



Efeito do Enriquecimento Ambiental a nível cognitivo em Murganhos “*Mus Musculus*”

Dissertação

Curso de Mestrado em Enfermagem Veterinária em pequenos Animais de Companhia

DANIEL JOSÉ ALMEIDA NOGUEIRA

Orientadores: Laura Hurtado

Elvas, 2024

DANIEL JOSÉ ALMEIDA NOGUEIRA

Efeito do Enriquecimento Ambiental a nível cognitivo em Murganhos “*Mus musculus*”

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em
(ENFERMAGEM VETERINÁRIA EM PEQUENOS ANIMAIS DE
COMPANHIA) conferido pelo Instituto Politécnico de Portalegre.

Orientador: Laura Hurtado

Arguente principal: Rui Patrício

Presidente do Júri: Carolina Silva

Classificação: 19 valores

Escola Superior de Biociências de Elvas

2024

Agradecimentos

Quero expressar um agradecimento sentido à minha família, cujo amor, apoio e compreensão foram a força motriz por trás de toda a minha jornada académica. Sem o vosso suporte inabalável, este caminho teria sido muito mais desafiante.

Aos meus estimados amigos, que estiveram ao meu lado nas horas de alegria e desafio, agradeço por cada momento partilhado e pela camaradagem que tornou esta jornada verdadeiramente memorável.

Um agradecimento especial à Professora Laura Hurtado, que aceitou a responsabilidade de orientar não apenas o meu trabalho final de licenciatura, mas também, três anos depois, a minha tese de mestrado. A sua dedicação e incentivo foram essenciais para moldar o resultado final desta investigação. Ao longo destes cinco anos, desde o início da licenciatura até à conclusão do mestrado, a professora Laura guiou o meu percurso académico com paciência, perícia e uma paixão contagiante pelo conhecimento.

Além disso, expresso o meu profundo agradecimento à Escola Superior Agrária de Elvas, que tem sido a minha segunda casa desde 2018. Agradeço não apenas pela qualidade académica, mas também pelo compromisso exemplar com o bem-estar dos animais envolvidos no estudo, garantindo cuidados veterinários de excelência.

Este é um capítulo significativo da minha vida académica, e é com profundo reconhecimento que expresso o meu agradecimento àqueles que tornaram possível alcançar este marco. Obrigado por fazerem parte da minha jornada e por contribuírem para o meu crescimento académico e pessoal.

Resumo

O enriquecimento ambiental é fundamental na promoção de uma qualidade de vida superior para os animais em cativeiro, destacando o impacto positivo que pode ter na saúde física e mental. Em cativeiro envolve a introdução de brinquedos, desafios alimentares, mudanças regulares no ambiente e adição de novos cheiros no habitat. Ao longo desta dissertação foram explorados com maior detalhe os efeitos do enriquecimento ambiental a nível cognitivo. Neste estudo, os animais incluídos foram da espécie *Mus musculus* nascidos em cativeiro e foram excluídos os que apresentavam problemas de saúde. A amostra (n=12) foi dividida em grupos. O grupo 1 (n=6) incluiu os animais que viveram num habitat com enriquecimento. O grupo 2 (n=5) incluiu os animais cujo habitat era desprovido de enriquecimento com exceção do social visto serem alojados em grupo. O 2A (n=1) é um subgrupo do grupo 2 composto por um sujeito que diferentemente do restante grupo viveu sem qualquer tipo de enriquecimento. A parte inicial do estudo foi dedicada à preparação da amostra. Numa segunda parte, este foi dividido em duas fases. Na fase 1, os animais foram observados de modo a recolher informações dos seus hábitos e comportamento. A observação dos sujeitos nos seus habitats teve como auxílio câmaras da marca *tp-link* que permitiu o registo de imagem tanto durante o dia como durante a noite devido a sua visão noturna. Na fase 2, cada sujeito foi submetido individualmente a dois desafios verificando-se o efeito que o enriquecimento ambiental ou a falta dele atuou nos animais em estudo. O grupo 2 registou menores tempos que os do grupo 1, sugerindo que o enriquecimento ambiental não teve qualquer efeito a nível cognitivo no grupo 1. No entanto, o grupo que beneficiou do enriquecimento mostrou-se mais saudável e exibiu comportamentos semelhantes aos que manifestaria na natureza.

Palavras-chave: Complexidade ambiental, Roedor, Comportamento

Abstract

Environmental enrichment is essential in promoting a higher quality of life for animals in captivity, highlighting the positive impact it can have on both physical and mental health. In captivity, it involves the introduction of toys, food-related challenges, regular changes in the environment, and the addition of new scents in the habitat. Throughout this dissertation, the effects of environmental enrichment on a cognitive level were explored in greater detail. In this study, the animals included were of the species *Mus musculus* born in captivity, and those with health issues were excluded. The sample (n=12) was divided into groups. Group 1 (n=6) included animals that lived in an enriched habitat. Group 2 (n=5) included animals whose habitat lacked enrichment, except for social enrichment since they were housed in groups. Subgroup 2A (n=1) consisted of a subject who, unlike the rest of the group, lived without any form of enrichment. The initial part of the study was dedicated to sample preparation. In the second part, the study was divided into two phases. In phase 1, the animals were observed to gather information about their habits and behavior. The observation of the subjects in their habitats was supported by TP-Link cameras, which allowed image recording both during the day and at night due to their night vision capability. In phase 2, each subject was individually subjected to two challenges, assessing the effect that environmental enrichment or the lack thereof had on the animals in the study. Group 2 recorded shorter times than Group 1, suggesting that environmental enrichment had no cognitive effect on Group 1. However, the group that benefited from enrichment was healthier and displayed behaviors similar to those exhibited in their natural habitat.

Keywords: Environmental complexity, Rodent, Behavior.

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

EV – Enfermeiro Veterinário

NAC – Novos Animais de Companhia

MV – Médico Veterinário

EA – Enriquecimento Ambiental

AL – Alimentar

Esc – Escavação

G – *Grooming*

IS – Interação Social

C. ninho – Construção ninho

CA – Comportamento Anormal

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

NV – Não Visível

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	iv
Índice Geral.....	v
Índice de Quadros.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
1. Introdução e Objetivos.....	I
1.1. Introdução.....	I
1.2. Objetivos.....	2
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Bem – Estar Animal.....	3
2.2. Enriquecimento Ambiental.....	9
2.3. Tipos de Enriquecimento Ambiental.....	9
2.4. Importância do Enriquecimento Ambiental.....	12
2.5. Patologias ou Distúrbios associados à falta de Enriquecimento Ambiental.....	13
2.6. Espécie em estudo.....	15
2.6.1. Características gerais.....	15
2.6.2. Alimentação.....	16
2.6.3. Características comportamentais.....	16
2.6.4. Sexagem.....	16
2.6.5. Características reprodutivas.....	17
2.6.6. Patologias e doenças parasitárias.....	18
2.6.7. A importância do murganho a nível científico.....	19
2.6.8. Perfil dos investigador.....	19
2.7. Bem – estar em <i>Mus musculus</i>	20
2.8. Enriquecimento Ambiental em <i>Mus musculus</i>	21
2.9. Patologias ou distúrbios associado à falta de Enriquecimento Ambiental em <i>Mus musculus</i>	22
2.9.1. Corticosterona e cortisol: Biomarcadores de stress em murganhos.....	23
2.10. Evolução do Enriquecimento Ambiental em murganhos.....	24
3. Material e Métodos.....	31
3.1. Objetivos do estudo clínico.....	31
3.2. Material.....	31

3.2.1. Desenho do estudo	31
3.2.2. Critérios de inclusão	33
3.2.3. Critérios de exclusão	33
3.2.4. Caracterização da amostra	33
3.3. Métodos	34
3.3.1. Formação dos grupos	35
3.3.2. Apresentação dos grupos	37
3.3.3 Habitat de cada grupo	41
3.3.4. Enriquecimento ambiental em cada grupo	42
3.3.5. Recolha de dados da fase I do estudo	44
3.3.6. Recolha de dados da fase II do estudo	47
3.3.7. Análise estatística dos dados	49
4. Resultados	50
4.1. Variação de peso	50
4.2. Variáveis estudadas na fase I	51
4.3. Variação dos hábitos diurnos e noturnos	57
4.4. Variáveis estudada na fase II	58
4.4.1. Desafio I	58
4.4.2. Desafio 2	59
5. Discussão	62
6. Conclusões	74
7. Bibliografia	75
Anexos	82
Anexo I - Parecer Orbea	83
Anexo II - Variação de peso individual	84
Anexo III - Tabela de recolha de dados comportamentais individuais e estatística descritiva dos mesmos	85
Anexo IV - Tabela de recolha de hábitos diurnos e noturnos individuais e estatística descritiva dos mesmos	86
Anexo V - Tabela de recolha dos tempos necessários para realização da prova individual e estatística descritiva dos mesmos	87

Índice de Quadros

Tabela 1 - O modelo dos cinco domínios.....	7
Tabela 2 - Classificação Taxonómica.....	15
Tabela 3 – Valores normais de referência de dados reprodutivos e crescimento em murganhos	18
Tabela 4 - Evolução do Enriquecimento Ambiental em murganhos ao longo dos anos.....	26
Tabela 5 - Enriquecimento ambiental presente em cada grupo em estudo.....	42
Tabela 6 - Média de peso por grupo das 14 pesagens realizadas (n12)	51
Tabela 7 - Avaliação do comportamento do grupo 1 (n6)	52
Tabela 8 - Avaliação do comportamento do grupo 2 (n5)	54
Tabela 9 - Avaliação do comportamento do grupo 2A (n1)	56
Tabela 10 - Avaliação dos hábitos diurnos e noturnos (n12).....	57
Tabela 11 – Avaliação do tempo do desafio 1	59
Tabela 12 – Avaliação do tempo do desafio 2	60
Tabela 13 - Pesos individuais da décima quarta semana de estudo da fase I do grupo 2. Circunferência a vermelho → peso final sujeito 11.....	64
Tabela 14 - Registo individual de horas de movimentos realizados no período diurno e noturno do grupo 1. Circunferência verde → sujeitos subordinados. Circunferência vermelha → sujeitos dominantes	67
Tabela 15 - Registo individual de horas de movimentos realizados no período diurno e noturno do grupo 2. Circunferência verde → machos. Circunferência vermelha → fêmeas.	68
Tabela 16 – Tempo individual do grupo 1 necessário para realização do desafio 1	68
Tabela 17 - Tempo individual do grupo 2 necessário para realização do desafio 1	69
Tabela 18 - Tempo individual do grupo 1 necessário para realização do desafio 2.....	70
Tabela 19 - Tempo individual do grupo 2 necessário para realização do desafio 2.....	70

Índice de Figuras

Figura 1 – 5 liberdades fundamentais que compõe o bem-estar animal	4
Figura 2 – Hierarquia de necessidade de Maslow.....	8
Figura 3 – Cinco tipos de EA, físico, cognitivo, sensorial, social e alimentar.....	11
Figura 4 – Reflexão sobre a metáfora da vida em gaiolas como a vida urbana para os humanos. À medida que é incorporado elementos de EA, aproximamo-nos à vida meio urbana e por fim rural	13
Figura 5 – Sexagem de murgancho com base na distância anogenital, que é o comprimento entre o ânus (seta preta) e a papila genital (seta vermelha). Os machos (A) têm uma distância anogenital maior em comparação com as fêmeas (B)	17
Figura 6 – As três atitudes que têm de estar presente em quem trabalhe diretamente com animais.....	19
Figura 7 – Princípio dos três Rs.....	20
Figura 8 - Dois murganchos com comportamento estereotipado. O da esquerda com saltos repetidos e o do lado direito a tentar sair entre as grades	22
Figura 9 - Murgancho com falta de pelo devido ao comportamento de <i>grooming</i> excessivo do companheiro.....	23
Figura 10 - A - gaiola padrão; B – gaiola com enriquecimento; C – gaiola de exercício e D – gaiola super enriquecida	25
Figura 11 – Desenho do estudo	32
Figura 12 – Sujeito 2 com lesão derivado de <i>grooming</i> excessivo e automutilação da cauda	34
Figura 13 – Nove murganchos recém-nascidos correspondentes à ninhada da fêmea I	34
Figura 14 – Passo a passo do procedimento cirúrgico orquiectomia em murganchos. A – Decúbito dorsal, B – Dissecção romba, C – Extração do cordão espermático, D – Sutura do cordão espermático, E – Sutura em U.....	37
Figura 15 – Gaiola desprovida de EA	38
Figura 16 – Composição grupo I	39
Figura 17 – Composição grupo 2	40
Figura 18 - Desenho completo e corte transversal representativo da gaiola com EA, realizado em Inkscape. 1 – gaiola, 2 – caixa organizadora 150l, 3 – Túnel, 4 – Cordas de trapilho.....	41
Figura 19 - Desenho completo e corte transversal representativo da gaiola sem EA, realizado em Inkscape	42
Figura 20 - Enriquecimento ambiental na gaiola do grupo I.....	43
Figura 21 – Enriquecimento ambiental na gaiola do grupo I.....	44
Figura 22 – Gaiola sem enriquecimento ambiental do grupo II	44
Figura 23 – Imagem registada pela câmara nº 3 em modo visão noturna	45

Figura 24 – imagens registadas pelas câmaras: nº1 (Grupo 1 parte inferior da gaiola), nº2 (Grupo 1 parte superior da gaiola), nº3 (Grupo 2) e nº4 (Grupo 2A)	46
Figura 25 – Notificação de movimento detetado da aplicação Tapo	46
Figura 26 – Tapete interativo	48
Figura 27 – Caixa cartão do tipo labirinto para averiguar a avaliação ao perigo de cada um dos estudados	48
Figura 28 - Atividade de escavação registado do sujeito 1 e 6	52
Figura 29 - Copula entre sujeitos 3 e 4	53
Figura 30 – Diagrama de caixas com valores de intervalo das variáveis AL, EA, Esc, G, IS e C. ninho (n6) Grupo 1	53
Figura 31 - Comportamento de barbeamento (<i>grooming</i> excessivo). Circunferência vermelha → lesão após sessão de barbeamento.....	54
Figura 32 - Comportamento estereotipado realizado pelo sujeito 11. Andar freneticamente à roda até cair.	55
Figura 33 – Diagrama de caixas com valores de intervalo das variáveis AL, G, IS, C. ninho e CA (n5) Grupo 2	55
Figura 34 - Desgaste da tinta na rede do habitat sem enriquecimento do sujeito 9	56
Figura 35 - Lesões dermatológicas causada por ácaros	57
Figura 36 - Diagrama de barras com valores das variáveis “Hábitos diurnos e noturnos” (n12)	58
Figura 37 – Gráfico do tempo necessário a cada indivíduo para realização do desafio 1	59
Figura 38 – Gráfico do tempo necessário a cada indivíduo para realização do desafio 1	60
Figura 39 - Comparação dos tempos necessários a cada indivíduo para realização dos desafios	61

I. Introdução e Objetivos

I.1. Introdução

A Enfermagem Veterinária é uma área relativamente recente que se tem revelado de extrema importância. Deste modo, o Enfermeiro Veterinário (EV) tem vindo a desenvolver conhecimentos em diversas áreas, nomeadamente a nível comportamental e cuidados de Novos Animais de Companhia (NAC).

A gestão do bem-estar e o enriquecimento ambiental (EA) são componentes essenciais dos cuidados veterinários preventivos (Pilny, 2015). Os pequenos mamíferos exóticos constituem um grupo diversificado de animais de companhia, com necessidades amplamente variadas em termos de cuidados, dieta e criação. Deste modo, o EA deve ir além do simples *design* da gaiola, de forma a proporcionar estimulação mental adequada, que responda às necessidades psicológicas de cada animal (Ratuski & Weary, 2022). Atender às exigências ambientais, dietéticas, de exercício e sociais dos animais é fundamental para assegurar a sua saúde e aumentar a sua resistência a doenças (Frohlich, 2020). O sucesso nesta abordagem depende, em grande parte, das visitas anuais ou semestrais de bem-estar ao veterinário, bem como do compromisso do tutor com os cuidados necessários já que a maioria das patologias presentes em NAC derivam de um mau manejo por parte dos tutores (Pilny, 2015).

O EA é uma ferramenta importante do bem-estar animal (Nawroth *et al.*, 2019). Refere-se às estratégias e práticas aplicadas em ambientes naturais ou em cativeiro para melhorar o bem-estar animal e estimular comportamentos inatos da espécie (Baumans, 2005). Em cativeiro, envolve a introdução de brinquedos, desafios alimentares, mudanças no ambiente, introdução de cheiros no ambiente e permitir interações sociais intraespecífico cujo espécies sejam de carácter social. Este pode ser dividido em vários tipos, sendo os principais o físico, cognitivo, social, sensorial e alimentar (Kempermann, 2019).

Ao longo desta dissertação, serão explorados e comparados os efeitos do EA a nível cognitivo na espécie *Mus musculus*, observando os sujeitos no seu habitat com o auxílio de alguns equipamentos de visualização, nomeadamente câmaras de vigilância que irão permitir o registo do comportamento dos sujeitos em estudo. Para além disso, os

animais irão ser submetidos a dois desafios para verificar se o EA presente na vida de uma dos grupos em estudo teve algum efeito nos animais.

1.2. Objetivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do EA a nível cognitivo mediante a criação de dois grupos, observando o comportamento ao longo de um período de tempo, permitindo uma recolha contínua de dados. Para além disso, desenvolveu-se dois desafios para comprovar se a presença ou ausência de EA teve algum efeito sobre os estudados.

Assim, apresentam-se três hipóteses:

- ❖ I: Os dois grupos em estudo não vão demonstrar uma diferença significativa entre eles.
- ❖ II: O grupo 2 irá demonstrar resultados de tempo inferiores ao grupo 1.
- ❖ III: O grupo 1 irá demonstrar resultados de tempo inferiores ao grupo 2.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Bem – Estar Animal

O bem-estar animal refere-se ao estado do animal, significando a forma como um animal lida com as condições em que vive. Um animal está em bom estado de bem-estar se, conforme indicado pelas evidências científicas, estiver saudável, confortável, bem nutrido, seguro, capaz de manifestar comportamento inato e se não sofrer de estados adicionais, como dor, medo e sofrimento. Um bom bem-estar animal requer prevenção de doenças e tratamento veterinário, abrigo adequado, manejo e nutrição (Mellor & Webster, 2014)

A capacidade de reconhecer e considerar às necessidades dos animais é essencial para lhes fornecer uma boa qualidade de vida e bem-estar geral. Essa capacidade é particularmente importante para animais que vivem em cativeiro e cuja inteligência requer uma maior preocupação por parte dos detentores. Infelizmente, os humanos muitas vezes não interpretam corretamente as necessidades dos animais porque tendem a confundi-las com suas próprias necessidades (Griffin *et al.*, 2023). Um exemplo dado por Maple *and* Perdue (2013) é que em contexto zoológico ou qualquer entidade que gere lucro o *design* passa à frente do bem-estar. O artigo baseia-se num estudo realizado por Hediger que destacou a relevância da qualidade do espaço versus quantidade. À medida que os zoológicos implementaram recintos mais naturalista, estes verificaram comportamentos inatos das espécies inclusive a nível intersocial.

Desde os primórdios do bem-estar animal, este é composto pelas Cinco liberdades fundamentais (figura 1) (Miller & Chinnadurai, 2023). Foi em 1965 que o relatório de Roger Brambell foi publicado. Trata-se de um documento fundamental na história do bem estar animal e é conhecido por introduzir o conceito das “Cinco liberdades” (Hampton *et al.*, 2023).

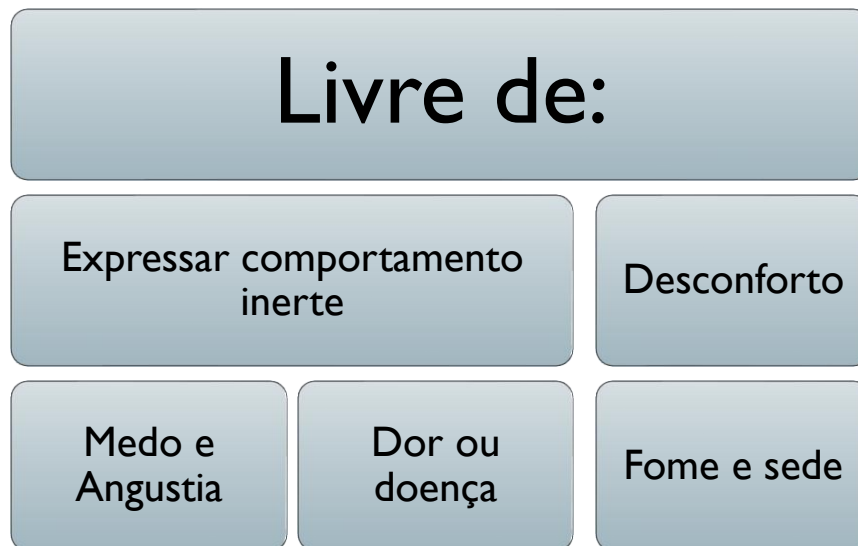


Figura I – Cinco liberdades fundamentais que compõe o bem-estar animal (Miller & Chinnadurai,2023).

O bem-estar animal evoluiu ao longo dos anos, demonstrando uma crescente preocupação com o tratamento ético dos animais em diferentes setores. A organização mundial de saúde animal desempenhou um papel fundamental na promoção de padrões internacionais para o bem-estar animal, influenciando as práticas adotadas (Mellor & Webster, 2014). Verificou-se uma tendência na conscientização e regulamentação mais rigorosa, com a possibilidade de inclusão de novos pontos para garantir o bem-estar dos animais. Mudanças legislativas e práticas de manejo têm sido implementadas para abordar questões específicas e garantir a melhoria contínua das condições de vida oferecida aos animais (Nawroth et al., 2019). A adição desses novos pontos verificam-se com maior ênfase em instituições zoológicas, onde têm a responsabilidade ética de proporcionar elevados níveis de bem-estar animal aos animais sob os seus cuidados. Um exemplo é o desenvolvimento de programas de monitoramento de bem-estar animal. O programa deve ser proativo para identificar áreas de melhoria contínua, bem como reativo para abordar quaisquer preocupações identificadas sobre o bem-estar dos animais. O programa deve ir além das cinco liberdades e utilizar ferramentas como o uso de perguntas para pesquisar possíveis preocupações com o bem-estar animal, por exemplo: “O animal consegue sentir-se seguro no abrigo oferecido?” (Miller & Chinnadurai, 2023).

Para avaliar e evitar a exposição dos animais a situações de bem-estar deficiente, é necessário compreender não só as suas necessidades e capacidades comportamentais,

mas também cognitivas. Assim, o conhecimento geral do comportamento da espécie envolvida assim como saber a percepção e interação que o animal tem com o seu habitat é de grande importância (Nawroth *et al.*, 2019). Por isso, Miller and Chinnadurai (2023) destacam que além dos programas de monitoramento, a gestão do bem-estar animal deve basear-se na ciência atual, incluindo, entre outras, cuidados e criação de animais, serviços veterinários, nutrição e investigação. O programa de gestão do bem-estar deve ser adaptativo, colocando em prática as descobertas científicas recentes. Além disso, reconhece-se que uma das ferramentas mais importantes no bem-estar animal é o EA. Proporcionar ambientes que estimulem os comportamentos naturais dos animais contribui significativamente para a sua saúde física e mental. Estratégias de enriquecimento, como oferta de espaços adequados, estímulos cognitivos e atividades recreativas, desempenham um papel crucial na promoção de uma vida mais saudável e feliz (Nawroth *et al.*, 2019). Em suma, o compromisso contínuo com o bem-estar animal envolve a adaptação constante às novas descobertas científicas, mudanças nas atitudes sociais e a implementação de políticas e práticas que assegurem uma convivência ética e responsável com os animais (Miller & Chinnadurai, 2023).

O modelo dos Cinco Domínios (Tabela 1) foi proposto há cerca de 30 anos como uma estrutura conceptual para simplificar as considerações sobre o bem-estar animal em animais de laboratório. Foi construído com base nos princípios do Relatório Brambell e no modelo das Cinco Liberdades (Mellor & Reid, 1994). Este modelo foi inicialmente concebido para avaliar o impacto de um experimento ou utilização proposta de animais, considerando todas as fontes de possível comprometimento do bem-estar, mais propriamente dito, o bem-estar negativo. O modelo dos Cinco Domínios assenta numa conceção de bem-estar animal baseada no estado afetivo, ou seja, nos “sentimentos”. O modelo propõe quatro domínios físicos/funcionais (nutrição, ambiente, saúde e comportamento, recentemente renomeado para “interação comportamental” (Hampton *et al.*, 2023) sendo o quinto domínio o chamado estado mental. A ideia básica é que o estado de bem-estar reflete a soma das experiências mentais do animal (Harvey *et al.*, 2022). Assim, o estado de bem-estar de um animal é uma função direta dos sentimentos do animal: o domínio mental. O modelo dos Cinco Domínios, por sua vez, interpreta as experiências dos animais como resultado de quatro outros aspetos da vida dos animais: o seu estado nutricional, o ambiente em que vivem, a sua saúde física e as suas oportunidades comportamentais (Mellor & Beausoleil, 2015). Em suma, o modelo

afirma que o bem-estar dos animais é determinado pela qualidade das suas experiências, e a nossa melhor evidência sobre essa qualidade advém dos outros quatro domínios. Subsequentemente atualizado, o modelo teve diversas manifestações desde a sua primeira concepção (Mellor, 2017) e foi recentemente ampliado para incorporar estados de bem-estar social positivos (Mellor & Beausoleil, 2015) e interações humano-animal (Mellor *et al.*, 2020).

Tabela 1 - O modelo dos cinco domínios (Mellor, 2017).

1.Nutrição		2.Meio ambiente		3.Saúde		4.Comportamento	
<u>Restrição</u>	<u>Oportunidade</u>	<u>Condições inevitáveis</u>	<u>Condições disponíveis</u>	<u>Presença de</u>	<u>Pouco ou nenhum</u>	<u>Exercício impedido por</u>	<u>Exercício através de</u>
Ingestão de água e alimento;	Água sempre disponível e fresca;	Extremos térmicos;	Termicamente tolerável;	Doença, lesão, mutilações	Lesão ou doença	Ambiente inadequado	Ambiente variado, novo e envolvente
Qualidade e variedade dos alimentos;	Dieta equilibrada e em quantidades ideais para cada espécie.	Substrato inadequado;	Substrato adequado	Falhas orgânicas	Funções orgânicas – funcionais;	Restrições à atividade	Desafios
Excesso de alimento;		Confinamento;	Espaço para movimentos livres;	Veneno	Consumo de veneno;	Restrições na atividade interativa entre animais	Livre circulação
Alimentação forçada.		Poluentes (CO2);	Odores agradáveis	Obesidade ou magreza	Condição corporal apropriada.	Limites para evitar ameaças, fugas	Exploração
		Odores fortes;	Intensidade da luz tolerável	Atrofia muscular		Limitações para dormir	Interação / jogos
		luz: intensidade inadequada;	Exposição ao ruído aceitável				Atividade sexual
		Ruído alto	Variabilidade ambiental				Uso de refúgios
		Monotonia ambiental	Previsibilidade				Sono / descanso suficiente
		Eventos imprevisíveis					
5.Estado Mental							
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Sede	Hidratação	Formas de desconforto: Térmico, físico, respiratório	Formas de conforto: normal e físico	Falta de ar	Conforto de boa saúde e alta capacidade funcional	Raiva, frustração	Calma
Fome	Prazer de beber	Olfativo	Respiratório	Dor	Vitalidade	Tédio,	Sociável
Mal estar de desnutrição	Prazeres diferentes (sabores, cheiros e texturas)	Auditivo	Olfativo	Débil, fraqueza		Solidão, isolamento	Excitação e brincadeira
Inchaço	Prazer mastigatório	Visual	Auditivo	Doença, mal-estar		Depressão	Gratificação sexual
Dor abdominal	Saciedade	Mal-estar devido à constância não natural	Visual	Náusea		Frustração sexual	Seguro, protegido e confiante
	Conforto abdominal		Conforto relacionado à variedade	Tontura		Ansiedade, medo	Gosta de novidade
				Esgotamento físico		Neofobia	renovado
						Exaustão	

A Pirâmide de Maslow é outra forma de organizar as necessidades dos animais. As necessidades são organizadas em uma hierarquia, que se inicia desde as necessidades mais básicas e fundamentais até as mais complexas e abstratas. Sendo que apenas nos devemos focar em necessidades de nível superior quando já se atingiu as de níveis mais baixos (Shoib *et al.*, 2022)

Cada Pirâmide de Maslow pode ser revisitada e criada para cada indivíduo, espécie entre outras. Por exemplo, Griffin *et al.* (2023) criou uma hierarquia de Maslow específica para cães e afirma que é crucial ser capaz de se reconhecer e entender as necessidades dos cães de forma precisa e adequada para desenvolver uma estrutura de necessidades reais, melhorando assim a qualidade de vida dos cães.

A *World Association of Zoos and Aquariums* WASA também utiliza a hierarquia de Maslow como ferramenta para atender as necessidades de todos os animais selvagens que têm a cargo. Inclusive sobrepõem a pirâmide de hierarquia de Maslow com uma árvore (figura 2) em que as raízes da árvore representam as necessidades fundamentais para sobrevivência. No tronco, encontram-se as necessidades físicas e cuidados de saúde. A copa é o local das atividades mais variadas e complexas relacionadas com o bem-estar animal onde se incluiu o EA e por último as aves a voar que representam a vitalidade e o conforto que os animais poderão sentir ao ter todas as suas necessidades atendidas (Mellor *et al.*, 2015).

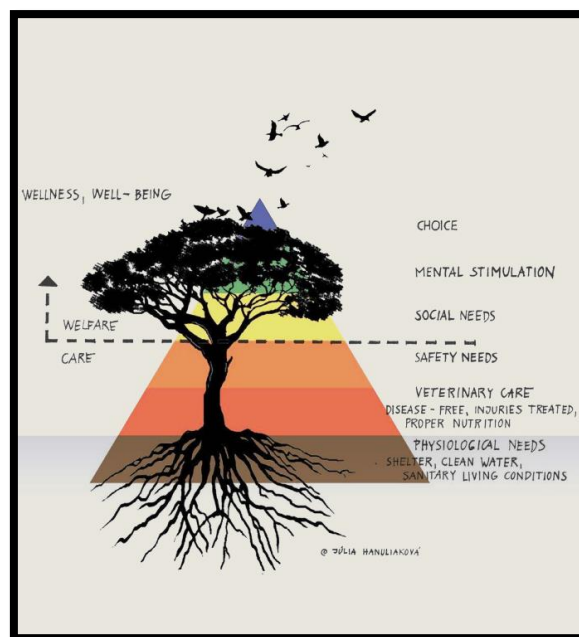


Figura 2 – Hierarquia de necessidade de Maslow (Mellor *et al.*, 2015)

2.2. Enriquecimento Ambiental

O EA refere-se às estratégias e práticas aplicadas em ambientes naturais ou em cativeiro para melhorar o bem-estar e estimular comportamentos naturais de animais (Baumans, 2005). Este conceito é comumente utilizado em contextos de conservação, zoológicos, laboratórios de pesquisa e até mesmo em ambientes domésticos para animais de estimação (Simone-Freilicher & Rupley, 2015).

O EA procura proporcionar aos animais um ambiente mais complexo e desafiante, de modo a promover o seu bem-estar físico e psicológico (Baumans, 2005). Isto inclui disponibilizar estímulos sensoriais, atividades, oportunidades de exploração e interação social, assemelhando-se ao que os animais experimentariam naturalmente no seu habitat (Segovia *et al.*, 2009).

Em cativeiro, por exemplo, pode envolver a introdução de brinquedos, desafios alimentares, mudanças no ambiente, como a inclusão de elementos naturais, e a promoção de atividades que incentivem a busca de comida ou a resolução de problemas (Love *et al.*, 2022). O EA ajuda a prevenir o tédio, o stress e os comportamentos estereotipados em animais, melhorando a sua qualidade de vida e saúde mental (Bayne, 2018).

2.3. Tipos de Enriquecimento Ambiental

O cuidado com os animais passou por uma transformação notável nas últimas duas décadas, com uma ênfase crescente no bem-estar psicológico dos mesmos (Bloomsmith *et al.*, 2018). Segundo Simone-Freilicher e Rupley (2015), existem diversos tipos de EA que podem ser aplicados a diferentes contextos e espécies de animais. Alguns dos tipos mais comuns incluem o físico, sensorial, cognitivo, social e alimentar (Kempermann, 2019). Quando usadas em conjunto, estas diferentes categorias de enriquecimento podem melhorar várias facetas do repertório comportamental dos animais (Bloomsmith *et al.*, 2018).

O primeiro tipo é o físico, envolve a alteração do ambiente em si. Adicionando estruturas de escalada, tocas, ramos, rochas ou outros elementos naturais para criar um ambiente mais diversificado (Simone-Freilicher & Rupley, 2015).

O segundo tipo de enriquecimento é o cognitivo, que estimula o cérebro dos animais, desafiando-os a resolver problemas, aprender novas tarefas ou realizar atividades que

exijam raciocínio, como quebra-cabeças e jogos interativos (Bayne, 2018). Outra forma de estimular os animais a nível cognitivo é através do treino, especialmente o treino com reforço positivo, que é uma forma de condicionamento em que os animais recebem uma recompensa (por exemplo, uma guloseima ou interação social) após executarem um comportamento desejado. Este tipo de treino depende da cooperação voluntária dos animais, em vez de os obrigar a obedecer através de contenção manual ou química, facilitando assim a sua manipulação (Bloomsmith *et al.*, 2018).

O terceiro tipo de enriquecimento é o sensorial, que estimula os sentidos dos animais. Este tipo de enriquecimento inclui a introdução de novos cheiros, sons, texturas e objetos no recinto ou jaula do animal (Simone-Freilicher & Rupley, 2015).

Todos os tipos de enriquecimento estão interligados (figura 3), uma vez que o enriquecimento físico proporciona estimulação cognitiva, assim como a estimulação cognitiva oferece estimulação sensorial, e assim sucessivamente. Proporcionar novidades aos animais pode ser feito expondo-os a novos objetos, espaços ou atividades que sejam estimulantes para animais em cativeiro e que os ajudem a praticar a resolução de novos desafios. Isto é útil porque, se os animais forem mantidos num ambiente completamente consistente (ou seja, sem novidades), podem reagir com medo ou evitamento quando confrontados com novos estímulos. As novidades podem ser introduzidas através da rotação de itens de enriquecimento, da oferta de novos tipos de recursos, da mudança dos animais para gaiolas maiores e da utilização de reforço positivo para ensinar novos comportamentos aos animais (ou seja, a aprendizagem de novas tarefas é uma experiência estimulante) (Bloomsmith *et al.*, 2018). No entanto, há uma ressalva importante em relação à introdução de novidades. Fazer mudanças no ambiente dos animais com demasiada frequência ou muito rapidamente pode ser stressante para alguns indivíduos. Por exemplo, animais com temperamentos altamente inibidos são menos propensos a aproximar-se de novos objetos ou atividades e, para esses indivíduos, a introdução de novidades sem uma preparação adequada pode, na verdade, aumentar o stress (Frohlich, 2020).

O enriquecimento social é o quarto tipo de EA, consistindo em permitir a interação com outros animais da mesma espécie, seja através de contacto físico ou observação (Bayne, 2018). Interações sociais apropriadas entre animais da mesma espécie são essenciais para o desenvolvimento normal e para o bem-estar. O alojamento social em

grupos ou pares compatíveis oferece aos animais oportunidades de se envolverem numa variedade de comportamentos típicos da espécie, como *grooming* (limpeza), afiliação, agonismo, brincadeira e cuidados parentais. O alojamento social também reduz a ocorrência de comportamentos anormais em muitas espécies (Bloomsmith *et al.*, 2018).

Por último, o enriquecimento alimentar envolve a forma como os alimentos são fornecidos aos animais. Pode incluir a distribuição de alimentos escondidos, a utilização de brinquedos alimentares que desafiam os animais a encontrar comida ou a necessidade de manipular objetos para obter alimento (Simone-Freilicher & Rupley, 2015).

Outro princípio é dar aos animais controlo e escolha no seu ambiente: O enriquecimento bem concebido fornece aos animais escolhas e um certo grau de controlo sobre os seus ambientes, permitindo-lhes lidar melhor com os fatores de stress ambientais. Por exemplo, diferentes tipos de enriquecimento físico (barreiras visuais e prateleiras elevadas) podem permitir que os animais controlem a sua proximidade em relação aos outros, o que pode reduzir conflitos e stress. Proporcionar material de nidificação adequado a espécies com comportamento de nidificação também lhes permite controlar a sua temperatura e evitar o stress associado a temperaturas mais baixas (Bloomsmith *et al.*, 2018).

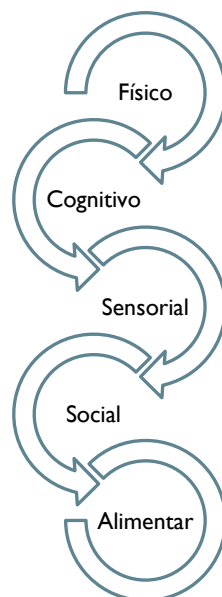


Figura 3 – Cinco tipos de EA, físico, cognitivo, sensorial, social e alimentar.
Adaptado de Kempermann, (2019).

2.4. Importância do Enriquecimento Ambiental

O EA é de extrema importância para os animais, uma vez que contribui significativamente para o seu bem-estar físico e psicológico (Simone-Freilicher & Rupley, 2015). Para os animais, como é o caso de muitos que vivem em cativeiro, o enriquecimento ajuda a replicar os estímulos e desafios que encontrariam nos seus ambientes naturais. Isso é crucial para manter um estado de saúde mental positivo e prevenir comportamentos indesejados, como o tédio, o stress e atividades repetitivas (Bayne, 2018).

Além disso, o EA ajuda a melhorar a qualidade de vida dos animais, proporcionando uma sensação de satisfação e entretenimento (Baumans, 2005). Quando os animais estão mais ocupados e envolvidos em atividades desafiantes, tendem a ser mais saudáveis, felizes e menos propensos a problemas de saúde relacionados ao stress, como o excesso de agressividade ou depressão (Bayne, 2018).

Em contextos de conservação, o enriquecimento também pode contribuir para programas de reprodução em cativeiro, facilitando comportamentos naturais de acasalamento e criação, o que é crucial para a preservação de espécies ameaçadas (Greggor *et al.*, 2018).

Na figura 4 apresentada, é possível observar uma comparação feita por Rojas-Carvajal *et al.*, (2022) entre diferentes cenários de vida em cativeiro. A imagem retrata inicialmente uma bateria de gaiolas carente de estímulos que reflete a monotonia da vida urbana, caracterizada por edifícios altos e monótonos e falta de estímulos. Conforme o EA é introduzido, a gaiola transforma-se, oferecendo aos animais uma experiência mais semelhante à vida em ambientes meio urbanos, com maior diversidade e complexidade. A transição completa para uma representação de campo ilustra a máxima expressão de enriquecimento, destacando os benefícios que um ambiente rico em estímulos pode proporcionar aos animais, semelhantes às experiências positivas associadas à vida no campo para os humanos. Este contraste visual enfatiza a importância vital do EA na promoção de uma qualidade de vida superior para os animais em cativeiro, destacando o impacto positivo que pode ter na saúde física e mental dos mesmos.



Figura 4 – Reflexão sobre a metáfora da vida em gaiolas como a vida urbana para os humanos. À medida que é incorporado elementos de EA, aproximamo-nos à vida meio urbana e por fim rural (Rojas-Carvajal et al., 2022)

2.5. Patologias ou Distúrbios associados à falta de Enriquecimento Ambiental

O enriquecimento ambiental é frequentemente utilizado para melhorar o bem-estar e reduzir comportamentos estereotipados em animais sob cuidados humanos. No entanto, o uso de objetos para enriquecer ambientes não deve ser considerado eficaz até que o seu sucesso seja cientificamente comprovado, com maior ênfase em animais com maior inteligência, como primatas, elefantes e cetáceos (Fabienne & Helen, 2012). De acordo com Tynes and Sinn (2014), a falta de enriquecimento ambiental pode levar a várias patologias e distúrbios em animais. Nas espécies anteriormente mencionadas, é mais difícil proporcionar uma boa qualidade de vida em cativeiro e evitar distúrbios causados pela monotonia da vida em cativeiro. Segundo, Fabienne and Helen (2012),

além de desenvolver um plano de enriquecimento ambiental para estas espécies, este tipo de animais mais inteligentes tende a demonstrar preferências por determinados objetos de enriquecimento ou atividades. Em suma, o comportamento dos animais deve ser considerado à luz do contexto social e dos perfis comportamentais individuais de cada animal. A relevância de uma abordagem construtivista para avaliar a eficácia de programas de enriquecimento deve ser discutida caso a caso.

Algumas patologias ou distúrbios que nos poderão indicar que não se está a atingir o nível de EA pretendido são os seguintes (Tynes & Sinn, 2014):

1. **Comportamentos Estereotipados:** Quando os animais não têm estímulos adequados para ocupar o seu tempo, podem desenvolver comportamentos estereotipados, como andar em círculos repetidamente, balançar a cabeça ou lambe compulsivamente. Estes comportamentos são muitas vezes indicadores de stress e tédio (Bayne, 2018).
2. **Agressão:** A falta de estímulos e oportunidades para expressar comportamentos naturais pode levar a níveis elevados de agressão entre animais, particularmente em contextos de cativeiro, como zoológicos (Greggor *et al.*, 2018). Segundo Tynes *and* Sinn, (2014), a agressividade também pode ser resultado da dor devido ao animal sofrer por outros distúrbios associados à falta de EA, como a automutilação.
3. **Obesidade e Problemas de Saúde:** A ausência de desafios relacionados com a alimentação e a falta de atividade física podem resultar em obesidade e problemas de saúde, como diabetes. (Rose & Roffe, 2013).
4. **Depressão e Apatia:** A monotonia e a falta de estimulação podem levar a estados de depressão e apatia, onde demonstram desinteresse por atividades, alimentação ou interação social (Meagher & Mason, 2012).
5. **Redução da Fertilidade:** Em contextos de reprodução em cativeiro, a falta de estímulo ambiental adequado pode afetar a fertilidade dos animais, dificultando a reprodução e a conservação das espécies (Greggor *et al.*, 2018).
6. **Automutilação:** Em alguns casos, os animais privados de enriquecimento podem recorrer à automutilação, causando ferimentos a si próprios (Tynes & Sinn, 2014).

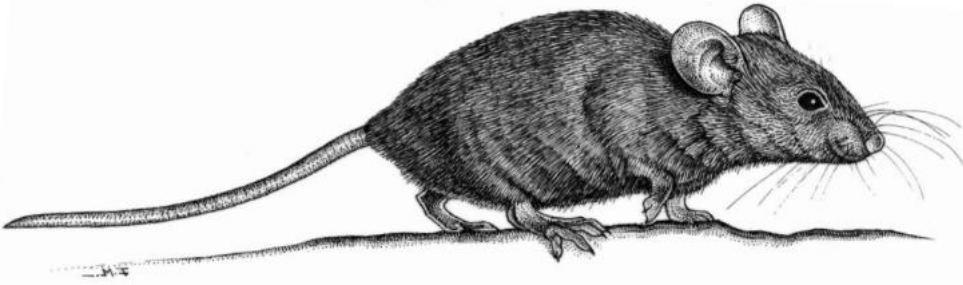
2.6. Espécie em estudo

A palavra roedor é derivada do verbo Latino *rodere*, que significa "roer". A característica mais distintiva deste grupo são, os incisivos elodontes (de crescimento contínuo) que todos os membros desta ordem possuem. Embora o tamanho do corpo varie muito, em geral, os roedores possuem uma estrutura corporal uniforme com várias adaptações (Frohlich, 2020).

A espécie em estudo pertencente ao grupo dos roedores é o *Mus musculus* (Tabela 2), vulgarmente designado como murganho ou rato de laboratório (Ratuski & Weary, 2022).

Tabela 2 - Classificação Taxonómica (Ratuski & Weary, 2022).

CLASSE	MAMMALIA
ORDEM	RODENTIA
FAMÍLIA	MURIDAE
GÉNERO	MUS
ESPÉCIE	MUS MUSCULUS



2.6.1. Características gerais

Os murganhos possuem uma estrutura corporal de roedor, composto pelo corpo longo que afina em direção à cabeça, pernas curtas com quatro dedos nas patas dianteiras e cinco dedos nas patas traseiras, e uma cauda longa. Os roedores não transpiram e não possuem glândulas sudoríparas, portanto, a sua capacidade de suportar altas temperaturas é limitada. A dissipação do calor ocorre através das orelhas e da cauda (Frohlich, 2020).

2.6.2. Alimentação

Os roedores têm a tendência natural de armazenar alimentos, a maioria são omnívoros, alimentam-se de ervas, sementes, grãos e, ocasionalmente, invertebrados na natureza. Os requisitos alimentares das espécies em ambientes laboratoriais estão bem estabelecidos (Frohlich, 2020). No ambiente doméstico, as necessidades são melhor alcançadas com uma dieta formulada, complementada com pequenas quantidades de alimentos frescos e sementes para variedade e interesse (Rose & Roffe, 2013).

Embora as misturas de sementes sejam utilizadas para roedores, essas dietas muitas vezes levam a uma alimentação seletiva e à obesidade. Os animais geralmente consomem sementes de alto teor calórico (girassol) e ignoram os pellets, resultando em desequilíbrio alimentar. Os requisitos de proteína são de 14% a 16% em murganhos e ratas, e as dietas formuladas devem refletir estes requisitos. As dietas para animais em reprodução ativa devem conter níveis mais altos de proteína (Frohlich, 2020).

2.6.3. Características comportamentais

Os exemplares silvestres escavam túneis de dois ou três centímetros de diâmetro, com compartimentos para acolher futuras ninhadas. Estas são revestidas de ervas secas que proporcionam isolamento térmico. Também podem construir ninhos debaixo de pedras, em buracos nas paredes e sítios similares quando a população ocupa um habitat mais urbano (Sans-Fuentes & Salvador, 2017).

Os ratos silvestres são socialmente gregários e associam-se em grupos familiares chamados demes. Cada deme é composta por um macho dominante reprodutor, uma hierarquia de fêmeas, machos subordinados e juvenis. Devido a este comportamento natural, as fêmeas em cativeiro geralmente convivem bem quando alojadas juntas, mas os machos adultos não devem ser mantidos juntos, pois podem ocorrer agressões, ferimentos e conseqüentemente morte. Os murganhos são omnívoros e de hábitos noturnos, embora sejam facilmente acordados durante o dia (Frohlich, 2020).

2.6.4. Sexagem

Determinar o sexo da maioria dos roedores é fácil em animais maduros, mas pode ser mais desafiador em animais muito jovens. Em geral, a distância entre o ânus e a papila genital é um método fiável para determinar o sexo de animais jovens. A distância anogenital é maior nos machos do que nas fêmeas (figura 5), e a papila genital é geralmente mais proeminente e tem uma abertura redonda nos machos. Segurar o

roedor verticalmente ou aplicar uma pressão suave dirigida caudalmente no abdômen permite que os testículos passem do abdômen através do canal inguinal para o escroto. Os mamilos estão presentes apenas nas fêmeas desta espécie e podem ser vistos por volta dos 10 dias de idade (Frohlich, 2020).

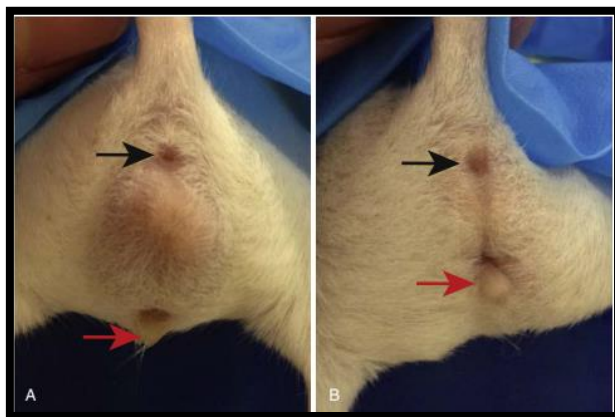


Figura 5 – Sexagem de murgancho com base na distância anogenital, que é o comprimento entre o ânus (seta preta) e a papila genital (seta vermelha). Os machos (A) têm uma distância anogenital maior em comparação com as fêmeas (B) (Frohlich, 2020).

2.6.5. Características reprodutivas

Na reprodução de *Mus musculus* as fêmeas apresentam um ciclo estral de cerca de quatro a cinco dias. Primeiramente o proestro, este dura cerca de 12h a 1 dia e ocorre um aumento na produção de estrogênios para maturação dos ovócitos. Nesta fase a fêmea não se encontra receptiva. De seguida, dá-se o Estro que é a fase em que a fêmea aceita o macho e ocorre o acasalamento (Cora et al., 2015). Após a fertilização, a gestação dura aproximadamente 19 a 21 dias, resultando no nascimento de uma ninhada que pode variar dependendo da linhagem e da idade da progenitora (Frohlich, 2020).

Uma particularidade dos murganhos e outros roedores na reprodução é o "efeito Bruce". Este efeito ocorre quando uma fêmea gestante é exposta a um novo macho. As feromonas presentes na urina do novo macho vão induzir a fêmea a abortar ou reabsorver os embriões. Este mecanismo é uma estratégia evolutiva que permite à fêmea maximizar o sucesso reprodutivo, potencialmente acasalando-se com um macho geneticamente mais apto ou dominante (Eccard et al., 2017).. Para além disso, o efeito

Bruce, é considerada uma contra estratégia das fêmeas em relação ao infanticídio antecipado (Palombit, 2015).

Os murganhos são progenitores bem-sucedidos na maioria das vezes, e a distocia é incomum. O instinto de nidificação é forte nestas espécies, com comportamento de construção de ninho ocorrendo antes do parto e até mesmo sem nenhuma ninhada presente. Portanto fornecer materiais de nidificação é importante para o sucesso reprodutivo. Após o nascimento, as crias são cuidadas pela progenitora, que as amamenta até estarem suficientemente desenvolvidas para se alimentarem sozinhas, geralmente após três a quatro semanas (Frohlich, 2020).

Tabela 3 – Valores normais de referência de dados reprodutivos e crescimento em murganhos (Frohlich, 2020). Imagem retirada de (Winters et al., 2022).

<i>MUS MUSCULUS</i>	VALORES	
Duração do proestro (pico de estrogênio), dias	4-5	
Duração do estro (cio), horas	9-20	
Duração da gestação, dias	19 - 21	
Nº de recém-nascidos	7 - 11	
Peso ao nascer (g)	1 – 1,5	
Abertura dos olhos, dias	12 – 14	
Idade ideal de desmame, dias	18 - 21	

2.6.6. Patologias e doenças parasitárias

Desde um ponto de vista sanitário, esta espécie não tem relevância em zoonoses. Ocasionalmente pode transmitir algumas doenças, como por exemplo rickettsioses pustulosa causada por *Rickettsia akari* cujo vetor se trate de um ácaro (*Allodermanyssus sanguineus*), febre causada pela mordedura do animal e consequentemente infecção bacteriana por *Actinobacillus muris* que pode estar presente na urina. Por último, estes também podem transmitir *Salmonella* sp ocasionada pela contaminação de alimentos por excrementos (Sans-Fuentes & Salvador, 2017).

2.6.7. A importância do murganho a nível científico

Ratazanas e murganhos fornecem modelos animais ideais para a pesquisa biomédica e estudos de medicina comparativa, pois apresentam muitas semelhanças com os seres humanos em termos de anatomia e fisiologia. Da mesma forma, ratazanas, murganhos e humanos possuem cada um aproximadamente 30.000 genes, dos quais cerca de 90% são partilhados por estas três espécies (Gibbs *et al.*, 2004). O uso de roedores para fins de investigação apresenta vantagens económicas: murganhos e ratazanas são relativamente pequenos e requerem pouco espaço ou recursos para a sua manutenção, têm períodos de gestação curtos, mas produzem um número relativamente grande de descendentes, e alcançam a idade adulta de forma relativamente rápida, com uma esperança de vida também relativamente curta (Bryda, 2013). Como desvantagens, apresentam dificuldade na recolha de material biológico, dificuldade na administração de drogas e dificuldade na realização de técnicas cirúrgicas (Paredes *et al.*, 2008).

2.6.8. Perfil dos investigadores

Os investigadores que trabalham com animais estão moralmente obrigados a manifestar três tipos de atitudes (figura 6) (Paredes *et al.*, 2008).



Figura 6 – As três atitudes que têm de estar presente em quem trabalhe diretamente com animais

- **Respeito:** Por se tratar de seres vivos e sensíveis, que estão a ser utilizados, devem ser tratados com todas as considerações que a situação exige
- **Afeto:** Devem ser tratados com carinho, independentemente de estarem a ser utilizados para fins laboratoriais.
- **Gratidão:** Reconhecimento pela importante ajuda ao tornarem-se os nossos mais íntimos colaboradores.

Do mesmo modo, pode-se afirmar que a investigação biomédica em animais é eticamente aceitável se seguir o princípio dos três Rs (figura 7) da experimentação humanizada para com os animais, proposto por William Russell (zoólogo e psicólogo) e Rex Burch (microbiólogo) em 1959 referenciado por Kirschner, (2021):

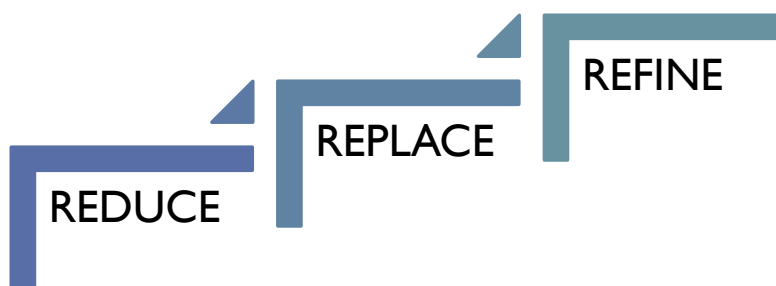


Figura 7 – Princípio dos três Rs

- **Reduzir**, ao máximo, o número de animais utilizados na investigação.
- **Substituir**, sempre que possível, o animal de experimentação por outro modelo experimental, quando o uso de animais não for imprescindível.
- **Refinar**, os métodos e técnicas utilizados, de forma a causar o menor sofrimento possível ao animal.

2.7. Bem – estar em *Mus musculus*

A preocupação com o bem-estar dos murganhos, tanto em condições laboratoriais como domésticas, tem vindo a ganhar crescente relevância, tal como acontece com outras espécies (Jirkof *et al.*, 2019). Para além de evitar condições adversas, como as definidas pelas 5 liberdades, é fundamental introduzir estímulos que promovam o bem-estar e induzam estados emocionais positivos (Green & Mellor, 2011).

Para tal, é essencial conhecer a espécie e os seus hábitos, de modo a proporcionar atividades que se assemelhem às que o animal realizaria em liberdade. Entre essas atividades Jirkof *et al.* (2019) incluem:

- **Construção de ninhos:** A construção de ninhos é um comportamento comum na maioria das espécies de roedores, e tanto a motivação como a capacidade para realizar essa atividade persistem nos murganhos em cativeiro (Jirkof, 2014).
- **Grooming:** Os murganhos realizam a limpeza de si próprios e também dos seus companheiros dentro do grupo social (Oliver *et al.*, 2018).

- **Escavação:** Os murganhos, sendo roedores que cavam tocas em condições naturais, mantêm esse comportamento nas linhagens de laboratório e domésticas, tal como acontece com a construção de ninhos (Jirkof, 2014).

Estas atividades podem ser utilizadas como indicadores do estado de bem-estar dos animais. Um murganho que apresente sinais de stress ou alguma patologia pode deixar de realizar essas atividades. Por exemplo, animais que não constroem ninhos e dormem desprotegidos num canto da gaiola indicam falta de bem-estar, sendo necessário identificar a causa desta situação (Möller *et al.*, 2018). Por outro lado, um comportamento excessivo de *grooming* também pode indicar que o animal não está em condições adequadas de bem-estar, podendo ser patológico ou resultar de tédio devido à falta de um ambiente enriquecido (Jirkof *et al.*, 2019). Oliver *et al.* (2018) utiliza um óleo fluorescente não tóxico, aplicado na testa do roedor, para medir a velocidade com que o pelo é limpo, como forma de avaliação do *grooming*.

2.8. Enriquecimento Ambiental em *Mus musculus*

O EA em *Mus musculus*, é uma prática cada vez mais utilizada em ambiente doméstico, em investigações científicas e na gestão de animais de laboratório, com o objetivo de melhorar o seu bem-estar e promover comportamentos naturais (Ratuski & Weary, 2022). O enriquecimento do ambiente envolve a introdução de estímulos e oportunidades de atividade no ambiente do murganho, a fim de enriquecer a sua vida e reduzir o stress associado ao cativeiro (Bayne, 2018).

Estas práticas de enriquecimento podem incluir a adição de objetos, como túneis, brinquedos, rochas e tubos, bem como alterações regulares na disposição do ambiente. A inclusão de substratos, como um alto nível de serradura e material para nidificação, permite que os murganhos expressem comportamentos naturais de escavação e construção de ninhos. A oferta de desafios cognitivos, como labirintos ou objetos que ocultam alimentos, também é comum para estimular a atividade mental dos animais (Ratuski & Weary, 2022).

Além disso, permitir que os murganhos tenham acesso a espaços maiores para explorar e disponibilizar uma dieta variada e nutritiva são componentes importantes do EA. Estas práticas visam melhorar o bem-estar destes roedores em cativeiro, minimizar o tédio e promover comportamentos naturais, resultando numa abordagem mais ética e

compassiva na gestão de murganhos em ambientes de laboratório e domésticos (Baumans, 2005).

2.9. Patologias ou distúrbios associado à falta de Enriquecimento Ambiental em *Mus musculus*

A falta de EA em *Mus musculus* pode levar a uma série de patologias e distúrbios comportamentais. A privação de estímulos e a monotonia do ambiente podem ter efeitos negativos no bem-estar e na saúde dos murganhos (Frohlich, 2020). Alguns dos problemas associados à falta de EA incluem:

- **Comportamentos estereotipados:** Os murganhos sujeitos à falta de enriquecimento são mais propensos a desenvolver comportamentos estereotipados, como dar voltas em círculos, lambe-se excessivamente, morder as grades da gaiola ou tentar passar entre elas (figura 8). Esses comportamentos repetitivos são indicativos de stress e podem prejudicar a saúde mental dos animais (Bayne, 2018).

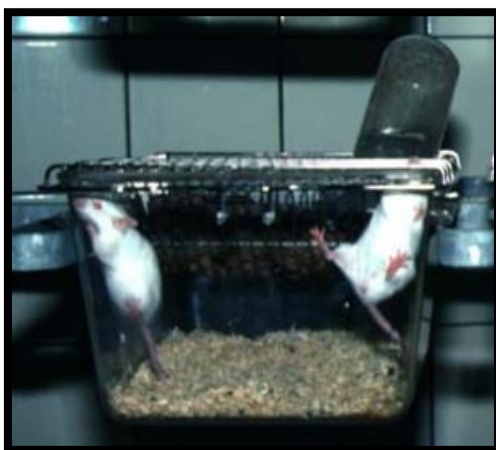


Figura 8 - Dois murganhos com comportamento estereotipado. O da esquerda com saltos repetidos e o do lado direito a tentar sair entre as grades. (Rose & Roffe, 2013)

- **Obesidade:** Os murganhos mantidos em ambientes sem estímulos físicos ou mentais adicionais têm maior probabilidade de se tornarem obesos. A falta de atividade e enriquecimento pode levar a um estilo de vida sedentário e ao consumo excessivo de alimentos (Rose & Roffe, 2013).

- **Agressividade:** A falta de estímulos e oportunidades para expressar comportamentos naturais pode levar à agressividade entre os murganhos, especialmente quando estão confinados em espaços apertados (Pritchett-Corning, 2020).
- **Desenvolvimento de ansiedade e depressão:** A falta de EA pode levar a níveis mais elevados de ansiedade e depressão, manifestando-se em comportamentos como apatia, isolamento e respostas anormais ao stress (Meagher & Mason, 2012).
- **Redução da capacidade cognitiva:** Murganhos mantidos em ambientes monótonos podem apresentar uma redução na capacidade cognitiva e de aprendizagem, já que não são desafiados intelectualmente (Frohlich, 2020).
- **Comportamento anormal de autocuidado:** A automutilação e o excesso de *Grooming* (figura 9) são comportamentos anormais que podem se desenvolver nos murganhos devido à falta de estímulos e enriquecimento (Rose & Roffe, 2013).



Figura 9 - Murganho com alopecia traumática devido ao comportamento de *grooming* excessivo do companheiro (Rose & Roffe, 2013).

- **Maior suscetibilidade a doenças:** O stress crónico causado pela falta de EA ou derivado de um mau manejo pode comprometer o sistema imunológico, tornando-os mais suscetíveis a doenças. A diminuição de stress pelo aumento de EA é considerado medicina preventiva (Frohlich, 2020).

2.9.1. Corticosterona e cortisol: Biomarcadores de stress em murganhos

Já é amplamente reconhecido que a corticosterona e o cortisol são os glicocorticóides endógenos presentes em situações de stress em roedores, sendo libertados através do

eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Terao & Katayama, 2016). De acordo com Gong *et al.* (2015), o cortisol nos murganhos e a corticosterona apresentam uma correlação estreita na sua dinâmica sob diferentes condições fisiológicas ou de stress. No entanto, enquanto a corticosterona se revelou um biomarcador mais associado a situações de stress crónico, o cortisol demonstrou uma resposta mais rápida do que a corticosterona em episódios de stress agudo severo.

2.10. Evolução do Enriquecimento Ambiental em murganhos

O EA tem sido amplamente estudado em roedores, mas não há consenso sobre como deveria ser o enriquecimento ou o que deveria alcançar. O uso inconsistente do termo “enriquecimento” cria desafios na obtenção de conclusões sobre a qualidade de um ambiente, o que pode retardar as melhorias nas instalações para estes animais (Ratuski & Weary, 2022).

Um dos desafios associados à catalogação dos efeitos do EA em murganhos é que os relatórios de efeitos de estudos que utilizam "enriquecimento" podem ser confundidos pelo facto de os itens fornecidos na gaiola para aumentar a complexidade estrutural não serem objetos que realmente melhoram o bem-estar dos animais. Claramente, a semântica desempenha um papel neste problema, uma vez que qualquer adição ao ambiente da gaiola parece ser automaticamente rotulada como um enriquecimento, quer a definição de enriquecimento seja alcançada ou não. Muitas ideias preconcebidas sobre os benefícios de certas estruturas de gaiola devem ser descartadas à medida que as evidências se acumulam sobre o seu valor como verdadeiros enriquecimentos (Bayne, 2018).

Por exemplo, os autores Love *et al.*, (2022), disponibilizam um protocolo recente para a montagem de alojamentos de murganhos com EA, exemplificando as diferentes condições de gaiolas: A: como gaiola padrão, B: como gaiola com enriquecimento, C: como gaiola de exercício, e D: como gaiola com super enriquecimento (figura 10).

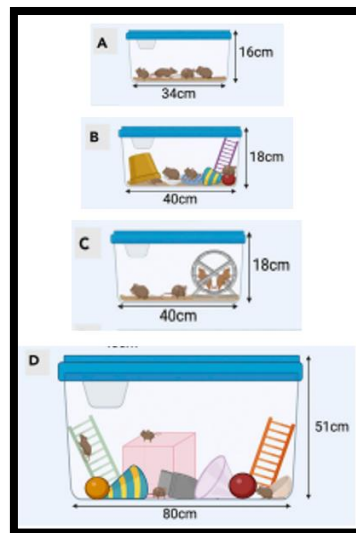


Figura 10 - A - gaiola padrão; B – gaiola com enriquecimento; C – gaiola de exercício e D – gaiola super enriquecida. Adaptado de (love et al., 2022)

No início da montagem, o autor recomenda "Preencher a base com maravalha esterilizada, suficiente para cobrir a base até aproximadamente 1 cm de profundidade". No entanto, de acordo com Ratuski & Weary (2022), é crucial oferecer um substrato com maior profundidade para permitir que os murganhos expressem o comportamento natural de escavação.

Love et al., (2022), propõe ainda oferecer enriquecimento ambiental separadamente da gaiola padrão onde os sujeitos vivem a maior parte do tempo, mudando os animais de ambiente frequentemente. Contudo, conforme afirmado por Frohlich, (2020), alterações abruptas no habitat podem causar stress, comprometendo o sistema imunológico dos murganhos e tornando-os mais suscetíveis a doenças. A predisposição do habitat pode e deve ser alterado assim como adição de enriquecimento ambiental de modo a proporcionar ao animal uma nova atividade ou objeto a descobrir dentro do seu habitat onde se sente seguro proporcionando um nova experiência positiva e não um episódio de stress onde o animal se irá sentir vulnerável (Pritchett-Corning, 2020).

Independentemente de não se encontrar um consenso sobre a definição do EA (Ratuski & Weary, 2022), tem se verificado ao longo dos anos uma evolução a nível da definição do EA recomendado para a espécie em estudo (tabela 4).

Tabela 4 - Evolução do Enriquecimento Ambiental em murganhos ao longo dos anos (Ratuski & Weary, 2022)

Evolução do Enriquecimento Ambiental em murganhos ao longo dos anos.		
Autor e ano	Definição do EA	EA recomendado
(Scharmann, 1991)	"Alojar animais de uma maneira propícia ao seu 'bem-estar psicológico'."	Utilização do espaço vertical da gaiola para proporcionar oportunidades de escalada aos roedores. Material para ninho Oportunidades de busca de alimentos
(Galef, 1999)	"...alterações no ambiente físico ou social para aumentar o bem-estar psicológico dos roedores."	Abrigo e material para ninho Desaconselha o aumento do tamanho das gaiolas
(Olsson & Dahlborn, 2002)	"...a prática de modificar as condições de alojamento com o objetivo de promover comportamentos naturais e melhorar problemas comportamentais" "O termo em si implica uma melhoria além da satisfação das necessidades básicas"	Material para ninho Estruturas de abrigo Acesso a rodas de exercício e gaiolas maiores ou mais estruturadas

(Hutchinson et al., 2005)	"Um método para melhorar a qualidade de vida" "Além das atividades sociais, [EA] pode ser alcançado permitindo e promovendo o exercício físico, a busca de alimentos, atividades manipulativas e cognitivas, conforme relevantes para a espécie em questão"	Habitação social Material de ninho Desaconselha o "superenriquecimento"
(Brown, 2009)	"Para além das atividades sociais, [EA] pode ser alcançado permitindo e promovendo o exercício físico, a busca por alimentos e atividades manipulativas e cognitivas."	cubos de feno; snacks à base de frutas ou vegetais, e dietas compostas por sementes e grãos que podem ser entregues aos animais de várias maneiras, como dentro de uma casca de massa seca ou um brinquedo de madeira com buracos.

Baumans & Van Loo, 2013)	"O [EA] pode ser definido como qualquer modificação no ambiente de cativeiro dos animais que visa melhorar o seu bem-estar físico e psicológico, fornecendo estímulos que correspondam às necessidades específicas da espécie."	Material para ninho Itens para roer Oportunidades para procurar alimentos Contacto social
(Bayne, 2018)	"...um método para melhorar o bem-estar animal fornecendo estímulos sensoriais e motores aos animais, através de estruturas e recursos que facilitem a expressão de comportamentos típicos da espécie e promovam o bem-estar psicológico através do exercício físico, atividades manipulativas e desafios cognitivos de acordo com as características específicas da espécie."	Material para ninho Caixas de ninho/abrigo

(Lewejohann et al., 2020)	“Melhorar as condições de alojamento”	Material para ninho Oportunidades de escavação Substrato para roer Mais espaço para participar em comportamento de jogo locomotor Treino cognitivo
(Pritchett-Corning, 2020)	Neste artigo, o autor utiliza o termo complexidade ambiental (CA) em vez de EA. "[CA] é, por necessidade, definida por comparações em vez de uma descrição específica. Podem ser postulados dois limites: um ambiente estéril e o ambiente tal como é experimentado pelos animais selvagens. Em geral, a complexidade ambiental pode ser agrupada em enriquecimento padrão, superenriquecimento e ambientes seminaturais."	"Padrão" CA: gaiola com alto substrato, material para ninho, abrigo e um parceiro social Um ambiente "superenriquecido" deve oferecer uma maior variedade de objetos, mais espaço e mais parceiros sociais Recintos "seminaturalísticos" devem oferecer mais oportunidades para comportamentos naturais; podem permitir acesso ao ar livre, sendo de ordens de magnitude maiores do que outras opções de alojamento Esforços adicionais para trabalhar com roedores em ambientes seminaturalísticos devem ser perseguidos

(Kentner et al., 2021)	“(EA) é uma forma de complexidade que inclui estimulação física, sensorial, cognitiva e social, proporcionando uma experiência de vida melhorada para animais, em comparação com as condições de alojamento padrão.”	Habitação social Utilizar gaiolas maiores para alojar grupos maiores Rotatividade regular do enriquecimento ambiental para efeito de novidade
-------------------------------	--	--

3. Material e Métodos

3.1. Objetivos do estudo clínico

O presente estudo com parecer favorável pela comissão de ética da Escola Superior de Biociências de Elvas (Anexo I) tem como objetivo verificar os efeitos do EA a nível cognitivo em 12 murganhos ($n=12$) divididos em dois grupos constituídos por 6 murganhos ($n=6$) cada um. Assim, apresentam-se três hipóteses:

- I: Os dois grupos em estudo não vão demonstrar uma diferença significativa entre eles.
- II: O grupo 2 irá demonstrar resultados de tempo inferiores ao grupo 1.
- III: O grupo 1 irá demonstrar resultados de tempo inferiores ao grupo 2.

3.2. Material

O estudo é de natureza prospetiva, foi observado o comportamento de 12 indivíduos da espécie *Mus musculus* ao longo de um período de tempo, permitindo a recolha contínua de dados.

3.2.1. Desenho do estudo

Este estudo clínico foi dividido em três partes. Na primeira parte, preparou-se a amostra, incluindo a aquisição do plantel de criação, o acompanhamento dos partos das ninhadas, o desmame e a castração dos machos, com o objetivo de evitar gravidezes indesejadas e promover uma convivência pacífica entre os machos.

Na segunda parte, após a formação dos grupos, iniciou-se a fase I do estudo, procedendo-se à observação dos mesmos, registando-se dados recolhidos entre 04/02/2024 e 05/06/2024. As informações recolhidas baseavam-se na visualização das filmagens capturadas pelas câmaras previamente instaladas da marca *tp-link* junto das gaiolas, registando-se dados sobre o comportamento e hábitos dos sujeitos.

Na terceira e última parte, após a permanência dos sujeitos nos seus habitats, avaliou-se o impacto do enriquecimento ambiental a nível cognitivo, submetendo os animais a dois desafios específicos onde foram monitorizados pelo EV controlando o comportamento e o tempo necessário a cada indivíduo para resolver o desafio ao qual estava a ser submetido (Figura I I).

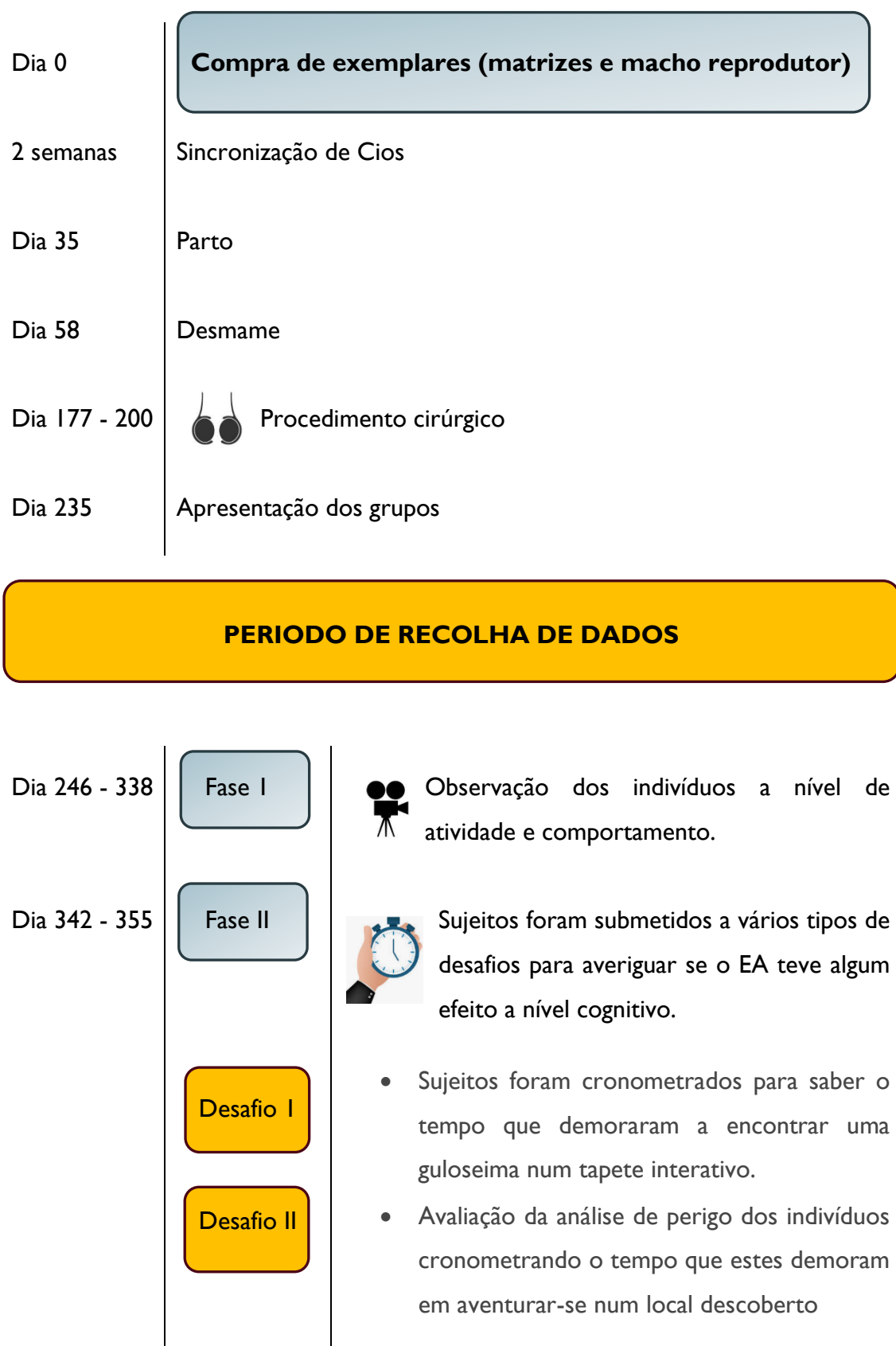


Figura 11 – Desenho do estudo

3.2.2. Critérios de inclusão

Os animais incluídos neste estudo são murganhos nascidos propositadamente em cativeiro para fins de investigação, assim como os progenitores adquiridos em loja específica com idade desconhecida. Para participar no estudo não foi tida em conta a condição corporal nem a raça ou mutação de cada animal, apenas a espécie.

Os elementos que cumpriram os critérios de inclusão foram divididos em 2 grupos e 1 subgrupo diferentes com as seguintes características:

- **Grupo 1:** Murganhos alojados em gaiola com EA (n=6).
- **Grupo 2:** Murganhos alojados em gaiola sem EA, contando apenas com enriquecimento social (n=5).
- **Grupo 2A:** Murganho alojado sem qualquer tipo de EA (n=1)

3.2.3. Critérios de exclusão

Neste estudo clínico apenas foi excluído uma fêmea que apresentava um tumor.

3.2.4. Caracterização da amostra

Inicialmente, o estudo demandava uma amostra composta por duas ninhadas de roedores da espécie *Mus musculus*, uma proveniente de progenitores criados em um ambiente enriquecido e a outra em condições convencionais. No entanto, devido à morte de uma das ninhadas e na impossibilidade de conduzir uma nova ninhada no momento, a decisão foi tomada de prosseguir o estudo com o progenitor, as duas matrizes e os 9 murganhos nascidos durante a pesquisa.

Os 12 animais incluídos neste estudo (n=12), 6 fêmeas e 6 machos da espécie *Mus musculus* foram divididos em dois grupos e um sub grupo, como anteriormente referido. O progenitor e as duas matrizes foram adquiridos em loja, desconhecendo-se a idade destes três. Os restantes 9 dos animais em estudo nasceram no dia 09 de julho de 2023 e tinham aproximadamente 8 meses no início da segunda parte do estudo.

A escolha dos elementos pertencentes a cada grupo foi aleatória tendo apenas o cuidado de deixar 3 fêmeas e 3 machos em cada grupo e colocar os progenitores no grupo sem EA. O sujeito 2 foi colocado no grupo 1 por apresentar stress pós cirurgico onde apresentava *grooming* excessivo e automutiliação da cauda (figura 12). Para evitar a evolução desse quadro clínico foi colocado na gaiola com EA.



Figura 12 – Sujeito 2 com lesão derivada de *grooming* excessivo e automutilação da cauda

3.3. Métodos

Para o estudo, foram adquiridas duas fêmeas e um macho da referida espécie. Com o propósito de sincronizar o ciclo reprodutivo das fêmeas e, assim, obter duas ninhadas com idades comparáveis, as fêmeas foram alojadas juntas, enquanto o macho permaneceu isolado mas com contacto visual e olfativo. Após duas semanas da aquisição dos indivíduos, os três sujeitos foram reunidos até que as fêmeas manifestassem indícios de gestação. Após a confirmação da gravidez, cada fêmea foi transferida para uma jaula distinta: a fêmea 1 numa gaiola com enriquecimento, enquanto a fêmea 2 numa gaiola sem EA, provida apenas de material para a construção de ninho.

O parto das fêmeas ocorreu com um dia de diferença. Da ninhada da Fêmea 1, criada em um ambiente enriquecido, nasceram 10 crias, com a exceção de um natimorto, resultando em 9 murganhos recém-nascidos saudáveis, evidenciando sinais de adequada amamentação (figura 13).



Figura 13 – Nove murganhos recém-nascidos correspondentes à ninhada da fêmea 1

A Fêmea 2 deu à luz 8 murganhos, e lamentavelmente, duas horas após o parto, durante uma verificação do cuidado materno, constatou-se o desaparecimento dos recém-nascidos, presumivelmente devido ao canibalismo por parte da progenitora.

Dessa forma, diante da impossibilidade de conduzir uma nova ninhada no momento, a decisão foi tomada de prosseguir o estudo com o progenitor, as duas matrizes e os 9 murganhos nascidos durante a pesquisa.

3.3.1. Formação dos grupos

Ao contrário das ratazanas os murganhos são bastante territoriais. Na natureza as fêmeas formam uma hierarquia entre elas. Esse comportamento faz com que não haja problema em mante-las juntas em ambiente laboratorial ou doméstico. Na natureza os grupos possuem um macho dominante e poderá existir alguns machos subordinados. Contudo, em ambiente doméstico e laboratorial não é possível proporcionar espaço suficiente. Por isso, os machos devem ser mantidos isolados.

Para conseguir uma convivência pacífica entre machos e evitar gravidezes indesejadas procedeu-se a orquiectomia nos 6 animais machos presentes no estudo.

O procedimento cirúrgico foi realizado três meses após o desmame, de modo aos recém-desmamado ganharem algum peso para aguardar a descida dos testículos, tornar o procedimento cirúrgico mais seguro e também por um sistema imunitário maduro.

No dia 28 de novembro de 2023 foram castrados o progenitor e três das suas crias com mais peso, que variava entre 32 a 38 gramas.

No dia 20 de dezembro de 2023 foram castrados as últimas duas crias com 32g cada uma.

Para o presente procedimento cirúrgico, não foi adotado o jejum prévio, dado que esses pequenos roedores não apresentam propensão ao vômito e possuem um metabolismo acelerado, impedindo períodos prolongados sem alimentação devido ao risco de hipoglicemia.

Antes da anestesia, administrou-se à pré-medicação com Ketamina (Nimatek®). A seringa foi carregada e retira-se o fármaco de modo a ficar apenas um conteúdo residual,

sendo esta quantidade considerada suficiente. Concomitantemente, Buprenorfina (Buprecare®) foi carregado na mesma seringa, com a quantidade específica a ser determinada consoante o peso do animal nas proporções de 0.1mg/kg. Após a administração dos fármacos pré anestésicos, os animais foram acondicionados num local calmo e escuro. Uma vez que o animal apresenta sintomas claros de sedação procede-se à tricotomia da área e uma primeira desinfecção com clorexidina.

Na sala de cirurgia, realiza-se uma segunda desinfecção antes da administração de lidocaína localizada nos testículos, seguida da indução com isoflurano para a manutenção anestésica com máscara adaptada. Durante essa fase, o animal foi posicionado na mesa cirúrgica em decúbito dorsal com tapete de aquecimento para prevenir a hipotermia, uma complicação anestésica significativa em NAC.

A fase seguinte envolveu a realização de uma incisão na linha média do escroto para exteriorização do testículo direito, seguido pela remoção de gordura excessiva por disseção romba de modo a visualizar e poder proceder à extração do testículo e parte do epidídimo. Este processo foi replicado para o testículo esquerdo, culminando na sutura da incisão com um ponto em U mais um ponto simples caso se justifique. A área cirúrgica foi limpa com clorexidina, e realizou-se uma verificação quanto à ausência de hemorragias (figura 14).

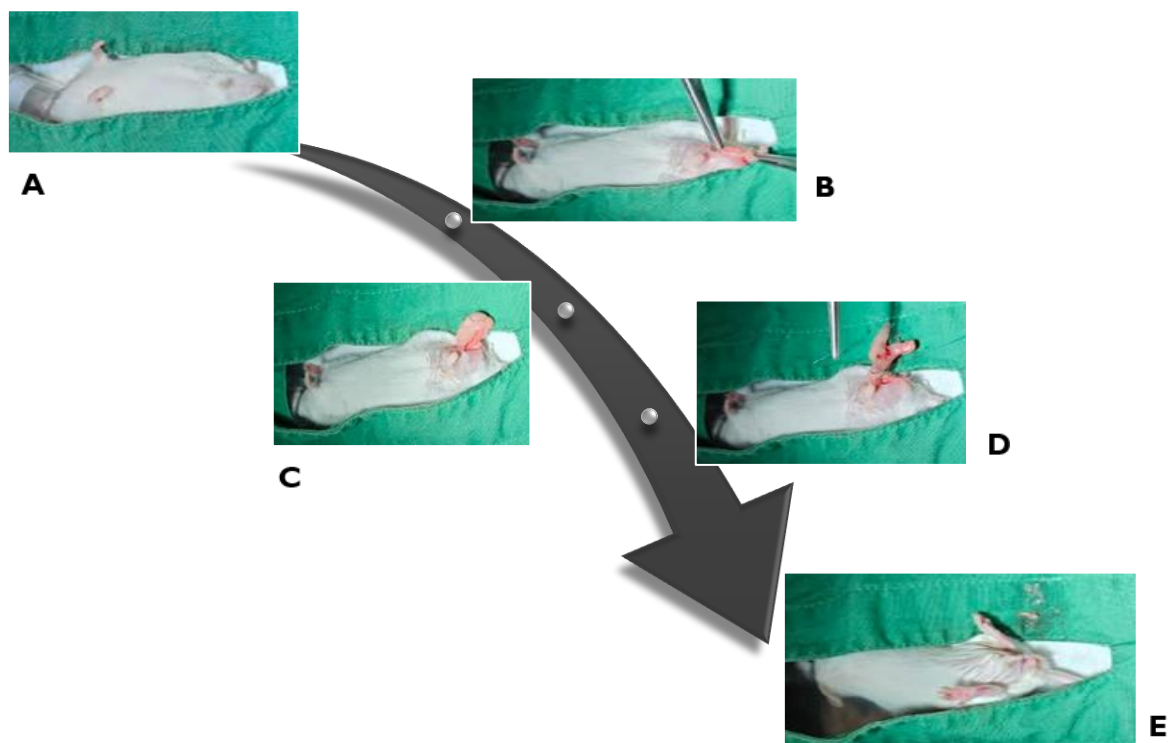


Figura 14 – Passo a passo do procedimento cirúrgico orquiectomia em murganhos. A – Decúbito dorsal, B – Dissecção romba, C – Extração do cordão espermático, D – Sutura do cordão espermático, E – Sutura em U

No recobro, os animais foram mantidos individualmente em um espaço limitado, sobre um fundo de papel branco para detecção precoce de hemorragias, com a aplicação de luz infravermelha para manter a temperatura. Em casos de hemorragias, procedeu-se imediatamente ao controlo com compressão de uma gaze na região escrotal, precisamente na sutura, durante 2 minutos, podendo ser complementado com gotas de cola cirúrgica. Após a recuperação da anestesia, foi monitorada a ingestão alimentar para evitar a hipoglicemia, com a opção de administrar soro glicosado por via oral, caso necessário.

Para o controlo da dor pós-operatória, foi prescrito Meloxicam por via oral, cujas dosagens específicas deverão ser calculadas segundo o peso de cada animal. Este é administrado de 12 em 12 horas nos primeiros três dias, finalizando com mais duas administrações a cada 24 horas após esse período.

Esperou-se um mês e meio após o procedimento cirúrgico antes de dar início à próxima fase, já que durante esse período, os machos poderão conter resíduos de espermatozoides nos ductos deferentes e também para dar tempo de baixar os níveis de testosterona para evitar brigas entre machos.

3.3.2. Apresentação dos grupos

Antes de criar os dois grupos, procedeu-se a uma primeira apresentação entre machos no dia 11 de janeiro de 2024 para verificar o efeito da orquiectomia na dinâmica social dos indivíduos.

Entre os machos que foram castrados no dia 28 de novembro de 2023 a aproximação foi positiva e não houve necessidade de os separar. Contudo, os dois machos que foram castrados no dia 20 de dezembro de 2023 ainda apresentaram sinais de agressividade e foram separados de imediato, mantidos individualmente com contacto visual e olfativo com a restante colónia de machos castrados para tentar uma nova introdução na colónia.

No dia 24 de janeiro de 2024 procedeu-se à tentativa de formar os dois grupos. A aproximação do grupo 1 foi positiva e foram vigiados de modo a perceber qualquer comportamento de agressividade.

Na formação do grupo 2, um dos sujeitos machos castrado no dia 20 de dezembro de 2023 continuou a apresentar comportamentos de agressividade tanto perante outros machos como perante fêmeas. Confrontado a tal comportamento foi gerado um subgrupo do Grupo 2. O Grupo 2A, constituído apenas pelo sujeito 9 e alojado em uma gaiola simples contendo apenas bebedouro, comedouro e esconderijo (Figura 15).



Figura 15 – Gaiola desprovida de EA

O grupo 1 foi constituído pelos sujeitos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (figura 16) a escolha dos elementos pertencentes a cada grupo foi aleatória tendo apenas o cuidado de deixar 3 fêmeas e 3 machos em cada grupo.

O grupo 2 foi composto pelos sujeitos 7, 8, 9, 10, 11 e 12 (figura 17).

GRUPO I



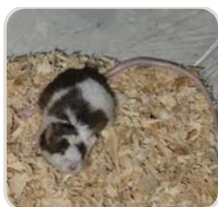
SUJEITO 1 – MACHO (branco e castanho)



SUJEITO 2 – MACHO (albino)



SUJEITO 3 – MACHO (branco)



SUJEITO 4 – FÊMEA (branco e castanho)



SUJEITO 5 – FÊMEA (branco e preto)



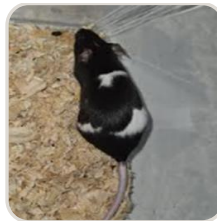
SUJEITO 6 – FÊMEA (albino)

Figura 16 – Composição grupo I

GRUPO 2



SUJEITO 7 – MACHO (branco e creme)



SUJEITO 8 – MACHO (branco e preto)



SUJEITO 9 – MACHO (branco)



SUJEITO 10 – FÊMEA (dourado)



SUJEITO 11 – FÊMEA (albino)



SUJEITO 12 – FÊMEA (tricolor: preto, creme e branco)

Figura 17 – Composição grupo 2

3.3.3 Habitat de cada grupo

O grupo 1 foi alojado numa gaiola com EA. Esta composta por uma gaiola (figura 18, nº1) acoplada a uma caixa organizadora com capacidade de 150l (figura 18, nº2).

Deste modo, consegue-se proporcionar aos animais uma parte com alto nível de substrato para poderem realizar o comportamento natural de escavação e elaboração de túneis (figura 18, nº3). Na parte superior, os animais poderão trepar (figura 18, nº4) de modo a exercitarem-se na procura por alimento devidamente colocado de forma diferente diariamente pelo tratador. Para além disso, durante o estudo o habitat sofreu várias alterações e foram adicionadas várias formas de enriquecimento ambiental.

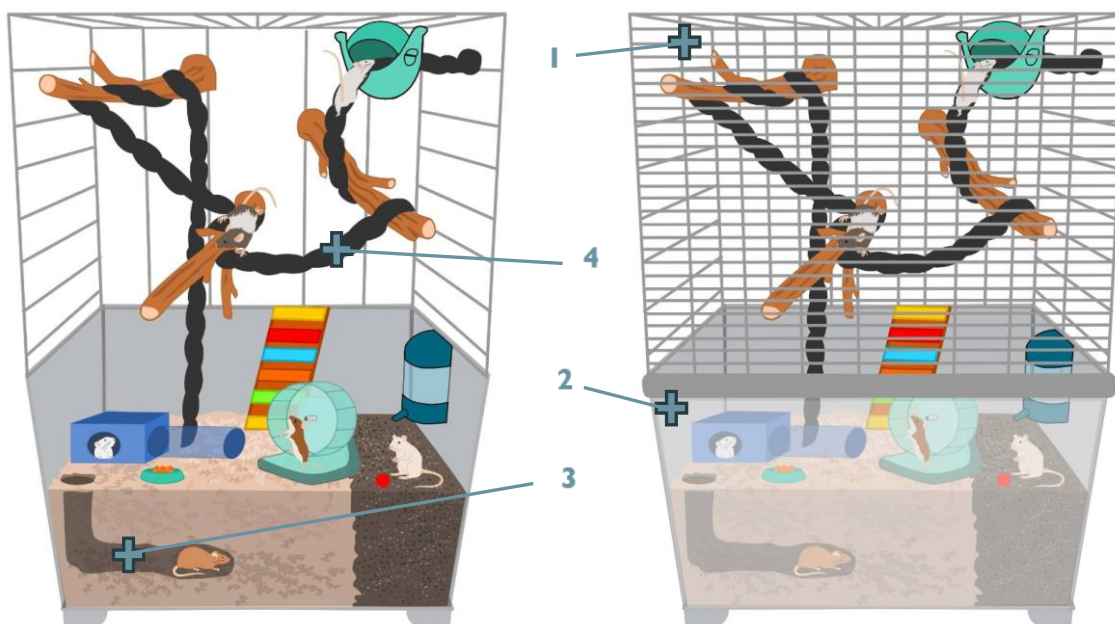


Figura 18 - Desenho completo e corte transversal representativo da gaiola com EA, realizado em Inkscape. 1 – gaiola, 2 – caixa organizadora 150l, 3 – Túnel, 4 – Cordas de tralho.

O habitat do grupo 2 constituiu uma caixa organizadora com capacidade para 80 litros, provida apenas de um bebedouro, um comedouro e um esconderijo. Nesta o substrato tem apenas a função de absorção de urina e conta com 1 a 2 centímetros de profundidade (figura 19).

O sujeito 9 foi alojado numa gaiola simples provida apenas de bebedouro, comedouro e um esconderijo. Tal como o habitat anterior, este tinha uma fina camada de substrato apenas para função de absorção de urina.

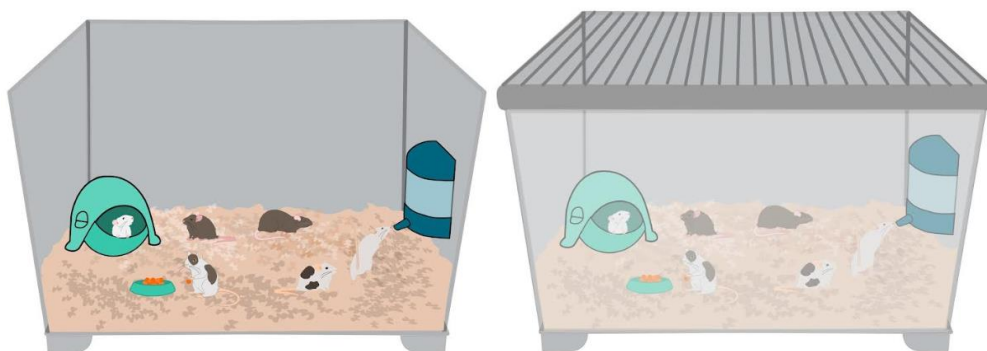


Figura 19 - Desenho completo e corte transversal representativo da gaiola sem EA, realizado em Inkscape

3.3.4. Enriquecimento ambiental em cada grupo

No Grupo 1 os 5 tipos de enriquecimento ambiental mais comuns estavam presentes, enquanto no grupo 2 apenas contava com enriquecimento social, visto estarem alojados em grupo e por último, o grupo 2A sem qualquer tipo de enriquecimento (tabela 5).

Tabela 5 - Enriquecimento ambiental presente em cada grupo em estudo

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 2A
FÍSICO	✓	✗	✗
COGNITIVO	✓	✗	✗
SENSORIAL	✓	✗	✗
SOCIAL	✓	✓	✗
ALIMENTAR	✓	✗	✗

A gaiola do grupo 1 para além do alto nível de substrato, contava com vários tipos de substratos (fibra de coco, feno e serradura), túneis e vários compartimentos (figura 20). A disposição da gaiola era mudada semanalmente.

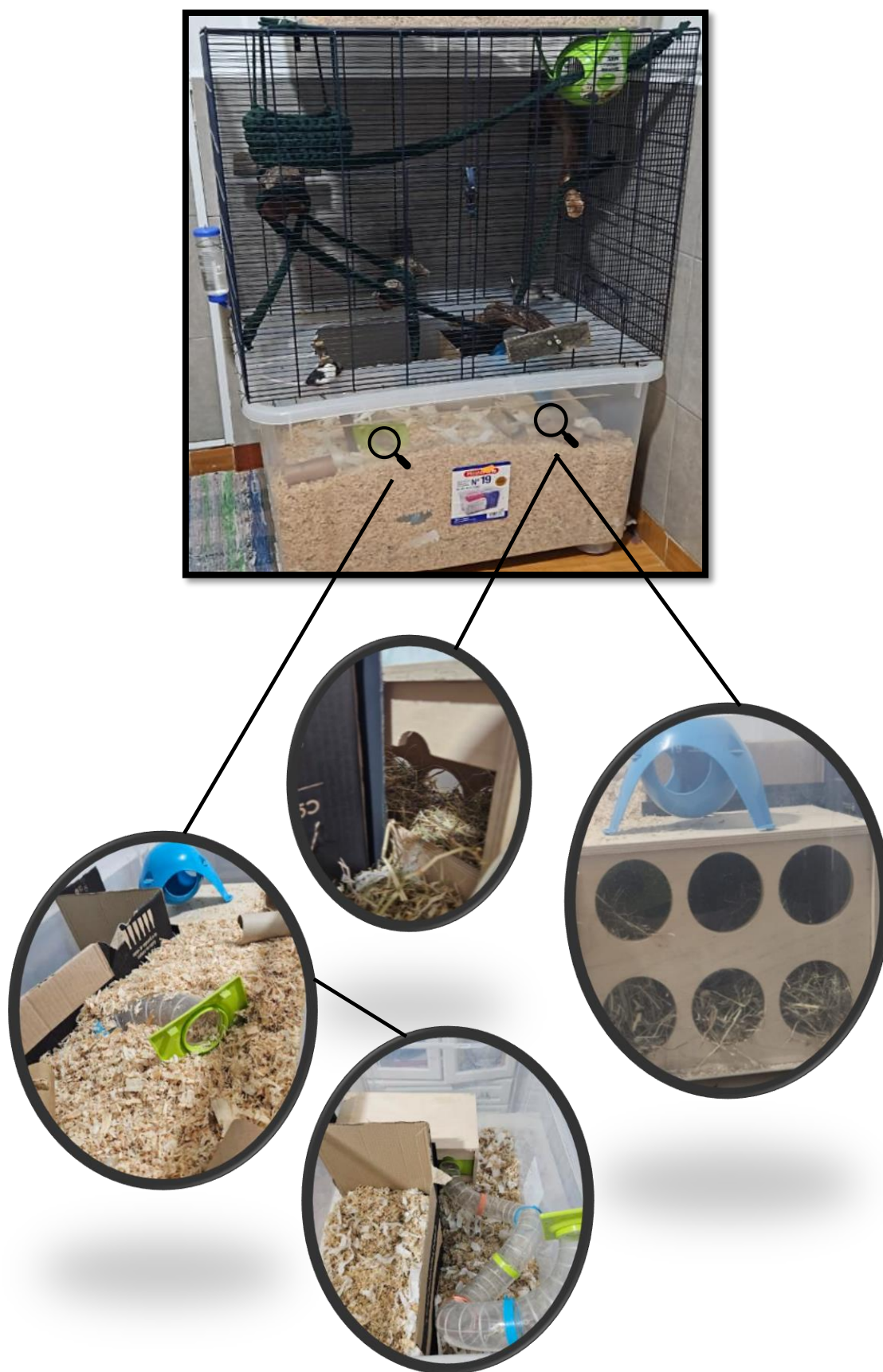


Figura 20 - Enriquecimento ambiental na gaiola do grupo I

A forma como era oferecida a alimentação também variava. O alimento era escondido para que os animais tivessem de o farejar e passar por várias etapas até chegarem ao alimento (figura 21). Para estimular os cinco sentidos esfregava-se o ambiente com ervas aromáticas, disponibilizava-se pelos de cão e gato pelo ambiente e substrato usado pelo grupo 2 com cheiro a urina e fezes.



Figura 21 – Enriquecimento ambiental na gaiola do grupo I

Para os restantes grupos, o EV apenas alimentava e procedia a higienização da gaiola semanalmente sem realizar qualquer mudança no habitat (figura 22).



Figura 22 – Gaiola sem enriquecimento ambiental do grupo II

3.3.5. Recolha de dados da fase I do estudo.

O estudo deu início no dia 4 de fevereiro de 2024, cada grupo devidamente alojado no seu habitat. A recolha de dados foi realizada uma vez por semana durante o estudo. De modo a observar os estudados no seu habitat foram instaladas quatro câmaras da marca

tp-link / tapo para registrar imagens tanto durante o dia como durante a noite graças à sua visão noturna (figura 23).



Figura 23 – Imagem registada pela câmara nº 3 em modo visão noturna

As câmaras nº 1 e 2 registavam os movimentos do grupo 1, sendo que a primeira estava posicionada de modo a capturar imagens da parte inferior do habitat (figura 24, nº1) enquanto que a segunda da parte superior (figura 24, nº2). A câmara nº3 registava os movimentos do grupo 2 (figura 24, nº3) e por último a nº4 que estava posicionada em frente ao habitat do sujeito 9.(figura 24, nº 4).



Figura 24 – imagens registadas pelas câmaras: nº1 (Grupo 1 parte inferior da gaiola), nº2 (Grupo 1 parte superior da gaiola), nº3 (Grupo 2) e nº4 (Grupo 2A)

Sempre que ocorria qualquer movimento dentro da gaiola a aplicação Android da tapo enviava uma notificação de movimento (figura 25).



Figura 25 – Notificação de movimento detetado da aplicação Tapo

Durante o período da primeira fase do estudo foram observado e retirados dados, de nível de atividade uma vez por semana. Tais como:

- ❖ Alimentar (AL);
- ❖ EA;
- ❖ Escavação (Esc);
- ❖ *Grooming* (G);
- ❖ Interação Social (IS);
- ❖ Construção Ninho (C. ninho);
- ❖ Comportamento Anormal (CA)

A observação foi realizada com a visualização de vídeos registados por camaras. Uma vez por semana também se procedeu a pesagem individual de cada animal em estudo com uma balança sensível para obtenção de pesos muito baixos e pouca margem de erro da marca Dibal. Os dados recolhidos foram registados numa ficha de registo individual.

Durante o tempo do estudo, o habitat do grupo I sofreu várias alterações de modo a enriquecer o ambiente e proporcionar desafios e atividade novas aos animais. As alterações passaram por, adição de novos objetos no ambiente, forma diferente de dispor o alimento, adição de esconderijos, introdução de cheiros novos, entre outros. Para além disso, uma vez por semana era modificado a disposição do ambiente. A interação do EV com os grupos 2 e 2A baseava-se apenas no fornecimento de alimentos.

No dia 05 de maio de 2024 foi o último dia de registo dos dados dos animais em estudo e deu-se início à segunda fase.

3.3.6. Recolha de dados da fase II do estudo.

Os animais vão ser submetidos a vários tipos de problemas de modo a averiguar se o EA teve algum efeito a nível cognitivo.

No primeiro desafio, foi colocado dentro de uma caixa organizadora com capacidade de 80l sem substrato, um tapete interativo (figura 26) onde foi escondido uma “guloseima”. Cada animal em estudo foi colocado na caixa individualmente e foi cronometrado o tempo necessário para encontrar o alimento.



Figura 26 – Tapete interativo

Na segunda prova, cada animal foi colocado dentro de uma caixa de cartão do tipo labirinto com uma pequena parte descoberta (figura 27). Na parte descoberta foram colocados pelos de um predador que neste case foi de *Felis catus*.



Figura 27 – Caixa cartão do tipo labirinto para averiguar a avaliação ao perigo de cada um dos estudados

O intuito desta prova foi averiguar se o EA teve algum efeito sobre os animais a nível da avaliação que estes tinham do perigo. Cada animal individualmente foi colocado dentro da caixa e foi cronometrado o tempo que cada um precisou para se aventurar na parte descoberta. Avaliando ainda o comportamento de cada animal antes de tentar sair pela parte descoberta.

3.3.7. Análise estatística dos dados

Neste estudo foi realizada análise descritiva dos dados obtidos através do software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 25.0. Com exceção dos dados relativos aos pesos dos sujeitos em estudo que foi realizado através do programa *Microsoft Office Excel* (2016). As variáveis categóricas analisadas foram numa primeira fase o comportamento dos sujeitos nos seus habitats, os hábitos diurnos e noturnos, assim como o peso de cada indivíduo. Na segunda e última fase foram analisados os resultados das provas as quais foram sujeitos os indivíduos em estudo.

As variáveis contínuas analisadas na fase I do estudo foram:

- ❖ Peso
- ❖ Não visível (NV)
- ❖ Enriquecimento Ambiental (EA)
- ❖ Escavação (Esc)
- ❖ *Grooming* (G)
- ❖ Interação social (IS)
- ❖ Construção do ninho (C.ninho)
- ❖ Comportamento anormal (CA)
- ❖ Hábito diurno
- ❖ Hábito noturno

As variáveis contínuas analisadas na fase II do estudo foram:

- ❖ Tempo do desafio I
- ❖ Tempo do desafio II

4. Resultados

A maioria dos objetivos do estudo foram cumpridos, na exceção de como foi referido anteriormente, devido ao falecimento de uma das ninhadas e na impossibilidade de conduzir uma nova gestação devido ao tempo limitado seguiu-se com o estudo unicamente com uma ninhada e os progenitores. A medição da corticosterona é um ponto fundamental para averiguar se os animais viviam em stress. No entanto, não foi possível conseguir um laboratório para a medição da hormona em causa a curto prazo.

No presente estudo foram avaliados numa primeira fase vários parâmetros de comportamento dos animais e numa segunda fase foram avaliados resultados após os animais serem sujeitos a desafios com o intuito de comprovar as hipóteses I, II ou III descritas nos objetivos do estudo clínico.

4.1. Variação de peso

O peso dos animais em estudo foi registado de forma individual contando no total com 14 pesagens (Anexo II).

O grupo 1 iniciou a segunda parte do estudo com uma média de 31g com um valor médio de incremento de 0,2g por pesagem. Ao fim das 14 pesagens a média do peso do grupo era de 34,8, ou seja, 3,8g a mais.

No grupo 2, este iniciou-se com uma média de 32,7g com um valor médio de incremento de 0,7g. No final a média de peso do grupo era de 41,8g. Contabilizando assim, 9,1g a mais em comparação com a pesagem inicial (tabela 6).

Tabela 6 - Média de peso por grupo das 14 pesagens realizadas (n12)

Média	GRUPO 1		GRUPO 2	
	(GRAMAS)	 EA	(GRAMAS)	
P1	31		32,7	
P2	31,3	↑ 0,3	37,5	↑ 4,8
P3	33,2	↑ 1,9	39,7	↑ 2,2
P4	32,5	↓ 0,7	39,8	↑ 0,1
P5	32,5	0	39,7	↓ 0,1
P6	32,3	↓ 0,2	39,3	↓ 0,4
P7	33,2	↓ 0,1	40,2	↑ 0,9
P8	33	↓ 0,2	41,3	↑ 1,1
P9	32,7	↓ 0,3	41,5	↑ 0,2
P10	33	↑ 0,3	41	↓ 0,5
P11	33	0	42	↑ 1
P12	35,3	↑ 2,3	41,7	↓ 0,3
P13	34,8	↓ 0,5	41,7	0
P14	34,8	0	41,8	↑ 0,1
 EA 				
Tam(n)	14	14		
Mín	31	32,7		
Máx	35,3	42		
DesvioP	1,2	2,5		

4.2. Variáveis estudadas na fase I

As variáveis observadas foram registadas individualmente (Anexo III) e foi calculada a média de cada um dos grupos para cada variável, assim como o intervalo de valores máximos e valores mínimos.

O grupo I dedicou em média 1 dia, 6 horas e 48 minutos (30,8) a alimentação, 1 dia, 9 horas e 18 minutos (33,3) ao EA fornecido, 23 horas e 48 minutos (23,8) à escavação, 6 horas e 48 minutos (6,8) ao *grooming*, 13 horas e 12 minutos (13,2) a interação social e 9 horas e 42 minutos (9,7) a construção do ninho. Os restantes 9 dias, 2 horas e 18 minutos (218,3) foram contabilizados na variável não visível (tabela 7).

Tabela 7 - Avaliação do comportamento do grupo I (n6)

GRUPO 1 (HORAS)  EA	Mínimo Estatística	Máximo Estatística	Média Estatística	Desvio Padrão
NV	185	239	218,3	22,8
AL	24	41	30,8	7,9
EA	29	38	33,3	3,6
Esc	17	31	23,8	4,7
G	3	9	6,8	2,7
IS	7	20	13,2	5,6
C. ninho	0	18	9,7	7,6

Exemplo de registo de atividade de escavação realizado pelos sujeitos I e 6 (figura 28)



Figura 28 - Atividade de escavação registado do sujeito I e 6

Durante a observação do grupo ao longo da duração do estudo, verificou-se um comportamento apenas registado entre os sujeitos com posição hierárquica mais alta, (sujeitos 3 e 4) o de acasalamento (figura 29).



Figura 29 - Copula entre sujeitos 3 e 4

No diagrama de caixas apresentado abaixo (figura 30) estão representados os intervalos de valores máximos e valores mínimos do grupo I. Na variável AL o intervalo está entre 24 e 41 horas, no EA está entre 29 e 38 horas, na Esc está entre 17 e 31 horas, no G está entre 3 e 9 horas, na IS está entre 7 e 20 horas e na C. ninho está entre 0 e 18 horas.

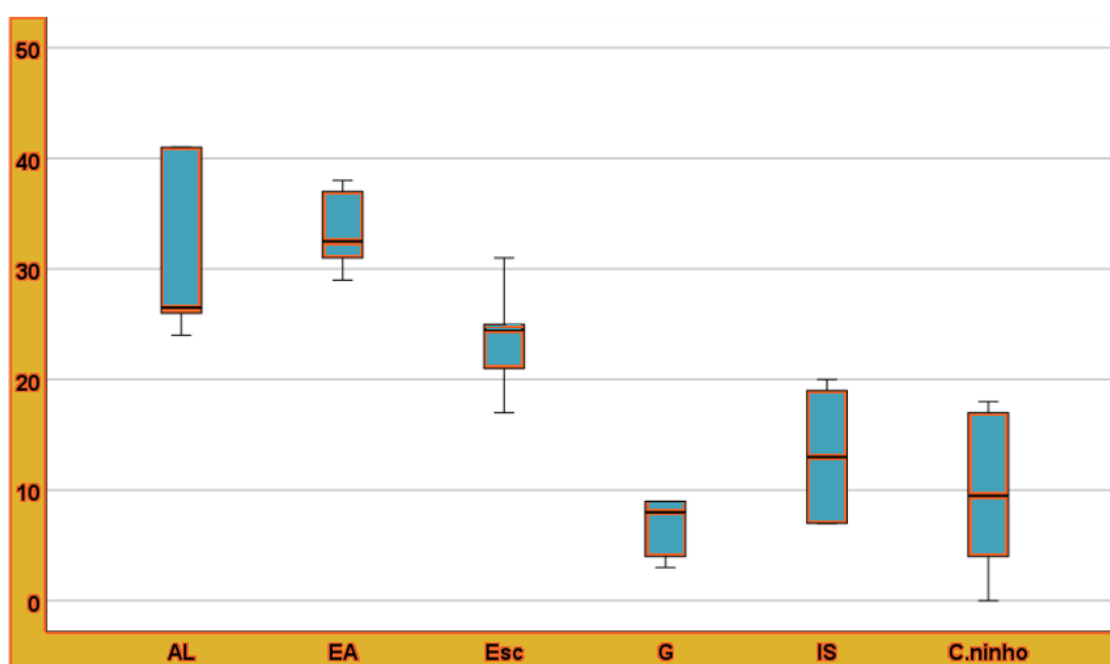


Figura 30 – Diagrama de caixas com valores de intervalo das variáveis AL, EA, Esc, G, IS e C. ninho (n6) Grupo I

O grupo 2 dedicou em média 3 dias e 10 horas (82) a alimentação, 23 horas e 36 minutos (23,6) ao *grooming*, 13 horas e 24 minutos (13,4) a interação social, 1 dia, 7 horas e 12 minutos (31,2) a construção do ninho e 8 horas (8) a comportamento anormal. Os

restantes 7 dias, 9 horas e 48 minutos (177,8) foram contabilizados na variável não visível (tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação do comportamento do grupo 2 (n5)

GRUPO 2 (HORAS) 	Mínimo Estatística	Máximo Estatística	Média estatística	Desvio Padrão
NV	164	197	177,8	15,3
AL	76	84	82	3,4
G	18	28	23,6	3,6
IS	10	20	13,4	4,4
C. ninho	21	42	31,2	8,4
CA	1	29	8	12,1

Neste grupo já foi observado CA, com maior ênfase nos sujeitos 8 e 11. na figura 31, o sujeito 8 foi visto a realizar comportamento de barbeamento.

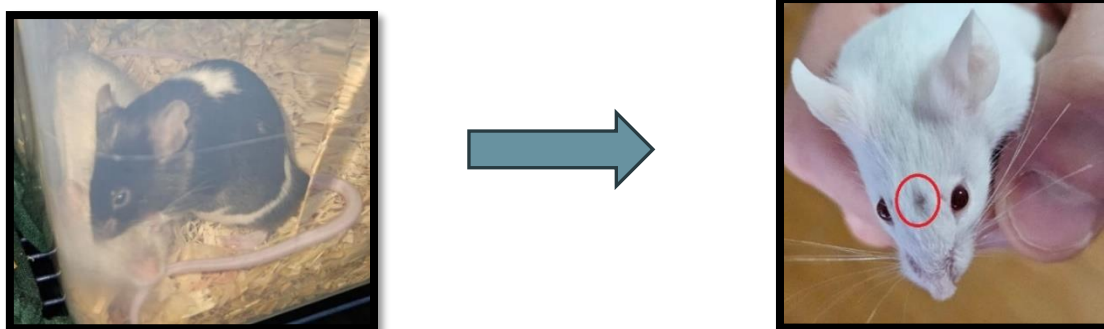


Figura 31 - Comportamento de barbeamento (*grooming* excessivo). Circunferência vermelha → lesão após sessão de barbeamento

O sujeito 11 foi o que mais dedicou tempo a atividade de CA tendo sido observado várias vezes a realizar comportamento estereotipado (figura 32).

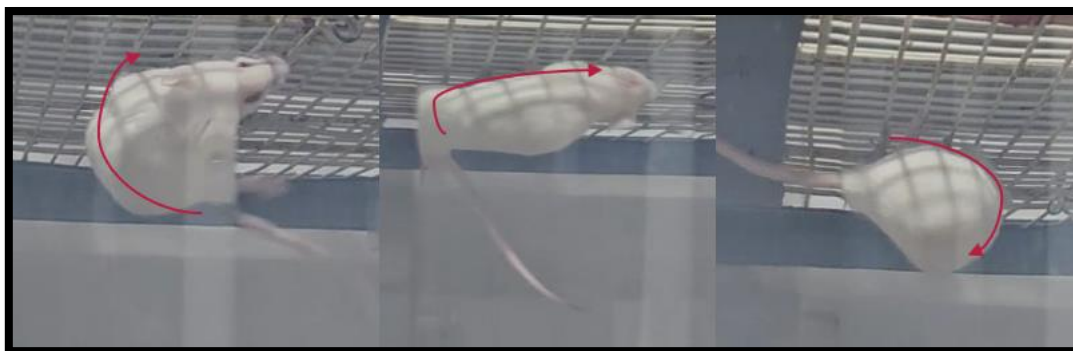


Figura 32 - Comportamento estereotipado realizado pelo sujeito 11. Andar freneticamente à roda até cair.

No diagrama de caixas apresentado abaixo (figura 33) estão representados os intervalos de valores máximos e valores mínimos do grupo 2. Na variável AL o intervalo está entre 76 e 84 horas, no G está entre 18 e 28 horas, na IS está entre 10 e 20 horas, na C. ninho está entre 21 e 42 horas e no CA está entre 1 e 29 horas.

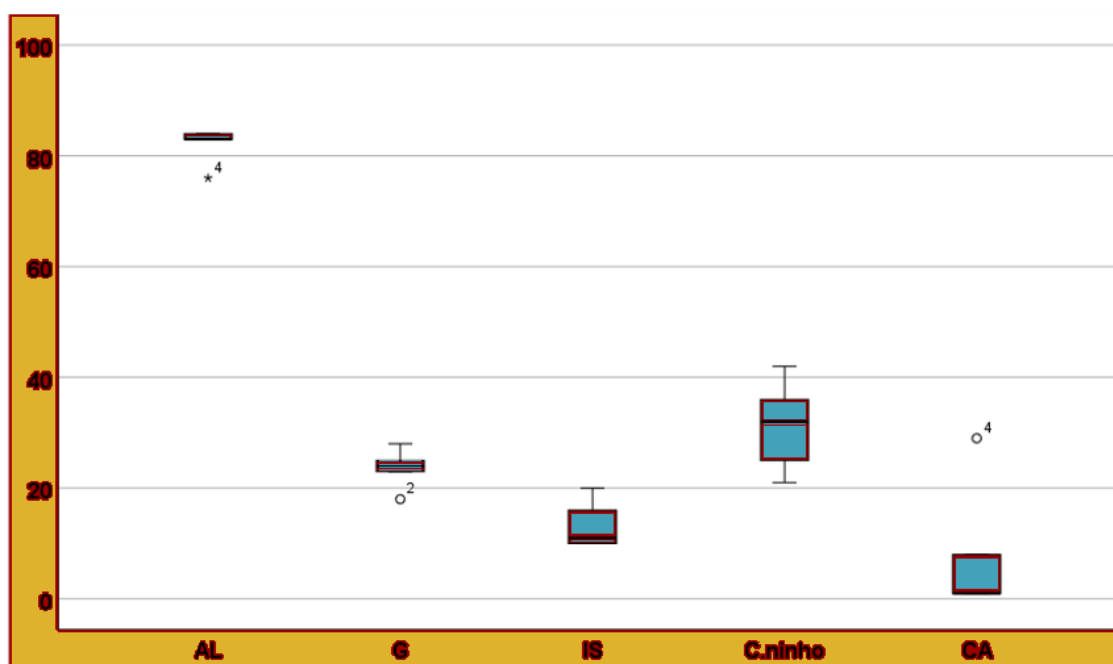


Figura 33 – Diagrama de caixas com valores de intervalo das variáveis AL, G, IS, C. ninho e CA (n5) Grupo 2

O sujeito 9 dedicou 2 dias e 23 horas (71) a alimentação, 1 dia e 9 horas (33) ao *grooming*, 21 horas (21) a construção do ninho e 1 dia e 14 horas (38) a comportamento anormal. Os restantes 7 dias e 5 horas (173) foram contabilizados na variável não visível (tabela 9).

Tabela 9 - Avaliação do comportamento do grupo 2A (n1)

GRUPO 2 – A	
	
	HORAS
NV	173
AL	71
G	33
C. ninho	21
CA	38

O CA apresentado pelo único sujeito do grupo 2A foi tal como, o do sujeito 11 o de comportamento estereotipado. O animal demonstrou grandes níveis de stress a roer as grades (figura 34) e tentar passar entre elas de forma repetitiva.



Figura 34 - Desgaste da tinta na rede do habitat sem enriquecimento do sujeito 9

Este foi ainda o único sujeito a apresentar problemas de saúde ao longo do estudo (figura 35).

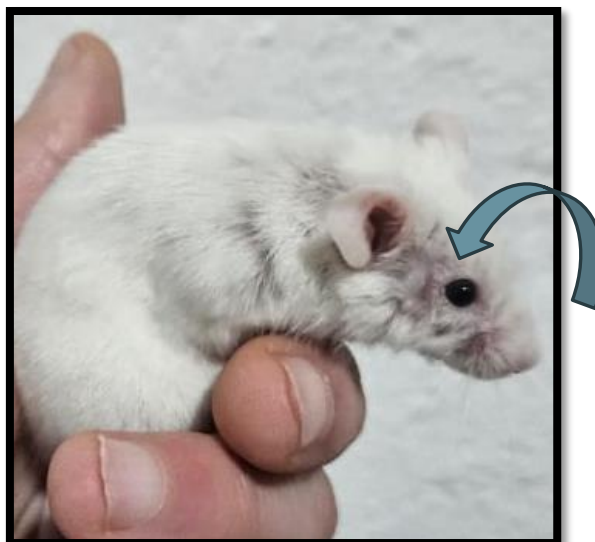


Figura 35 - Lesões dermatológicas causada por ácaros

4.3. Variação dos hábitos diurnos e noturnos

As variáveis observadas foram registadas individualmente (Anexo IIII) e foi calculada a média de cada um dos grupos para cada variável (tabela 10).

Tabela 10 - Avaliação dos hábitos diurnos e noturnos (n12)

GRUPO (HORAS)		DIURNO	NOTURNO
1  EA	MÉDIA	35,8	82
	n	6	6
2 	MÉDIA	97,2	57,2
	n	6	6

Durante as horas visualizadas o grupo 1 esteve em média ativo 1 dia, 11 horas e 48 minutos (35,8) durante o dia e 3 dias e 10 horas (82) durante a noite.

O grupo 2 esteve ativo 4 dias, 1 hora e 12 minutos (97,2) durante o dia e 2 dias, 9 horas e 12 minutos (57,2) durante a noite (figura 36).

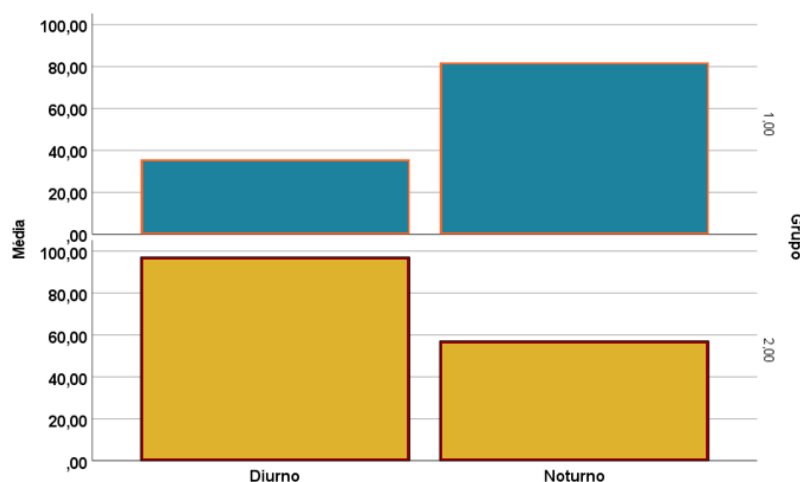


Figura 36 - Diagrama de barras com valores das variáveis “Hábitos diurnos e noturnos” (n12)

4.4. Variáveis estudada na fase II

As variáveis observadas foram registadas individualmente (Anexo V). Nas figuras 37 e 38 apresentam-se os tempos individuais necessários para realização de ambos os desafios para cada individuo e foi calculada a média de cada um dos grupos para cada variável, assim como o intervalo de valores máximos e valores mínimos.

4.4.1. Desafio I

- Grupo 1: Para realização do primeiro desafio, o sujeito 1 requereu de 17 minutos e 23 segundos. O sujeito 2, 15 minutos e 36 segundos. O sujeito 3, 7 minutos e 16 segundos. O sujeito 4, 10 minutos e 5 segundos. O sujeito 5, 15 minutos e 48 segundos e por último, o sujeito 6 com 22 minutos e 32 segundos (figura 37).
- Grupo 2: Para realização do primeiro desafio, o sujeito 7 requereu de 2 minutos e 35 segundos. O sujeito 8, 4 minutos e 2 segundos. O sujeito 9, 2 minutos e 41 segundos. O sujeito 10, 3 minutos e 11 segundos. O sujeito 11, 7 minutos e 42 segundos e por último, o sujeito 12 com 4 minutos e 13 segundos (figura 37).

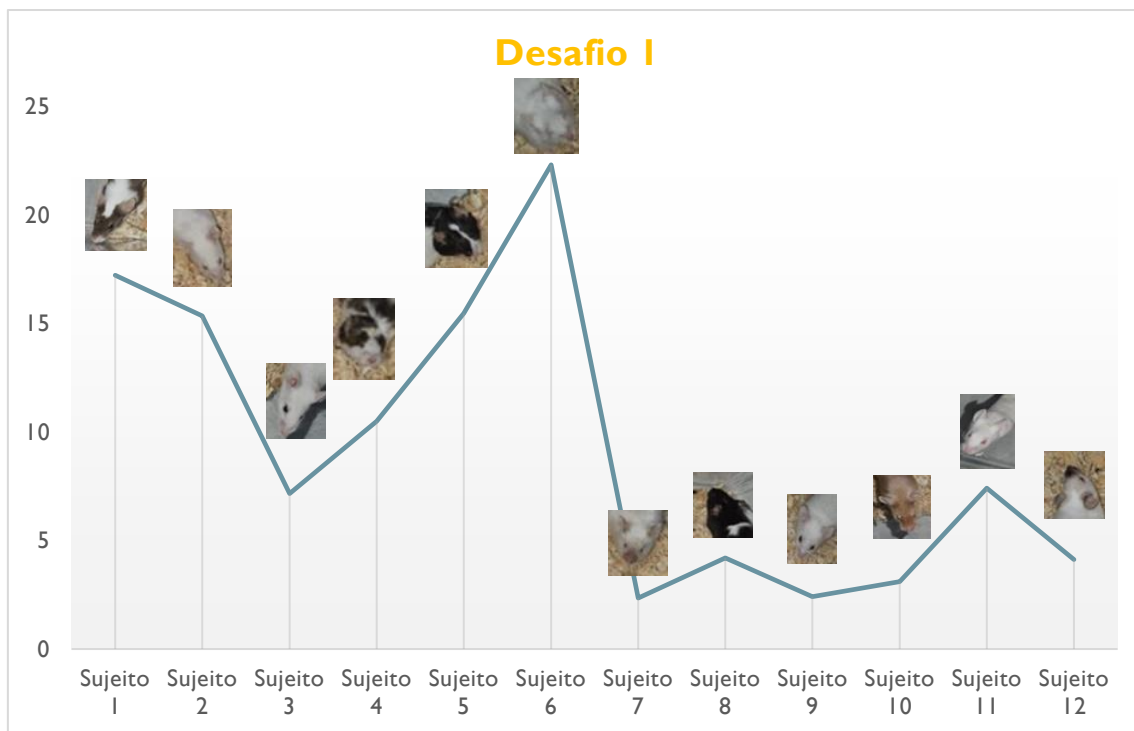


Figura 37 – Gráfico do tempo necessário a cada indivíduo para realização do desafio I

No desafio nº1, o grupo I apresentou uma média de tempo de 15 minutos e 8 segundos (14,68) e o grupo 2 realizou a prova com uma média de tempo de 4 minutos e 34 segundos (3,94)(tabela 11).

Tabela 11 – Avaliação do tempo do desafio I

DESAFIO I (MINUTOS)		Mínimo estatística	Máximo estatística	Média estatística	Desvio padrão
GRUPO I (n6)		7,16	22,32	14,68	5,3
GRUPO II (n6)		2,35	7,42	3,94	1,9

4.4.2. Desafio 2

- Grupo I: Para realização do segundo desafio, o sujeito 1 requereu de 4 minutos e 56 segundos. O sujeito 2, 5 minutos e 36 segundos. O sujeito 3, 3 minutos e 27 segundos. O sujeito 4, 4 minutos e 22 segundos. O sujeito 5, 5 minutos e 16 segundos e por último, o sujeito 6 com 6 minutos e 1 segundo (figura 38).

- Grupo 2: Para realização do segundo desafio, o sujeito 7 requereu de 1 minuto e 49 segundos. O sujeito 8, 1 minuto e 55 segundos. O sujeito 9, 1 minuto e 26 segundos. O sujeito 10, 1 minuto e 11 segundos. O sujeito 11, 2 minutos e 36 segundos e por último, o sujeito 12 com 1 minuto e 53 segundos (figura 38).



Figura 38 – Gráfico do tempo necessário a cada individuo para realização do desafio 1

No desafio nº2, o grupo 1 apresentou uma média de tempo de 5 minutos e 18 segundos (4,78). O grupo 2 realizou a prova com uma média de tempo de 1 minuto e 6 segundo (1,6) (tabela 12).

Tabela 12 – Avaliação do tempo do desafio 2

DESAFIO II (MINUTOS)		Mínimo estatística	Máximo estatística	Média estatística	Desvio padrão
GRUPO I (n6)		3,27	6,10	4,78	1
GRUPO II (n6)		1,11	2,36	1,6	0,4

A figura 39, mostra a comparação dos gráficos de linhas referentes aos dois desafios aos quais os animais foram submetidos. Cada linha representa a resposta dos animais em cada um dos testes, sendo possível observar um padrão bastante semelhante entre ambos.



Figura 39 - Comparação dos tempos necessários a cada individuo para realização dos desafios

5. Discussão

O EA em murganhos melhora consideravelmente a sua qualidade de vida. Neste estudo verificou-se que os estudados com EA não apresentaram nenhuma patologia nem demonstraram qualquer comportamento anormal, inclusive o morder ou tentar passar entre as grades tão característico dos roedores. Para além disso o grupo I criou uma hierarquia denominada por Frohlich (2020), de deme e ao longo do estudo foram demonstrando comportamentos cada vez mais parecido ao que vivenciaríamos na natureza tal como, ter comportamento de presa e hábitos mais noturnos.

Neste caso, a deme era composta por um macho dominante (sujeito 3) e dois machos subordinados (sujeito 1 e 2). Na hierarquia das fêmeas, o sujeito 4 era a fêmea alfa e as outras duas fêmeas subordinadas (sujeito 5 e 6). Os sujeitos com uma posição mais alta na hierarquia foram os mais visualizados fora do ninho e inclusive assistiu-se à cópula entre os dois indivíduos, comportamento apenas registados entre estes. Na quarta semana de observação também se verificou uma mudança nos hábitos diurnos para noturnos.

O grupo I tem uma maior taxa de horas registadas na variável “não visível” devido ao fato de estes terem um alto nível de substrato permitindo que tivessem certa atividade debaixo deste ficando fora da visão das câmaras. Em certos casos conseguiu-se registar movimento de escavação devido aos túneis feitos por eles estarem junto da parede da parte inferior do habitat.

A atividade a qual o grupo dedicou mais tempo foi na utilização do EA fornecido com maior ênfase os que envolviam alimentação. O enriquecimento sensorial despertava curiosidade aos sujeitos inclusive, desencadeou uma desarmonização entre o grupo. O sujeito 3 ficou durante alguns dias mais ativo e inquieto e brigou com o sujeito 1 sendo que este já passou a maioria do tempo dentro do ninho saindo apenas para se alimentar e hidratar terminando muitas vezes em perseguição pelo sujeito dominante. Confrontado a tal comportamento deixou-se de utilizar substrato usado por outros indivíduos como enriquecimento sensorial, usando-se apenas pelos de cão e gato e esfregar o ambiente com ervas aromáticas.

No grupo 2, os animais em estudo tiveram um comportamento parecido ao longo dos 93 dias da primeira fase do estudo. Não demonstraram haver qualquer hierarquia dentro

do grupo. Os hábitos permaneceram maioritariamente diurnos com um maior nível de atividade nas horas de movimento na divisão onde se encontravam, pelo tratador EV. Nesta colónia já se verificou a presença de algum CA destacando o sujeito II que dedicou 29 horas a comportamento estereotipado. O sujeito pulava para a grade de cima do habitat e andava à roda freneticamente até cair e voltar a saltar para repetir o processo. De todos os CA registados este foi o mais importante e o que mais se enquadra na definição de comportamento estereotipado.

O sujeito 8 também apresentou algum CA importante, este pulava nos cantos da gaiola várias vezes e andava muitas vezes para trás e para a frente. Outro comportamento registado foi o de barbeamento que segundo Rose *and* Roffe, (2013) deriva de stress.

O sujeito II dedicou muito mais tempo a CA em comparação com os sujeitos que partilhavam o mesmo habitat. O sujeito 8 dedicou 8h a comportamento anormal e os sujeitos 7, 10 e 12 (progenitores) dedicaram apenas 1h.

Apesar de todos os sujeitos viverem sob condições idênticas. Esta diferença comportamental pode ser atribuída, com grande probabilidade, às características individuais de cada animal, uma vez que, tal como em outras espécies, existem variações intrínsecas entre os indivíduos.

Embora o ambiente seja igual para todos os sujeitos, alguns animais podem ser mais suscetíveis à ausência de enriquecimento, apresentando uma maior propensão para sinais de stress e frustração. Estes indivíduos podem demonstrar uma maior vulnerabilidade à falta de estímulos externos, enquanto outros, sob as mesmas condições, revelam maior resiliência, exibindo um comportamento mais estável.

A diferença observada pode, assim, ser explicada pela interação entre predisposições individuais e a forma como cada animal reage ao ambiente. Este fenómeno sublinha a importância de considerar as diferenças individuais ao analisar o impacto do EA no comportamento animal referido por Fabienne *and* Helen, (2012). Assim, o comportamento diferencial de um dos sujeitos poderá ser um reflexo de uma maior sensibilidade à privação de enriquecimento, ilustrando que nem todos os animais reagem da mesma forma a estímulos (ou à sua ausência), ainda que expostos às mesmas condições.

No caso do sujeito 11, comparando com os restantes sujeitos pertencentes ao mesmo grupo. Esta foi a única do grupo a não atingir os 40g na décima quarta e última pesagem da fase I do estudo. Demonstrando que, o stress e o tempo dedicado a CA influenciou no peso do animal em questão (tabela 13).

Tabela 13 - Pesos individuais da décima quarta semana de estudo da fase I do grupo 2. Circunferência a vermelho → peso final sujeito 11.

Sujeitos		14 ^a
7		47
8		44
9		46
10		40
11		32
12		42

Para além disso, verifica-se que os progenitores apresentaram maior resiliência em viver num habitat monótono em comparação com os dois sujeitos que nasceram durante a pesquisa num ambiente mais enriquecido derivado do hábito que estes animais tinham em viver em condições convencionais tendo apenas acesso ao essencial para sobreviver.

Este grupo dedicou a maioria do seu tempo na alimentação, seguido da construção do ninho, sendo a única atividade que estes poderiam desenvolver dentro do seu habitat que lhe proporcione alguma satisfação ao ocupar a mente dos mesmos.

Nos diagramas de caixas apresentados nos resultados, verifica-se que os intervalos são maiores no grupo 1 devido à formação da deme e da diferença de atividade entre os sujeitos com maior posição hierárquica em comparação com os sujeitos subordinados. No grupo 2 os intervalos são pouco significativos, com alguma diferença nas variáveis C. ninho e CA. Na variável C. ninho, o intervalo deve-se às fêmeas terem dedicado mais tempo à atividade em comparação com os machos, tendo como valores mínimos o dos machos e máximos o das fêmeas. Na variável CA o intervalo deve-se a diferença de variações intrínsecas entre os indivíduos referido anteriormente, onde o sujeito 11

dedicou mais horas à atividade em comparação com os restante sujeitos pertencentes ao mesmo grupo sob condições idênticas.

No grupo 2A, composto unicamente pelo sujeito 9, foi onde foi observado o maior número de CA, dedicando 38 horas a atividade. O animal demonstrou grandes níveis de stress a roer as grades e tentar passar entre elas o que acabou por afetar o sistema imunitário do mesmo, fazendo com que este sofresse de lesões dermatológicas causadas por ácaros ao ponto de necessitar de assistência médica veterinária.

A pesagem semanal dos animais em estudo foi mais uma vertente que comprova que o EA melhora a qualidade de vida dos animais.

O grupo 1 iniciou a segunda parte do estudo com uma média de 31g com um valor médio de incremento de 0,2g por pesagem. Ao fim das 14 pesagens a média do peso do grupo era de 34,8, ou seja, 3,8g a mais.

No grupo 2, este iniciou-se com uma média de 32,7g com um valor médio de incremento de 0,7g. No final a média de peso do grupo era de 41,8g. Contabilizando assim, 9,1g a mais em comparação com a pesagem inicial. Contudo, algumas alterações no peso dos indivíduos derivam de fatores externos.

Na primeira pesagem, os animais em estudo apresentavam peso abaixo do normal em comparação a pesagens feitas anteriormente durante exames físicos para verificar o estado de saúde dos animais. Esta perda de peso deriva de o stress ao qual os animais foram submetidos em conhecer um novo habitat e a serem apresentados aos restantes indivíduos. Estes resultados comprovam que ao contrário do que afirmado por Love *et al*, (2022) mudanças constantes de habitat irão provocar perdas de peso derivado do stress e consequentemente baixas do sistema imunitário predispondo os animais a vários tipos de patologias.

Essa perca de peso fez com que nas primeiras pesagem e após ambientação dos animais ao habitat os murganhos aumentaram todos de peso, verificando uma taxa de incremento maior no grupo 2 provavelmente devido a monotonia do ambiente.

Na quarta pesagem do grupo 1, verificou-se uma descida generalizada no peso dos sujeitos. Esta pesagem ocorreu após a formação da deme, altura em que todos os indivíduos no habitat começaram a dormir no ninho do sujeito dominante. A construção

coletiva do ninho, aliada ao stress associado à definição da hierarquia dentro do grupo, parece ter contribuído para a perda de peso observada entre os sujeitos.

Na sexta pesagem, o grupo 2 sofreu uma descida na média do peso devido a uma perda substancial de peso do sujeito 9. Nessa semana o animal apresentou lesões dermatológicas que causavam imenso prurido causando mal estar. O sujeito deixou de construir ninho, dormia completamente desprotegido em sítios aleatórios e diminui a ingestão de alimento. Essa fase derivou numa perda total de 3g para o sujeito envolvido.

Na nona pesagem, verificou-se uma média de perda de peso de 0,3g no grupo 1. Na semana anterior a pesagem foi colocado dentro do habitat substrato com cheiro a urina dos sujeitos do grupo 2. O fornecimento desse enriquecimento sensorial desencadeou uma desarmonização dentro da deme como referido anteriormente. O sujeito 3 perseguiu e envolveu-se em brigas com o sujeito 1, este último tratando-se de um macho subordinado passou grande parte do tempo no ninho saindo apenas para se alimentar e hidratar. O stress sentido pelos dois fez com que os mesmos perdessem peso, afetando o sujeito 1 com a perda de 1g e 2g para o sujeito 3.

Na semana anterior a décima segunda pesagem dos animais em estudo a ausência do EV habitual fez com que fosse necessário um novo tratador para alimentar os animais. O mesmo não fornecia o mesmo cuidado e durante essa semana foi oferecido pouco EA que envolvesse alimentação facilitando o acesso a alimento aos sujeitos pertencentes ao grupo 1. Essa falta de EA registou um aumento substancial na média de peso do grupo. Por outro lado, o grupo 2 apresentou uma baixa de peso geral provavelmente por má gestão de quantidade de alimento fornecido.

Na quarta semana de observação, para além da formação da deme, verificou-se um aumento de habito noturno no grupo 1. Com maior ênfase nos sujeitos subordinados (tabela 14, circunferência a verde). Os sujeitos com uma posição mais alta na hierarquia foram os mais visualizados fora do ninho durante o dia (tabela 14, circunferência vermelha). Sendo que a função mais registada durante esse período foi o de transporte de alimento para o ninho. Durante a noite não se verificou diferenças significativas entre os estudados.

Tabela 14 - Registo individual de horas de movimentos realizados no período diurno e noturno do grupo 1. Circunferência verde → sujeitos subordinados. Circunferência vermelha → sujeitos dominantes

Sujeitos (horas)	Hábito diurno	Hábito noturno
1 	23	84
2 	19	78
3 	71	81
4 	63	79
5 	19	84
6 	20	86

No grupo 2, observamos uma diferença apenas no padrão de atividade diurna. As fêmeas (tabela 15, circunferência a vermelha) tiveram maior atividade durante o dia em comparação com os machos (tabela 15, circunferência a verde). Esta diferença poderá ser atribuída ao maior esforço despendido pelas fêmeas na construção do ninho, o que resultou numa maior dedicação à atividade física em relação aos machos. No grupo 1, não se registrou esta diferença entre os sexos, os indivíduos que mais tempo se dedicaram às atividades foram os de maior estatuto hierárquico, seguidos pelas fêmeas subordinadas e, por fim, pelos machos subordinados, embora a diferença entre estes últimos tenha sido pouco significativa.

Tabela 15 - Registo individual de horas de movimentos realizados no período diurno e noturno do grupo 2. Circunferência verde → machos. Circunferência vermelha → fêmeas.

Sujeitos (horas)	Hábito diurno	Hábito noturno
7 	87	44
8 	84	53
9 	93	65
10 	105	59
11 	110	62
12 	104	60

Na fase 2 do estudo para além de se notar uma diferença entre grupos também se verifica uma diferença entre sujeitos pertencentes ao mesmo grupo. Com o intuito de verificar o efeito do EA a nível cognitivo em murganhos, os sujeitos foram postos à prova para determinar o tempo que este necessitariam a encontrar o alimento previamente escondido num tapete interativo. Inicialmente esperava-se que os animais com EA teriam maior facilidade em encontrar o alimento. Contudo, o grupo 2 obteve melhor pontuação que o grupo 1 demonstrando necessitar de menos tempo para finalizar o desafio.

No grupo 1, os sujeitos com posição hierárquica mais alta necessitaram de menos tempo para resolver o desafio nº1 (tabela 16) em comparação com os sujeitos subordinados.

Tabela 16 – Tempo individual do grupo 1 necessário para realização do desafio 1

SUJEITOS  EA	1	2	3	4	5	6
TEMPO (minutos)	17,23	15,36	<u>7,16</u>	<u>10,5</u>	15,48	22,32

No grupo 2, em geral estes necessitaram de menos tempo para realização da prova comparando com os sujeitos do grupo 1 (tabela 17). Tal como na diferença do CA dentro deste grupo, os progenitores pareceram serem mais resilientes ao stress e a ambientação ao novo espaço foi mais rápida, podendo de seguida iniciar a resolução do desafio. O sujeito 9 que vive completamente isolado e sem EA ao contrário dos seus irmãos necessitou apenas de 2 minutos e 41 segunda para finalizar a prova.

Tabela 17 - Tempo individual do grupo 2 necessário para realização do desafio 1

SUJEITOS 	7	8	9	10	11	12
TEMPO (minutos)	2,35	4,20	2,41	3,11	7,42	4,13

O grupo 2 poderá ter apresentado resultados mais rápidos do que o grupo 1, com uma média de tempo de 3,94 minutos em comparação com a média de 14,68 minutos do grupo 1 devido à falta de uma segunda caixa organizadora. A caixa utilizada no desafio 1 também foi usada como habitat para o grupo 2, o que poderá ter provocado a presença de odores já familiares para esse grupo, explicando assim a necessidade de menos tempo para se adaptarem ao novo ambiente.

O segundo desafio, que foi uma caixa de tipo labirinto escuro em que apenas uma parte da caixa se encontrava descoberta. Os sujeitos do grupo 2 mais uma vez, finalizaram a prova mais rápido com média de 1,6 minutos sendo apenas o tempo de explorar e atravessar o labirinto até chegaram à parte descoberta sem demonstrar qualquer comportamento de medo. Já no grupo 1, os sujeitos exploraram e atravessaram o labirinto, mas ao contrário do grupo 2 estes ao chegarem à parte descoberta “espreitavam” e voltavam para traz em busca de outra saída mais segura, demorando assim, mais tempo a aventurar-se na parte descoberta e contabilizando com uma média de 4,78 minutos.

No grupo 1, os sujeitos 3 e 4 tiveram mais confiança para desenvolver o desafio apresentando os resultados de tempo mais baixos do grupo (tabela 18).

Tabela 18 - Tempo individual do grupo 1 necessário para realização do desafio 2

SUJEITOS	1	2	3	4	5	6
 EA						
TEMPO (minutos)	4,56	5,36	3,27	4,22	5,16	6,10

No grupo 2, mais uma vez os progenitores assim como o sujeito 9 apresentaram o tempo mais baixo para desenvolver o desafio (tabela 19). Sendo que o sujeito 8 com uma diferença muito pouca significativa comparando com os progenitores mas destacando o sujeito 11 com uma diferença mais significativa tanto no desafio 1 como no desafio 2.

Tabela 19 - Tempo individual do grupo 2 necessário para realização do desafio 2

SUJEITOS	7	8	9	10	11	12
						
TEMPO (minutos)	1,49	1,55	1,26	1,11	2,36	1,53

Sendo o desafio nº 2 completamente diferente do primeiro verificaram-se resultados com o mesmo padrão de diferença de tempo entre grupos e entre sujeitos do mesmo grupo desenhando duas linhas de gráfico quase idênticas.

Este desafio foi realizado numa caixa de cartão especialmente concebida para esse propósito, eliminando assim qualquer fator externo que pudesse comprometer os resultados ao contrário do que aconteceu no desafio 1. No entanto, os resultados foram semelhantes ao desafio anterior, o que sugere que o comportamento do grupo 1, mais próximo do que experienciaria na natureza, contribui para um sentido de presa mais apurado. Esta característica prolonga o tempo de ambientação, ao mesmo tempo que aumenta a capacidade de análise de perigo por parte dos indivíduos.

Tendo em conta os valores obtidos dir-se-ia que este estudo permitiu confirmar a hipótese II, de que o grupo 2 necessitou de menos tempo para realizar os desafios em comparação com o grupo 1. Contudo, este comportamento mais parecido ao que teriam

na natureza presente no grupo 1 faz com que dificilmente seja possível avaliar o efeito do EA a nível cognitivo entre grupos com comportamentos tão diferentes.

Antes da formação dos grupos, os machos foram sujeitos ao procedimento cirúrgico orquiectomia de modo a averiguar o efeito da castração na dinâmica social dos indivíduos e permitir uma convivência pacífica entre eles. Já que segundo Frohlich (2020) os machos adultos não podem ser mantidos juntos devido a agressividade intraespecífica que estes apresentam quando não estão castrados derivado do nível de testosterona presente na corrente sanguínea.

Nos 6 sujeitos machos, o procedimento de orquiectomia resultou numa convivência pacífica entre eles em 5 dos 6 sujeitos. Esta ramificação do estudo pode ser continuado futuramente como estudo principal, colmatando as falhas e limitações identificadas, sendo que a maior é o tamanho da amostra (n6). A orquiectomia nestes animais poderá ser uma mais-valia, já que no presente estudo verificou-se que dentro do grupo 2, o sujeito 9 que foi mantido isolado apresentou altos níveis de stress e comportamento anormal comparando com os restantes sujeitos mantidos em colónia. Dito isto, pelos simples factos da orquiectomia possibilitar a vida em colónia sem gravidezes indesejadas faz com que o procedimento seja uma mais valia para o bem-estar dos mesmos.

Neste estudo apenas foi excluída uma fêmea que apresentava um tumor. Para os restantes animais selecionados não foi tido em conta qualquer característica específica, bastando apenas que os animais se apresentassem saudáveis e que fossem da espécie *Mus musculus*.

Para a elaboração do estudo, foi de grande importância o conhecimento geral sobre a espécie e de como estes percebem e interagem com o seu ambiente para determinar o melhor EA. O EA tem sido amplamente estudado em roedores, mas não há consenso sobre como deveria ser o enriquecimento ou o que deveria alcançar. O uso inconsistente do termo “enriquecimento” cria desafios na obtenção de conclusões sobre a qualidade de um bom ambiente enriquecido (Ratuski & Weary, 2022).

Um dos desafios associados à catalogação dos efeitos do enriquecimento ambiental em murgos é que os relatórios de efeitos de estudos que utilizam "enriquecimento" podem ser confundidos pelo facto de os itens fornecidos na gaiola para aumentar a complexidade estrutural não serem objetos que realmente melhoram o bem-estar dos

animais. Claramente, a semântica desempenha um papel neste problema, uma vez que qualquer adição ao ambiente da gaiola parece ser automaticamente rotulada como um enriquecimento, quer a definição de enriquecimento seja alcançada ou não. Muitas ideias preconcebidas sobre os benefícios de certas estruturas de gaiola devem ser descartadas à medida que as evidências se acumulam sobre o seu valor como verdadeiros enriquecimentos (Bayne, 2018). Por exemplo, os autores Love *et al*, (2022), disponibilizam um protocolo recente para a montagem de alojamentos de murganhos com enriquecimento ambiental exemplificando a montagem do habitat dos murganhos.

No início da montagem, o autor recomenda "Preencher a base com maravalha esterilizada, suficiente para cobrir a base até aproximadamente 1 cm de profundidade". No entanto, este procedimento parece ignorar um dos comportamentos naturais mais importantes dos murganhos, a escavação. De acordo com Ratuski & Weary (2022), é crucial oferecer um substrato com maior profundidade para permitir que os murganhos expressem esse comportamento natural.

Love *et al*, (2022), propõe ainda oferecer enriquecimento ambiental separadamente da gaiola padrão onde os sujeitos vivem a maior parte do tempo, mudando os animais de ambiente frequentemente. Contudo, conforme afirmado por Frohlich, (2020) e verificado no presente estudo, alterações abruptas no habitat podem causar stress, comprometendo o sistema imunológico dos murganhos e tornando-os mais suscetíveis a doenças. A predisposição do habitat pode e deve ser alterado assim como adição de enriquecimento ambiental de modo a proporcionar ao animal uma nova atividade ou objeto a descobrir dentro do seu habitat onde se sente seguro proporcionando um nova experiência positiva e não um episódio de stress onde o animal se irá sentir vulnerável (Pritchett-Corning, 2020).

Após a conclusão do estudo, procedeu-se à apresentação de todos os sujeitos envolvidos, a introdução foi realizada de forma controlada, tendo em vista a observação e avaliação das interações sociais entre os indivíduos. Todos os sujeitos, com exceção do sujeito 9, demonstraram comportamentos adequados durante a integração no habitat com EA.

O sujeito 9, no entanto, evidenciou, uma vez mais, episódios de agressividade em relação aos outros animais. Dado o risco de comprometer a segurança e o bem-estar dos restantes animais, determinou-se que o sujeito 9 deverá viver isoladamente. Este irá

viver no habitat anteriormente utilizado pelo grupo 2 mas com acesso ao devido EA necessário para atender as suas necessidades.

Para o presente estudo, o autor da dissertação teve em conta as três atitudes referenciadas anteriormente (respeito, afeto e gratidão) assim como, o princípio dos três Rs (Reduzir, Substituir e Refinar) e compromete-se a partir deste momento, todos os sujeitos do estudo, incluindo o sujeito 9, passarão a viver como animais de companhia sob a sua tutela e cuidados, assegurando-se assim um acompanhamento contínuo e a manutenção de condições ótimas para o seu bem-estar físico e psicológico

O presente estudo é factível, repetível e seguro. As limitações identificadas foram:

1. Tamanho da amostra:
 - ❖ Amostra reduzida ($n=12$);
 - ❖ Seleção da amostra (morte de uma ninhada e impossibilidade de conduzir nova gestação);
2. Método de recolha de dados:
 - ❖ De forma manual (aumenta a probabilidade de erros);
3. Tempo e duração do estudo:
 - ❖ Estudo transversal (necessita de muito tempo para a observação);
 - ❖ Estudo longitudinal (deveria contar no mínimo de duração de 1 ano para verificar diferenças sazonais);
4. Variáveis de confusão:
 - ❖ Controlo de dados inadequados (dados difíceis de interpretar);
5. Viés do pesquisado:
 - ❖ Cuidadores cegos (ausência de EV habitual fez com haja outro cuidador, essa troca fez com que exista uma subida substancial na média de peso dos sujeitos na décima segunda semana de pesagem);
6. Limitações tecnológicas:
 - ❖ Equipamentos (falta de mais equipamentos como mais câmaras para facilitar a observação).

Como viés de seleção, o tratador foi sempre o mesmo EV em todas as observações

6. Conclusões

Este estudo atingiu os seus objetivos ao fornecer informações relevantes sobre o impacto do EA no comportamento dos murganhos.

Na primeira fase do estudo foi possível recolher informações a nível comportamental de extrema importância para conseguir avaliar os resultados.

Na segunda fase, os desafios aos quais os sujeitos foram submetidos permitiram comprovar a hipótese II, que previa que o grupo 2 apresentaria tempos inferiores ao grupo I. No entanto, os resultados devem ser interpretados com cautela, devido a várias limitações identificadas ao longo do processo de pesquisa, especialmente no que diz respeito ao comportamento dos animais, que se revelou um fator de influência significativa nos resultados obtidos.

Apesar de os resultados indicarem que o grupo 2, sem EA, obteve um desempenho superior ao do grupo I, o autor não desvaloriza a importância do EA para o bem-estar dos murganhos. O grupo que beneficiou do enriquecimento mostrou-se mais saudável e exibiu comportamentos semelhantes aos que manifestaria no seu habitat natural. Além disso, o grupo I não apresentou CA nem desenvolveu qualquer patologia.

Este estudo deverá ser continuado, de modo a colmatar as falhas e limitações identificadas, visando encontrar um consenso sobre a definição correta de EA para roedores, com adaptações específicas para cada espécie e a avaliação do seu impacto nos animais.

Em conclusão, o autor sublinha que, à medida que se aprofunda o conhecimento sobre o comportamento dos animais, será possível proporcionar um EA mais adequado e eficaz para cada espécie.

7. Bibliografia

Baumans V. (2005). Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR journal*, 46(2), 162–170.

<https://doi.org/10.1093/ilar.46.2.162>

Baumans, V., & Van Loo, P. L. (2013). How to improve housing conditions of laboratory animals: the possibilities of environmental refinement. *Veterinary journal (London, England)*, 195(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.09.023>

Bayne K. (2018). Environmental enrichment and mouse models: Current perspectives. *Animal models and experimental medicine*, 1(2), 82–90. <https://doi.org/10.1002/ame2.12015>

Bloomsmith, M. A., Perlman, J. E., Hutchinson, E., & Sharpless, M. (2018). Behavioral Management Programs to Promote Laboratory Animal Welfare. In R. H. Weichbrod (Eds.) et. al., *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing*. (2nd ed., pp. 63–82). CRC Press/Taylor & Francis.

Brown C. (2009). Novel food items as environmental enrichment for rodents and rabbits. *Lab animal*, 38(4), 119–120. <https://doi.org/10.1038/labon0409-119>

Bryda, E. C. (2013). The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Missouri medicine*, 110(3), 207–211. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23829104/>

Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic pathology*, 43(6), 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>

Eccard, J. A., Dammhahn, M., & Ylönen, H. (2017). The Bruce effect revisited: is pregnancy termination in female rodents an adaptation to ensure breeding success after male turnover in low densities?. *Oecologia*, 185(1), 81–94. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3904-6>

- Fabienne, D., & Helen, B. (2012). Assessing the effectiveness of environmental enrichment in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Zoo biology*, 31(2), 137–150. <https://doi.org/10.1002/zoo.20383>
- Frohlich J. (2020). Rats and Mice. *Ferrets, Rabbits, and Rodents*, 345–367. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48435-0.00025-3>
- Galef B. G., Jr (1999). Environmental enrichment for laboratory rodents: animal welfare and the methods of science. *Journal of applied animal welfare science : JAAWS*, 2(4), 267–280. https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0204_2
- Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K. C., Burch, P. E., Okwuonu, G., Hines, S., Lewis, L., DeRamo, C., Delgado, O., Dugan-Rocha, S., Miner, G., Morgan, M., Hawes, A., Gill, R., ... Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 428(6982), 493–521. <https://doi.org/10.1038/nature02426>
- Gong, S., Miao, Y. L., Jiao, G. Z., Sun, M. J., Li, H., Lin, J., Luo, M. J., & Tan, J. H. (2015). Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PloS one*, 10(2), e0117503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117503>
- Green, T., & Mellor, D. (2011). Extending ideas about animal welfare assessment to include 'quality of life' and related concepts. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(6), 263–271. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.610283>
- Greggor, A. L., Vicino, G. A., Swaisgood, R. R., Fidgett, A., Brenner, D., Kinney, M. E., Farabaugh, S., Masuda, B., & Lamberski, N. (2018). Animal Welfare in Conservation Breeding: Applications and Challenges. *Frontiers in veterinary science*, 5, 323. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00323>
- Griffin, K. E., Arndt, S. S., & Vinke, C. M. (2023). The Adaptation of Maslow's Hierarchy of Needs to the Hierarchy of Dogs' Needs Using a Consensus Building Approach. *Animals : an open access journal from MDPI*, 13(16), 2620. <https://doi.org/10.3390/ani13162620>

- Hampton, J. O., Hemsworth, L. M., Hemsworth, P. H., Hyndman, T. H., & Sandøe, P. (2023). Rethinking the utility of the Five Domains model. *Animal welfare (South Mimms, England)*, 32, e62. <https://doi.org/10.1017/awf.2023.84>
- Harvey, A. M., Ramp, D., & Mellor, D. J. (2022). Review of the Foundational Knowledge Required for Assessing Horse Welfare. *Animals*, 12(23), 3385. <https://doi.org/10.3390/ani12233385>
- Hutchinson, E., Avery, A., & Vandewoude, S. (2005). Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR journal*, 46(2), 148–161. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.2.148>
- Jirkof P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of neuroscience methods*, 234, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001>
- Jirkof, P., Rudeck, J., & Lewejohann, L. (2019). Assessing Affective State in Laboratory Rodents to Promote Animal Welfare-What Is the Progress in Applied Refinement Research?. *Animals* : 9(12), 1026. <https://doi.org/10.3390/ani9121026>
- Kempermann G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature reviews. Neuroscience*, 20(4), 235–245. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0120-x>
- Kentner, A. C., Speno, A. V., Doucette, J., & Roderick, R. C. (2021). The Contribution of Environmental Enrichment to Phenotypic Variation in Mice and Rats. *eNeuro*, 8(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0539-20.2021>
- Kirschner, K. M. (2021). Reduce, replace, refine-Animal experiments. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 233(3), e13726. <https://doi.org/10.1111/apha.13726>
- Lewejohann, L., Schwabe, K., Häger, C., & Jirkof, P. (2020). Impulse for animal welfare outside the experiment. *Laboratory animals*, 54(2), 150–158. <https://doi.org/10.1177/0023677219891754>
- Love, C. J., Gubert, C., Renoir, T., & Hannan, A. J. (2022). Environmental enrichment and exercise housing protocols for mice. *STAR protocols*, 3(4), 101689. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101689>

- Maple, T.L., Perdue, B.M. (2013). Psychology and Animal Welfare. In: Zoo Animal Welfare. Animal Welfare, vol 14. Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-35955-2_5
- Meagher, R. K., & Mason, G. J. (2012). Environmental enrichment reduces signs of boredom in caged mink. *PloS one*, 7(11), e49180.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049180>
- Mellor, D. J., & Reid, C. S. W. (1994). Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. Improving the well-being of animals in the research environment, 3-18.
- Mellor, D. J., & Webster, J. R. (2014). Development of animal welfare understanding drives change in minimum welfare standards. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 33(1), 121–130. <https://doi.org/10.20506/rst.33.1.2258>
- Mellor, D. J., & Beausoleil, N. (2015). Extending the ‘Five Domains’ model for animal welfare assessment to incorporate positive welfare states. *Animal Welfare*, 24(3), 241–253. doi:10.7120/09627286.24.3.241
- Mellor, D. J., Hunt, S. & Gusset, M. (2015) Caring for Wildlife: The World Zoo and Aquarium Animal Welfare Strategy. Gland: WAZA Executive Office Gland, Switzerland, 87 pp
- Mellor, D. J. (2017). Operational Details of the Five Domains Model and Its Key Applications to the Assessment and Management of Animal Welfare. *Animals* 7, 60(8).
<https://doi.org/10.3390/ani7080060>
- Mellor, D. J., Beausoleil, N. J., Littlewood, K. E., McLean, A. N., McGreevy, P. D., Jones, B., & Wilkins, C. (2020). The 2020 Five Domains Model: Including Human-Animal Interactions in Assessments of Animal Welfare. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10(10), 1870. <https://doi.org/10.3390/ani10101870>
- Miller, L. J., & Chinnadurai, S. K. (2023). Beyond the Five Freedoms: Animal Welfare at Modern Zoological Facilities. *Animals* : 13(11), 1818.
<https://doi.org/10.3390/ani13111818>

- Möller, C., Wolf, F., van Dijk, R. M., Di Liberto, V., Russmann, V., Keck, M., Palme, R., Hellweg, R., Gass, P., Otzdorff, C., & Potschka, H. (2018). Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsia*, 59(4), 765–777. <https://doi.org/10.1111/epi.14028>
- Nawroth, C., Langbein, J., Coulon, M., Gabor, V., Oesterwind, S., Benz-Schwarzburg, J., & von Borell, E. (2019). Farm Animal Cognition-Linking Behavior, Welfare and Ethics. *Frontiers in veterinary science*, 6, 24. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00024>
- Oliver, V. L., Thurston, S. E., & Lofgren, J. L. (2018). Using Cageside Measures to Evaluate Analgesic Efficacy in Mice (*Mus musculus*) after Surgery. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 57(2), 186–201.
- Olsson, I. A., & Dahlborn, K. (2002). Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Laboratory animals*, 36(3), 243–270. <https://doi.org/10.1258/002367702320162379>
- Palombit R. A. (2015). Infanticide as sexual conflict: coevolution of male strategies and female counterstrategies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(6), a017640. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017640>
- Paredes, F. D. M. F., Yanavilca, R. A. M., Fernández, A. L. R., & Tarmeño, R. A. C. (2008). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. *Ministerio de salud del Perú*.
- Pilny, A. A. (2015). Small exotic companion mammal wellness management and environmental enrichment. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, 18(2), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2015.01.002>
- Pritchett-Corning, K. R. (2020). Environmental Complexity and Research Outcomes. *ILAR journal*, 60(2), 239–251. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilaa007>
- Ratuski, A. S., & Weary, D. M. (2022). Environmental Enrichment for Rats and Mice Housed in Laboratories: A Metareview. *Animals* : 12(4), 414. <https://doi.org/10.3390/ani12040414>
- Rojas-Carvajal, M., Sequeira-Cordero, A., & Brenes, J. C. (2022). The environmental enrichment model revisited: A translatable paradigm to study the stress of our modern

lifestyle. *The European journal of neuroscience*, 55(9-10), 2359–2392.
<https://doi.org/10.1111/ejn.15160>

Rose, P. E., & Roffe, S. M. (2013). A case study of Malayan tapir (*Tapirus indicus*) husbandry practice across 10 zoological collections. *Zoo biology*, 32(3), 347–356.
<https://doi.org/10.1002/zoo.21018>

Sans-Fuentes, M. A., & Salvador, M. A. (2017). Ratón casero—*Mus musculus* Linnaeus, 1758. https://digital.csic.es/bitstream/10261/112032/4/musmus_v1.pdf

Scharmann, W. (1991). Improved Housing of Mice, Rats and Guinea-pigs: A Contribution to the Refinement of Animal Experiments. *Alternatives to Laboratory Animals*, 19(1), 108–114. doi:[10.1177/026119299101900120](https://doi.org/10.1177/026119299101900120)

Segovia, G., del Arco, A., & Mora, F. (2009). Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 116(8), 1007–1016. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0214-0>

Shoib, S., Amanda, T. W., Menon, V., Ransing, R., Kar, S. K., Ojeahere, M. I., Halabi, S. E., & Saleem, S. M. (2022). Is Maslow's Hierarchy of Needs Applicable During the COVID-19 Pandemic?. *Indian journal of psychological medicine*, 44(1), 98–100.
<https://doi.org/10.1177/02537176211060435>

Simone-Freilicher, E., & Rupley, A. E. (2015). Juvenile psittacine environmental enrichment. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, 18(2), 213–231.
<https://doi.org/10.1016/j.cvex.2015.01.003>

Terao, M., & Katayama, I. (2016). Local cortisol/corticosterone activation in skin physiology and pathology. *Journal of dermatological science*, 84(1), 11–16.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.06.014>

Tynes, V. V., & Sinn, L. (2014). Abnormal repetitive behaviors in dogs and cats: a guide for practitioners. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 44(3), 543–564. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.01.011>

Winters, C., Gorssen, W., Ossorio-Salazar, V. A., Nilsson, S., Golden, S., & D'Hooge, R. (2022). Automated procedure to assess pup retrieval in laboratory mice. *Scientific reports*, 12(1), 1663. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05641-w>

Anexos

Anexo I - Parecer Orbea



Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais do Instituto Politécnico de Portalegre ORBEA – IPPortalegre

PARECER 17/2023

O Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais do Instituto Politécnico de Portalegre (ORBEA – IPPortalegre), designado pelo Despacho 06/2023 do Sr. Presidente do Instituto Politécnico de Portalegre, avaliou no dia 24 de maio de 2023 o pedido de avaliação do projeto/atividade intitulado/a: **Enriquecimento Ambiental em Novos Animais de Companhia e o seu Efeito a Nível Cognitivo**, cujo promotor é **Daniel José Almeida Nogueira**, e analisou a proposta tendo em consideração os pressupostos previstos no Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de agosto, designadamente:

- Envolvimento de procedimentos com animais, conforme a definição prevista na alínea h) do art.º 3º do Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de agosto e, em caso afirmativo:
- Grau de severidade dos mesmos e adequação do perfil da pessoa responsável pela sua execução;
- Objetivos previstos e seu enquadramento;
- Justificação da realização dos procedimentos, tendo em conta os princípios dos 3R (*replace, reduce, refine*);
- Envolvimento da ocorrência de animais;
- Utilização de espécies animais sujeitas a restrições especiais e requisitos específicos;
- Realização de procedimentos excluídos do âmbito de aplicação do Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de agosto;

Na sequência da análise produzida por um painel de 2 avaliadores sobre a documentação submetida, o ORBEA - IPPortalegre decidiu emitir **PARECER FAVORÁVEL** à proposta, sendo que a mesma dispensa a submissão de pedido de autorização à Direção Geral de Alimentação e Veterinária.

A Diretora do ORBEA – IPPortalegre,



Praça do Município, 11 | 7300-110 Portalegre | T +351 245 301 500 | F +351 245 330 353 | E geral@ippportalegre.pt

www.ippportalegre.pt

IPP.GER.4-Rev.5

Anexo II - Variação de peso individual

Sujeitos	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	13 ^a	14 ^a
1  EA	32	32	36	34	34	34	35	35	34	35	36	38	38	38
2  EA	32	32	34	34	34	34	34	34	34	34	34	37	36	36
3  EA	36	36	38	37	37	36	37	37	35	36	36	40	39	38
4  EA	30	31	33	33	32	32	33	32	32	32	32	34	34	34
5  EA	30	30	31	31	31	31	32	32	32	32	32	33	33	33
6  EA	26	27	27	26	27	27	28	28	29	29	28	30	29	30
7 	36	42	46	46	45	46	47	47	47	46	48	47	47	47
8 	33	40	41	42	43	42	43	44	44	43	45	44	44	44
9 	33	38	41	43	41	38	40	43	44	44	44	45	45	46
10 	32	37	38	38	39	39	39	40	40	40	41	40	40	40
11 	30	32	34	32	31	31	32	33	33	32	32	32	32	32
12 	32	36	38	38	39	40	40	41	41	41	42	42	42	42

Anexo III - Tabela de recolha de dados comportamentais individuais e estatística descritiva dos mesmos

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NV	229	239	185	194	233	230	197	191	173	172	164	165
AL	26	24	41	41	27	26	84	83	71	83	76	84
EA	31	29	38	37	31	34	X	X	X	X	X	X
ESC	25	21	31	24	17	25	X	X	X	X	X	X
G	9	9	4	3	7	9	23	18	33	24	25	28
IS	12	14	19	20	7	7	10	11	X	20	10	16
C.ninho	4	0	18	17	14	5	21	25	21	36	32	42
CA	X	X	X	X	X	X	1	8	38	1	29	1

Grupo I

Estatística Descritiva

	N	Mínimo	Máximo	Média	Erro Desvio
NV	6	185,00	239,00	218,3333	22,78303
AL	6	24,00	41,00	30,8333	7,93515
EA	6	29,00	38,00	33,3333	3,61478
ESC	6	17,00	31,00	23,8333	4,66548
G	6	3,00	9,00	6,8333	2,71416
IS	6	7,00	20,00	13,1667	5,63619
C.ninho	6	,00	18,00	9,6667	7,60701
N válido (de lista)	6				

Grupo II

Estatística Descritiva

	N	Mínimo	Máximo	Média	Erro Desvio
NV	5	164,00	197,00	177,8000	15,25451
AL	5	76,00	84,00	82,0000	3,39116
G	5	18,00	28,00	23,6000	3,64692
IS	5	10,00	20,00	13,4000	4,44972
C.ninho	5	21,00	42,00	31,2000	8,40833
CA	5	1,00	29,00	8,0000	12,12436
N válido (de lista)	5				

Anexo IV - Tabela de recolha de hábitos diurnos e noturnos individuais e estatística descritiva dos mesmos

Sujeitos (horas)	Hábito diurno	Hábito noturno
1  EA	23	84
2  EA	19	78
3  EA	71	81
4  EA	63	79
5  EA	19	84
6  EA	20	86
7 	87	44
8 	84	53
9 	93	65
10 	105	59
11 	110	62
12 	104	60

Relatório			
Grupo		Diurno	Noturno
1,00	Média	35,8333	82,0000
	N	6	6
	Erro Desvio	24,31803	3,16228
2,00	Média	97,1667	57,1667
	N	6	6
	Erro Desvio	10,64738	7,57408
Total	Média	66,5000	69,5833
	N	12	12
	Erro Desvio	36,69159	14,10002

Anexo V - Tabela de recolha dos tempos necessários para realização da prova individual e estatística descritiva dos mesmos

Sujeitos	Desafio I	Desafio II
1 	17,23	4,56
2 	15,36	5,36
3 	7,16	3,27
4 	10,5	4,22
5 	15,48	5,16
6 	22,32	6,10
7 	2,35	1,49
8 	4,20	1,55
9 	2,41	1,26
10 	3,11	1,11
11 	7,42	2,36
12 	4,13	1,53

Descritivas

prova = 1,00, grupo = 1,00

Estatística Descritiva^a

	N	Mínimo	Máximo	Média	Erro Desvio
Tempoprova	6	7,16	22,32	14,6750	5,29145
N válido (de lista)	6				

a. prova = 1,00, grupo = 1,00

prova = 1,00, grupo = 2,00

Estatística Descritiva^a

	N	Mínimo	Máximo	Média	Erro Desvio
Tempoprova	6	2,35	7,42	3,9367	1,88531
N válido (de lista)	6				

a. prova = 1,00, grupo = 2,00

prova = 2,00, grupo = 1,00

Estatística Descritiva^a

	N	Mínimo	Máximo	Média	Erro Desvio
Tempoprova	6	3,27	6,10	4,7783	,98644
N válido (de lista)	6				

a. prova = 2,00, grupo = 1,00

prova = 2,00, grupo = 2,00

Estatística Descritiva^a

	N	Mínimo	Máximo	Média	Erro Desvio
Tempoprova	6	1,11	2,36	1,5500	,43308
N válido (de lista)	6				

a. prova = 2,00, grupo = 2,00