

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO
ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Joana Fisch

**Efeitos do enriquecimento ambiental
no desempenho reprodutivo e na
quantidade e morfologia de
Complexos Cumulus-Oócito de
*Rattus norvegicus***

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2016

Joana Fisch

**Efeitos do enriquecimento ambiental
no desempenho reprodutivo e na
quantidade e morfologia de
Complexos Cumulus-Oócito de
*Rattus norvegicus***

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Alexandre Tavares Duarte de
Oliveira

Coorientadora: Fernanda Bastos de Mello

**Porto Alegre
2016**

Catálogo na Publicação

Fisch, Joana

Efeitos do enriquecimento ambiental no desempenho reprodutivo e na quantidade e morfologia de complexos cumulus-Oócito de *Rattus norvegicus* / Joana Fisch. -- 2016.

85 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Orientador(a): Alexandre Tavares Duarte de Oliveira ;
coorientador(a): Fernanda Bastos de Mello.

1. Enriquecimento Ambiental. 2. Complexos cumulus-oócito . 3. Ratos Wistar. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores Professor Alexandre e Professora Fernanda por todos os ensinamentos, paciência e exemplo.

Aos meus pais por todo apoio e ajuda sempre. A minha amada irmã Elisa um muito obrigado por toda ajuda nas trocas das caixas e execução do projeto, a minha amada irmã Patrícia por toda parceria e auxílio com a estatística e com o inglês. E ao meu marido por toda força e compreensão.

Ílaskara, Juliana e Lia, sem vocês eu não teria conseguido, muito obrigada por todo apoio, ajuda e disposição.

A Eliana e a Marília pela ajuda durante o projeto.

Minhas colegas da UFCSPA Camila e Cristiane muito obrigada pela ajuda, coleguismo e amizade. A equipe de estatística da UFCSPA, em especial a Cristiane, muito obrigada pela paciência.

A funcionária Ignês por toda disponibilidade e ajuda durante todo projeto, meus sinceros agradecimentos.

E por fim, agradeço a todos os animais utilizados nesse projeto que são o grande motivo do meu aprender.

RESUMO

A preocupação com o bem-estar animal tem se tornado cada vez mais clara com o passar do tempo, inclusive na experimentação científica. Muitos pesquisadores têm sinalizado que o uso do enriquecimento ambiental pode ser efetivo na redução de condições estressantes e de comportamentos anormais e provavelmente fornece um melhor desempenho reprodutivo em roedores. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho reprodutivo de ratos Wistar criados em três condições diferentes de alojamento. Os animais foram separados em um casal por gaiola e em três grupos experimentais (10 casais por grupo); grupo controle onde os casais foram mantidos sem qualquer enriquecimento ambiental; grupo PVC onde foram mantidos com um tubo de PVC e grupo rolo de papelão onde foram mantidos com um rolo de papelão produzido comercialmente. Para avaliar a performance reprodutiva foi avaliado o número de filhotes/ninhada; número de ninhadas; intervalo entre partos; ocorrência de canibalismo; ganho de peso dos filhotes; quantidade e classificação morfológica dos Complexos Cumulos-Oócito (CCOs) obtidos após a superovulação das fêmeas nascidas da primeira, segunda e última gestação em todos os grupos. Além disso, o nível plasmático de corticosterona foi mensurado nos animais que serviram como progenitores e um total de 60 ratos machos com 60 dias de idade selecionados aleatoriamente nascidos da primeira e da última ninhada (20 machos de cada grupo) foram testados primeiramente no labirinto em cruz elevado e no outro dia no teste do campo aberto. Foram encontradas diferenças significativas no número e classificação morfológica dos CCOs. O grupo controle apresentou taxas estatisticamente mais altas (225/2535— 8,9%) de CCOs grau 4 quando comparado aos grupos enriquecidos, ($p=0,001$), bem como o número de oócitos competentes foi maior nos grupos enriquecidos ($p: 0,001$). Além disso, observamos ausência de canibalismo e aumento no número de ninhadas no grupo rolo de papelão e os filhotes machos do mesmo grupo tiveram um aumento no ganho de peso estatisticamente significativo quando comparado ao grupo PVC ($p=0,008$). Nossos achados sugerem que o uso de enriquecimento ambiental proporciona melhorias no desempenho reprodutivo de ratos Wistar.

Palavras-chave: Enriquecimento ambiental; Performance reprodutiva; Ratos; Complexo Cumulus-Oócitos

ABSTRACT

The worry with animal welfare has become increasingly clear in the course of time, including in scientific experimentation. Several researchers have signaled that environmental enrichment can be effective in reducing stressful conditions and abnormal behavior, and may provide better reproductive performance in rodents. In this context, this study aim to evaluate the reproductive performance of Wistar rats reared in three different housing conditions. Animals were separated into breeding pairs, one pair per cage and pairs randomly assigned to three experimental groups (10 couples per group): control group were provided cages without any environmental enrichment; a PVC group with a PVC pipe; and cardboard roll group with a commercially available cardboard tube. To compare the reproductive performance of the three groups, the following were evaluated: the number of pups/litter; number of litter; parturition interval; occurrence of cannibalism; weight gain of offspring; quantity and morphological classification of cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained after the superovulation of the females born from the first, second and last pregnancy in all groups. Moreover, the plasma level of corticosterone in breeding animals was measure. A total of 60 male rats randomly select with 60 days old from the first-and last-born litter (20 male from each group) were first tested in the elevated plus-maze (EPM) and on the following day, were tested in the open filed test (OFT). Significant differences were found in the number and morphological classification of COCs. In the control group, the number of oocytes in grade 4 presented statistically higher rates (225/2535, 8.9%) compared to the other groups as well as, the number of competent oocytes was higher in the enriched groups ($p=0.001$). Moreover, we find that the males of cardboard roll group differed significantly in weight gain compared to PVC group ($p=0.008$). In addition to this, we did not detect occurrence of cannibalism in this group. Our findings suggest that environmental enrichment provides improvements in reproductive performance of Wistar rats.

Key-words: Environmental enrichment; Reproductive performance; Rats; Cumulus-oocyte complexes

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	10
1 Revisão Bibliográfica.....	11
1.1 Bem-Estar em roedores.....	11
1.1.1 Definição e Fatores Interferentes.....	11
1.1.2 Indicadores de Bem-Estar: comportamentais, fisiológicos bioquímicos.....	13
1.2 Reprodução em Ratos.....	16
1.2.1 Comportamento Sexual.....	16
1.2.2 Ciclo Estral	18
1.2.3 Desenvolvimento Folicular	19
1.2.4 Superovulação.....	21
1.3 Relação entre Bem-Estar e Reprodução.....	22
1.3.1 Efeitos de Estresse sobre a Função Reprodutiva.....	22
1.3.2 Efeitos do Estresse Materno sobre a Prole.....	23
1.4 Enriquecimento Ambiental.....	25
1.4.1 Definição e História.....	25
1.4.2 Tipos e Protocolos de Enriquecimento Ambiental.....	27
1.4.3 Efeitos do EA Sobre a Reprodução de Roedores.....	29
1.4.4 Efeitos do EA Sobre a Prole.....	31
1.4.5 Métodos de Avaliação dos Programas de Enriquecimento.....	32
1.4.5.1 Testes Comportamentais.....	32
1.4.5.2 Testes Bioquímicos.....	34
1.4.5.2.1 Dosagem de Corticosterona.....	34
Referências Bibliográficas.....	37
2 Objetivos.....	47
2.1 Gerais.....	47
2.2 Específicos.....	48
3 Situação do Manuscrito.....	48
4 Artigo Científico.....	49
Abstract.....	50
1 Introduction.....	51
2 Materials and Methods.....	52
2.1 Animals.....	52

2.2 Parent Evaluation	54
2.2.1 Reproductive Performance.....	54
2.2.2 Blood Sample and Corticosterone Assay.....	55
2.3 Offspring Evaluation.....	55
2.3.1 Weight Gain of Offspring.....	56
2.3.2 Cumulus-Oocyte Complexes Collection and Evaluation.....	56
2.3.3 Behavioral Testing.....	57
2.3.3.1 Elevate Plus Maze.....	57
2.3.3.2 Open Field.....	57
2.4 Statistical analysis.....	57
3 Results.....	58
3.1 Parent evaluation.....	58
3.1.1 Reproductive performance.....	58
3.1.2 Number of pups born per litter.....	59
3.1.3 Parturition interval.....	59
3.1.4 Corticosterone assay.....	60
3.2 Offspring evaluation.....	60
3.2.1 Body weight gain.....	60
3.2.2 Quantity and morphological classification of cumulus-oocyte complexes (COCs).....	61
3.2.2 Behavior Testing.....	62
4 Discussion.....	62
5 Conclusion.....	66
Conflict of interest.....	66
References.....	66
5. Conclusão.....	70
Certificado de Edição Cambridge Proofreading.....	71
Regras para Submissão da Revista Applied Animal Behaviour Science.....	72
Aprovação do Comitê de ética no Uso de Animais.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

CORT: Corticosterona

CRH: Hormônio liberador de corticotrofina

EA: Enriquecimento ambiental

eCG: Gonadotrofina Coriônica Equina

FSH: Hormônio folículo estimulante

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG: Gonadotrofina Coriônica Humana

hGMG: Gonadotrofina da Menopausa Humana

HPA: Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

kHz: Kilohertz

IL1 α : Interleucina 1 α

IL6: Interleucina 6

LH: Hormônio luteinizante

PMSG: Gonadotrofina Sérica da Égua Gestante

PRL: Prolactina

PVC: Policloreto de polivinila

μ m: Micrômetro

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Bem-Estar em Ratos

1.1.1 Definição e Fatores Interferentes

O interesse pela pesquisa científica na área de bem-estar animal apresentou um acentuado crescimento nos últimos anos, onde cientistas e instituições se dedicam à melhoria da qualidade de vida dos animais, particularmente daqueles mantidos em cativeiro. A preocupação em torno dos efeitos entre a interação do meio ambiente com os animais, há décadas, prende a atenção de pesquisadores do mundo inteiro. Entretanto, a questão de como definir e quantificar o bem-estar ainda está em constante debate (PIZZUTO; SGAI; GUIMARÃES, 2009).

Segundo alguns autores, o bem-estar animal refere-se, basicamente, à qualidade de vida dos animais e como estes a percebem (BAPTISTA; DA SILVA; OLIVEIRA, 2009). Para Silva et al. (2010) a avaliação do bem-estar animal pode envolver aspectos ligados às instalações, ao manejo, ao ambiente e, principalmente, à resposta do animal no dia-a-dia, ou seja, a resposta comportamental frente aos regimes de criação.

Por outro lado, para outros autores, como Hughes (1982) o bem-estar corresponde a um estado onde o animal está em harmonia com a natureza ou com o seu ambiente. A este conceito, Hurnik (1992) adicionou a ideia de que o bem-estar significa uma alta qualidade de vida do animal, defendendo que um ótimo funcionamento biológico do organismo ocorre somente quando a sua vida está identificada ou alinhada com o ambiente, reiterando que este cenário se denomina estado de harmonia. Também considera que somente nestas condições, com o melhor funcionamento biológico, é que o animal alcança sua máxima qualidade de vida.

Anteriormente, Broom (1986) apresentou uma definição que foi muito bem aceita e difundida, defendendo que o bem-estar de um indivíduo é o seu estado em relação às suas tentativas de lidar com o ambiente em que se encontra. O autor destacou que quando os desafios são vencidos com pouco esforço e gasto de recursos, o bem-estar do animal é satisfatório. Por outro lado, quando há falha no enfrentamento destes desafios, o bem-estar pode ser considerado pobre.

Já o estresse, que é um fator interferente do bem-estar, pode ser definido como um estímulo ambiental com potencial para sobrecarregar ou desafiar os

sistemas de controle ou de homeostasia do animal, reduzindo sua adaptação, ou seja, houve a falência das tentativas de enfrentar as dificuldades (MANTECA et al., 2013).

Diariamente estamos submetidos a situações de estresse que podem desencadear alterações em nosso organismo. A exposição ao estresse é capaz de alterar a homeostasia fisiológica e psicológica de um indivíduo induzida pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Os glicocorticoides são efetores finais do eixo HPA e participam do controle da homeostase corporal e da resposta do organismo ao estresse, exercendo ações adaptativas e essenciais para a sobrevivência imediata quando em resposta a estímulos agudos (CHROUSOS; GOLD, 1992; TSIGOS; CHROUSOS, 2002).

Em animais de experimentação, o estresse é, primariamente, de natureza emocional ou psicológica. Muitas situações, que parecem comuns para o homem, são estressantes para animais de experimentação como, por exemplo, a exposição à luz muito clara ou a espaços muito amplos. Várias condições podem causar estresse psicológico, entre elas, cabe salientar: novidade, estímulos indutores de medo, fatores sociais, incapacidade de realizar padrões normais de comportamento, causas de dor, desconforto e doença, manejos que levem à frustração ou ao conflito, procedimentos que causem doenças ou indisposição (RIVERA, 2002).

O estresse é inevitável. O conceito popular diz que o estresse é inerente e ruim e que deve ser evitado a todo custo. Entretanto, este é parte da vida, e os sistemas biológicos sofisticados sofreram evolução para ajudar a conviver com ele, o segredo para proteger o bem-estar animal está em minimizar os custos biológicos de um estresse indesejável (MORBEG, 1987).

Manteca et al. (2013) consideraram que para promover o bem-estar os animais devem estar em um ambiente que permita que expressem ao máximo o comportamento natural da espécie. Cientistas que aplicam este conceito, frequentemente, estudam o comportamento dos animais na natureza e o comparam com o comportamento dos animais em cativeiro, supondo que as diferenças observadas são decorrentes do ambiente.

A visão de que os animais deveriam manifestar todo o seu repertório de comportamentos foi compartilhada nas primeiras pesquisas de bem-estar animal. Posteriormente, foi aceito que parte deste repertório incluía certas

atividades que decorriam ou envolviam a adaptação dos animais às circunstâncias adversas encontradas. Os animais na natureza sofrem de situações ameaçadoras com severos e frequentes problemas com risco de morte, e seu comportamento natural reflete seu esforço para sobreviver. Assim seria incorreto considerar que o comportamento selvagem (natural) é sempre indicativo de bem-estar. Muitas vezes este comportamento pode representar a luta pela sua sobrevivência (POOLE, 1996).

No entanto, algumas necessidades de comportamento são imprescindíveis para a manutenção do bem-estar, pois quando não são atendidas podem causar padecimento mental. As necessidades de comportamento que englobam a maioria das espécies animais são: necessidade de exploração e busca de alimento; necessidade de locomoção; necessidade de construção do ninho antes do parto; necessidade de contato social (BERGERON; MEUNIER-SALAUN; ROBERT, 2008).

Considerando um enfoque multidimensional, o bem-estar animal pode ser caracterizado de diferentes maneiras, mas existe um consenso que em qualquer definição deve ser considerado três aspectos: o estágio emocional do animal, o funcionamento biológico e a habilidade do animal mostrar o padrão normal de comportamento (MANTECA et al., 2013).

Portanto, tornar os ambientes social e físico de animais em cativeiro mais complexo ou mais próximo do natural é um meio amplamente reconhecido para aumentar o bem-estar. Com relação a animais de laboratório, é importante que o ambiente de alojamento desses animais seja estudado e adequado da melhor maneira possível, não apenas para aumentar o conforto dos animais, mas também, para assegurar que resultados científicos confiáveis e de boa qualidade sejam obtidos (SHERWIN, 2004).

1.1.2. Indicadores de Bem-Estar: comportamentais, fisiológicos e bioquímicos

Para definir a condição de bem-estar animal deve-se adotar uma visão multidisciplinar que aborde, criteriosamente, o animal e o ambiente onde ele está inserido, independentemente de considerações morais, a medida do bem-estar e a interpretação devem ser objetivas. Em decorrência dessa demanda de

objetividade, o desenvolvimento de critérios é tão complexo quanto for o ambiente onde o animal estiver inserido (SILVA et al., 2010).

Fraser (2008) cita que a avaliação de bem-estar também pode ser feita sob três aspectos: indicadores de bem-estar que servem para avaliar os animais em si, estes incluem a presença de lesões, a incidência da doença, escore de condição corporal, bem como, o desempenho de certos comportamentos; critérios baseados nos recursos, que servem para avaliar o alojamento, alimentação e outros recursos que são destinados aos animais e por fim, critérios relativos à gestão que focam no cuidado humano como um fator importante no bem-estar animal, inclui a competência do pessoal no manejo, práticas de alimentação, estratégias de higiene, manutenção de registros entre outras tarefas.

Beynen et al. (1987) citaram que a avaliação dos sinais clínicos é um método não-invasivo de medir o estresse nos animais de laboratório, mas necessita de pessoa capacitada para fazê-lo, geralmente um médico veterinário. Os autores mediram os seguintes sinais em vários trabalhos sobre estresse: atividade exploratória, postura corporal, aparência do pelo, aparência dos olhos, secreção de olhos e nariz, higiene do orifício anal, aparência das orelhas e patas. Alterações observadas nos sinais clínicos citados são indicativas de comprometimento no bem-estar.

Além da análise dos sinais clínicos para medir o estresse pode-se avaliar alterações de comportamento, porém é necessário conhecer bem o etograma. Um etograma é como uma “impressão digital” comportamental que compila uma lista de ações e comportamentos classificados em categorias com significância funcional (DIXON; FISCH, 1998).

Uma vez que o comportamento normal é definido, comportamentos anormais podem ser identificados e a sua relevância considerada. Um comportamento normal ou natural pode ser definido como qualquer comportamento aprendido com função de promoção de saúde, sobrevivência e reprodução de um animal em certo ambiente (KELLING; JENSEN, 2002).

Por exemplo, ratos e camundongos vocalizam ao serem manuseados, e podem se tornar mais agressivos quando estiverem sentindo alguma dor. É um método não-invasivo de avaliar o estresse. Exige um mínimo de manuseio e de

familiarização com a pessoa que vai tomar conta dos animais. Às vezes, é conveniente que mais de uma pessoa avalie as alterações (RIVERA, 2002).

A mesma autora supracitada afirmou que uma câmara de vídeo colocada acima da gaiola pode ser muito útil na avaliação do comportamento. Com isso alguns parâmetros comportamentais podem ser medidos como, por exemplo: higiene do animal, apetite (consumo de água e alimento), atividade, agressividade, expressão facial, vocalização, aparência, postura e resposta ao manejo.

Além das alterações comportamentais pode-se avaliar os sinais fisiológicos dos animais, tais como: a temperatura corporal (afetada pelo estresse, pode ser medida por radiotelemetria), a respiração, a perda de peso (bom indicador de estresse crônico), a estrutura de células sanguíneas, o ritmo cardíaco/pressão arterial, o fluxo sanguíneo entre outros (RIVERA, 2002).

Ainda podemos citar alguns parâmetros bioquímicos utilizados para medir estresse, são eles: corticosteroides, glicocorticoides, catecolaminas (adrenalina, noradrenalina), prolactina, glucagon, glicose, insulina, atividade da renina plasmática (indicador sensível do estresse repetitivo) (RIVERA, 2002).

Segundo a autora supracitada, há parâmetros que podem ser medidos no *post mortem*, durante a necropsia do animal. Alguns achados decorrentes do estresse são: ulceração gástrica, lesões cardiovasculares, lesões renais, amiloidose, hipertrofia e hemorragia das adrenais, alterações músculo-esqueléticas, aceleração das alterações da retina por causa da idade, alterações de peso de alguns órgãos.

A avaliação do bem-estar animal é muitas vezes complicada pelas diversas maneiras em que os animais são mantidos. Uma boa condição de bem-estar animal é resultado da interação complexa entre genética, nutrição, meio ambiente, saúde, capacidade de gestão e outros fatores. Portanto, os esforços para monitorar e melhorar o bem-estar animal precisam de uma abordagem orientada por um sistema que utilize uma vasta gama de informações e que captem as complexas interações existentes (SUNDRUM, 2006; FRASER, 2008).

1.2 Reprodução em Ratos

1.2.1 Comportamento Sexual

O comportamento sexual nos animais, incluindo a corte, é caracterizado por uma enorme diversidade de eventos, que visam garantir que o acasalamento ocorra com um parceiro ideal, no tempo e lugar apropriados. Este comportamento é uma expressão da fisiologia reprodutiva que se desenvolve a partir de complexas interações neuroendócrinas (AGMO, 1997; HULL; MEISEL; SACHS, 2002; HULL; WOOD; MCKENNA, 2006).

Ratos machos, geralmente, começam um encontro sexual investigando a face e a região anogenital da fêmea. Ambos os parceiros podem emitir, mutuamente, cerca de 50 kHz de vocalizações ultra-sônicas (HULL; DOMINGUES, 2007). Já o comportamento sexual da fêmea ocorre na noite da fase pró-estro (chamado de “estro comportamental” por alguns autores) e pode ser dividido em três componentes: atrativo, proceptivo (investigação de genitália do macho, pequenas corridas e saltos, vocalizações, contatos físicos) e receptivos (o reflexo de lordose) (PFAFF et al., 1994; PFAFF et al., 2006).

No início do comportamento copulatório em mamíferos, a fêmea receptiva, normalmente, permanece imobilizada enquanto o macho se aproxima de sua região posterior, abraça seus flancos com suas patas dianteiras, e inicia uma série de movimentos superficiais da pélvis (*thrusting*) caracterizando a chamada monta. O pênis está parcialmente ereto durante esses movimentos (HULL; WOOD; MCKENNA, 2006). A fêmea assume uma rígida postura de lordose, com suas costas planas ou côncavas e sua cauda desviada para um lado, expondo sua vagina. Esta postura é a indicação mais proeminente de que a rata está sexualmente receptiva e facilita a inserção peniana pela qual o macho realiza a estimulação vaginocervical durante a cópula (PFAFF et al., 1994; PFAFF et al., 2006).

Essa estimulação induz aumento de concentração plasmática de hormônios como a prostaglandina e a progesterona na fêmea, que são necessários para o sucesso reprodutivo, isto é, a implantação do blastocisto (CAMERON; HA; ERSKINE, 2003). Em alguns casos, mesmo a fêmea receptiva pode rejeitar o macho, principalmente se suas abordagens não são adequadas. Sua postura de rejeição pode incluir a fuga, caracterizada pela manutenção de sua cauda e parte posterior abaixados, chutando a face do macho com as patas

traseiras ou virando-se para ameaçar ou atacar o macho (HULL; WOOD; MCKENNA, 2006).

A intromissão é o evento que define a cópula. Montado sobre a fêmea, o macho irá realizar movimentos profundos de penetração vaginal, seguidos da desmonta rápida, quando normalmente realiza a limpeza de sua genitália. O número de intromissões que precedem a ejaculação é um importante fator de promoção da fertilidade, uma vez que o aumento do número de intromissões que precede a ejaculação pode aumentar a quantidade de espermatozoides e facilitar o seu transporte para a fêmea (ADLER; TONER, 1986; HULL; WOOD; MCKENNA, 2006). Nos ratos, como na maioria das espécies, os machos somente ejaculam após a estimulação de várias intromissões. A ejaculação é caracterizada por uma penetração profunda, longa, seguida de uma desmonta lenta e relaxada. Contrações espasmódicas da musculatura esquelética pélvica acompanham a ejaculação (HULL, WOOD; MCKENNA, 2006).

Após a ejaculação, os machos costumam realizar novamente a limpeza genital e entrar em um período de latência. Este intervalo pós-ejaculatório pode ser curto, como 30 segundos em algumas espécies, enquanto em outros podem durar horas ou dias. Nos ratos, este intervalo pode variar de 5 a 10 minutos. Os primeiros 50% a 75% deste intervalo são considerados o período refratário absoluto, quando o macho não irá copular de novo, mesmo se estimulado (HULL; WOOD; MCKENNA, 2006).

Na natureza os limites da estação da procriação dos roedores são controlados pelos fatores externos, tais como a quantidade de luz em 24 horas, a disponibilidade de alimento e a densidade populacional. Quando os animais são mantidos nas condições de laboratório, a estação de procriação estende-se durante o ano todo e a fêmea, normalmente, permite o acasalamento quando está no estro (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2010). O acasalamento, geralmente, ocorre durante a fase de ausência de luminosidade, sendo os machos bastante territoriais e capazes de sentir o odor de fêmeas no estro (BAKER; LINDSEY; WEISBROTH, 1979).

Os sistemas de acasalamento observados em biotérios são distintos: alguns utilizam acasalamentos monogâmicos intensivos durante o ano, isto é, uma fêmea permanece com o mesmo macho na produção por aproximadamente sete partos. Outros utilizam acasalamentos poligâmicos (2 fêmeas e 1 macho) e

intensivos. Há alguns, que adotam o sistema poligâmico e rotativo, permitindo o descanso das fêmeas durante o período de lactação (MATTARRAIA, 2007).

1.2.2 Ciclo Estral

A secreção cíclica das gonadotrofinas hipofisárias e dos hormônios esteroides ovarianos caracteriza os ciclos reprodutivos dos mamíferos que tem por evento marcante a ovulação, processo no qual o oócito é liberado pelo ovário e, se fecundado, dará origem a um zigoto, que prosseguirá o desenvolvimento embrionário no oviduto e no útero. Em alguns animais a ovulação é sazonal, ocorrendo uma vez por ano (animais monoéstricos), já os animais poliéstricos são aqueles que apresentam vários ciclos reprodutivos anualmente (MARCONDES et al., 2001).

A rata é poliéstrica, apresenta ovulação espontânea; isto significa que um padrão secretor de estrogênio associado com o desenvolvimento de folículo (s) dominante (s), que são aquele (s) com capacidade ovulatória, é quase sempre capaz de iniciar a liberação de uma onda de LH que resulta na ovulação (DUKES, 1996). O útero é formado por dois cornos e a glândula mamária possui seis pares de tetas que são visíveis a partir da segunda semana de vida. A abertura do canal da vagina ocorre por volta de 30 a 45 dias de idade e o ciclo estral regular tem início aproximadamente uma semana após a abertura do canal da vagina. O ciclo estral dura de quatro a cinco dias e possui quatro fases (metaestro, diestro, pró-estro e estro), as quais podem ser observadas através da análise citológica da secreção vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

A caracterização de cada fase do ciclo estral em ratas é baseada na proporção entre três tipos de células observadas na secreção vaginal: as células epiteliais, as células cornificadas e os leucócitos. A fase de metaestro apresenta concentrações baixas do nível sérico de estradiol e ao esfregaço vaginal observa-se leucócitos em número mais alto, poucas células fusiformes cornificadas e algumas células epiteliais. No diestro, observa-se esfregaço praticamente constituído apenas por leucócitos. No pró-estro com o aumento dos níveis séricos de estradiol, há atividade proliferativa do epitélio vaginal, com o predomínio de células arredondadas, polinucleadas que podem estar dispersas ou agrupadas. É nesta fase do ciclo que os níveis de estradiol estão

mais altos e na qual ocorre o pico de LH. No estro há a queda dos níveis de estradiol coincidentemente com a ovulação e formação do corpo lúteo, há diminuição da proliferação do epitélio vaginal, apresentando esfregaço vaginal constituído predominantemente de células cornificadas, dando o aspecto de “folhas secas” (MATTARAIA, 2007).

Do início da maturidade sexual até a idade de 12 meses, a duração média do ciclo estral na rata está por volta de 4 dias (MANDL; ZUCKERMAN, 1951; LONG; EVANS, 1996). Isto faz do rato um animal ideal para investigação das mudanças que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (SPORNITZ; SOCIN; DAVID, 1999; MARCONDES et al., 2001).

As fêmeas que foram cobertas apresentam o tampão copulatório da vagina que se forma 3 a 8 horas após a cópula e permanece no local por até 24 horas. Este tampão é formado a partir da secreção das glândulas vesiculares do macho e encontra-se no trato reprodutivo da fêmea, da vulva até a cérvix e tem papel fundamental no transporte do espermatozoide transcervical e na potencialização da fertilidade, pois impede a saída dos espermatozoides da genitália feminina após o coito (MATTARAIA, 2007).

A duração da gestação da rata é em média de 21 dias e nascem cerca de 6 a 12 filhotes. As ratas podem apresentar cio pós-parto, o qual ocorre dentro de 48 horas após o parto, geralmente fértil, podendo a fêmea gerar uma ninhada enquanto aleita outra (MATTARAIA, 2007).

1.2.3 Desenvolvimento Folicular

O folículo ovarino é a unidade funcional do ovário na qual o componente somático (células tecais e granulosas) e germinativo (oócitos) são intimamente associados e interdependentes. O ovário é responsável pelo desenvolvimento dos folículos e pela ovulação, bem como pela produção de hormônios sexuais que agem no trato reprodutivo. Na hipófise estão localizadas as células secretoras de gonadotrofinas, responsáveis pela produção e liberação dos dois hormônios que regulam a atividade reprodutiva ovariana, o hormônio folículo estimulante e o hormônio luteinizante. A síntese e liberação destes hormônios é controlada pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) produzido no núcleo arqueado do hipotálamo (MANSER; MORRIS; BROOM, 1995). A

secreção de GnRH é realizada em pulsos, o que determina também a pulsatilidade na secreção dos hormônios hipofisários (CAMPOS et al., 2012).

Os folículos ovarianos podem ser classificados de acordo com o grau de evolução, em pré-antrais - FOPA (primordiais, primários e secundários) ou antrais (terciários e pré-ovulatórios) (FIGUEIREDO et al., 2008).

Ao longo do desenvolvimento folicular, os oócitos passam por diversas modificações morfológicas e bioquímicas. Tais eventos, que se iniciam com a formação do folículo primordial e continuam até o momento da ovulação, tornam o oócito competente. A aquisição da competência ocorre de maneira gradual e sincronizada com os eventos foliculares visto que, o desenvolvimento do folículo e o do oócito são eventos paralelos e relacionados funcionalmente (CHAVES et al., 2010).

Segundo os mesmos autores supracitados, durante o estágio de folículo pré-antral, os oócitos aumentam o volume, passando de aproximadamente 20 μm de diâmetro no folículo primordial para 120 μm no folículo pré-ovulatório o que está correlacionado com o incremento do conteúdo proteico e o acúmulo de substâncias essenciais para a maturação, a fecundação e o desenvolvimento embrionário pré-implantação.

O crescimento folicular ocorre continuamente durante a vida, ou pelo menos até ocorrer a exaustão da reserva de folículos primordiais. Quando um determinado folículo primordial é recrutado, ele irá se desenvolver até a ovulação ou entrar em atresia (morte das células foliculares e oócito), sendo este processo responsável pela eliminação de aproximadamente 99,9% dos folículos presentes no ovário (MAYER et al., 2004).

Durante a formação do antro folicular, as células da granulosa se diferenciam em células da granulosa murais e células do *cumulus oophorus*. As células da granulosa murais formam a parede folicular, enquanto as células do *cumulus* envolvem o oócito. As células em contato direto com o oócito desenvolvem projeções citoplasmáticas que cruzam a zona pelúcida e formam junções do tipo *gap* com o oolema. Essa estrutura organizada composta pelo oócito e pelas células do cumulus é chamada de complexo cumulus-oócito (CCO) (RIENZI et al., 2012).

No folículo pré-ovulatório, a diferenciação terminal do *cumulus oophorus* desempenha um papel crucial na maturação do oócito e na aquisição do potencial para o desenvolvimento após a fecundação (MAYER et al., 2004).

Portanto, desde a constituição da unidade folicular no ovário, iniciada na formação do folículo primordial, os processos de crescimento, desenvolvimento e aquisição de competência do oócito são dependentes de sua interação com as células da granulosa (MAYER et al., 2004).

1.2.4 Superovulação

A superovulação nada mais é do que o aumento do número fisiológico de ovulações próprias da espécie, provocada mediante a administração exógena de gonadotrofinas (CABODEVILA; TORQUATI, 2001).

O tratamento superovulatório envolve o uso de hormônios que promovem o desenvolvimento folicular e a liberação de oócitos em maior quantidade. Para isso, são usados hormônios como o FSH, a hGMC (Gonadotrofina da Menopausa Humana) e a eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina), originalmente chamada PMSG (Gonadotrofina Sérica da Égua Gestante), atuando na indução do desenvolvimento folicular e, o LH e o hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) promovendo a indução da ovulação e ruptura do folículo (MARTÍN-COELLO et al., 2008; BARROS et al., 2015). Portanto, FSH e eCG possuem atividades biológicas semelhantes, ambos estimulando o crescimento e a maturação do folículo ovariano (HAFEZ; GOFF; HAFEZ, 2004).

Em roedores, o modelo clássico de hiperestimulação ovariana envolve uma injeção de eCG para mimetizar a atividade do hormônio folículo estimulante no que se refere ao desenvolvimento de múltiplos folículos, seguido de uma dose de hCG, para produzir os efeitos do LH em relação à maturação folicular e ovulação (ROSSI et al., 2011).

O FSH tem meia-vida biológica mais curta que o eCG. Assim, múltiplas injeções de FSH são necessárias para estimular a mesma quantidade de crescimento folicular que iria resultar de uma única dose de eCG (HAFEZ; GOFF; HAFEZ, 2004).

Ao administrar eCG, a incidência de folículos atrésicos reduz, provavelmente, isso acontece porque esse hormônio pode impedir que folículos normais se tornem atrésicos ou faz com que os folículos que chegaram ao estado

de atresia voltem ao seu estado normal. Também, altas taxas de oócitos já foram obtidas em camundongos, sendo o eCG indicado para tratamentos de superovulação em várias espécies de roedores (BARROS et al., 2015).

1.3 Relação entre Bem-Estar e Reprodução

1.3.1 Efeitos de Estresse sobre a Função Reprodutiva

A reprodução é um dos processos biológicos mais susceptíveis aos efeitos do comprometimento do bem-estar, no entanto há uma enorme dificuldade de identificar o quanto ela é comprometida, pois esse efeito é sutil, e de forma geral leva a problemas de subfertilidade e somente em situações muito graves a infertilidade (SORENSEN; FRASER, 2010).

Sabe-se que os glicocorticóides são capazes de promover a sobrevivência do indivíduo sob condições estressantes através da modulação de funções essenciais como o metabolismo, imunidade e função cardiovascular. Simultaneamente, esses hormônios suprimem as funções ditas não essenciais, como o comportamento sexual e parental, assim como a fisiologia reprodutiva (WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é um dos principais mediadores da resposta endócrina não somente para o estresse, mas também para os outros tipos de excitação emocional que podem requerer atividade, como por exemplo, atividade sexual iminente e chegada do alimento. Quando o sistema nervoso central percebe algum fator causador de excitação, neurotransmissores no sistema límbico estimulam o hipotálamo a produzir hormônio liberador de corticotrofina (CRH) que, por sua vez, estimula as células corticotróficas localizadas na glândula pituitária a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este hormônio na circulação estimula o córtex adrenal a secretar glicocorticóides cuja função é preparar o corpo para uma atividade física (MANSER; MORRIS; BROOM, 1995).

O hormônio glicocorticoide predominante em primatas, cães, gatos e hamster Syrio é o cortisol, enquanto que outros roedores de laboratório produzem principalmente corticosterona. Em roedores, quando o eixo HPA é ativado por estresse, um aumento significativo nos níveis plasmáticos de glicocorticóides é observado aproximadamente 5 a 10 minutos após o início do estresse e níveis máximos são observados até 20 minutos após. Alguns

exemplos de fatores estressantes que comprovadamente aumentam os níveis dos glicocorticoides são: novo ambiente, contenção, choque elétrico, separação materno-infantil e conflitos agressivos (luta pela dominância) (MANSER; MORRIS; BROOM, 1995).

Os hormônios relacionados ao estresse podem afetar a função sexual nos três níveis do eixo-hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG): no hipotálamo, ao inibir a secreção de GnRH; na hipófise, com a consequente interferência na liberação de LH e FSH, que é dependente do GnRH; privando o folículo ovariano de um suporte adequado de LH, essa condição resulta em um crescimento folicular lento e redução da produção de estradiol (PIZZUTO; SGAI; GUIMARAES, 2009) e por fim, nas gônadas ao alterar o efeito estimulatório das gonadotrofinas sobre a liberação de esteróides sexuais (RIVIER; RIVEST, 1991; TILBROOK, TURNER; CLARKE, 2000), levando a uma redução da libido, da atividade sexual ou a uma supressão reprodutiva com consequente comprometimento reprodutivo (CARLSTEAD; SHEPHERDSON, 1994).

Outro efeito dos corticosteroides sobre os níveis de estrogênio e progesterona, é que estes hormônios regulam a expressão e secreção de citocinas inflamatórias IL1 α e IL6 que, por sua vez, possuem influência direta no blastocisto e na implantação do embrião (BASAK et al., 2002; GOLUB et al., 2004).

Portanto, a exposição crônica a fatores estressantes aumenta a atividade do eixo HHA e, concomitantemente, reduz a atividade do eixo (HHG) (YOUNG & KORSZUN, 2002; RETANA-MARQUEZ et al. 2003). Não há dúvidas, que estresses sociais e ambientais produzem efeitos prejudiciais na função reprodutiva (WINGFIELD & SAPOLSKY, 2003). No entanto, diferentes fatores estressantes produzem diferentes efeitos reprodutivos, havendo diferença nas respostas a curto e longo prazo. Estresse de curta duração, muitas vezes, não acarreta alterações reprodutivas e há fatores considerados estressantes que são estimulantes (TILBROOK, TURNER; CLARKE, 2000; MOTZER & HERTIG, 2004).

Em muitas espécies o estresse agudo facilita ou é até mesmo necessário para função reprodutiva. Nessas situações, existe a ativação do sistema simpático adreno-medular e a consequente liberação de norepinefrina e

epinefrina, que podem estar diretamente envolvidas na ativação sexual (PIZZUTO; SGAI; GUIMARAES, 2009).

Tal contradição do efeito do estresse na reprodução sinaliza que os animais possam precisar de experiências de alguns estímulos ambientais para otimizar a vigilância individual e suas respostas frente a mudanças de ambientes (DANTZER et al., 1983).

Logo, modificações no ambiente, ou enriquecimentos ambientais que combinem o conhecimento do habitat natural, da fisiologia e do comportamento típico, visam sempre aumentar a prevalência de comportamentos naturais, reduzir os níveis de estresse e aumentar as atividades físicas, além de melhorar as condições de saúde e desempenho reprodutivo (CARLSTEAD, 1996). Já o estresse crônico e acentuado é sabido que prejudica o desempenho reprodutivo, como visto anteriormente.

1.3.2 Efeitos do Estresse Materno sobre a Prole

Efeitos do estresse sobre a função gonadal em animais adultos são reversíveis; quando as condições estressantes são removidas, a função reprodutiva normal será retomada. O mesmo não é necessariamente verdade quando a tensão é aplicada durante os primeiros estágios do desenvolvimento fetal. Assim, quando ratas grávidas estão expostas a graves tensões em estágios críticos, anomalias sexuais e reprodutivas podem aparecer na sua prole quando eles atingem a idade adulta, uma condição que tem sido referida como a "síndrome do estresse pré-natal" (WARD, 1983). Esta síndrome é caracterizada por anormalidades no comportamento sexual, especialmente na prole masculina, anormalidades que têm sido atribuídas como "feminização" e "desmasculinização" das regiões do cérebro que controlam o comportamento sexual (AMSTRONG, 1986).

Já para as fêmeas, os autores supracitados encontraram taxas de concepção e de prenhez mais baixas, maior índice de abortos espontâneos, gestações mais longas e menos viáveis quando comparadas a animais não estressados. Embora os mecanismos da síndrome de estresse pré-natal não tenham sido estabelecidos com certeza, tem sido sugerido que o estresse pré-natal pode criar equilíbrio anormal de hormônios adrenais durante a fase crítica

da diferenciação do hipotálamo fetal, conduzindo assim, uma variedade de disfunções reprodutivas observadas quando adulto.

1.4 Enriquecimento Ambiental

1.4.1 Definição e História

Sistemas de alojamento para os animais em cativeiro tem sido muitas vezes concebido com base em considerações de ordem econômica e ergonômica, tais como equipamentos, custos, espaço, carga de trabalho, a capacidade de observar os animais e manter certo grau de higiene, com pouca ou nenhuma consideração pelo bem-estar dos animais (BAUMANS; VAN LOO, 2013).

Segundo os mesmos autores, a padronização da gaiola dos animais de laboratório foi considerada essencial para reduzir a variação, resultando numa gaiola em forma de caixa de sapatos e material de cama padrão para roedores. No entanto, ao longo da última década, houve reconhecimento da importância de fornecer um ambiente que atenda às necessidades específicas das espécies, incluindo a complexidade ambiental e habitação social, a fim de melhorar seu bem-estar.

O enriquecimento ambiental (EA) é definido como modificações do ambiente que resultam em uma melhoria do funcionamento biológico de animais em cativeiro (NEWBERRY, 1995).

Outra definição foi adotada por Chamove (1989) e Van de Weerd e Baumans (1995) definindo enriquecimento ambiental como uma alteração no ambiente dos animais de cativeiro com o objetivo de fornecer oportunidades para estes animais expressarem o máximo possível seus comportamentos naturais.

Na década de 1920, o primatologista Robert Yerkes buscava pioneiramente melhorias das condições de habitação de primatas não humanos em zoológicos e laboratórios. O aumento da pressão pública na década de 1960 levou à emissão de diretrizes e legislação para melhorar o bem-estar de todos os animais mantidos em cativeiro, não abrangendo apenas zoológicos, mas também fazendas e laboratórios de pesquisas. A importância de enriquecimento para roedores de laboratório foi pela primeira vez formalmente reconhecida por Donald Hebb em 1940 que descobriu que ratos de laboratório soltos para vagar em sua casa como animais de estimação tinham condições de resolução de problemas e habilidades superiores de aprendizagem do que

os ratos alojados em condições padrão de laboratório (HUTCHUNSON; AVERY; VANDEWOUDE, 2005; SIMPSON; KELLY; 2011).

As primeiras investigações a respeito do impacto do enriquecimento ambiental concluíram que roedores vivendo em um ambiente complexo tiveram cérebros mais pesados do que os animais da mesma espécie criados em um ambiente não enriquecido (DIAMOND et al., 1966).

A ideia básica do enriquecimento ambiental é aumentar a qualidade de vida dos animais confinados (YOUNG; ABELSON; LIGHTMAN, 2004). Segundo Reinhardt e Reinhardt (2006), o enriquecimento ambiental pode também alterar uma série de parâmetros, como por exemplo, excitabilidade dos animais diminuída diante dos procedimentos de manipulação no laboratório, melhora nas condições gerais de saúde, diminuição dos níveis de agressão intra-espécie, diminuição dos níveis circulantes de hormônios supra-renais associados ao estresse e diminuição da frequência de comportamentos estereotipados. Da mesma forma, o enriquecimento ambiental é proposto como uma forma de melhorar as condições da gaiola, focalizando alguns aspectos sociais, nutricionais, sensoriais, psicológicos e físicos.

Além disso, segundo Würbel (2001) e Peña et al. (2006) o EA permite alterar a função e a estrutura neural melhorando a aprendizagem e as habilidades da memória, aumentando o peso do cérebro, a espessura cortical, a densidade de contatos sinápticos, o tamanho dos núcleos neuronais e o número de ramos dendríticos. Os mesmos autores mostraram também, que o EA melhora o processamento do córtex auditivo, acelera o desenvolvimento do sistema visual, aumenta a plasticidade celular durante a neurogênese e a sobrevivência dos neurônios recém-formados e reduz a apoptose espontânea.

Em ambientes complexos, os animais não estão apenas respondendo a um estímulo de forma isolada, mas a muitos estímulos variáveis de uma vez, causando aumento da variação (ESKOLA; KALISTE-KORHONEN, 1999; TSAI et al., 2003). No entanto, pode-se argumentar que, pelos animais poderem executar mais comportamentos específicos da espécie em ambientes enriquecidos, eles podem ser mais capazes de lidar com eventos inesperados e assim mostrar uma resposta mais uniforme (BAUMANS; VAN LOO, 2013).

Baumans (2006) observou que fatores ambientais exercem importante influência nos animais de laboratório e nos resultados dos experimentos, uma

vez que o animal fica confinado na gaiola durante toda sua vida. Portanto, animais mantidos em ambientes altamente artificiais são modelos menos adequados para extrapolar resultados experimentais para humanos. Já os animais mantidos em ambientes enriquecidos podem ser mais estáveis tanto no aspecto fisiológico quanto psicológico, bem como, melhores representantes da espécie, assegurando melhores resultados científicos (VAN DE WEERD et al., 1997).

Porém, ainda hoje as gaiolas de laboratório, geralmente, não são adequadas para as necessidades comportamentais e psicológicas dos animais. Os hábitos dos roedores de explorar, descansar, escalar, limpar-se, procurar alimento, fazer ninho e comportar-se socialmente não são totalmente considerados (NEVES et al., 2013). Nos biotérios, os principais cuidados são com o estabelecimento de normas de biossegurança e com a modernização do alojamento, com intuito de minimizar variáveis, como doenças infecciosas, exposição a toxinas ou variações no ambiente. Contudo, essa padronização na manipulação dos roedores tem consequências adversas para os animais em termos de falta de complexidade em seu ambiente, limitando a capacidade dos animais de controlar seu ambiente físico e social (OLSSON; DAHLBORN, 2002; OTTESEN, et al., 2004; HEDRICH; MOSSMANN; NICKLAS, 2004; NRC, 2011).

1.4.2 Tipos e Protocolos de Enriquecimento Ambiental

O enriquecimento ambiental é um conjunto de técnicas que modificam o ambiente, melhorando a qualidade de vida dos animais ao satisfazer suas necessidades comportamentais (FRISKE; GAMMIE, 2005; BAUMANS; AUGUSTSOON; PERRETTA, 2010) podendo ser focado tanto no ambiente social (parceiros sociais, incluindo os seres humanos), quanto no ambiente físico, que consiste em estímulos sensoriais (auditivos, visuais, olfativos e táteis) como também nos aspectos nutricionais (tipo de alimento e formas de prove-lo) (SIMPSON; KELLY, 2011).

Existem vários tipos de enriquecimento para animais de laboratório que podem ser produzidos artesanalmente ou adquiridos comercialmente e que permitem esterilização. Caixas de animais escavadores podem ser facilmente enriquecidas com artefatos adaptados, como tubos de tamanho apropriado e materiais para construção de ninhos livres de toxinas (ex. algodão) (GNADT,

2006). Artefatos como: barras de metal, cordas, objetos de plástico também são muito empregados. Os roedores parecem preferir abrigos nos quais possam se proteger da luz e as fêmeas possam fazer ninhinhos (MANSER, MORRIS, BROOM, 1995; NEWBERRY, 1995; GARBIN; FALEIROS; LAGO, 2012).

A adição de múltiplos itens de enriquecimento, em comparação ao uso de um item em particular, pode ter o potencial de melhorar o bem-estar de ratos Wistar ao aumentar a complexidade das gaiolas e criar um ambiente com mais similaridade ao habitat natural. Concluindo que o bem-estar de ratos de laboratório pode melhorar se os animais forem alojados em um ambiente complexo, mas também em um ambiente com diversidade de objetos de enriquecimento (ABOU-ISMAIL, 2011). Em contrapartida, Sirois (2008) alerta que algumas espécies, em particular os ratos, podem responder de maneira insatisfatória à manipulação quando albergados num ambiente altamente enriquecido.

O enriquecimento ambiental é complexo e existem inúmeras maneiras de fornecer enriquecimento. Há uma falta de consistência em protocolos de enriquecimento entre diferentes laboratórios (BARDO; BEVINS, 2000). A variação no grau de complexidade dos ambientes enriquecidos pode ser responsável pelas variações entre resultados apresentados por diferentes experimentadores. Os padrões para o enriquecimento podem variar entre estudos e o que é referido como super-enriquecimento em um estudo pode também ser definido como um enriquecimento regular por outro (FOX; MERALI; HARRISSON; 2006).

A literatura existente sugere que os programas de EA para os ratos podem variar muito entre laboratórios, no entanto a grande parte dos estudos incluídos na revisão de literatura de Simpson e Kelly (2011) citaram que na maioria dos protocolos os ratos foram alojados em ambientes enriquecidos no pós-desmame, por um período de 4-8 semanas. Esta idade e duração pareceram produzir efeitos benéficos sobre o comportamento e pode ser útil como um protocolo padrão de EA.

O ideal seria que os objetos fossem substituídos e rearranjados diariamente para maximizar a novidade. Este arranjo fornece três facetas chaves da novidade: o enriquecimento, o contato social e o exercício. Foi demonstrado

em ratos que todos os três aspectos são compensadores (BARDO, 1998; BARDO; BEVINS, 2000).

Concordando com os autores supracitados, Simpson e Kelly (2011) relatam que na maior parte dos protocolos de enriquecimento ambiental os objetos devem ser movidos ou alterados um número de vezes por semana para manter a novidade do ambiente.

Parâmetros tais como a idade do animal, grau e duração do enriquecimento, espécie e sexo podem afetar os resultados de uma experiência. A falta de consistência em protocolos provavelmente decorre de uma falta de consenso quanto à definição do que constitui de fato "enriquecimento ambiental". Alguns autores podem definir EA com base na complexidade de que um ambiente mais complexo é mais enriquecedor. No entanto, a complexidade ambiental por si só não produz todos os efeitos benéficos observados. O enriquecimento ambiental, pela maioria das definições, deve exercer uma influência positiva sobre o organismo. Assim, o enriquecimento deve proporcionar uma vantagem global para o indivíduo (BASSETT; BUCHANAN-SMITH, 2007).

Porém, para Cymerblit-Sabba et al. (2013), embora existam protocolos diferentes, todos eles compartilham o mesmo conceito de novidade e complexidade do ambiente. Um grande espaço dentro do qual o animal possa explorar a introdução de uma variedade de objetos que variam em tamanho, forma, peso, cheiro e textura, fornecendo estimulação visual, olfativa, entre outros benefícios já citados anteriormente.

1.4.3 Efeitos do EA Sobre a Reprodução de Roedores

A utilização de ambientes enriquecidos afeta a reprodução de roedores positivamente pois, como já foi visto, diminui o estresse e melhora o bem-estar, aumentando consequentemente a qualidade de uma criação ao adequar o manejo a padrões éticos aceitáveis, diminui a casuística clínica, diminui a mortalidade, incrementa a taxa reprodutiva maximizando a relação custo/benefício (BOERE, 2001), além de, melhorar o controle das respostas ansiosas para lidar com o ato da cópula e situações estressantes (SAMPEDRO-PIQUERO; ARIAS; BEGEGA, 2014), promove o desenvolvimento de um repertório comportamental mais "natural" melhorando as taxas de reprodução,

reduzindo comportamentos anormais e minimizando padrões comportamentais autodestrutivos e estereotípias (NUNES; GUERRA; BUSSAB, 2003).

Além disso, segundo Reinhardt e Reinhardt (2006), o uso do EA pode diminuir o índice de infanticídio, canibalismo ou negligência, aumentar a taxa de sucesso de acasalamentos e melhorar o comportamento social com o grupo.

Um exemplo de enriquecedor ambiental que afeta positivamente a reprodução de ratos é material para ninho, pois permite-lhes criar um microambiente adequado e seguro para descansar, esconder-se e para se reproduzir além de, proporcionar aumento dos cuidados maternos (MANSER; MORRIS; BROOM, 1955; BAUMANS; VAN LOO, 2013). Estudos mostraram que a falta de material para ninho produziu um aumento substancial no comportamento ansioso e que a aprendizagem e a memória foram afetadas negativamente (BAUMANS, 2005).

Além disso, tem sido sugerido que um ruído de fundo constante, como um rádio, tem algumas vantagens de facilitar a reprodução por tornar os animais menos assustados (BAUMANS, AUGUSTOON; PERRETTA, 2010). Krohn, Salling e Koneruo (2011) mostraram que ratos reagem a diferentes padrões de som a partir de um rádio, mas essa reação pode variar de acordo com as diferentes linhagens de rato.

Shair, Nunez e Osman (2012) examinaram como a sobrevivência e o crescimento de filhotes de camundongo C57BL/6 são afetados por três tipos de enriquecimento: algodão, tecidos e iglus de plástico, durante a última semana de gestação e os dois primeiros meses após o parto. Tanto a presença quanto o tipo de enriquecimento não influenciaram a sobrevivência e peso dos filhotes, o que sugere que a utilização de tais materiais não influencia negativamente o sucesso reprodutivo ou sobrevivência dos filhotes.

Carvalho et al. (2009) investigaram os efeitos do ambiente enriquecido no desenvolvimento e desempenho reprodutivo de camundongos Swiss. O enriquecimento físico consistiu de livre acesso dos animais para dispositivos tubulares de diferentes formas e tamanhos. A avaliação do desenvolvimento foi realizada por monitorização taxa de crescimento durante 39 dias, a partir do desmame (21 dias) até início da maturidade sexual (60 dias de idade). Mais de cinco gestações consecutivas foram observadas e as seguintes variáveis foram monitoradas: tamanho da ninhada, número de animais nascidos vivos; número

de filhotes vivos as 12 horas e nos dias 4, 9, 12, 15 e 18; número de animais desmamados por ninhada; peso médio de ninhadas nos dias 4, 9, 12, 15 e 18. Os resultados mostraram que o enriquecimento do meio ambiente não influenciou de forma significativa, os parâmetros avaliados. No entanto, não há motivo para privar os animais de um ambiente enriquecido onde eles possam desenvolver o seu comportamento natural, garantindo melhora na saúde e bem-estar.

Já em outro estudo, tubos de PVC foram introduzidos em gaiolas de casais de ratos Wistar e provocaram uma tendência no aumento do número de filhotes nascidos (NEVES et al., 2013). Em outro trabalho, o algodão foi introduzido em casais de camundongos C57BL/6, sendo avaliados vários parâmetros reprodutivos (taxa de fertilidade, intervalo entre partos, prolificidade, número e percentagem de filhotes desmamados, percentagem de mortalidade pré-desmame e ganho de peso de filhotes desmamados). Os autores observaram uma redução na mortalidade pré-desmame e um aumento no peso de filhotes mantidos em gaiolas abertas enriquecidas com algodão (FONTES et al., 2012).

1.4.4 Efeitos do EA Sobre a Prole

Segundo Cymerblit- Sabba et al. (2013), Cutuli (2015) e Zuen et al. (2016) a exposição pré-natal ao EA tem efeitos emocionais e hormonais de longo prazo nos descendentes, além disso, esses estudos fornecem evidências de efeitos benéficos sobre o comportamento e performance cognitiva da prole, especificamente na aprendizagem e memória com indícios de alterações estruturais cerebrais. Baumans e Van Loo (2013) ainda citam que o enriquecimento ambiental precoce, ou seja, no pré-desmame diminui a ansiedade em ratos adultos a longo prazo, e é provável que enriquecimento seja eficaz porque provoca um aumento no nível de cuidados maternos.

Baldini et al. (2013) e Cymerblit-Sabba et al. (2013) concluíram que o EA foi útil para resgatar comportamentos anormais, como a reatividade emocional e aprendizagem espacial, bem como déficits de habilidades motoras induzidas pelo estresse pré-natal. Além disso, foi observado que a elevada secreção de corticosterona em resposta ao estresse, no pré-natal em animais estressados, pode ser invertida com o uso do enriquecimento ambiental pós-natal.

Marques et al. (2014) realizaram um estudo onde observaram que a estimulação precoce com um ambiente enriquecido é capaz de prevenir déficits em habilidades motoras e alterações histológicas em um modelo de rato com paralisia cerebral.

Baumans (2005) ainda citou que o canibalismo observado na fêmea com relação aos neonatos depende da linhagem, e em muitos casos, pode ser minimizado, quando os animais são mantidos em um lugar calmo com pouca intensidade de luz e com material para fazer ninho.

1.4.5 Métodos de Avaliação dos Programas de Enriquecimento

1.4.5.1 Testes Comportamentais

O fato de o comportamento de um animal ser influenciado pelo ambiente em que vive tem sido usado para estudar os seus mecanismos básicos, para localizar as áreas do cérebro envolvidas ou para identificar neurotransmissores que modulam esse comportamento. Ao expor animais a um ambiente padronizado ou a uma mudança definida nessas condições ambientais, pode-se induzir um comportamento específico ou a uma mudança comportamental (CLASSEN, 2000).

Portanto, os efeitos do EA podem ser avaliados através da exposição de animais a testes comportamentais, o que permite verificar mudanças no comportamento do rato, como por exemplo, o aumento da exploração de um ambiente, sugerindo diminuição da ansiedade (VAN DER WEERD, 1997).

O labirinto em cruz elevado é um dos modelos validados para pesquisas de ansiedade em ratos e camundongos, pois se baseia em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. A premissa básica é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando um típico conflito de aproximação/esquiva (MEZADRI et al., 2011). O aparato do teste consiste em um labirinto em formato de cruz, elevado. Os dois braços opostos do labirinto têm paredes fechadas enquanto os outros dois braços são descobertos. Rodgers et al. (1997) constataram que ratos apresentavam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos, e em uma chance de escolha, como um labirinto, preferiam consistentemente os braços fechados, interpretando-se a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia.

Já os estudos que avaliam a estruturação do espaço ou as respostas dos animais a diferentes ambientes ou processos, as tomadas de decisões do animal são os fatores mais importantes na avaliação. Os testes de escolha simples são particularmente úteis para o estabelecimento de preferências ambientais, os estudos com animais domésticos são realizados a partir das preferências do animal pelo tipo de alimento, local de descanso, exploração dos materiais, calor, iluminação, escolha de companheiro e comportamento social. Muitos desses estudos tomam como medida de preferência o número de escolhas feitas por uma opção em relação as demais, ou a quantidade de tempo gasto pelo animal em cada opção. Entre os diversos tipos de testes comportamentais que tem sido empregado para medir emocionalidade ou locomoção em animais, um dos mais utilizados é o do campo aberto, inspirados nas propostas de Hall (1934), que se popularizou como teste de avaliação de comportamento exploratório (SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994; POLTYREV et al., 1996).

O aparato do campo aberto é constituído por uma grande arena circular, cercada por uma parede. O piso do campo aberto é dividido em vários campos por linhas radiais e círculos concêntricos. O rato é colocado no campo aberto próximo a parede e os movimentos e comportamentos exibidos podem ser gravados.

Raimundo et al. (2011) estudaram casais de camundongos Swiss (45 dias) submetidos a duas condições ambientais: padrão e de EA. Após o desmame, os filhotes machos foram transferidos para um ambiente similar até os 40 dias de vida. No fim deste período, os camundongos foram submetidos ao estresse social agudo (alteração dos animais da gaiola por 24 horas) sendo então, avaliados nos testes comportamentais: labirinto em cruz elevado e teste do campo aberto.

Os autores supracitados concluíram que EA desde o período pré-natal à fase adulto-jovem determinou aos camundongos dispostos na condição de ambiente enriquecido menor reatividade quando expostos a um novo ambiente, evidenciada pela maior atividade exploratória, ao mesmo tempo determinou um efeito ansiolítico demonstrado no teste do Labirinto em Cruz Elevado.

A exposição a fezes de felino foi usada para avaliar a ansiedade em camundongos BALB/c criados em duas condições diferentes de alojamento, com e sem EA. Dois testes comportamentais clássicos (labirinto em cruz elevado e o

teste campo aberto) usados para medir ansiedade foram empregados para comparar as reações dos animais criados nas duas condições. Foi observado neste experimento que os animais alojados no ambiente enriquecido foram mais ativos que os animais alojados em condições padrão tanto no labirinto em cruz elevado quanto no campo aberto (ROY et al., 2001). Concordando com Mezadri et al. (2011) que citam que artifícios de EA favorecem baixos níveis de ansiedade, aumentando a atividade locomotora em testes como o do campo aberto.

A evidência experimental indica, portanto, que o ambiente enriquecido induz alterações neurobiológicas e comportamentais. EA no início da vida melhora a aprendizagem e memória e reduz o estado de ansiedade. Além disso, o EA estabelecido na idade adulta também foi capaz de reduzir a ansiedade, todos avaliados por testes comportamentais, corroborando assim, com todos os estudos citados acima (LEGGIO et al., 2005; GOES; ANTUNES; SILVA, 2015).

1.4.5.2 Testes Bioquímicos

1.4.5.2.1 Dosagem de Corticosterona

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é um importante modulador da resposta ao estresse. A atividade do HPA é refletida pelo aumento nas concentrações plasmáticas de ACTH e corticosterona (BELZ et al., 2003). Sendo assim, os níveis plasmáticos de alguns hormônios como a corticosterona refletem a resposta do animal a condições estressoras (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003; MARCUZZO, 2006; COLE, 2012).

Portanto, embora ainda não haja um consenso sobre o método de avaliar um programa de enriquecimento ambiental (SHERPERDSON, 1998) uma extensiva lista de parâmetros fisiológicos de experimentos prévios foi re-analisada para avaliar o efeito do EA; tipo de gaiola, tamanho dos grupos e, conseqüentemente, o número de animais necessários em estudo com ratos Wistar. Os resultados indicaram que alguns parâmetros fisiológicos são susceptíveis a variabilidade atribuível às modificações ambientais, como os níveis de corticosterona, enquanto outras não (MERING; KALISTE-KORHONEN; NEVALAINEN, 2001).

Os autores sugerem também que a variação dos diferentes parâmetros pode alterar de um experimento para o outro e entre ambientes diferentes. Os

níveis de corticosterona variam muito entre os indivíduos, o que aumenta o número de animais necessários. Além disso, medidas de corticosterona podem ser sensíveis a erro devido a pequena quantidade de amostra sanguínea e/ou estresse durante a colheita da mesma (MERING; KALISTE-KORHONEN; NEVALAINEN, 2001).

Concordando com os resultados dos estudos de Belz et al. (2003) que sustentaram a ideia de que aspectos estruturais de um ambiente podem influenciar parâmetros fisiológicos e comportamentais dos animais. Ratos de ambos os sexos mantidos em gaiolas com EA (inclusão de objetos) tiveram significativa diminuição nas concentrações do ACTH e corticosterona quando comparado com aqueles em gaiolas padronizadas. A interação com o objeto parece ter fornecido diversão, ocasionando menor atividade do HPA antes e após estresse moderado. Esses resultados são importantes porque níveis basais estáveis e baixos, resultantes de um ambiente enriquecido, são essenciais para uma correta resposta do eixo HPA nas mais variadas áreas de pesquisa.

Porém, existem várias advertências ao tentar extrapolar o estado emocional e comportamental do animal em relação aos níveis de corticosterona no plasma, um fato importante é o simples ato de adquirir uma amostra de sangue para medir corticosterona que por si só pode ser estressante, especialmente com amostragem de alta frequência (CROFTON; ZHANG; GRENN, 2015).

Além disso, os corticosteróides são secretados em pulsos de hora em hora que tem amplitude mais expressiva durante o período de atividade do animal, resultando em um padrão circadiano global de secreção (YOUNG, ABELSON; LIGHTMAN, 2004). Logo, para evitar a variabilidade circadiana, as amostras devem ser preferencialmente coletadas entre 11:00h e 12:00h a.m., quando a concentração de hormônio no plasma é relativamente baixa, visto que, são animais com atividade noturna (CYMEDRBLIT-SABBA et al., 2013).

Portanto, avaliar o estresse em animais ambientalmente enriquecidos com base nos níveis de corticosterona pode muitas vezes contribuir para diferentes hipóteses sobre se o enriquecimento ou alojamento padrão é inerentemente estressante, por causa de resultados inconsistentes de níveis de corticosterona entre animais enriquecidos e com alojamentos padrão (KONKLE et al., 2010).

No entanto, isto não quer dizer que corticosterona não é importante, ou que não está envolvida nos efeitos benéficos de enriquecimento ambiental. No

entanto, os níveis de corticosterona medidos não fornecem um quadro completo da natureza adaptativa das respostas ao estresse de um animal (CROFTON, ZHANG; GRENN, 2015).

Cada vez mais experimentos vêm sendo feitos para comprovar a eficácia do uso de EA na qualidade de vida e aspectos reprodutivos dos animais de laboratório. No entanto, nenhum estudo até o momento avaliou se o ambiente dos animais de laboratório influencia na qualidade e quantidade dos complexos cúmulos-oócito diretamente, o que vem a ser um ponto importante de estudo, visto que, descobertas nessa área poderão trazer benefícios para os centros criadores de animais e para pesquisas na área da embriologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-ISMAIL, U. A. The effects of cage enrichment on agonistic behaviour and dominance in male laboratory rats (*Rattus norvegicus*). **Res Vet Sci**, v. 90, n. 2, p. 346-51, 2011.
- ADLER, N. T.; TONER, J. P. The effects of copulatory behavior on sperm transport and fertility in rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 474, p. 21-32, 1986.
- AGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 1, n. 2, p. 203-9, 1997.
- ARMSTRONG, D. T. Environmental stress and ovarian function. **Biol Reprod**, v. 34, n. 1, p. 29-39, 1986.
- BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H. The laboratory Rat: Biology and Diseases. San Diego, Academic Press: p. 435, 1979.
- BALDINI, S. et al. Enriched early life experiences reduce adult anxiety-like behavior in rats: a role for insulin-like growth factor 1. **J Neurosci**, v. 33, n. 28, p. 11715-23, 2013.
- BAPTISTA, R.I.A.A.; DA SILVA, J.M.; OLIVEIRA, M.A.B. Comportamento do Gato Mourisco em Cativeiro. In: *IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão*, Recife, PE. Anais da IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009.
- BARDO, M. T. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. **Crit Rev Neurobiol**, v. 12, n. 1-2, p. 37-67, 1998.
- BARDO, M. T.; BEVINS, R. A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 153, n. 1, p. 31-43, 2000.
- BARROS, F.F.P.C. et al. Reproductive Endocrine and *In vitro* Production Aspects in Paca (*paca cuniculus*-Linnaeus, 1766). **Rev. Invest. Vet**, v. 14, n.1, p.1-6, 2015.
- BASAK, S. et al. Expression of pro-inflammatory cytokines in mouse blastocysts during implantation: modulation by steroid hormones. **Am J Reprod Immunol**, v. 47, n. 1, p. 2-11, 2002.
- BASSETT, L.; BUCHANAN-SMITH, H.M. Effects of predictability on the welfare of captive animals. Conservation, Enrichment and Animal Behaviour. **Appl Anim Behav Sci**, p. 223-245, 2007.
- BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. **ILAR J**, v. 46, n. 2, p. 162-70, 2005.

BAUMANS, V. The laboratory mouse. In: Poole, T. The UFAW handbook on the care and the management of laboratory animals. 7 ed. British: Blackwell Science, v.1, p. 282-312, 2006.

BAUMANS, V.; AUGUSTSOON, H; PERRETTA, G. Animal needs and environmental refinement. In: Howard, B., Nevalainen, T., Perretta, G. (Eds.). The COST Manual of Laboratory Animal Care and Use, Refinement, Reduction and Research. CRC, Press, London, p. 75–100, 2010.

BAUMANS, V.; VAN LOO, P. L. How to improve housing conditions of laboratory animals: the possibilities of environmental refinement. **Vet J**, v. 195, n. 1, p. 24-32, 2013.

BELZ, E. E. et al. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 76, n. 3-4, p. 481-6, 2003.

BERGERON, R.; MEUNIER-SALAUN, C.; ROBERT, S. The welfare of pregnant and lactating sows. In: FAUCITANO, L.; SCHAEFER, A. Welfare of pigs from birth to slaughter. Versailles: Wageningen Academic, p. 65-95.2008.

BEYNEN, A. C. et al. Assessment of discomfort in gallstone-bearing mice: a practical example of the problems encountered in an attempt to recognize discomfort in laboratory animals. **Lab Anim**, v. 21, n. 1, p. 35-42, 1987.

BOERE, V. Environmental enrichment for neotropical primates in captivity. **Ciêñ Rural, Santa Maria**, v.31, n. 3, p. 543-551, 2001.

BROOM, D. M. Coping with challenge: welfare in animals including humans. In: Coping, stress, and welfare. Berlin: Dahlem University Press, p. 1-9, 2001.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **Br Vet J**, v. 142, n. 6, p. 524-6, 1986.

CABODEVILA, J.; TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: PALMA, G.A. Biotecnologia de la reproducción 1ª edição INTA, Argentina, p. 79-108, 2001.

CAMERON, N.; HA, G. K.; ERSKINE, M. S. Effect of adrenalectomy on mating-induced prolactin surges and pseudopregnancy in the female rat. **Neuroendocrinology**, v. 78, n. 3, p. 138-46, 2003.

CAMPOS, C. O. et al. Preventing Microbial Contamination during Long-Term In Vitro Culture of Human Granulosa-Lutein Cells: An Ultrastructural Analysis. **ISRN Obstet Gynecol**, v. 2012, p. 152, 2012.

CARLSTEAD, K. Effects of captivity on the behavior of wild mammals. In: Kleiman DG, Allen ME, Thompson KV, Lampkin S. Wild mammals in captivity. Chicago: University of Chicago Press, p.317-333, 1996.

CARLSTEAD, K.; SHEPHERDSON, D. Effects of environmental enrichment on reproduction. **Zoo Biology**, v. 13, n. 5, p. 447-458, 1994.

CARVALHO, A. F. et al. Development and reproductive performance of Swiss mice in an enriched environment. **Braz J Biol**, v. 69, n. 1, p. 153-60, 2009.

CHAMOVE, A. S. Cage design reduces emotionality in mice. **Lab Anim**, v. 23, n. 3, p. 215-9, 1989.

CHAVES, R. N. et al. Nerve growth factor promotes the survival of goat pre-antral follicles cultured in vitro. **Cells Tissues Organs**, v. 192, n. 4, p. 272-82, 2010.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, n. 9, p. 1244-52, 1992.

CLASSEN, W. Behaviour, Neurology and Electrophysiology. In: KRINKE, G.J. (Ed.). **The Laboratory Rat (The Handbook of Experimental Animals)**. San Diego: Academic Press. p. 419-435, 2000.

COLE, D. C. **Non-Invasive Measurement of Corticosterone in Food Restricted Rats**. 98 p. Thesis (M Sc) University of Toronto (Canada), 2012.

CROFTON, E. J.; ZHANG, Y.; GREEN, T. A. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 49, p. 19-31, 2015.

CUTULI, D. et al. Pre-reproductive maternal enrichment influences rat maternal care and offspring developmental trajectories: behavioral performances and neuroplasticity correlates. **Front Behav Neurosci**, v. 9, p. 66, 2015

CYMERBLIT-SABBA, A. et al. Prenatal Enriched Environment improves emotional and attentional reactivity to adulthood stress. **Behav Brain Res**, v. 241, p. 185-90, 2013.

DANTZER, R. et al. The effect of different housing conditions on behavioural and adrenocortical reactions in veal calves. **Reprod Nutr Dev**, v. 23, n. 3, p. 501-8, 1983.

DIAMOND, M. C. et al. Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. **J Comp Neurol**, v. 128, n. 1, p. 117-26, 1966.

DIXON, A. K.; FISCH, H. U. Animal models and ethological strategies for early drug-testing in humans. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 2, p. 345-58, 1998.

DUKES, H. *Fisiologia dos Animais Domésticos* 11ª Ed Guanabara Koogan, 1996.

ESKOLA, S.; KALISTE-KORHONEN, E. Nesting material and number of females per cage: effects on mouse productivity in BALB/c, C57BL/6J, DBA/2 and NIH/S mice. **Lab Anim**, v. 33, n. 2, p. 122-8, 1999.

Figueiredo J.R. et al. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. **Biotécnicas Aplic Repr Ani**. São Paulo: Editora Roca, p.303-327, 2008.

FONTES, R.S.; SANTOS, R.A.; ONG, F.M.P.; NEVES, S.M.P.; BALIEIRO, J. C.C, DAMY, S.B. Efeito do enriquecimento ambiental na produção de camundongos C57BL/6 mantidos em diferentes sistemas de alojamento. RESBCAL. **Rev Soc Bra Ciên Ani Lab**. v. 1, p. 54-63, 2012.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behav Brain Res**, v. 175, n. 1, p. 1-8, 2006.

FRASER, A. F. Veterinarians and animal welfare--a comment. **Can Vet J**, v. 49, n. 1, p. 8, 2008.

FRISKE, J. E.; GAMMIE, S. C. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. **Physiol Behav**, v. 85, n. 2, p. 187-94, 2005.

GARBIN, N.L.C.; FALEIROS, R.R.; LAGO, L.A. Enriquecimento ambiental em roedores utilizados para experimentação animal: revisão de literatura. Revista Acadêmica, Ciências Agrárias Ambientais. Curitiba, v. 10, n. 2, p. 153-161, 2012.

GNADT, B.J. Ethical and legal perspectives. In: SUCKOW, M.A.; WEISBROTH, S.T.; FRANKLIN, C.L. The laboratory rat. USA: Elsevier Academic Press, p. 53-70, 2006.

GOES, T. C.; ANTUNES, F. D.; TEIXEIRA-SILVA, F. Environmental enrichment for adult rats: effects on trait and state anxiety. **Neurosci Lett**, v. 584, p. 93-6, 2015.

GOLUB, M. S. et al. Effects of restraint stress in gestation: implications for rodent developmental toxicology studies. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 71, n. 1, p. 26-36, 2004.

HAFEZ, E. S.; GOFF, L.; HAFEZ, B. Mammalian fertilization, IVF, ICSI: physiological/molecular parameters, clinical application. **Arch Androl**, v. 50, n. 2, p. 69-88, 2004.

HEDRICH, H.J.; MOSSMANN, H.; NICKLAS, W. Housing and maintenance. In: HEDRICH, H.; BULLOCK, G.; PETRUSZ, P. The handbook of experimental animals: the laboratory mouse. USA: Elsevier Academic Press, p. 117-127, 2004.

HUGHES, B. O. The historical and ethical background of animal welfare. How well do our animals fare? In: Annual conference of the reading university agricultural club, 15. p. 1-9, 1982.

HULL, E. M.; DOMINGUEZ, J. M. Sexual behavior in male rodents. **Horm Behav**, v. 52, n. 1, p. 45-55, 2007.

HULL, E. M.; MEISEL, R. L.; SACHS, B. D. Male sexual behavior. In: PFAFF, D. W, ARNOLD, A. P.; ETGEN, A. M.; FAHRBACH, S. E.; RUBIN, R. T.(Eds.) **Hormones, Brain and Behav**. San Diego: Academic Press. p. 3–137, 2002.

HULL, E. M.; WOOD, R. I.; MCKENNA, K. E. Chapter 33 - Neurobiology of Male Sexual Behavior A2 - Wassarman, Jimmy D. Neill Tony M. Plant Donald W. Pfaff John R.G. Challis David M. de Kretser Joanne S. Richards Paul M. In: (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. St Louis: Academic Press, p.1729-1824, 2006.

HURNIK, J. F. Behaviour. In: PHILLIPS, C.; PIGGINS, D. Farm animals and the environment. Wallingford: Ed. C.A.B. International, p. 235-244, 1992.

HUTCHINSON, E.; AVERY, A.; VANDEWOUDE, S. Environmental enrichment for laboratory rodents. **ILAR J**, v. 46, n. 2, p. 148-61, 2005.

JOCA, S.R.L.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Estresse, depressão e hipocampo. **Rev. Bras. Psiqui**. v. 25, p. 46-51, 2003.

KEELING, L.; JENSEN, P. Behavior disturbances, stress and welfare. In: Jensen, P. The ethnology of Domestic Animals: An Introductory Tex. Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI Publising, p. 79-78, 2002.

KONKLE, A. T. et al. Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 49, n. 4, p. 427-36, 2010.

KROHN, T. C.; SALLING, B.; HANSEN, A. K. How do rats respond to playing radio in the animal facility? **Lab Anim**, v. 45, n. 3, p. 141-4, 2011.

LAPCHIK, V.B.V.; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. Cuidados e Manejos de Animais de Laboratório. São Paulo: Atheneu, p. 551-5, 2010.

LEGGIO, G.M.; MANDOLESI, L.; FEDERICO, F.; SPIRITO, F.; RICCI, B.; GELFO, F.; PETROSINI, L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behavioral Brain Research**, v.163, n.1, p. 78-90, 2005.

LONG, J. A.; EVANS, H. M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California*, 6: 1-14, 1996.

MANDL, A. M.; ZUCKERMAN, S. The relation of age to numbers of oocytes. **J Endocrinol**, v. 7, n. 2, p. 190-3, 1951.

MANSER, C. E.; MORRIS, T. H.; BROOM, D. M. An investigation into the effects of solid or grid cage flooring on the welfare of laboratory rats. **Lab Anim**, v. 29, n. 4, p. 353-63, 1995.

MANTECA, X.; SILVA, C.A.; BRIDI, A.M.; DIAS, C.P. Animal welfare: concepts and practical procedures to evaluate the swine productions systems. Seminário: Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 4213-4230, 2013.

MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiol Behav**, v. 74, n. 4-5, p. 435-40, 2001.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, v. 62, n. 4A, p. 609-14, 2002.

MARCUZZO, S. Estudo sobre a densidade de espinhos dendríticos de neurônios da amígdala medial pósterio-dorsal de ratos em diferentes condições experimentais. Dissertação de Mestrado em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MARQUES, M. R. et al. Beneficial effects of early environmental enrichment on motor development and spinal cord plasticity in a rat model of cerebral palsy. **Behavioural Brain Research**, v. 263, p. 149-157, 2014.

MARTÍN-COELLO, J. et al. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). **Theriogenology**, v. 70, n. 6, p. 1004-13, 2008.

MATTARAIA, Vânia Gomes de Moura. Eficiência reprodutiva de ratos Wistar: sincronização, restrição alimentar e sistemas de produção. 2007. iv, 83 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007.

MAYER, L.P. et al. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biol. Reprod.** v.71, p. 130-138, 2004.

MEDRAZI, T.J. et al. Bem-estar de animais experimentais Avaliação do comportamento de ratos alojados em caixas de cores diferentes, **Rev Etol**, v.10, n.1, p. 21-26, 2011.

MERING, S.; KALISTE-KORHONEN, E.; NEVALAINEN, T. Estimates of appropriate number of rats: interaction with housing environment. **Lab Anim**, v. 35, n. 1, p. 80-90, 2001.

MOBERG, G. P. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. **J Anim Sci**, v. 65, n. 5, p. 1228-35, 1987.

MORTON, D. B.; GRIFFITHS, P. H. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. **Vet Rec**, v. 116, n. 16, p. 431-6, 1985.

MOTZER, S.A.; HERTIG, V. Stress, stress and health. *Nursing Clinics of North America*, v.39, p. 01-17, 2004.

NEVES, S.P.; ONG, F.M.P.; RODRIGUES, L.D.; SANTOS, R.A.; FONTES, R.S.; SANTANA, R.O. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação- FCF-IQ/USP. São Paulo, p. 25-29, 2013.

NEWBERRY, R. C. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. **Appl Anim Behav Sci**, 1995.

NRC (National Research Council). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Ed. The National Academies Press, Washington, DC, 2011.

NUNES, C.R.O.; GUERRA, R.F.; BUSSAB, V.S.R. Enriquecimento ambiental, privação social, e manipulação neonatal. **Rev Ciên hum**, Florianópolis; EDUFSC, n. 34. p. 365-394, 2003.

OLSSON, I. A.; DAHLBORN, K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". **Lab Anim**, v. 36, n. 3, p. 243-70, 2002.

OTTESEN, J. L. et al. New housing conditions: improving the welfare of experimental animals. **Altern Lab Anim**, v. 32 Suppl 1B, p. 397-404, 2004.

PEÑA, Y. et al. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. **Behav Brain Res**, v. 174, n. 1, p. 181-7, 2006.

PFAFF, D. W. et al. GnRH neurons and other cellular and molecular mechanisms for simple mammalian reproductive behaviors. **Recent Prog Horm Res**, v. 49, p. 1-25, 1994.

PFAFF, D.W.; SAKUMA, Y.; KOW, L.M.; LEE, A.W.L.; EASTON, A. Hormonal, Neural, and Genomic Mechanisms for Female Reproductive Behaviors, Motivation, and Arousal. Kobil and Neill's **Physiology of Reproduction** (Third Edition). D.N. Jimmy, Ph.D, M.P. Tonyet al. St Louis, Academic Press: p.1825-1920, 2006.

PIZZUTTO, C. S. SGAI, M. G. F. G. e GUIMARÃES, M. A. B. V. O enriquecimento ambiental como ferramenta para melhorar a reprodução e o bem-estar de animais cativos. Belo Horizonte: **Rev Bras Reprod Anim**. 33: 129-138 p, 2009.

POLTYREV, T. et al. Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. **Dev Psychobiol**, v. 29, n. 5, p. 453-62, 1996.

POOLE, T. Natural behavior is simply a question of survival. *Animal Welfare*, Wheat Hampstead, v. 5, p. 218, 1996.

RAHMAN, S.; BARDO, M. T. Environmental enrichment increases amphetamine-induced glutamate neurotransmission in the nucleus accumbens: a neurochemical study. **Brain Res**, v. 1197, p. 40-6, 2008.

RAIMUNDO, J.M. et al. Efeito ansiolítico do enriquecimento ambiental durante o período perinatal de camundongos, 63 Reunião Anual da SBPC, C. **Ciênc Biol**, 2011.

REINHARDT, V.; REINHARDT, A. Variables, refinement and environmental enrichment for rodents and rabbits kept in research institutions- making life easier for animals in laboratories. Make life easier for animals in laboratories. Animal Welfare Institute, Washington, p. 21-40, 2006.

RETANA-MÁRQUEZ S.; BONILLA-JAIME H.; VÁZQUEZ-PALACIOS, G.; MARTÍNEZ-GARCÍA R.; VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones & Behavior*, v. 44, n. 04, p. 327-337, 2003.

RIENZI, L.; BALABAN, B.; EBNER, T.; MANDELBAUM, J.; The oocyte. **Hum Reprod**.v.27, p. 2-21, 2012.

RIVERA, E. A.B. Estresse em animais de Laboratório Em: ANDRADE, A., PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books. p. 263-273, 2002.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biol Reprod**, v. 45, n. 4, p. 523-32, 1991.

RODGERS, R.J., et al. Comparative behavioral profiles of buspirone and its metabolite 1-(2-pyrimidine)-piperazine-(1pp) in the murine elevated plus-maze. **J. Méd. Biol**, 1997.

ROSSI, L. M. et al. Action of ovarian stimulation drugs on the first generation of offspring of *Mus musculus* mice. **Arq Med Hosp Fac Ciênc Med Santa Casa São Paulo**, v. 56, n.1, p.1-6, 2011.

ROY, V. et al. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiol Behav**, v. 74, n. 3, p. 313-20, 2001.

SAMPEDRO-PIQUERO, P.; ARIAS, J. L.; BEGEGA, A. Behavioral testing-related changes in the expression of Synapsin I and glucocorticoid receptors in standard and enriched aged Wistar rats. **Exp Gerontol**, v. 58, p. 292-302, 2014.

SHAIR, H. N.; NUNEZ, Y.; OSMAN, M. M. Enrichment materials do not negatively affect reproductive success and offspring survival and weight in mice. **Lab Anim (NY)**, v. 41, n. 1, p. 14-9, 2012.

SHERPHERDSON, D.J. Tracing the path of environmental enrichment in zoos. In: Shepherdson, D.J. ;Mellen, J.D.; Hutchins, M. Second Nature: environmental enrichment for captive animals. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, p. 1-12, 1988.

SHERWIN, C.M. The influence of standard laboratory cages on rodents and the validity of research data. **Animl Welf.**, v. 13, n.1, p.9-15, 2004.

SILVA, E.V.C; RUEDA, P.M.; CARNEIRO, R.C.P.B.; MACEDO, G.G.; ZUCCARI, C.E.S.N. Estratégias para avaliar bem-estar animal em animais em reprodução. **Ciênc Vet. trop.**, Recife-PE, v. 13, suplemento 1, p. 20-28, 2010.

SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behav Brain Res**, v. 61, n. 1, p. 59-64, 1994.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. **Behav Brain Res**, v. 222, n. 1, p. 246-64, 2011.

SIROIS, M. Medicina de Animais de Laboratório: Princípios e Procedimentos. São Paulo, Roca, p.62, 2008.

SORENSEN, J. T.; FRASER, D. On-farm welfare assessment for regulatory purposes: Issues and possible solutions. **Livestock Science**. p. 131: 1-7, 2010.

SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DRAVID, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **Anat Rec**, v. 254, n. 1, p. 116-26, 1999.

SUNDRUM, A. Achievements of research in the field of livestock systems and quality production. Em ROSATI, A. TEWOLDE AND C. MOSCONI (editors.). Animal Production and Animal Science Worldwide. WAAP book of the year 2006.

TILBROOK, A. J.; TURNER, A. I.; CLARKE, I. J. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. **Rev Reprod**, v. 5, n. 2, p. 105-13, 2000.

TSAI, P. P. et al. Are the effects of different enrichment designs on the physiology and behaviour of DBA/2 mice consistent? **Lab Anim**, v. 37, n. 4, p. 314-27, 2003.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Jour Psychosomatic Res**. v.53, n. 4, p. 865-871, 2002.

VAN DE WEERD, H. A. et al. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. **Lab Anim**, v. 31, n. 2, p. 133-43, 1997.

VAN DE WEERD, H. A. Evaluation of environmental enrichment for laboratory mice. **Vet Q**, v. 19, n. sup1, p. 59, 1997.

VAN DER WEERD, H.A.; BAUMANS, V. Environmental enrichment in rodents. In: Environmental Enrichment Information Resources for Laboratory Animals. AWIC Resource Series 2:145–149, 1995.

WARD, I. L. Effects of maternal stress on the sexual behavior of male offspring. **Monogr Neural Sci**, v. 9, p. 169-75, 1983.

WINGFIELD, J. C.; SAPOLSKY, R. M. Reproduction and resistance to stress: when and how. **J Neuroendocrinol**, v. 15, n. 8, p. 711-24, 2003.

WÜRBEL, H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 4, p. 207-11, 2001.

YOUNG, E. A.; ABELSON, J.; LIGHTMAN, S. L. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. **Front Neuroendocrinol**, v. 25, n. 2, p. 69-76, 2004.

YOUNG, E. A.; KORSZUN, A. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis in mood disorders. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, v. 31, n. 01, p. 63- 78, 2002.

ZUENA, A. R. et al. Maternal exposure to environmental enrichment before and during gestation influences behaviour of rat offspring in a sex-specific manner. **Physiol Behav**, v. 163, p. 274-287, 2016.

2 Objetivos

2.1 Geral

Analisar se a utilização de enriquecedores ambientais afeta aspectos reprodutivos em casais de ratos Wistar e na sua prole.

2.2 Específicos

Comparar o efeito da utilização de dois tipos diferentes de enriquecedores ambientais em casais de ratos Wistar nos seguintes aspectos:

- Número de filhotes nascidos/ ninhada;
- Número de ninhadas;
- Ocorrência de canibalismo;
- Intervalo entre partos;
- Nível plasmático de corticosterona (machos e fêmeas que serviram como progenitores durante o experimento).

Comparar o efeito da utilização de dois tipos diferentes de enriquecedores ambientais nos filhotes nascidos durante o experimento nos seguintes aspectos:

- Fêmeas: quantidade e classificação morfológica dos complexos cumulos-oócitos obtidos após a superovulação das fêmeas nascidas da primeira, segunda e última gestação de todos os grupos.
- Machos: resultado dos testes comportamentais campo aberto e labirinto em cruz elevado realizados em 30 machos nascidos da primeira ninhada e 30 machos nascidos da última ninhada selecionados aleatoriamente de todos os grupos (10 machos de cada grupo).
- Machos e fêmeas: ganho de peso.

3. SITUAÇÃO DO MANUSCRITO

O manuscrito intitulado “Effects of environmental enrichment on reproductive performance and quantity and morphology of Cumulus-Oocyte Complexes obtained from *Rattus norvegicus*” foi submetido à revista científica Applied Animal Behaviour Science, fator de impacto 1.795.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Title: “Effects of environmental enrichment on reproductive performance and quantity and morphology of Cumulus-Oocyte Complexes obtained from *Rattus norvegicus*”

Authors:

Joana Fisch ^{a,b} e-mail: joanafisch@hotmail.com

Iaskara Viera de Oliveira ^{a,b} e-mail: iaskaravieira@hotmail.com

Juliana Fank ^b e-mail: julianafank@gmail.com

Lia Mara Gomes Paim ^b e-mail: liag.paim@gmail.com

Marília Remuzzi Zandoná ^a e-mail: mariliaz@ufcspa.edu.br

Eliana Franco Lopes ^b e-mail: eliana.lopes@ufrgs.br

Fernanda Bastos de Mello ^a e-mail: fernandabm@ufcspa.edu.br

Alexandre Tavares Duarte de Oliveira. ^{a,b} e-mail: atdo@ufrgs.br

^a PPG – Ciências da Saúde - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre –UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada- Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author:

Alexandre Tavares Duarte de Oliveira

Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500, sala 111 - Porto Alegre- 90050-170

E-mail: atdo@ufrgs.br

ABSTRACT

Several researchers have observed that environmental enrichment (EE) can be effective in reducing stressful conditions and abnormal behavior and may provide better reproductive performance in rodents. In this context, this study aimed to evaluate the reproductive performance of Wistar rats reared in three different housing conditions. Animals were separated into breeding pairs, one pair per cage and pairs randomly assigned to three experimental groups (ten couples per group): control group were provided cages without any environmental enrichment; PVC group with PVC pipe; and cardboard roll group with a commercially available cardboard tube. To compare the reproductive performance of the three groups, the following were evaluated: number of pups/litter; number of litters; parturition interval; occurrence of cannibalism; weight gain of offspring; as well as the quantity and quality of cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained after superovulation of the females born from the first, second and last pregnancy in all groups. Moreover, the plasma level of corticosterone in breeding animals was measured. A total of 60 male rats randomly selected from the first- and last-born litters (20 males from each group) were first tested in an elevated plus-maze (EPM) and on the following day, were tested in an open field test (OFT). Significant differences were found in the number and morphological classification of COCs. In the control group, the number of oocytes in grade 4 presented statistically higher rates (225/2535, 8.9%) compared to the other groups as well as, the number of competent oocytes was higher in the enriched groups ($p=0.001$). Moreover, we find that the males of cardboard roll group differed significantly in weight gain compared to PVC group ($p=0.008$). In addition to this, we did not detect occurrence of cannibalism in this group. Our findings suggest that environmental enrichment provides improvements in reproductive performance of Wistar rats.

Keywords: rat, environmental enrichment, reproductive performance, cumulus-oocyte complexes.

1. Introduction

Environmental enrichment (EE) aims to promote a more pleasant habitat for laboratory animals, allowing them to express their natural behavior and improve their cognitive and physical responses (Simpson and Kelly, 2011). This is important not only in terms of animal welfare, but also allows for more reliable research results, since the animals tend to behave more naturally (Garbin et al., 2012). All enrichment protocols share the same concept of novelty and complexity of the environment. A large space within which the animal can explore and be introduced to a variety of objects, varying in weight, size, shape, smell and texture, renders stimulation of visual, somatosensory, and olfactory systems (Cymerblit-Sabba et al., 2013). However, housing systems for laboratory animals have often been designed on the basis of ergonomic and economic considerations, such as cost, space, equipment, maintenance workload and ability to observe the animals and to maintain a certain degree of hygiene, with little or no consideration for animal welfare (Baumans and Van Loo, 2013).

Previous studies (Carlstead and Shepherdson 1994; Pizzuto, 2009) have noted that EE can be effective in reducing stressful conditions and abnormal behavior, by providing opportunity for behavior-coping responses. However, some degree of acute stress, provided for by EE, may be beneficial for reproduction by maintaining a level of responsiveness to socio-sexual stimuli necessary for sexual arousal and reproductive activation. Reproduction is one of the biological processes most susceptible to the effects of welfare commitment; however, because this effect is subtle and generally leads to subfertility problems, there is a huge difficulty in identifying how much reproduction is actually compromised in these situations (Sorensen and Fraser, 2010).

Nevertheless, it is still unknown how and if EE influences follicular and oocyte development. Most of the research involving animal reproduction and embryology used only cumulus-oocyte complexes (COCs) with cumulus oophorus compact and homogeneous cytoplasm. Despite advances in the procedures of maturation, fertilization and *in vitro* culture compared to the *in vivo* process, the percentage of *in*

vitro embryos capable of developing normally is still low. According Gilchrist et al. (2008), one of the main factors affecting embryo developmental rates is oocyte competence to perform maturation. According to the same authors (Gilchrist and Thompson, 2007) only a small number of collected oocytes have the potential for full embryo development. In addition, according to Meldrum et al. (2016), enhancing oocyte competence is a key intervention that promises to reduce the number of euploid embryos failing to produce viable deliveries.

Aside from the problem of low viability, embryo production in domestic animals from unstimulated ovaries using oocyte *in vitro* maturation (IVM) is routine practice and is an important platform technology for artificial breeding, cloning and transgenic animal production (Gilchrist and Thompson, 2007). Therefore, there are many studies designed to assess oocyte maturation, studying for example, the effects of medium maturing, gas atmosphere, and the effect of maturation time on cultivation, among other issues. However, no one has evaluated whether animal environment directly influences the COCs; this is an important point of study, not only to improve the quality of animal breeding laboratory centers but also to further understand exogenous factors on embryological development.

Therefore, the aim of this study was to compare the morphological classification and the number of COCs obtained from females born from couples with two different types of EE besides others reproductive parameters, like number of pups/litter, number of litters, parturition interval, occurrence of cannibalism and weight gain of offspring. Results from these analyses will contribute to the discussion about the beneficial of the use of EE in laboratorial animals.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Thirty male and thirty female Wistar rats (each 60 days old), obtained from Animal Facility of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre,

Brazil) were used for the experiment. The animals were housed in a vivarium at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) in a standard cage (41 x 34 x 17.8 cm; Beiramar, Campinas, Brazil) with woodchip bedding in a colony room. A seven-day acclimation period was given prior to the start of the study. The animal room was maintained at $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 50–57% humidity and on a 12/12 h light dark cycle (lights on at 06:00 h). They were given a commercial pelletized diet (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, Brazil) and tap water *ad libitum*.

All experimental protocols were approved by the Animal Care Committee of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA, Porto Alegre, Brazil) through the approval 152/14. Furthermore, all animal experiments were conducted in strict accordance with the recommendations in the International Animal Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and according to Brazilian law n° 11794/2008 for animal experiments. All procedures of euthanasia in this experiment following Normative Resolution 13, of September 20, 2013 the Nacional Council of Animal Experimentation Control (CONCEA).

The animals were divided into three groups containing ten males and ten females, and were housed one couple per cage. Control group was housed without any contact with environmental enrichment (standard condition). PVC group were housed with a polyvinyl chloride (PVC) 90° corner pipe fitting with an inner diameter of 96 mm at one end and 105 mm on the other, a thickness of 4 mm and length of 160 mm, cleaned when necessary (Figure 1A). Cardboard roll group were housed with a commercially available cardboard tube (Granja RJ, Suzano, São Paulo, Brazil: <http://granarg.com.br/insumo.php>) with inner diameter of 90 mm, thickness of 2 mm and length of 150 mm, exchanged with a new one whenever necessary (Figure 1B).

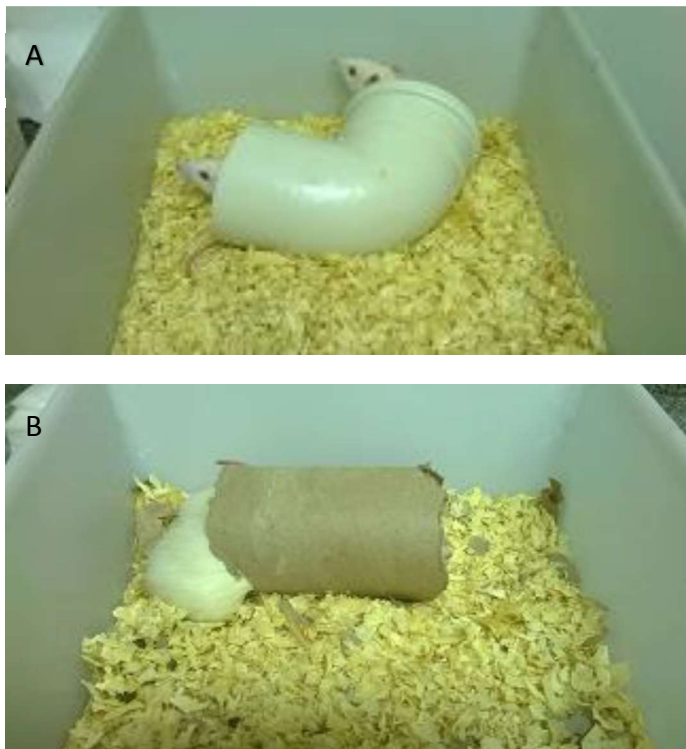


Figure 1. Examples of rearing conditions. (A) - Polyvinyl chloride pipe used as environment enriching in PVC group. (B) - Cardboard cylinder produced commercially used as environmental enriching in cardboard roll group.

2.2 Parent evaluation

2.2.1 Reproductive performance

The animals were mated as monogamic couples avoiding consanguinity. In this system, the male remains with the same female throughout reproductive life.

The couples were observed daily for births during a period of five months (153 days). The day of birth was counted as day 0; on day 1, the number of pups per dam was counted, sexed, animals were individually weighed and litters culled to eight pups, four males and four females. The surplus animals were euthanized by decapitation shortly after birth. Moreover, the number of litters and occurrence of cannibalism was monitored daily after each birth. The parturition interval was recorded as the number of days between the first birth and second birth, the second and third birth, third and the fourth birth and the fourth and fifth birth for each group. Any couples that had cannibalized two consecutive litters and did not procreate during the first three months of observation were eliminated from the experiment being euthanized by exposure to

isoflurane in oxygen (induction 5%, 2 L/min) for 10–15 mins in an induction chamber until the confirmation of death. Cannibalism means eating all or part of an individual of the same species (Zarrow *et al.* 1972).

2.2.2 Blood Sample and corticosterone assay

Blood samples were collected to measure the corticosterone levels of the male and female progenitors at the end of the experiment (day 153). Collections were performed between 11 and 12 a.m., when plasma hormone concentrations are relatively low (Cymerblit-Sabba *et al.*, 2013). The animals were exposed to isoflurane in oxygen (induction 5%, 2 L/min) for 5 min in an induction chamber until the animals were completely anaesthetized. After that, blood samples were collected by cardiac puncture causing death of the animal. A volume of 1.0 to 2.0 mL of blood was collected in 2 mL centrifuge tubes containing heparin. Heparinized blood samples were centrifuged (15 min, 3240 rpm, 20 °C); plasma was isolated and stored at - 80 °C until assayed.

Hormonal determinations were carried out in duplicate, with a minimal total number of 12 samples per group. The assays were conducted by the Clinical Laboratory of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Samples were diluted and corticosterone levels determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturers' protocol (Corticosterone EIA Kit Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA).

2.3 Offspring evaluation

After weaning, all females born from the first, second and last litter for all groups were housed, four animal per cage, keeping the group/EE the same as their parents, when they were designated to superovulation and collection of oocytes. Moreover, 30 males from the first litter (10 males randomly selected from each group) and 30 males from the last litter (10 males randomly selected from each group) were housed, four animal per cage, keeping the group/EE the same as their parents until day 60 when

they underwent behavioral tests. The rest were euthanized immediately after weaning by exposure to isoflurane in oxygen (induction 5%, 2 L/min) for 10–15 mins in an induction chamber until the confirmation of death.

2.3.1 Weight gain of offspring

The offspring were individually weighed on the day 1 and at weaning at day 21. The final weight gain was determined by the difference between the final and initial weight of the animals in grams.

2.3.2 Cumulus-Oocyte Complexes collection and evaluation

Females intended for superovulation were treated with intraperitoneal injection of 20 UI eCG (Folligon, Intervet, Boxmeer, The Netherlands) and after 48 hours, were euthanized with isoflurane vapor overdose. Immediately after euthanasia, the ovaries were removed from the abdominal cavity of each female as described in Alcoba et al. (2013) and Paim et al. (2015). Briefly, the ovaries were maintained at 37 °C in modified PBS (Whittingham, 1971) until the moment of scraping. Then, the ovaries were transferred to a plastic Petri dish containing modified PBS supplemented with 2% FBS and their cortexes sliced using a scalpel blade to release COCs into the medium. COCs morphologic evaluation was accomplished by the observation of cumulus cell aspect and ooplasm uniformity under a stereomicroscope (Meiji EMZ 13TR, Meiji Techno Co, Saitama, Japan). COCs were selected and placed in a Petri dish containing manipulation medium M2 (Quinn et al., 1982). We classified the COCs into four groups: (1) COCs that presented homogeneous ooplasm and various layers of surrounding cumulus cells which showed a high degree of compaction; (2) COCs with homogeneous ooplasm, showing fewer layers and less compacted cumulus cells; (3) COCs that presented more heterogeneous ooplasm, with some degree of granulation, very few or no layers of surrounding cumulus cells with no degree of compaction; and (4) COCs with unusual shapes and very heterogeneous ooplasm, presenting no layers of surrounding cumulus cells (Paim et al., 2015). The COCs were classified according

to their developmental competence, so the COCs grade, 1, 2 and 3 were considered competent, in contrast the COCs grade 4 were considered degenerated.

2.3.3 Behavioral testing

All behavioral experiments took place between 09:00 h and 12:00 h. On the day of the test, the animals were taken to the testing room 15 minutes prior to testing for acclimatization. Both the open field test and elevated plus maze apparatuses were sanitized with alcohol prior to the next animal performing the test. After the tests, males were euthanized using the same protocol described above.

2.3.3.1 Elevate plus maze

The EPM performance evaluation was conducted according to Li et al. (2016). The apparatus was composed of a central part (5 x 5 cm), two opposing open arms (20 x 5 cm) and two opposing enclosed arms (5 x 5 x 15 cm). The maze was made of brown-painted wood, elevated at a height of 50 cm. The test lasted 5 minutes long. Rats were initially placed on the center platform facing a corner, allowing equal choice of entering an open or a closed arm. The time spent on the open and closed arms, the entries into the arms and the total distance travelled were monitored, as well as the number of "rearing" (getting up on two legs), and fecal boli. Entry into an arm was defined as entry with all four paws into the arm.

2.3.3.2 Open field

The OFT performance evaluation was conducted according to Li et al. (2016). Animals were placed in a circular arena divided into 25 quadrants and observed for 5 minutes. Latencies before leaving the initial part was noted, together with the total number of fields crossed, "rearing", "grooming" (self-cleaning), number of fecal boli and immobility periods were also noted.

2.4 Statistical analysis

All the variables with normal distribution (weight gain, number of pups/litter, parturition interval) were analyzed using ANOVA, with post-hoc multiple comparisons of means adjusted with the Bonferroni method when necessary. Normality was tested

with the Kolmogorov-Smirnov test. Behavioral tests and measures of corticosterone levels were analyzed non-parametrically using the Kruskal Wallis non-parametric test. The number of litter and quantity and morphological classification of cumulus-oocyte complexes were analyzed using the Chi-square (X^2) test, supplemented by adjusted residual calculation, when statistical differences were observed. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$. Data were analyzed using SPSS version 21 software.

3. Results

Two couples from the control group had to be removed from the experiment; one was due to cannibalism of two litters and the other for failure to procreate during the first three months of observation. In the PVC group, one mother died for unknown reasons after the third gestation, so the male of this couple was euthanized.

3.1 Parent evaluations

3.1.1 Reproductive performance

Two others mothers from the control group cannibalized one litter each, and we observed one case of cannibalism in PVC group. In all cases of cannibalism, the mother ate all of the pups before 4 days post-birth. In the cardboard roll group, we did not observe cannibalism.

Regarding the number of litters/group, we expected that all couples had five litters each during the experiment. Therefore, we found statistical differences between the groups: in the control group six couples out of a total of eight couples had five litters (30/40; 75%). In the PVC group, seven couples a total of nine couples had five litters (35/45; 77%); and in the cardboard roll group, all 10 couples had five litters (50/50; 100%) ($p = 0.001$), showing a higher rate compared to other groups during the five months of observation. The data are shown in Table 1.

Table 1. Number of expected litters *versus* obtained litters per group.

Group	Couples	Expected Litters	Obtained Litters	
	N	N	N	%
Control	8	40	30 ^B	75
PVC	9	45	35 ^B	77
Cardboard Roll	10	50	50 ^A	100

%= relation between obtained litters and expected litters.

Obtained litters was counted just the couples who had five litters.

Superscripts A and B indicate statistically significant differences among the groups.
p=0.001.

3.1.2 Number of pups born per litter

In total, 1.280 pups were born in this experiment, 338 in control group, 452 in PVC group and 490 in cardboard roll group. Despite this visual difference, statistical analysis did not show significant differences between the groups. Table 2 shows the mean and standard deviation of number of pups born per litter and group.

Table 2. Number of pups born per litter and group.

Groups	N	Litter 1	Litter 2	Litter 3	Litter 4	Litter 5
Control	8	9.5 (±2.8)	9.0 (±2.8)	9.7 (±2.6)	9.1 (±4.1)	8.0 (±3.5)
PVC	9	10.5 (±2.5)	9.8 (±2.1)	10.7 (±2.7)	9.3 (±3.2)	8.7 (±2.3)
Cardboard Roll	10	10.2 (±1.7)	8.2 (±1.9)	11.4 (±3.3)	10.3 (±4.5)	8.7 (±3.8)

N: Number of couples (breeders) per group. Data showed as mean and standard deviation.

3.1.3 Parturition interval

The results of parturition interval did not show significant differences between the three groups. The data are shown in Table 3.

Table 3. Parturition interval in days between the groups.

Group	Parturition interval			
	Parturition 1–2	Parturition 2–3	Parturition 3–4	Parturition 4–5
Control	27.7 (± 8.0)	24.6 (± 1.6)	32.2 (± 11.0)	25.3 (± 1.5)
PVC	34.2 (± 13.3)	25.9 (± 1.5)	27.4 (± 6.0)	26.0 (± 2.5)
Cardboard Roll	27.0 (± 6.3)	25.0 (± 0.9)	25.5 (± 0.9)	26.5 (± 3.2)

Data showed as mean and standard deviation. Parturition interval in days between litters 1 and 2, 2 and 3, 3 and 4, 4 and 5 for each group.

3.1.4 Corticosterone assay

No significant differences were found in the results of corticosterone levels between the three groups. The median and interquartile range of corticosterone in males, with levels presented in ng/mL were: control group 151.1 (112.2–167.3); PVC group 152.1 (144.7–225.6); cardboard roll group 190.0 (135.4–306.7) ($p = 0.325$). In the females: control group 214.9 (125.4–287.5); PVC group 255.4 (150.6–401.0) and cardboard roll group 209.7 (169.2–410.9) ($p = 0.728$).

3.2 Offspring evaluation

3.2.1 Body weight gain

The results in Figure 2 shows the differences in weight gain of males and females between the groups. The results revealed that the males in the cardboard roll group had a significantly higher weight gain ($43.6 \text{ g} \pm 6.5 \text{ g}$) compared to the PVC group ($41.9 \text{ g} \pm 6.4 \text{ g}$) ($p = 0.008$), but there was no significant difference with the control group ($42.2 \text{ g} \pm 6.3 \text{ g}$). There was no significant difference between groups in body weight gain of females. The mean and standard deviation of weight gain in the females in the groups were: control ($40.7 \text{ g} \pm 5.6 \text{ g}$), PVC ($40.5 \text{ g} \pm 5.4 \text{ g}$), cardboard roll ($41.3 \text{ g} \pm 6.9 \text{ g}$) ($p = 0.351$).

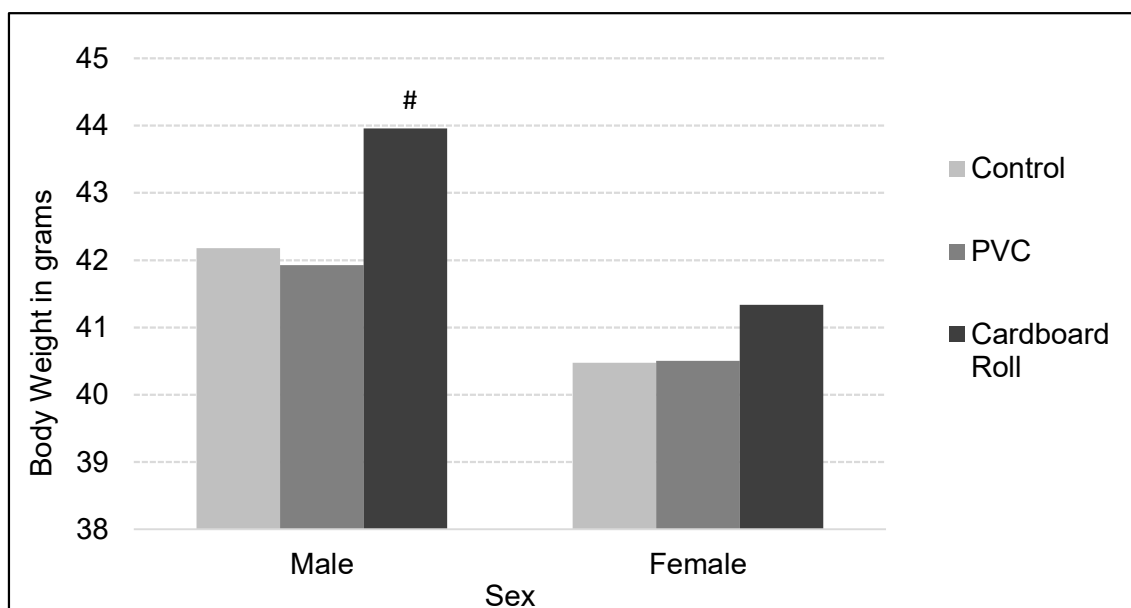


Figure 2. Body weight gain (g) of males and females, as expressed by the difference in individual weights between the first day of life and day 21.

[#] significant difference compared to PVC group ($p=0.008$).

3.2.2 Quantity and morphological classification of cumulus-oocyte complexes (COCs)

A total of 253 animals were used in this step of the study. The average age of the female rats was 31.2 ± 2.48 days old (mean $\pm$ SD) and 8.518 COCs were collected (2.535 in the control group; 2.821 in the PVC group and 3.162 in the cardboard roll group).

We found significant differences in the quantity of COCs grade 4. The control group had statistically higher rates compared to the enriched groups (225/2535; 8.9%). These data are summarized in Table 3. At the same time that the enriched groups had statistically higher rates of competence COCs (grade 1, 2 and 3) (PVC- 2.650; Cardboard roll- 2.992) when comparing to the control group (2.310) $p=0.001$.

Table 4. Quantity and morphological classification of cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained from *Rattus norvegicus* born from the first, second and last litter.

Group	N	Morphological Classification				Total COCs
		Grade 1 n (%)	Grade 2 n (%)	Grade 3 n (%)	Grade 4 [*] n (%)	
Control	76	252 (9.9)	1724 (68.0)	334 (13.2)	225 ^A (8.9)	2535
PVC	88	313 (11.1)	1985 (70.4)	352 (12.5)	171 ^B (6.1)	2821
Cardboard Roll	89	349 (11.0)	2202 (69.4)	441 (13.9)	170 ^B (5.4)	3162

* p=0,001.

N = Total number of female born from the first, second and last litter per group.

n (%): Total number and percentage of oocytes collected during the experiment by group.

Superscripts A and B indicate statistically significant differences among the groups.

3.2.3 Behavior testing

No significant differences were found in either the open field test or the elevate plus maze test between the three groups for all variables analyzed.

4. Discussion

A good morphological classification and quantity of COCs obtained from females is a crucial point for research in the embryology field and consequently will improve reproductive performance in a breeding system. It is already known that most of the research involving animal reproduction and embryology used only COCs presenting cumulus oophorous compact and homogeneous cytoplasm. Our results, shown in Table 4, demonstrate that the control group had a higher number of degenerate COCs (grade 4) when compared to the enriched groups. At the same time that the enriched groups had a higher number of COCs with better developmental competence, when comparing to control group. It seems that, in this case, an improvement in the environment influenced the quality of female gametes, agreeing with Meldrum et al. (2016), who showed that adverse environments have harmful effects on gametes in humans. No similar study was found with which to compare our results in animals. However, for laboratory animals, research shows that complex environments are able to influence socio-sexual responses involved in reproduction

(Carlstead and Shepherdson, 1994). This adaptation of the animal, modulated by the complexity of the environment, brings about typical behaviors and endocrine satisfactory and functional changes that allow a better reproductive performance (Carlstead and Shepherdson, 1994). Besides this, it is known that psychologic stress may reduce oocyte competence by shifting blood flow away from the ovary as part of the classic “fight or flight” response, and methods to reduce stress, like the use of EE, can improve pregnancy success (Meldrum et al., 2016).

Although we have found an improvement in the quality of COCs in the enriched group, we did not detect a significant difference in the number of newborns or a better result in parturition interval in the EE groups (Tables 2 and 3). Agreeing with Carvalho et al. (2009) and Baumans et al. (2010) who noted that the used for EE did not cause any ovulatory stimulation that could lead to a higher number of pups per litter either a decrease in parturition interval. However, according to the authors, this is no reason to deprive the animals from an EE, where they can guarantee health and well-being and develop their natural instinctive behavior.

In relation of weight gain, Figure 2 shows that the males from the cardboard roll group differ from the males from the PVC group. The increase in weight gain in the cardboard roll group can be compared to Coimbra et al. (2014) who observed there was a greater total duration of breastfeeding in enriched groups. Thus, they concluded that the presence of structure modulates the type of parental care, and that breastfeeding can be considered the item most relevant, because it is directly associated with the growth and development of offspring. However, the results about the effects of EE on weight gain is not fully understood. Van de Weerd et al. (1997) assumed that the heat loss of enriched mice was reduced because of nesting material, accounting for the fact that animals consumed less food. In addition, Tsai et al. (2003), found significantly higher food intake in non-enriched groups, adding that heat loss reduction may not be the only reason; other factors, such as non-enriched mice spending more time playing with food and having no incentive to move and expend

energy may cause a weight gain. Furthermore, some authors believe that this variation in results suggests that the effects of enrichment may be influenced by the type of enrichment, the duration of experiments, and the sex and the strain of examined animals (Tsai et al., 2002). As expected, females were significantly lighter than males in weight gain (Lopez and Laber, 2015).

However, Reinhardt and Reinhardt (2006) defend the proposition that EE reduces the rate of infanticide, cannibalism, and improves social behavior with the group. In the control group we observed three cases of cannibalism. In the PVC group, just one mother has cannibalized her litter and in the cardboard roll group, there was no cannibalization, in agreement with previous findings. In addition, we noticed that the cardboard roll group was the only one in which all couples had five litters. Indeed, a review by Simpson and Kelly (2011) noted that several researchers believe that EE appears to be effective in reducing stressful conditions, abnormal behaviors and in improving reproduction in different species.

This difference in results between the two types of enrichment used in the experiment can be explained by the fact that every time that the cardboard roll was chewed, another one was introduced, increasing the stimulus, while the PVC apparatus was only sanitized and reattached. In a review, Simpson and Kelly (2011) said that in most EE protocols the objects have to be changed or moved around a number of times each week to maintain the novelty of the environment. Therefore, this fact probably contributed to a decrease in the occurrence of cannibalism, an increase in the number of litters, and improvement in maternal care by the increase in breastfeeding with consequent larger weight gain of offspring.

Our results in the EMP and OFT behavioral tests did not show any significant differences among the three groups, disagreeing with the majority of articles described in the Fox et al. (2006) and Simpson and Kelly (2011) reviews. These authors reported that EE has been shown repeatedly to increase the number of open arm entries and time spent in open arms in the EMP, indicating reduced anxiety. A factor analysis study

using the OFT confirmed that EE had an anxiolytic effect. The review of Simpson and Kelly (2011) explains that in the OFT a number of authors have shown EE to habituate more rapidly than controls. This appears to be a relatively consistent finding and was found when various protocols were employed. The lack of significant differences between groups in our experiment may be accounted for by the variable impact EE has on different strains (Van de Weerd et al., 1994; Tsai et al., 2002) and perhaps if we had used a larger sample we might have been able to detect any differences between the groups.

Another parameter for the evaluation of physiological indicators of stress level is glucocorticoids measures (Fox et al., 2006). We note in our results that females had greater plasma corticosterone levels than males. This is thought to be due to ovarian hormones and the oestrous cycle of rats (Simpson and Kelly, 2011). However, there is not yet a consensus on the effects of EE on plasma corticosterone level. Evidence suggests that EE renders the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis response more adaptive and efficient (Mohammed et al., 1993; Larsson et al., 2002). EE may decrease emotional reactivity by lowering corticosterone levels. However, researchers disagree on the effect of EE on stress hormones. While some studies have found that EE decreased resting corticosterone levels (Belz et al., 2003) or following exposure to stressors (Roy et al., 2001; Welberg et al., 2006), others have found that resting levels in EE animals did not differ from those of non-enriched controls (Van de Weerd et al., 1997; Pham et al., 1999, Roy, et al., 2001), agreeing with our findings, or that EE animals had higher basal levels of corticosterone (Marashi, et al., 2003; Benaroya-Milshtein et al., 2004; Moncek et al., 2004). Pronounced variability in enrichment protocols may account for some of the inconsistencies noted in the effects of EE on behavior and physiology (Roy et al., 2001; Belz et al., 2003).

However, even if some occasional inconsistencies exist on reproductive performance response to the use of EE, most authors cited above advocate the use of EE because the benefits far outweigh the lack of results.

5. Conclusion

To our knowledge this is the first study that explores the effects of EE in the COCs in rats, and our result suggest that the use of a cardboard roll and PVC tube can increase the oocyte competence and decrease the number of degenerated oocytes. Additionally, our findings show no cases of cannibalism and a larger number of deliveries in the cardboard roll group in agreement with some studies that suggest that EE causes reproductive improvement and decreases the chances of cannibalism. Therefore, the used of both environmental enrichment brought some positive outcome for the reproductive parameters evaluated, and does not negatively impact reproductive success.

Conflict of interest

All authors declare that they have no conflict of interests.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Alcoba, D.D., da Rosa Braga, B.L., Sandi-Monroy, N.L., Proença, L.A., Felix Lopes, R.F., de Oliveira, A.T., 2013. Selection of *Rattus norvegicus* oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining. *Zygote* 21, 238–245.
- Baumans, V., Van Loo, P.L., 2013. How to improve housing conditions of laboratory animals: the possibilities of environmental refinement. *Vet J* 195, 24–32.
- Baumans, V., Van Loo, P.L., Pham, T.M., 2010. Standardisation of Environmental Enrichment for Laboratory Mice and Rats: Utilisation, Practicality and Variation in Experimental Results. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 37, 101–114.
- Belz, E.E., Kennell, J.S., Czambel, R.K., Rubin, R.T., Rhodes, M.E., 2003. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 76, 481–486.
- Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., Yaniv, I., Pick, C.G., 2004. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates

- stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* 20, 1341–1347.
- Carlstead, K., Shepherdson, D., 1994. Effects of environmental enrichment on reproduction. *Zoo Biology* 13, 447–458.
- Carvalho, A.F., Araújo, A.J., Farias, D.F., Rocha-Bezerra, L.C., Cavaleiro, M.G., 2009. Development and reproductive performance of Swiss mice in an enriched environment. *Braz J Biol* 69, 153–160.
- Coimbra, F.C., Maroni, F.T., Carvalho, T.B., 2014. Physical enrichment affects indicators of welfare in mice (*Mus musculus*). *RESBCAL*, São Paulo, 2, 195–205.
- Crofton, E.J., Zhang, Y., Green, T.A., 2015. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neurosci Biobehav Rev* 49, 19–31.
- Cymerblit-Sabba, A., Lasri, T., Gruper, M., Aga-Mizrachi, S., Zubedat, S., Avital, A., 2013. Prenatal Enriched Environment improves emotional and attentional reactivity to adulthood stress. *Behav Brain Res* 241, 185–190.
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.G., Buchner, A., 2007. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39, 175–191.
- Garbin, L.C., Faleiros, R.R., Lago, L.A., 2012. Environmental enrichment of rodents utilized for animal experimentation: literature review, *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, 153–161.
- Gilchrist, R.B., Lane, M., Thompson, J.G., 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 14, 159–177.
- Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67, 6–15.
- Larsson, F., Winblad, B., Mohammed, A.H., 2002. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 193–207.
- Li, K.A., Lund, E.T., Voigt, J.P., 2016. The impact of early postnatal environmental enrichment on maternal care and offspring behaviour following weaning. *Behav Processes* 122, 51–58.
- Lopez, M.F., Laber, K., 2015. Impact of social isolation and enriched environment during adolescence on voluntary ethanol intake and anxiety in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 148, 151–156.
- Marashi, V., Barnekow, A., Ossendorf, E., Sachser, N., 2003. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav* 43, 281–292.
- Marashi, V., Barnekow, A., Sachser, N., 2004. Effects of environmental enrichment on males of a docile inbred strain of mice. *Physiol Behav* 82, 765–776.
- Meldrum, D.R., Casper, R.F., Diez-Juan, A., Simon, C., Domar, A.D., Frydman, R., 2016. Aging and the environment affect gamete and embryo potential: can we intervene? *Fertil Steril* 105, 548–559.

- Mohammed, A.H., Henriksson, B.G., Söderström, S., Ebendal, T., Olsson, T., Seckl, J.R., 1993. Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res* 57, 183–191.
- Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B.B., Jezova, D., 2004. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol* 16, 423–431.
- Paim, L.M., Gal, L.L., Lopes, R.F., Oliveira, A.T., 2015. Vitrification of *Rattus norvegicus* immature cumulus-oocyte complexes using hyaluronic acid. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 51, 995–1002.
- Peña, Y., Prunell, M., Dimitsantos, V., Nadal, R., Escorihuela, R.M., 2006. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behav Brain Res* 174, 181–187.
- Pham, T.M., Ickes, B., Albeck, D., Söderström, S., Granholm, A.C., Mohammed, A.H., 1999. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience* 94, 279–286.
- Pizzutto, C.S., 2009. O enriquecimento ambiental como ferramenta para melhorar a reprodução e o bem-estar de animais cativos, In: Sgai, M.G.F.G., Guimarães, M.A.B.V. (Eds.), *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, pp. 129–138.
- Quinn, P., Barros, C., Whittingham, D.G., 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 66, 161–168.
- Reinhardt, V.; Reinhardt, A. 2006. Variables, refinement and environmental enrichment for rodents and rabbits kept in research institutions—making life easier for animals in laboratories. *Make life easier for animals in laboratories*. Animal Welfare Institute, Washington, 21–40.
- Roy, V., Belzung, C., Delarue, C., Chapillon, P., 2001. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol Behav* 74, 313–320.
- Shair, H.N., Nunez, Y., Osman, M.M., 2012. Enrichment materials do not negatively affect reproductive success and offspring survival and weight in mice. *Lab Anim (NY)* 41, 14–19.
- Simpson, J., Kelly, J.P., 2011. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res* 222, 246–264.
- Sorensen, J.T., Fraser, D., 2010. On-farm welfare assessment for regulatory purposes: Issues and possible solutions, *Livestock Sci*, 1–7.
- Tsai, P.P., Pachowsky, U., Stelzer, H.D., Hackbarth, H., 2002. Impact of environmental enrichment in mice. 1: effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Lab Anim* 36, 411–419.
- Tsai, P.P., Stelzer, H.D., Hedrich, H.J., Hackbarth, H., 2003. Are the effects of different enrichment designs on the physiology and behaviour of DBA/2 mice consistent? *Lab Anim* 37, 314–327.
- Van de Weerd, H. A., Baumans, V., Koolhaas, J. M., van Zutphen, L. F. (1994) Strain

specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *J Exp Anim Sci* 36(4–5), 117–127.

Van de Weerd, H.A., Van Loo, P.L., Van Zutphen, L.F., Koolhaas, J.M., Baumans, V., 1997. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Lab Anim* 31, 133–143.

Welberg, L., Thrivikraman, K.V., Plotsky, P.M., 2006. Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats. *Psycho neuroendocrinology* 31, 553–564.

Wei, Y., Yang, C.R., Wei, Y.P., Ge, Z.J., Zhao, Z.A., Zhang, B., Hou, Y., Schatten, H., Sun, Q.Y., 2015. Enriched environment-induced maternal weight loss reprograms metabolic gene expression in mouse offspring. *J Biol Chem* 290, 4604–4619.

Whittingham, D.G., 1971. Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil Suppl* 14, 7–21.

Zarrow, M. X., Eleftheriou, B. E., Denenberg, V. H. 1972. Pheromonal facilitation of HCG-induced ovulation in different strains of immature mice. *Biol. Reprod.* 6, 277.

5 Conclusão

A partir dos resultados obtidos foi possível observar uma melhora no desempenho reprodutivo dos animais pertencentes aos grupos enriquecidos. Nestes grupos, o número de oócitos degenerados foi menor e o número de oócitos viáveis foi maior quando comparado ao grupo controle. Além disso, observamos um maior número de partos por fêmea e ausência de canibalismo materno no grupo rolo de papelão. Portanto, o uso de enriquecimento ambiental trouxe resultados positivos para os parâmetros reprodutivos analisados.

Futuros experimentos são necessários para comprovar a eficácia do uso de EA analisando principalmente outros aspectos do sistema reprodutor feminino, como avaliação no crescimento e desenvolvimento embrionário e também sobre os gametas masculinos.

Como este foi um experimento pioneiro na avaliação do uso do EA sobre a quantidade e classificação morfológica dos CCOs ainda são necessários experimentos adicionais para definir um protocolo consistente de EA. Sabe-se que a rotação/introdução de um novo EA (estímulo novo) traz benefícios aos animais, porém, muitas vezes faltam recursos financeiros e de pessoal para que a introdução de programas de enriquecimento ambiental mais complexos seja levada adiante.

Finalmente, os resultados do presente trabalho foram obtidos com a utilização de ratos da linhagem Wistar, sendo que diferentes linhagens podem responder diferentemente frente as mesmas metodologias aplicadas.

CERTIFICADO DE EDIÇÃO CAMBRIDGE PROOFREADING



EDITORIAL

CERTIFICATE

Authors: Joana Fisch Iaskara Vieira de Oliveira Juliana Fank Gomes, Marília Remuzzi Zandoná Eliana Franco Lopes, Fernanda Bastos de Mello Alexandre Tavares Duarte de Oliveira	Document title: "Effects of environmental enrichment on reproductive performance and quantity and morphology of Cumulus-Oocyte Complexes obtained from Rattus norvegicus females"	Date Issued: 29th Aug 2016
--	---	--------------------------------------



This document certifies that the above manuscript was proofread and edited by Cambridge Proofreading LLC.

This document certifies that the above manuscript was proofread and edited by Cambridge Proofreading Worldwide LLC. The document was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of our academic editors. The editor endeavoured to ensure that the author's intended meaning was not altered during the review. All amendments were tracked with the Microsoft Word 'Track Changes' feature. Therefore, the authors had the option to reject or accept each change individually.

Kind regards,
Cambridge Proofreading



Cambridge Proofreading Worldwide LLC is a registered company headquartered in Chicago, Illinois, USA with a global presence. All of our editors are native speakers from USA and the UK. Our Certificate of Good Standing can be found in the Illinois state business database.

REGRAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA APPLIED ANIMAL BEHAVIOUR SCIENCE

INTRODUCTION

Types of paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Letters to the Editor
4. Book Reviews

Original Research Papers should report the results of original research on topics that are within the scope of the journal (<http://www.elsevier.com/locate/applanim>). The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be spontaneously submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to:

Dr. Bonne Beerda e-mail: bonne.beerda@wur.nl

Dr. Bas Rodenburg e-mail: bas.rodenburg@wur.nl

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

M. Mendl

Department of Clinical Veterinary Science

University of Bristol Langford House

Langford BS40 5DU

UK

e-mail: mike.mendl@bris.ac.uk

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Policy and ethics

Animal Experimentation

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL:

http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guiding_Principles_2012.pdf

Authors may also wish to refer to the ethical guidelines published on the website of the International

Society for Applied Ethology <http://www.applied-ethology.org/ethicalguidelines.htm>, or read the

following article: Sherwin, C.M., Christiansen, S.B., Duncan, I.J., Erhard, H., Lay, D., Mench, J., O'Connor, C., and Petherick, C. (2003), 'Guidelines for the ethical use of animals in applied animal behaviour research', *Applied Animal Behaviour Science*, 81: 291-305. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult

<http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>. For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our

green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and begins from the publication date of the issue your article appears in. This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information. In addition, the International Society for Applied Ethology can help members with the preparation of manuscripts for publication in *Applied Animal Behaviour Science* (and other English-language journals). Non-members of this Society will first need to join to gain access to this service: contact the Membership Secretary, Hans Spoolder, e-mail: hans.spoolder@wur.nl. Members should send requests for assistance to Ngaio Beausoleil, Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences, Massey University, Private Bag 11-222, Palmerston North, New Zealand 4442, E-mail: N.J.Beausoleil@massey.ac.nz, Fax number: +64 6 350 5714. Include the paper title, authors, contact address (including fax and e-mail if possible), key words and the journal to which the paper will be submitted. Do not send the manuscript. You will be sent the details of someone who will help you with the English of your paper. The helper should be acknowledged in your paper, but will not expect to be included as an author.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/applan/>

PREPARATION

The use of English, punctuation and grammar should be of a sufficient high standard to allow the article to be easily read and understood. Do not quote decimals with naked points (e.g. use 0.08, not .08). Times of day should be in the format 10:00 h. Numbers less than 10 should be text, unless they are followed by a unit of measurement or are used as designators e.g. seven pigs from Group 3 were each trained for 7 days, with three sessions each lasting 3 min. Numbers greater than nine should be written as numerals.

Article Structure

Manuscripts in general should be organized in the following order:

- Title (should be clear, descriptive and not too long)

- Name(s) of author(s) - we would like to publish full first names rather than initials, and would appreciate it if you would provide this information

- Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

- Abstract

- Keywords (indexing terms), maximum 6 items

- Introduction

- Material studied, area descriptions, methods, techniques and ethical approval

- Results

- Discussion

- Conclusion

- Acknowledgment and any additional information concerning research grants, etc.

- References

- Tables

- Figure captions

- Tables (separate file(s))

- Figures (separate file(s)).

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text. Articles should not normally exceed 25 pages of text (11-point font, aligned left and double spaced) and contain a maximum of six or seven Tables and Figures in total.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 750 words (approximately three pages).

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. When locations are given, it should be remembered that this is an international journal and provide the state/county and country, or longitude and latitude for lesser-known locations. Full details of commercial products and technical equipment should be provided, as necessary, including name of the model, manufacturer and location of manufacture, and any Trademarks. As appropriate, a statement should be made that the work has received ethical approval or that the authors have read the policy relating to animal ethics and confirm that their study complies. Data collection and collation: units of all measures need to be specified; the experimental design should be explained together with an explanation of the experimental unit; the ways in which data are

derived must be specified (e.g. individual scores were summed for the four, 12-h periods and the mean used for the analysis); the methods used for determining the normality of distribution of the residuals and homogeneity of variances need to be specified; any transformations of data need to be described; statistical analyses need to be reported in full.

Results

This section should include only results that are relevant to the hypotheses outlined in the Introduction and considered in the Discussion. Present results in tabular or graphical form (see following sections) wherever possible. Text should explain why the experiment was carried out, and elaborate on the tabular or graphical data. Sufficient data should be presented so that the reader can interpret the results independently. If data require transformation to be suitable for parametric analyses, then due consideration needs to be given as to which and how data are presented in the manuscript. For example, putting error bars on graphs of the raw or back-transformed data is meaningless if analysis was performed on transformed data. To assist with interpretation of biological meaning, however, back-transformed means (but not errors) could be presented instead of/in addition to transformed data. In particular, statistical analyses should be complete and appropriate, and full details should be given either in the text, or in the Figures or Tables legends. Include the type of test, the precise data to which it was applied, the value of the relevant statistic, the sample size and/or degrees of freedom, and the probability level. Any assumptions that have been made should be stated. If in doubt, a statistical expert should be consulted.

Discussion

The discussion should interpret the results, and set them in the context of what is already known in the appropriate field. This section should normally start with a brief summary of the main findings.

The discussion should be focused and limited to the actual results presented, and should normally not exceed about 1500 words. All results presented in the Results section should be discussed (if they do not warrant discussion, they do not warrant inclusion) and there should be no presentation and discussion of results that have not been presented in the Results section (i.e. no new data presented in the Discussion). Any necessary extensive discussion of the literature should be placed in the Discussion, and not in the Introduction.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. It should provide a brief "take home" message and briefly outline the application/implications of the study's findings.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. As this is the most-read part of a paper, it is useful to provide some data and significance levels in the description of the main results. The Abstract should not be longer than 400 words.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name. Highlights are three to five bullet points that provide readers with a quick overview of the article.

These provide the context, core results and highlight what is distinctive about the work.

- Include 3 to 5 highlights.
- There should be a maximum of 85 characters, including spaces, per highlight.
- The core results only should be covered.

See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Nomenclature and Units

1. Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. 2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. 3.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed. Units and abbreviations should conform to the Systeme International d'Unites.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ¹⁸O. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.
- Figures and Tables to be uploaded as separate files while submitting manuscript.
- Tables to be sent as editable source files (.doc or .xls) with heading on it.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Figure captions should be understandable without reference to the main text. Figures should not duplicate results described elsewhere in the article.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules. Table captions should provide sufficient detail that the Table can be understood without reference to the main text.

Limitations

Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

- Figures and Tables to be uploaded as separate files while submitting manuscript.
- Tables to be sent as editable source files (.doc or .xls) with heading on it.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished

results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/downloads/styles>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/applied-animal-behaviour-science>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al.(2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci.Comm.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

References to books

If a book or monograph is cited as a source of specific information, then please give the relevant page(s).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word

Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and

to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
UFCSPA

A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

Projeto: 14-152

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

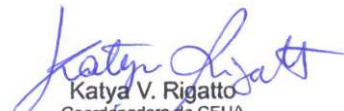
Pesquisadores:

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
FERNANDA BASTOS DE MELLO
JOANA FISCH

Título: EFEITO DO USO DE ENRIQUECEDORES AMBIENTAIS SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS WISTAR

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim com eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.

Porto Alegre, 12 de novembro de 2014.


Katya V. Rigatto
Coordenadora do CEUA
UFCSPA