **PLOS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1-15, 2014.

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.; 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.

FESTING, S.; WILKINSON, R. The ethics of animal research. **EMBO reports**, v. 8, p. 526-530, 2007.

FLEITAS, M. F. G.; ARANDA, M. S L.; DIEGUEZ, H. H.; DEVOUASSOUX, J. D.; CHIANELLI, M. S.; DORFMAN, D.; ROSENSTEIN, R. E. Pre-ischemic enriched environment increases retinal resilience to acute ischemic damage in adult rats. **Experimental Eye Research**, v. 178, p. 198-211, 2018.

FREITAS, R. M. de. Influência do número de animais por gaiola sobre o nível de ansiedade em camundongos. **Revista Neurociência**; v. 19, n. 4, p. 581-582, 2011.

GIORDANO, F.; LOSURDO, A.; QUARANTA, V. N.; CAMPOBASSO, N.; DALENO, A.; CARPAGNANO, E.; GESUALDO, L.; MOSCHETTA, A.; BRIENZA, N. Effect of single session receptive music therapy on anxiety and vital parameters in hospitalized

Covid-19 patients: a randomized controlled trial. **Scientific Reports**, v. 12, n. 3154, p. 1-9, 2022.

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.

HORVATH, G.; REGLODI, D.; VADASZ, G.; FARKAS, J.; KISS, P. Exposure to enriched environment decreases neurobehavioral deficits induced by neonatal glutamate toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 19054-19066, 2013.

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

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.

JUNGLING, A.; REGLODI, D.; KARADI, Z. N.; HORVATH, G.; FARKAS, J.; GASZNER, B.; TAMAS, A. Effects of postnatal enriched environment in a model of Parkinson's disease in adult rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, v. 2, não p. 2017.

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: 15 jan. 2023.

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

LÄHDEPURO, A.; SAVOLAINEN, K.; LAHTI-PULKKINEN, M.; ERIKSSON, J. G.; LAHTI, J.; TUOVINEN, S.; KAJANTIE, E.; PESONEN, A. K.; HEINONEN, K.; RÄIKKÖNEN, K. The impact of early life stress on anxiety symptoms in late adulthood. **Scientific Reports**, v. 9, n. 4395, não p. 2019.

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

LEENAARS, C. H. C.; MIERDEN, S. V. D.; DURST, M.; GOERLICH-JANSSON, V. C.; RIPOLI, F. L.; KEUBLER, L. M.; TALBOT, S. R.; BOYLE, E.; HABEDANK, A.; JIRKOF, P.; LEWEJOHANN, L.; GASS, P.; TOLBA, R.; BLEICH, A. Measurement of corticosterone in mice: a protocol for a mapping review. **Laboratory Animals**, v. 54, n. 1, p. 26-32, 2020.

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.

MASATAKA, N.; PERLOVSKY, L. Music can reduce cognitive dissonance. **Nature Precedings**, não p., 2012.

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.

MELLOR, D. J.; BEAUSOLEIL, N. J.; LITTLEWOOD, K. E.; MCLEAN, A. N.; MCGREEVY, P. D.; JONES, B.; WILKINS, C. The 2020 five domains model: including human–animal interactions in assessments of animal welfare. **Animals**, v. 10, n. 10, p.1-24, 2020.

MILLER, L. J.; VICINO, G. A.; SHEFTEL, J.; LAUDERDALE, L. K. Behavioral Diversity as a Potential Indicator of Positive Animal Welfare. **Animals**, v. 10, n. 7, p. 1-17, 2020.

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.

MOTA-ROJAS, D.; ORIHUELA, A.; STRAPPINI-ASTEGGIANO, A.; CAJIAO-PACHÓN, M. N.; AGÜERA-BUENDÍA, E.; MORA-MEDINA, P.; GHEZZI, M.; SPILSBURY, M. A. Teaching animal welfare in veterinary schools in Latin America. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 131-140, 2018.

NEWBERRY, R. C. Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. **Applied Animal Behavior Science**, 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.

PATTEN, A. R.; YAU, S. Y.; FONTAINE, C. J.; MECONI, A., WORTMAN, R. C.; CHRISTIE, B. R. The benefits of exercise on structural and functional plasticity in the rodent hippocampus of different disease models. **Brain Plasticity** v. 1, n. 1, p. 97–127, 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.

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.

POLITI, F. A.S.; PIETRO, R. C. L.R.; SALGADO, H. R. N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 17-28, 2008.

SACKS, O. Alucinações musicais. São Paulo: Companhia das Letras, 2007.

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**, p. 12-14, 1956

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.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO (SBCAL). Disponível em:

<[https://www.sbc.al.org.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=41#:~:text=Dentre%20as%20suas%20compet%C3%A7%C3%A3o%20animal.](https://www.sbc.al.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=41#:~:text=Dentre%20as%20suas%20compet%C3%A7%C3%A3o%20animal.)> Acesso em: 31 mai. 2023.

SOUZA, J. A. de.; SILVA, M. C. da.; JUNIOR J. C. de S. F.; SOUZA, F. L. de.; SOUZA, S. L. de. Maternal separation in the light or dark phase of the circadian cycle has different effects on the corticosterone levels and anxiety-like behavior in male adult rats. **Physiology & Behavior**, v. 247, n. 1 p. 1-8, 2022.

STUART, S. A.; ROBINSON, E. S. J. Reducing the stress of drug administration: implications for the 3Rs. **Scientific Reports**, v. 5, n. 14288, p. 1-8, 2015.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 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 of 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.

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

WI, S.; LEE, J. W.; KIM, M.; PARK, C. H.; CHO, S. R. An enriched environment ameliorates oxidative stress and olfactory dysfunction in Parkinson's disease with  $\alpha$ -synucleinopathy. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 5, p. 831-839, 2018.

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.