

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE A  
ANSIEDADE E MORFOLOGIA NEURONAL DE COELHOS**  
*(Oryctolagus cuniculus)*

**THAÍS FREITAS MARQUES BOZICOVICH**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós Graduação em Zootecnia  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutora em  
Zootecnia, Área de Concentração  
Produção Animal.

BOTUCATU - SP  
Outubro -2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE A  
ANSIEDADE E MORFOLOGIA NEURONAL DE COELHOS**  
*(Oryctolagus cuniculus)*

**Thaís Freitas Marques Bozicovich**

Mestre em Zootecnia

**Orientadora:** Prof. Ass. Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura

**Co-orientador:** Prof. Dr. Jose de Anchieta Castro e Horta Junior

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Zootecnia, Área de Concentração Produção Animal.

BOTUCATU - SP  
Outubro -2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

B793e Bozicovich, Thaís Freitas Marques, 1983-  
Efeito do enriquecimento ambiental sobre a ansiedade e morfologia neuronal de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Thaís Freitas Marques Bozicovich. - Botucatu : [s.n.], 2015

v, 88 f. : fots. color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2015

Orientador: Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura  
Coorientador: José de Anchieta Castro e Horta Junior  
Inclui bibliografia

1. Coelho - Morfologia. 2. Coelho - Comportamento.  
3. Córtex cerebral. 4. Animais - Proteção. I. Moura, Ana Silvia Alves Meira Tavares. II. Horta Júnior, José de Anchieta Castro e. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

**DEDICO**

*Aos meus queridos pais, CELSO e MARIA CLÁUDIA, pelo amor, carinho e apoio incondicional que me deram em todas as fases da minha vida. Pela educação que recebi e por me guiarem no caminho certo.*

*Ao meu esposo MARCELO, por todo amor, compreensão e ajuda. Por nunca me deixar desanimar mesmo nas horas mais difíceis.*

*A minha sogra MARIA LUZINETE, pelo seu apoio, incentivo e por todo cuidado e carinho com o meu bebe enquanto eu me dedicava a esse trabalho.*

*Ao meu filho DANTE, que veio alegrar a minha vida.*

**OFEREÇO**

*À Deus, que é presença constante em minha vida e me deu as forças necessárias para a realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e mentora Prof<sup>ª</sup>. Ass. Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura, que confiou em mim e me deu a chance de realizarmos este trabalho. Por ter sido durante esses anos mais que professora e orientadora, mas também grande amiga e incentivadora.

Ao Prof. Dr. Jose de Anchieta Castro e Horta Junior, pela dedicação, orientação e ensinamentos valiosos. Pelo exemplo de profissional, pelo apoio oferecido sempre e pela amizade conquistada durante esses anos de convivência.

Ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, oportunidade da realização deste curso.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – (Processo no. 2012/17157-7) pela concessão de bolsa de estudo e reserva técnica, viabilizando a realização deste trabalho.

À colaboradora e amiga Dra Simone Fernandes, Zootecnista e Auxiliar Acadêmica do Departamento de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, pela imensa ajuda, apoio e amizade.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e Instituto de Biociências UNESP, Botucatu, por me oferecer a infra-estrutura necessária para a realização das atividades deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Neuromorfologia, do Departamento de Anatomia, do Instituto de Biociências UNESP, Botucatu, pelo apoio na condução das análises.

Ao colaborador Dair Vieira, funcionário da Área de Produção de coelhos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, pela imensa ajuda prestada e pela grande amizade.

A amiga e doutoranda Nicole Orsi Barioni pela grande amizade, apoio e ajuda durante a realização das análises.

À Pamela Assis Gelier, aluna de graduação do curso de Zootecnia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu pela sua cooperação e ajuda.

Aos secretários da seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, Seila Cristina Cassinelli Vieira e Ellen Cassemiro Guilhen, pelo auxílio e prestação de serviços.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>Página</b>
CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	2
1. O coelho: histórico e características morfo-fisiológicas.....	2
2. Hábitos comportamentais .....	3
3. Cunicultura e o bem-estar animal .....	4
4. Avaliação do bem-estar .....	5
5. Enriquecimento Ambiental .....	7
5.1. Enriquecimento físico .....	8
5.2. Enriquecimento social .....	11
6. Modelo animal para o estudo do medo e ansiedade .....	15
7. Efeito do enriquecimento morfologia neuronal .....	19
7.1 Neurotransmissores.....	20
7.2 Fatores neurotróficos e neurogênese .....	21
7.3 Mudanças morfológicas .....	22
Referências Bibliográficas.....	24
 <b>CAPÍTULO II</b>	
<b>AValiação dos comportamentos ligados à ansiedade de</b>	
<b>COELHOS EM AMBIENTE ENRIQUECIDO</b> .....	36
Resumo .....	36
Abstract .....	37
Introdução .....	38
Material e Métodos .....	39
Resultados e Discussão.....	43
Conclusão .....	48
Referências Bibliográficas.....	49
 <b>CAPÍTULO III</b>	
<b>AValiação da morfologia neuronal de coelhos em</b>	
<b>CRESCIMENTO EM AMBIENTE ENRIQUECIDO</b> .....	60
Resumo .....	60
Abstract.....	61
Introdução .....	62
Material e Métodos .....	63
Resultados e Discussão.....	65
Conclusão .....	67
Referências Bibliográficas.....	68
 <b>CAPÍTULO IV</b>	
Implicações.....	75
 <b>APÊNDICE</b>	
Padronização de métodos de estudo da morfologia neuronal.....	78

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>CAPÍTULO II</b>	<b>Página</b>
Tabela 1 Comportamentos dos coelhos, ensaio piloto, no teste de labirinto em cruz elevado aos 49 e 79 dias .....	53
Tabela 2 Desempenho dos coelhos, ensaio piloto, em crescimento de acordo com o enriquecimento físico .....	54
Tabela 3 Comportamentos dos coelhos no teste de labirinto em cruz elevado .....	55
Tabela 4 Desempenho dos coelhos em crescimento de acordo com o tipo de enriquecimento .....	57
 <b>CAPÍTULO III</b>	
Tabela 1 Características morfológicas de neurônios piramidais da área pré-central (motora) do córtex frontal de coelhos em crescimento .....	72
Tabela 2 Características morfológicas de neurônios piramidais da área pós-central (somato-sensorial) do córtex parietal de coelhos em crescimento .....	73

## INDICE DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO II</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Gaiolas com enriquecimento físico e social.....	52
Figura 2. Labirinto em cruz elevado utilizado na observação.....	52
Figura 3. Efeito da interação do enriquecimento social x idade, sobre o numero de tentativas de entrada no braço aberto. ....	56
Figura 4. Efeito da interação enriquecimento social x ambiente sobre a conversão alimentar.....	58
 <b>CAPÍTULO III</b>	
Figura 1. Morfologia dos neurônios piramidais da área cortical motora primária em todos os tratamentos. ....	70
Figura 2. Morfologia dos neurônios piramidais da área cortical somatossensorial primária em todos os tratamentos.....	71
 <b>APÊNDICE</b>	
Figura 1. Identificação das áreas corticais pré e pós-central. ....	84
Figura 2. Fotomicrografia de secção coronal do telencéfalo evidenciando a lesão eletrolítica no córtex pré-central segundo as coordenadas estereotáxicas estabelecidas.....	85
Figura 3. Resultado da padronização das técnicas morfológicas para estudo da morfologia neuronal.. ....	86

## **CAPÍTULO I**

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1. O coelho: histórico e características morfo-fisiológicas

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) é um mamífero lagomorfo da família dos *Leporidae* pertencente ao gênero *Oryctolagus*. Caracteriza-se pela cauda curta, orelhas e patas compridas. Esse pequeno mamífero encontra-se facilmente em muitas regiões do planeta. Os vestígios mais antigos do coelho foram encontrados na Ásia e fósseis também foram descobertos na Península Ibérica. A partir do extremo sudoeste da Europa, o coelho-europeu (*O.*) espalhou-se por todo o continente e, nos últimos séculos, por todo o mundo.

O coelho é originário da península Ibérica tendo sido descoberto pelos fenícios que, ao verem a alta e rápida reprodução destes animais, apelidaram o país de “I Spah Im” que significa “País dos coelhos”, derivando o nome “Hispania” (Quinton, 2005). No império Romano, sua criação já era descrita para consumo humano da carne. No século XI, os monges os criavam em grandes áreas fechadas chamadas “garenne” o que facilitou a reprodução. Como estes animais ocupavam pouco espaço, se alimentavam pouco e se reproduziam em grande quantidade e em curto espaço de tempo, as expedições marinhas viam os coelhos como uma reserva de carne ideal para as longas viagens. Desde o século XVI, os coelhos seguiram junto a explorações e expedições ocidentais, se proliferando por diversas partes do mundo. Com a abolição das criações “garenne”, as “cuniculturas” surgiram mais organizadas e controladas, com animais separados por raça, sexo e idade. (Quinton, 2005).

Em 1638 Willian Harvey, médico britânico, foi pioneiro ao usar o coelho como modelo animal no seu estudo do funcionamento do sistema circulatório (Harvey, 1638). O uso do coelho em testes toxicológicos foi iniciado a partir da metade do século XIX, quando se descobriu que podiam ser alimentados com beladona (uma das plantas mais tóxicas do hemisfério ocidental) sem que se intoxicassem. Assim foi identificada a atropinesterase, enzima presente no soro dos coelhos que desativa a atropina e drogas derivadas. O coelho é o modelo biológico usado para testes de pirogênio, sendo portanto, muito usado na liberação de produtos imunobiológicos (Quinton, 2005).

Entre as espécies convencionais de animais de laboratório (ratos, hamister, camundongo, cobaias e coelhos), o coelho é o único que no Brasil também é explorado para o consumo de carne. A criação de coelhos está ligada à produção de carne, pelo

(coelho Angorá) e pele (coelho Rex), além da criação em biotérios. De acordo com a Associação Americana de Criadores de Coelhos (American Rabbit Breeders Association –ARBA, s.d.) existem atualmente 47 raças conhecidas de coelho doméstico. A partir do coelho selvagem europeu, por intermédio de mutações naturais, cruzamentos e seleção, foi obtido um grande número de raças de diversas cores e pesos, chegando aos coelhos gigantes que atingem mais de 9 kg, o que representa cinco vezes mais do que o peso do coelho selvagem. Além disso, sofreu profundas modificações na cor da pelagem e dos olhos e no comprimento do pêlo e das orelhas (Melo e Silva, 2003).

Os coelhos têm corpo arredondado, cabeça grande provida de longas orelhas, audição e olfato bem desenvolvidos e amplo campo de visão. São classificados como lagomorfos por terem quatro incisivos na mandíbula superior. Os incisivos crescem durante toda a vida necessitando de uma contínua atividade de roer alimentos fibrosos para prevenir um excessivo crescimento dos dentes. As patas posteriores são mais compridas que as anteriores, o coração se encontra situado na parte média da caixa torácica, ligeiramente desviado para a esquerda, e não tem a aorta anterior. A temperatura média do corpo é 38,3 °C, podendo chegar a 39 °C quando submetido ao estresse. O sistema genital é similar ao dos mamíferos. A fêmea tem dois cornos uterinos e ambos se comunicam, separadamente, com a vagina. A fêmea possui de 3 a 5 pares de tetas. O macho não tem glândula e nem vesículas seminais. A fêmea é poliéstrica, podendo ser coberta a qualquer época do ano. Como a gata e a fêmea do furão, a coelha está incluída entre as fêmeas que não apresentam ovulação espontânea, ovula somente após a cópula e/ou uma forte excitação sexual, muito embora exista uma pequena porcentagem de fêmeas que pode ovular espontaneamente (Melo e Silva, 2003).

## *2. Hábitos comportamentais*

Os coelhos possuem hábitos crepusculares, portanto estão mais ativos no período da manhã e da noite (Richardson, 2000). Já os animais criados em cativeiro podem ter hábitos crepusculares ou possuírem hábitos completamente noturnos (Barros, 2011).

Os lagomorfos são animais gregários preferindo viver na companhia de outros. Na natureza vivem em tocas grandes onde geralmente habitam cerca de 60 a 70

indivíduos, que se dividem em pequenos grupos, que variam entre 2 a 8 indivíduos cada grupo. Dentro destes grupos, há apenas um macho dominante que tolera apenas a presença de machos jovens. O macho dominante pode escolher apenas uma fêmea como parceira sexual permanente, porém pode formar um harém acasalando-se com diversas fêmeas (Richardson, 2000).

Quando vivem em grupos, os coelhos selvagens passam muito tempo cuidando uns dos outros, realizando o chamado “grooming” social, que significa as lambidas para a limpeza de áreas do corpo onde não conseguem acessar sozinhos, como a região da face e nuca (Harcourt-Brown, 2002).

O coelho doméstico carrega, em sua ancestralidade selvagem, o comportamento de agir como presa, logo, suas respostas frente a quaisquer estímulos serão de fuga ou luta. Oferecendo a eles um ambiente sem estresse permitirá que demonstrem seu comportamento natural e prevenirá o desenvolvimento de diversos problemas comportamentais (Harcourt-Brown, 2002).

### *3. A cunicultura e o bem-estar animal*

A maioria das criações dos coelhos é, principalmente, para o fornecimento de alimento. O pêlo, a pele e, também as suas fezes podem ser aproveitadas. Atualmente os europeus (França e Espanha) são os que mais apreciam a carne de coelho, que é vendida fresca ou congelada. A carne de coelho apresenta alto valor nutricional, pois é rica em proteína de alta digestibilidade e possui índice de colesterol baixo, e é de fácil preparo (Melo e Silva, 2003). As peles são usadas para fazer casacos, enfeites ou chapéus. Elas também podem ser cortadas e tingidas para se parecerem com as de visão, castor ou outras peles mais valiosas. Os pêlos longos dos coelhos da raça Angorá são torcidos em fios macios e quentes e usados em suéteres e outros agasalhos. Suas fezes também podem ser aproveitadas como fertilizante.

No Brasil, a cunicultura tecnicamente orientada, organizadas, e com fins comerciais começaram a aparecer a partir de 1957. A princípio, coube aos produtores gerar condições que pudessem garantir o bem-estar mínimo para viabilizar a produção. Mais recentemente, a conscientização e regulamentação relativas ao bem-estar animal cresceram e passou a ser importante que o animal pudesse expressar seu comportamento natural, satisfazendo suas necessidades etológicas (EFESA-European Food and Safety

Authority, 2005). Portanto, além de garantir a produção animal de acordo com padrões sanitários, o produtor precisa atender um mercado cada vez mais exigente em relação ao bem-estar animal.

No Brasil, todas as discussões referentes a criação e uso de animais para propósitos científicos e didáticos são de responsabilidade do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). O CONCEA tem ainda o importante papel de formular as normas brasileiras de criação e uso desses animais.

O bem-estar dos animais, juntamente com as questões ambientais e a segurança dos alimentos, é considerado um dos maiores desafios nas criações mundiais. A convicção dos consumidores de que os animais utilizados para a produção de alimentos devem ser bem tratados, ganha cada vez mais importância, principalmente junto a União Européia (U.E.) e frente aos países terceiros que colocam animais vivos ou produtos de origem animal nos estados membros. Deste modo, a legislação da U.E., dirigida ao bem-estar dos animais, aumentou consideravelmente nos últimos anos (Simpson e Kelly, 2011).

O bem-estar animal pode ser considerado uma demanda para que um sistema seja defensável eticamente e aceitável socialmente. As pessoas desejam comer carne com “qualidade ética”, isto é, carne oriunda de animais que foram criados, tratados e abatidos em sistemas que promovam o seu bem-estar, e que sejam sustentáveis e ambientalmente corretos. Ele deve ser definido de forma que permita pronta relação com outros conceitos, tais como: necessidades, liberdades, felicidade, adaptação, controle, capacidade de previsão, sentimentos, sofrimento, dor, ansiedade, medo, tédio, estresse e saúde (Broom e Molento, 2004). Pode ser medido por métodos científicos e deve ser independente de quaisquer considerações éticas, culturais ou religiosas.

#### *4. Avaliação do bem-estar*

O *Farm Animal Welfare Council* (1991), baseando-se nas cinco liberdades, define bem-estar quando o animal está livre de fome e sede; de desconforto; de dor, doenças e lesões; do medo e ansiedade; e, finalmente, que possa expressar livremente o comportamento típico da espécie. Segundo Broom (1986) o bem-estar de um indivíduo é seu estado em relação às suas tentativas de adaptar-se ao seu ambiente. Ou seja, a sua capacidade de reação frente ao um novo desafio. Dizemos “bem-estar bom” quando o animal esta habilitado para alostase (condição de homeostase mantida na presença do

agente estrassor), onde ele consegue se reproduzir e mantém uma boa saúde física e comportamental. Já “bem-estar ruim” o animal apresenta uma falência da alostase, apresentando perda de peso, aumento da susceptibilidade a doenças e estereotípias (Broom e Molento, 2004).

Estudos estão sendo conduzidos na busca por criações diferenciadas, que possam melhorar o bem-estar animal (Verga et al., 2007). Para Hoy e Verga (2006) uma criação em conformidade com o bem-estar significa: mínimo de mortalidade no plantel, animais livres de ferimentos, com boa saúde, que possam expressar seu comportamento espécie-específico e que tenham condições de desenvolvimento de acordo com a idade e sexo.

São usados vários indicadores para aferir o bem-estar de um animal, como o dano físico, a dor, o medo, o comportamento, a redução de defesas do sistema imunológico e a incidência de doenças conforme Hoy e Verga (2006). O bem-estar é avaliado por meio de indicadores fisiológicos e comportamentais. As medidas fisiológicas associadas ao estresse têm sido usadas baseadas no fato de que, se o estresse aumenta (aumento dos glicocorticoides, o hormônio do estresse), o bem estar bom diminui. Já os indicadores comportamentais são baseados especialmente na ocorrência de comportamentos alterados, e daqueles que se afastam do comportamento no ambiente natural (Olsson et al, 2003).

A avaliação de bem-estar deve considerar as variáveis fisiológicas, as comportamentais e as patológicas (Hoy e Verga, 2006). Níveis hormonais dos glicocorticoides, frequência cardíaca e respostas imunológicas podem ser usados como indicadores das condições de criação, quando correlacionadas com outros parâmetros, como o comportamento e a mortalidade dos animais. Características ligadas ao desempenho produtivo, por exemplo: o peso vivo, conversão alimentar e fertilidade, também podem ser usados como critérios de bem-estar. Um baixo desempenho é um indicador de uma criação deficiente, seja pelo ambiente ou pelo manejo inadequados (Hoy e Verga, 2006). Isso pode gerar uma certa ansiedade nos animais, aumentando a frequência cardíaca, e gerando uma tensão muscular, que podem interferir com sua capacidade de agir, de se expressar ou de lidar com uma situação rotineira (McNaughton e Junior, 2007)

A produção de coelhos é influenciada por elementos ambientais (Princz et. al., 2008). Por isso, os animais acabam sendo expostos a muitos fatores estressantes, tais como: viver em condições limitantes nas gaiolas, em ambiente monótono e de alta densidade, que favorece a ocorrência de comportamentos estereotipados. Este tipo de

comportamento se caracteriza pela repetição de movimentos que não têm nenhum objetivo aparente ou função (Kowalska et. al., 2008), tais como: morder a barra e cavar o piso da gaiola, realizar excessivos “self-grooming”, dentre outros.

Atividades estereotipadas e anormais são sinais de frustração e ansiedade, indicando uma redução do bem-estar. Cavar o chão ou roer as grades pode ser considerado um comportamento “normal” em um contexto ambiental pobre (Morisse e Maurice, 1997). Aspectos atípicos do comportamento social, como a agressividade excessiva (Morisse et.al., 1999), maternal, como a rejeição ou canibalismos da ninhada (Lehmann, 1991) e da ingestão de alimentos, como a redução do apetite (Finzi et. al., 1986) podem ser avaliados como indicadores de estresse. Melhorar o ambiente, proporcionando condições para que o animal possa se expressar mais livremente, poderia ocasionar uma melhora no seu bem-estar e, conseqüentemente, em sua produtividade.

### *5. Enriquecimento Ambiental*

O enriquecimento foi definido por Newberry (1995) como qualquer modificação no ambiente de animais cativos que tivesse por objetivo melhorar seu bem-estar, fornecendo estímulos para suas necessidades espécie - específicas. Permite ao animal expressar parte do repertório de atividades do seu comportamento natural (Jordan et. al., 2006), e ainda diminui o estresse gerado pela falta de espaço ou pelo tédio. Todavia, é importante avaliar o enriquecimento em função dos benefícios para o animal, examinando o uso e a preferência por um determinado enriquecimento, o efeito no comportamento e no desempenho (Baumann, 2005).

Os enriquecimentos podem ser classificados como alimentares e não alimentares (Swaisgood e Sherherdon, 2005) ou ainda, os últimos, de forma mais detalhada como físicos, sensoriais, cognitivos e sociais (Bosso, 2011). Segundo Swaisgood e Sherherdon (2005), como enriquecimentos alimentares podem ser citados: variações de dieta, mudança nos horários ou número de vezes que o alimento é ofertado e alterações que visem aumentar o tempo gasto na obtenção do alimento (ex: esconder). Já os não alimentares incluem: a adição de objetos para a manipulação e o treinamento através de condicionamento que podem ser classificados como enriquecimento cognitivo; a introdução de aromas, materiais com urina e fezes de outras espécies, exemplos de enriquecimento sensorial; mudanças maiores como alterações no lugar onde o animal é criado (vegetação, esconderijo, brinquedos) classificadas como enriquecimento físico; e

a criação de interações inter-específicas ou intra-específicas como forma de enriquecimento social (Moraes et al, 2012). Nas criações de coelhos os mais usados são os enriquecimentos não alimentares, principalmente o enriquecimento físico e o social.

### *5.1 Enriquecimento físico*

Mesmo em um ambiente favorável, alojar coelhos em gaiolas convencionais dificilmente satisfará todas as suas necessidades comportamentais, por tratar-se de espécie adaptada a ambientes complexos na natureza. Portanto, isto pode resultar em aumento do estresse e manifestação de comportamentos estereotipados, tais como: morder as barras da gaiola e realizar excessivos cuidados corporais (Hansen e Berthelsen, 2000). Para evitar este problema, vários tipos de enriquecimento vêm sendo estudados, levando em consideração a produtividade, o comportamento e o bem-estar dos animais (Princz et. al., 2008). Apesar de ser amplamente aceito que o enriquecimento físico pode melhorar o bem-estar e o comportamento animal, ele deve ser planejado cuidadosamente para assegurar que a sua implementação não traga consequências negativas, ressalta Medina (2011).

A mudança do tipo de piso da gaiola (Trocino et. al., 2004; EFSA, 2005; Princz et. al. 2008; Trocino et. al., 2008), com presença ou não de cama de palha (Trocino e Xiccato, 2006; Siloto et. al, 2009), por exemplo, pode permitir a expressão de certos comportamentos naturais, tais como coçar e cavar, além de proporcionar maior conforto e interação entre os animais.

Para a produção orgânica de coelhos recomenda-se que sejam criados em cama de palha (pelo menos 50% do piso deve ser coberto com a cama) a fim de lhes oferecer maior conforto (Szendrő e Dalle Zotte, 2010). Contudo, o desempenho produtivo é bastante afetado. Quando comparados com animais criados em gaiolas menores, houve uma diminuição do ganho de peso, no peso final, no rendimento de carcaça, no consumo de alimento e no depósito de gordura (Lambertini et.al., 2001; Dal Bosco et. al. 2002; Dalle Zotte et. al., 2010). Segundo estes autores, o consumo da cama de palha foi responsável pela diminuição da ingestão de alimentos, afetando, conseqüentemente, o ganho de peso, em decorrência do baixo valor nutritivo da palha. Eles também afirmaram que o consumo de palha traz o risco da coccidiose que, além de afetar a saúde dos animais, diminui a produtividade e aumenta a mortalidade. Trocino et.al. (2008) comentaram que o baixo rendimento de carcaça pode ser devido a essas condições mais debilitantes de saúde, além da maior atividade dos animais e o baixo

consumo de ração atuarem como adjuvantes neste baixo rendimento (maior volume do trato gastrointestinal devido ao maior consumo de alimento volumoso).

Tanto Orova et.al. (2004), quanto Morisse et.al. (1999), deram aos coelhos a opção de escolha entre usar ou não a cama de palha. Nos dois casos, a maioria dos animais preferiu ficar no piso de arame. Jekkel et. al. (2008) conduziram um experimento onde a cama de palha foi colocada gradativamente, dependendo da idade dos animais (um grupo sem cama, um com cama durante todo o experimento, um com cama a partir da sétima semana de idade e no último a cama foi posta na nona semana). Em todas as situações, a cama promoveu diminuição do consumo de ração. Além disso, não foi observada nenhuma mudança no padrão comportamental, levando-os a concluir que a cama de palha não melhorou o bem-estar dos coelhos.

Resultado diverso deste foi encontrado por Bessei et. al. (2001), ao trabalharem com animais em crescimento, em uma câmara climática onde a temperatura variou de 5°C a 30°. Metade do piso de plástico das gaiolas foi forrado com cama de palha. Verificaram que, quando a temperatura ambiental passou dos 30°C, os animais preferiram ficar no piso de plástico, enquanto que abaixo dos 15°C, eles optaram pela cama. Siloto et al. (2009) observaram que em temperaturas superiores a 20°C os coelhos permaneceram a maior parte do tempo sobre o piso de arame. Usando a cama como enriquecimento foi possível notar que os animais em gaiolas enriquecidas apresentaram maior frequência do comportamento lúdico, exploratório e houve também maior interação entre os animais. O comportamento estereotipado se sobressaiu nas gaiolas sem enriquecimento. Segundo estes autores, este tipo de enriquecimento favoreceu o bem-estar dos animais. O enriquecimento com palha ainda resultou em redução de gordura dissecável na carcaça (Zeferino et. al., 2011).

Com ou sem a cama de palha, alguns autores consideram o piso de arame (o mais utilizado nas gaiolas) desfavorável do ponto de vista do bem-estar. Dresher (1996) relatou que animais alojados em gaiola com este tipo de piso passaram a maior parte do tempo deitados. Em coelhos usados para fins didáticos, científicos e reprodução, o piso de arame pode causar lesões nas patas, o que não ocorre com coelhos em crescimento, devido ao curto ciclo de produção. Testes de preferência, onde o coelho teve a opção de escolha entre diferentes tipos de piso, mostraram que eles preferiram o piso feito com material plástico. Mas, com o aumento da idade e/ou do peso, eles aceitaram bem o piso de arame quando metade do piso foi forrada com uma placa de plástico (Matics et.al., 2003). No entanto, esses mesmos testes mostraram que coelhos em crescimento

preferiram piso de plástico ao de arame (Matics et. al., 2003; Princz et. al., 2008). Avaliando o efeito do tipo de piso (arame e plástico), Dalle Zotte et.al. (2009b) não constataram diferença na qualidade da carne entre os tratamentos. Trocino et. al. (2008), trabalhando com animais em crescimento, observaram que o uso de piso de plástico ou de aço ripado melhorou o desempenho dos animais em relação ao arame.

Outros tipos de enriquecimento que podem ser utilizados são os abrigos (Lidfors, 1997; Hansen e Berthelsen, 2000) e as plataformas elevadas, utilizados principalmente para fêmeas reprodutoras (Trocino e Xiccato, 2006; EFSA, 2005; Verga et. al., 2007). Gaiolas providas de abrigos teriam como propósito principal a disponibilização de um local seguro para situações onde o animal se sentisse ameaçado. Contudo, como eles já estão adaptados aos sistemas de criação intensiva, eles não se sentiram tão ameaçados e passaram a maior parte do tempo em cima dos abrigos, e não dentro deles exteriorizando seu comportamento exploratório. Já o uso das plataformas elevadas, em gaiolas de fêmeas com ninhada, tem atingido seu objetivo de satisfazer a necessidade da fêmea se isolar de seus láparos e, ainda, estimular o exercício.

O uso de pedaços de madeira, feno ou cubos de capim prensado para estimular o hábito de roer, provaram ser úteis (Verga et. al., 2007), pois diminuíram a agressividade dos animais (Trocino e Xiccato, 2006). Lidfors (1997) comparou o comportamento de machos em gaiolas enriquecidas com graveto de madeira, feno ou cubos de capim, e pôde observar uma diminuição do comportamento agressivo e estereotipado, e uma interação mais frequente com o enriquecimento nas gaiolas com feno e cubos de capim.

Dentre estes enriquecimentos, o mais comum para coelhos em crescimento é o uso do pedaço de madeira. Este tipo de enriquecimento provou ser o mais apropriado, pois oferece aos animais a oportunidade de roer, já que esta atividade demonstrou ser uma das mais importantes do seu comportamento natural (Stauffacher, 1992). Princz et. al. (2008) ofereceram dois tipos de madeira, uma mais macia e outra mais dura, para coelhos em crescimento e constataram que os animais preferiram a madeira mais macia. Em gaiolas enriquecidas com este material, os animais se mostraram mais ativos, passaram mais tempo realizando o comportamento exploratório e menos tempo deitados (Verga et. al., 2004). A presença do graveto suspenso no teto, além de limitar a contaminação fecal, estimulou a atividade física, aumentando a frequência de pulos e a interação social (Trocino e Xiccato, 2006; Verga et. al. 2004). Luzi et. al. (2003a) mostraram que a ingestão de alimentos e a cecotrofia aumentaram em coelhos alojados em gaiolas com madeira. Maertens e Van Oeckel (2001) observaram que o

coelho pode interagir com o graveto por um longo tempo. Consequentemente, durante o seu período mais ativo, animais sem o enriquecimento ficaram facilmente entediados e começaram a morder as barras da gaiola, o comedouro e até mesmo uns aos outros (Princz et. al. 2008).

O uso do enriquecimento aumentou a frequência do que os autores chamam de “allo-grooming”, o que indica uma grande interação social. Zucca et. al. (2008) ressaltaram que enquanto a interação entre os animais é bastante frequente na presença do enriquecimento, o comportamento agressivo não foi observado. Sendo assim, ao enriquecer as gaiolas com o uso da madeira, o aparecimento do comportamento agressivo e, conseqüentemente, as lesões resultantes, puderam ser reduzidas ao mínimo. Diversos autores verificaram uma diminuição das lesões nas orelhas de coelhos alojados em gaiolas enriquecidas (Dalle Zotte et.al., 2009b; Princz et. al., 2008, 2009; Barros, 2012). A redução do comportamento agressivo foi determinante para o bem-estar dos animais a partir da 11ª semana de idade, quando as brigas se tornaram mais frequentes e mais violentas (Princz et.al., 2008). Esta redução das brigas e dos ferimentos ocasionados por elas, além de melhorar o bem-estar dos animais, também melhorou o desempenho dos mesmos. O comportamento agressivo afetou negativamente o peso final da carcaça (Dalle Zotte et. al., 2009b).

Estudos apontaram uma melhora na produtividade quando os animais foram criados em gaiolas com pedaços de madeira, tais como: aumento nas taxas de crescimento e de ingestão de alimentos (Maertens et. al., 2004; Princz et. al., 2008; Rizzi e Chiericato, 2008), aumento do ganho de peso diário (Luzi et. al., 2003b; Princz et. al., 2009) e maior peso final (Luzi et. al., 2003b; Princz et. al., 2009; Rizzi e Chiericato, 2008). Dalle Zotte et. al. (2009b) também verificaram que o enriquecimento afetou positivamente as características de abate: aumento do peso e do rendimento da carcaça e do peso dos cortes. Diferentes estudos constataram que o pedaço de madeira influenciou positivamente a qualidade da carcaça: a carne ficou mais vermelha (Luzi et. al., 2003b; Kermauner et. al., 2004) e com maior capacidade de retenção de água (Kermauner et. al., 2004), além de ter aumentado seu rendimento (Dalle Zotte et. al., 2009b).

### *5.2 Enriquecimento social*

Baseando-se no comportamento gregário dos coelhos silvestres, os coelhos de laboratório e os das criações comerciais, tanto em fase reprodutiva como em fase de

crescimento, deveriam ser criados em grupos. A qualidade de vida dos animais criados em grupos é significativamente melhor quando comparada à de um animal alojado sozinho em uma gaiola (Gunn e Morton, 1995). Animais criados em grupos são mais ativos, passam a maior parte do tempo se movimentando, explorando o ambiente e interagindo entre eles.

Coelhos de laboratório normalmente são criados em gaiolas individuais e acabam sofrendo com a privação do contato social e com o ócio causado pelo ambiente estéril. Em alguns países europeus, como na Itália, para atender a demanda de um coelho mais pesado, abatido aos 90 dias de idade, o que impossibilita a criação em grupos, ainda existem criações de coelhos em crescimento em gaiolas individuais. Isto pode acarretar sintomas psicológicos de estresse, como a automutilação (Chu et. al., 2004). Vários tipos de enriquecimento favoreceram a diminuição do comportamento anormal, contudo o enriquecimento social (alojando no mínimo dois animais por gaiola) apresentou melhores resultados (Chu et. al., 2004).

Filiou et al. (2012) avaliaram o padrão comportamental e o nível de medo em coelhos alojados em gaiolas individuais, com dois animais por gaiola e em gaiolas coletivas. Eles observaram que os animais em gaiolas coletivas passaram mais tempo fazendo cuidados corporais uns nos outros (“allo-grooming”), movimentando-se e correndo mais que os demais grupos. Já os animais alojados em gaiolas individuais exibiram um nível maior de medo (maior tempo no teste de imobilização tônica), além de terem ficado menos ativos que os animais em gaiolas coletivas.

Levando isso em consideração, Dalle Zotte e colaboradores (2009a), trabalhando com coelhos alojados sozinhos, equiparam metade da gaiola com espelhos e deixaram a outra metade coberta com painéis de plástico. Durante o experimento 75% dos coelhos preferiram ficar na parte equipada com os espelhos. Os coelhos, diferentemente dos chimpanzés (Schilhab, 2004), elefantes (Plotnick et. al., 2006) e golfinhos (Delfour e Marten, 2001), não são capazes de reconhecer sua própria imagem refletida no espelho. Isto sugere que somente a imagem de outro coelho já tornou o ambiente mais confortável para esses animais.

Porém, agrupar os animais em crescimento pode gerar um grande problema quando chega a época da maturidade sexual e o aparecimento do comportamento agressivo, principalmente nos machos. Fêmeas lactantes também podem apresentar este comportamento quando criadas em um grupo com muitas fêmeas. Este tipo de comportamento é um dos maiores problemas dos grupos numerosos (Szendrő, 2012).

Bigler e Oester (1996) observaram que a frequência e a severidade das lesões produzidas pelas brigas entre eles estão relacionadas tanto com o tamanho do grupo, quanto com a idade dos animais. Quanto maior e mais velho for o grupo, maior a frequência de lesões mais severas. Dando suporte a esses resultados, Szendrő e colaboradores (2009) verificaram que a taxa de lesões nas orelhas foi de 3,5% nos animais com nove semanas, 6,1% na 10<sup>a</sup> semana e de 10,4% na 11<sup>a</sup> semana. Já Postollec et. al. (2003) não observaram lesões em coelhos criados em grupos pequenos, até quatro animais por gaiola. Verga et. al. (2006) constataram aumento no comportamento agressivo em coelhos com idade entre 60 e 80 dias criados em grupos grandes, acima de oito animais por gaiola. Resultados semelhantes também foram apresentados por Morisse e Maurice (1997), Szendrő et. al. (2009) e Vervaecke et. al. (2010), que constataram maior frequência deste tipo de comportamento nos animais com 80 dias de idade. Vervaecke et. al. (2010) também observaram um aumento repentino das agressões, devido à formação de hierarquia, somente a partir da 10<sup>a</sup> semana de idade, em consonância com Gallazzi (1985), que notou que antes dos 70 dias de idade não houve incidência de brigas, sugerindo que este tipo de comportamento pouco ocorre antes da 10<sup>a</sup> semana de idade.

Pensando em coelhos selvagens, onde o comportamento agressivo entre animais do mesmo sexo só aparece após a maturidade sexual, uma alternativa para a diminuição do comportamento agressivo nos coelhos em crescimento seria o alojamento por grupos do mesmo sexo. Contudo, Mykytowycz et al.(1974) e Vervaecke et al.(2010) relataram que, ao contrario do comportamento observado em coelhos selvagens, o comportamento agressivo entre grupos só de machos e só de fêmeas está presente nas criações de coelhos em crescimento. Para observar este efeito, Szendrő (2012) formou dois grupos unissexuais e um heterossexual e constatou que no grupo feminino as lesões no corpo ocasionadas por brigas apareceram mais cedo, com idade entre 7 e 9 semanas, do que no grupo masculino e no grupo heterossexual. Já nos animais mais velhos, com 11 semanas, a ocorrência de lesões foi 40,5% maior no grupo masculino. Barros et al. (2012) também trabalhando com a mesma formação de grupos (mono e heterossexuais) observaram que aos 70 dias (10 semanas), os grupos masculinos apresentaram maior frequência de comportamento agressivo. Baseando-se neste resultado pode-se concluir que, ao contrario do que se imaginava, alojar animais do mesmo sexo é desvantajoso quando comparado com grupos heterossexuais.

Segundo Verga (2000), o tamanho da gaiola e do grupo em que se encontram interfere no bem-estar de coelhos na fase pós desmame, em criações intensivas. De acordo com o CONCEA, o espaço mínimo de piso recomendado para os coelhos variam de acordo com o peso do animal. Animais com menos de 2 kg o mínimo recomendado é de 0,14 m<sup>2</sup>/ animal, entre 2 e 4 kg é de 0,28 m<sup>2</sup>/animal e animais que pesam entre 4 e 5,5 kg é de 0,37 m<sup>2</sup> por animal.

O maior problema em alojar os animais com alta densidade, ou numa gaiola de tamanho inadequado, está relacionado à falta de espaço disponível. Segundo Mormerde (1988), a alta lotação pode acarretar menor frequência de movimentos dos coelhos. Sob estas condições, não há possibilidade dos animais expressarem todo seu repertório comportamental, como se alongar e saltar, observação compartilhada por Dixon e colaboradores (2010). Este tipo de restrição, que influencia a execução do comportamento, geralmente causa frustração no animal e afeta o seu bem-estar, além de causar danos permanentes nos ossos, como a osteoporose (Dresher, 1996).

Alguns estudos mostraram que grupos alojados em alta densidade tiveram o desempenho produtivo prejudicado (Aubert e Duperray, 1992; Bigler e Oester, 1996; Morisse e Maurice, 1997), tendo também favorecido o aparecimento da agressividade com o avanço da idade (Verga et. al., 2006). Conforme Verga et. al. (2007) animais em crescimento, quando criados em grupos de dois a seis animais por gaiola, ocupando espaço de 500-700 cm<sup>2</sup>/cabeça, não têm condições de correr, saltar, ou ficar de pé. Xiccato et. al. (1999), observaram que, ao alojar de três a quatro animais/gaiola, houve uma diminuição no ganho de peso diário, no peso final e na ingestão de alimentos comparado com animais isolados. Segundo esses autores, essa diminuição do ganho de peso seria decorrente da maior frequência de movimentos, que aumenta o requerimento energético. Contudo, não há uma explicação para a redução da ingestão, tendo em vista que a densidade baixa não geraria problemas de competição por alimentos. Lazzaroni et. al. (2009), estudando animais criados em grupos, em baias com acesso a cama de palha, e animais em gaiolas individuais, também observaram pior desempenho dos animais criados em grupos. Os animais apresentaram menor ingestão de alimentos, ganho de peso e peso final. Os autores atribuíram o desempenho pior ao maior espaço a que eles tinham acesso, e à baixa ingestão de alimentos e consumo da cama de palha. Por sua vez, animais em gaiolas individuais apresentaram os melhores resultados, tanto no desempenho quanto no abate (maior peso ao abate e maior peso das partes).

Mirabito et al. (1999), por outro lado, constataram que grupos de seis animais/gaiola apresentaram melhor conversão alimentar quando comparados com coelhos em gaiolas individuais ou em duplas. Além disso, demonstraram maiores frequências de locomoção, comportamento exploratório e ingestão de alimentos. Princz et al. (2009) e Szendrő et al. (2009) advertiram que, quando o tamanho do grupo excede sete animais/gaiola, a taxa de conversão alimentar piora. Resultado semelhante foi constatado por Morisse e Maurice (1997), que compararam grupos de 6, 7, 8 e 9 coelhos/gaiola (15,3, 17,8, 20,4 e 23,0 coelhos/m<sup>2</sup>), e observaram que na décima semana houve uma ligeira redução na interação social, afetada por uma densidade acima de seis coelhos/gaiola (15 coelhos/m<sup>2</sup>). Eles concluíram que o bem-estar pode ser melhorado se a densidade do grupo não ultrapassar 40 kg/m<sup>2</sup> na décima semana de vida. Diante disso, podemos considerar seis coelhos/gaiola, não excedendo a densidade de 15 coelhos /m<sup>2</sup>, como o limite compatível para expressão do comportamento de animais alojados em gaiolas (0,77m x 0,51m x 0,30m).

Baseando-se nisso chega-se à conclusão de que, quanto maior o tamanho do grupo, maior será o nível de estresse e piores a ingestão de alimento, o ganho de peso, o desempenho no abate, maior a mortalidade e as lesões ocasionadas por brigas. Segundo Szendro (2012), o ideal seria de 4 a 5 animais por gaiola e em gaiola com enriquecimento físico.

#### 6. *Modelo animal para o estudo de medo e ansiedade em coelhos*

O medo é a emoção que se dá na presença de um perigo real. Já a ansiedade é a apreensão, vivenciada em situações onde o perigo é potencial. Sua finalidade também é preparar o organismo para uma possível situação de enfrentamento. No entanto, dependendo da intensidade, da frequência e do contexto no qual é apresentada, pode adquirir papel desajustador (Cruz e Landeira-Fernandez, 2012).

Ao longo das décadas, diversos modelos animais foram desenvolvidos e padronizados para o estudo experimental da ansiedade. Eles são amplamente utilizados na investigação pré-clínica de novas drogas ansiolíticas, na avaliação fisiológica do mecanismo de ação dessas drogas, no teste empírico de hipóteses comportamentais e fisiopatológicas relacionadas aos transtornos de ansiedade, bem como no mapeamento dos circuitos neurais que regula as reações de defesa frente a situações de perigo em potencial (Cruz, et al, 1997).

A antecipação de uma situação de perigo no ambiente tem início com processos perceptuais mediados por duas classes de estímulos: as que sinalizam perigo em potencial de maneira inata, independente de aprendizagem, e as que o fazem por meio de processos de aprendizagem, mediada pelo condicionamento clássico. Elas compartilham as mesmas finalidades de sinalizar e antecipar para o organismo alguma situação de perigo potencial no ambiente e deflagrar reações de defesa compatíveis. Os modelos animais de ansiedade fundamentam-se justamente na manipulação experimental desses estímulos e na observação consecutiva das reações comportamentais e fisiológicas decorrentes (Cruz e Landeira-Fernandez, 2012).

Na ciência experimental, modelo é qualquer representação de um fenômeno complexo em uma forma mais simples (Cruz e Landeira-Fernandez, 2012). A partir dessa perspectiva, é possível simular um fenômeno ainda desconhecido por meio de sistemas conhecidos. Os modelos animais de ansiedade procuram reproduzir uma situação ambiental de provável ocorrência de diferentes formas de aversão ou desconforto. Geralmente isso é feito expondo-se animais a: ambientes novos ou potencialmente perigosos, estímulos ou contextos associados a estímulos nociceptivos moderados, situações sinalizadoras da presença de um predador natural, confrontos iminentes com animais da mesma espécie. Os padrões comportamentais e as reações fisiológicas ativadas em decorrência do contato com essas fontes sinalizadoras de perigo em potencial são utilizados como medidas de ansiedade (McNaughton e Junior, 2008).

Por testes comportamentais entende-se uma série de metodologias e abordagens e de diferentes aparelhos por meio dos quais se estudam modelos experimentais animais (Pinto et al., 2011). De um modo geral, esses testes representam importante contribuição na compreensão, principalmente, nos estudos que correlacionam parâmetros comportamentais e ansiedade (Ohl, 2003).

Em coelhos os testes mais utilizados são o da imobilidade tônica o de campo aberto e o do labirinto em cruz elevado. A adaptação do coelho ao ambiente em que ele é criado pode ser entendida por meio da observação de sua resposta aos testes comportamentais, em que a reação e o medo em relação ao homem, a um novo ambiente, ou a sua condição psíquica (ansiedade, estresse) são avaliados.

O teste de imobilidade tônica é utilizado para avaliar a reação do animal, sendo o homem considerado como predador (Ferrante et al., 1992; Trocino et al., 2004 e 2008; Verwer et al., 2009; Filiou et al., 2012; Hecker, 2013). O coelho é retirado da gaiola e colocado deitado de barriga para cima em uma calha feita de madeira. São feitas três

tentativas para que ele fique imóvel nesta posição e, quando ele fica imóvel, a duração é de no máximo 180 segundos (Ferrante et al.,1992). A condição de imobilidade tônica corresponde a variações fisiológicas precisas e sua duração também pode ser condicionada por fatores genéticos.

O teste de campo aberto avalia a reação do animal em um ambiente desconhecido (Meijsser et al, 1989; Ferrante et al, 1992; de Passillé et al, 1995; Filiou et al., 2012; Hecker, 2013). Cada animal é colocado em uma pequena caixa fechada durante um minuto e é levado até um local mais espaçoso, de preferência em um ambiente natural e aberto. Após esse período é aberta a porta da caixa para permitir que o animal saia. Caso o animal não saia da caixa depois de um minuto que a porta foi aberta, ele é gentilmente retirado da caixa e a porta é fechada. São registrados os comportamentos de pulos, corridas exploratórias, levantamento, imobilização, cuidados corporais, cavar, roer e descansar. No total o teste tem duração de 12 minutos (Ferrante et al.,1992).

O teste do labirinto em cruz elevado é um dos testes animais de ansiedade mais utilizados por diversos pesquisadores em todo o mundo. Foi validado inicialmente por Handley e Mithani em 1984 e é baseado no comportamento natural dos animais. O aparato utilizado neste teste, o qual pode ser construído em madeira ou em acrílico, é constituído por dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços circundados por paredes (braços fechados). Ele foi a princípio construído e utilizado para avaliar o comportamento de ratos. Os autores do teste observaram que os animais, ao serem colocados no centro do aparato, demonstravam clara tendência a explorar os braços fechados, em detrimento dos abertos. A exposição dos ratos a situações naturalmente ameaçadoras, representadas no modelo pela altura e pelo espaço aberto, explicaria a maior aversão a explorar os braços abertos. O labirinto em cruz elevado é um teste de ansiedade amplamente utilizado tanto para a descoberta de novos agentes ansiolíticos, quanto para investigar as bases psicológicas e neuroquímicas da ansiedade (McDermott e Kelly, 2008). Sua ampla utilização se deve aos seguintes fatores: é de simples e rápida utilização; não é um equipamento caro, podendo ser construído facilmente; é eficaz na detecção de drogas com possível atividade ansiolítica, sem que seja necessário o condicionamento aversivo.

É considerado, portanto, um teste baseado em respostas naturais dos animais. Assume-se que os braços abertos do labirinto combinem dois componentes naturalmente aversivos aos animais: ser um ambiente novo e ser um espaço aberto, uma

vez que não possuem paredes protetoras. Em contraste, os braços fechados por paredes altas representam, para o animal, um ambiente que oferece proteção contra estímulos potencialmente nocivos, tais como a presença de predadores (Handley e Mithani, 1984).

Quando um rato ou camundongo é colocado no labirinto para que o explore livremente durante um período de tempo determinado, geralmente de 5 minutos, o animal tende a explorar os braços abertos somente durante 20 a 25% do tempo, sugerindo que a possível aversão causada por esses braços realmente exista. Esse parâmetro (tempo total de permanência nos braços abertos do modelo), portanto, representa um forte índice relacionado à ansiedade. Isto pôde ser comprovado com a administração de ansiolíticos e ansiogênicos, pois os animais que foram tratados com compostos ansiolíticos permanecem por mais tempo nos braços abertos em comparação com animais não tratados com compostos ansiogênicos, que passaram mais tempo acucados nos braços fechados do que explorando os braços abertos (McDermott e Kelly, 2008).

Geralmente, o procedimento empregado no teste do labirinto em cruz elevado consiste em colocar um animal no espaço onde os braços abertos e os braços fechados se cruzam. A partir daí, cada animal é observado durante 5 minutos para registro do tempo total de permanência nos braços abertos do modelo, bem como do número de entradas em cada um dos braços (Handley e Mithani, 1984). Após o desenvolvimento deste teste, muitas modificações foram introduzidas, sejam estruturais ou metodológicas. Atualmente existem labirintos construídos em madeira ou em acrílico, com as paredes dos braços fechados sendo transparentes ou opacas, entre outras variações.

Em relação aos parâmetros observados, além do tempo total de permanência em cada um dos braços e do número total de entradas, alguns pesquisadores também consideram na análise outras medidas, consideradas comportamentais, tais como o número de vezes que o animal explora a extremidade dos braços abertos, o número de vezes que se levanta contra as paredes dos braços fechados, entre outras medidas (Pinto et al., 2011). Os parâmetros obtidos neste teste podem ser observados tanto pela presença do pesquisador na sala do experimento quanto por meio de uma câmera filmadora, a qual grava as sessões-teste para análise posterior.

As interpretações do comportamento animal durante os testes de reatividade nem sempre concordam, porque as razões para se explicar um determinado comportamento podem ser diferentes (de Passillé et al, 1995;. Rushen, 2000). Por exemplo, a atividade

locomotora de um coelho, durante o teste de campo aberto, pode depender da necessidade de explorar o ambiente novo à procura de alimento e abrigo (um comportamento positivo de adaptação) ou ser derivada a partir do instinto de escapar de um predador (um comportamento negativo do medo). Em qualquer caso, alta atividade locomotora e atividade exploratória durante o teste são consideradas sinais de boa adaptação, ao passo que a imobilidade representa uma reação de adaptação passiva vista de forma negativa, pois demonstra que este animal teve um temperamento mais ansioso, resultado de um maior nível de estresse.

### *7. Efeito do enriquecimento morfologia neuronal*

O ambiente enriquecido se constitui numa forma de criação diferenciada, em um ambiente mais semelhante ao da vida natural. No entanto, a partir de observações feitas em ratos e camundongos (Mohammed, et al., 2002) e em coelhos (Princz, et al., 2009), verificou-se que o animal, ao interagir com o novo ambiente enriquecido, acabou explorando, também, novas maneiras de utilizar tal enriquecimento. O ambiente enriquecido passa a ter outro objetivo, que não somente melhorar o bem-estar, mas também de gerar um ambiente mais estimulante. E conseqüentemente acaba por estimular o aprendizado dos animais.

O enriquecimento aumenta as interações sociais, o exercício físico e a estimulação sensorial (Percaccio et al., 2007). Estudos feitos com camundongos, ratos, gatos e macacos mostraram que, ao ter contato com o enriquecimento, os encéfalos desses animais sofreram diversas modificações (Sale, et al., 2009). Sendo assim, alojar animais em ambiente enriquecido pode mudar a estrutura e a função neuronal levando a melhorias duradouras no aprendizado e memória (Peña, et al., 2009).

O impacto do enriquecimento foi primeiramente reconhecido por Donald Hebb. Ele observou que os ratos mantidos em sua casa como pets tinham melhor desempenho de comportamento do que aqueles mantidos em laboratório (Hebb, 1947). Dois anos mais tarde, ele desenvolveu a teoria da plasticidade sináptica como a base do aprendizado, sendo este o conceito central nos estudos sobre enriquecimento (Hebb, 1949).

A partir daí, diversos estudos feitos em ratos e camundongos relataram que o enriquecimento aumentou o peso cerebral e a espessura cortical (Diamond, et al., 1964; Beaulieu e Colonnier, 1987), a ramificação dendrítica, o número de espinhos dendríticos e a neurogênese (Renner e Rosenweig, 1987; Diamond, 1988; Kempermann, et al.,

1997), produziu mudanças neuronais em áreas sensoriais específicas (Coq e Xerri, 1998; Engineer et al., 2004; Sale et al., 2004), melhoram a plasticidade celular (medida pelos níveis de neurotrofinas, expressão das proteínas sinápticas e pela sinaptogênese) e reduziu a apoptose espontânea (Rampon et al., 2000a; Van Praag et al., 2000; Nithianantharajah e Hannan, 2006).

No que diz respeito às funções cognitivas, tem sido mostrado que o enriquecimento melhorou a memória espacial (Nilsson et al., 1999; Pham et al., 1999, Bennett et al., 2006), aprimorou a memória a longo tempo (Rampon et al., 2000b; Bruel-Jungerman et al., 2005), aumentou a atividade exploratória e melhorou o desempenho em labirintos (Escorihuela, et al., 1995). Alguns efeitos positivos do enriquecimento na reatividade emocional também foram relatadas em ratos (Escorihuela, et al., 1995; Francis et al., 2002) e em camundongos (Benaroya-Milshtein et al., 2004).

### *7.1 Neurotransmissores*

Neurotransmissores, em conjunto com os fatores de crescimento - como o fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês: brain-derived neurotrophic factor - BDNF) e o fator de crescimento do nervo (do inglês: nerve growth factor - NGF) - e a atividade hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) vêm sendo investigados quanto às suas funções no comportamento e plasticidade cerebral, em animais que tiveram contato com o enriquecimento (Simpson e Kelly, 2011).

Os neurotransmissores mais estudados têm sido a serotonina (5HT), dopamina (DA), noradrenalina (NA), a acetilcolina (ACh), os opióides, o ácido gama aminobutírico (GABA) e o glutamato. Neurotransmissores, tais como 5HT, DA e NA estão associados com comportamento emocional e muitas vezes correlacionados com testes comportamentais de ansiedade ou depressão (Galani, et al., 2007; Brenes, et al., 2009).

Ratos com menos de um mês de idade, alojados em ambiente enriquecido, tiveram uma melhora na expressão do gene do receptor 5HT<sub>1A</sub> no hipocampo (Rasmuson et al., 1998). Brenes e colaboradores (2008, 2009) observaram um aumento nos níveis de 5HT no hipocampo e no córtex frontal, tanto em ratos mais jovens quanto nos adultos, criados em caixas enriquecidas. Del Arco e colaboradores (2008) não observaram efeito do enriquecimento nos níveis basais da DA no córtex pré-frontal de ratos alojados em ambiente enriquecido durante 12 meses, no entanto, o mesmo grupo,

12 semanas mais tarde, mostrou uma redução na densidade do receptor D1 no córtex pré-frontal. Adicionalmente, a diminuição da absorção da DA e a diminuição da expressão de Transportadores DA (DAT) na superfície da célula no córtex pré-frontal, também foram observados em ratos jovens criados em ambiente enriquecido (Zhu et al., 2004, 2005). Além disso, o aumento da NA no hipocampo, tanto de animais adultos quanto os mais jovens, é mais uma prova de que o uso do enriquecimento pode promover mudanças neuroquímicas no cérebro (Galani et al., 2007; Brenes et al., 2009).

### *7.2 Fatores neurotróficos e neurogênese*

Os fatores neurotróficos são proteínas conhecidas por promover a sobrevivência da célula e de suas funções, particularmente as relacionadas com plasticidade sináptica. NGF, BDNF e neurotrofina-3 (NT-3) são amplamente expressos no hipocampo e estão envolvidos na neuroplasticidade para a aprendizagem e memória (Ernfors, et al., 1990). Um estudo feito com ratos alojados em ambiente enriquecido durante um ano mostrou um aumento nos níveis de BDNF no hipocampo, no prosencéfalo basal, no rombencéfalo e no córtex cerebral, em comparação aos controles (Ickes, et al., 2000). Tanto o hipocampo, como o córtex cerebral, estão envolvidos em funções de memória. Sendo assim, o enriquecimento, ao aumentar os níveis de BDNF, pode contribuir para alterações morfológicas e na plasticidade sináptica (Nilsson, et al., 1999; Lu, et al., 2003). Em contrapartida, o decréscimo nos níveis dos fatores neurotróficos pode ser uma resposta ao estresse, à ansiedade e à depressão (Martinowich e Lu, 2008).

Alojar animais em ambiente enriquecido tem sido eficaz para auxiliar a memória e a aprendizagem, melhorando a plasticidade do cérebro (van Praag, et al., 2000). Plasticidade refere-se à capacidade do sistema nervoso de se adaptar e mudar de acordo com os desafios do ambiente, permitindo assim que todos os animais sejam capazes de aprender e armazenar informações. Um mecanismo pelo qual isso é alcançado é a neurogênese, que literalmente refere-se ao nascimento de neurônios. A neurogênese ocorre basicamente no hipocampo, uma região cerebral pertencente ao sistema límbico, relacionado com o aprendizado e memória (Couillard-Despres et al, 2009, Garthe et al, 2009).

Mudanças estruturais associadas com o enriquecimento e a plasticidade incluem a neurogênese (Lu, et al., 2003). O enriquecimento físico promove a neurogênese em camundongos C57Bl/6 tanto em animais mais jovens, como nos mais velhos (Kempermann et al, 1997), altera a distribuição dorso-ventral de células envolvidas no

processo de neurogênese no giro dentado, em camundongos *BALB/c* machos jovens (Tanti et al, 2012) e em fêmeas *BALB/c* de meia idade (Ramirez-Rodriguez et al, 2014). Lieberwirth e colaboradores (2012) observaram que o isolamento social, de fêmeas adultas de ratazana de pradaria, não só prejudica a proliferação celular, sobrevivência e a diferenciação neuronal nas áreas límbicas do cérebro, como aumenta a frequência dos comportamentos ligados a ansiedade e depressão.

### 7.3. *Mudanças morfológicas*

Mudanças morfológicas associadas com o enriquecimento incluem o aumento no peso e tamanho do cérebro (Bennett, et al., 1969), o aumento do crescimento dendrítico (Leggio, et al., 2005), sinaptogeneses e aumento da espessura cortical (Rozsenszweig e Bennett, 1996). Estudos revelaram que o aumento da espessura cortical é devido a uma maior ramificação e comprimento dendrítico, a proliferação dos espinhos dendríticos e ao maior número de sinapses (Faherty et al, 2003, Leggio et al, 2005). Johansson e Belichenko (2002) verificaram um aumento no córtex somato-sensorial devido a uma maior ramificação dendrítica e na densidade da coluna em ratos adultos (3 meses de idade) do sexo masculino, após 3 semanas em ambiente enriquecido, em comparação com o grupo controle.

Resultados semelhantes são observados em ratos criados em grupos em comparação aos isolados. Em animais agrupados, foi observado aumento do peso cortical, do nível dos fatores neurotróficos, da densidade neuronal, enquanto que animais criados isolados apresentaram anormalidades neuroanatômicas, neuroquímicas, psicológicas e comportamentais (Risedal et al., 2002; Gordon et al., 2003; Preece et al., 2004; Stranahan et al., 2006).

Os coelhos podem ser criados tanto para fins comerciais, como animais de estimação e, também, como animais de laboratório. Ainda, sob o ponto de vista neurológico, o uso desses animais como modelo experimental se restringe ao estudo da visão na oftalmologia. Em comparação com os roedores, há poucos estudos sobre a neuroanatomia dos lagomorfos, tornando as comparações detalhadas mais difíceis. Mesmo sendo uma espécie adaptada a usar ambientes complexos, ainda não há estudos sobre o desenvolvimento cerebral de coelhos criados em ambientes enriquecidos. Contudo Barros et al. (2012) verificaram que coelhos machos aos 77 dias, quando alojados em gaiolas com o enriquecimento físico, tiveram um aumento do peso cerebral em relação os animais alojados em gaiolas convencionais. Também não há estudos

sobre as possíveis modificações cerebrais de coelhos com e sem enriquecimento físico e social.

O Capítulo II, denominado **AVALIAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS LIGADOS A ANSIEDADE DE COELHOS EM AMBIENTE ENRIQUECIDO** apresenta-se redigido em formato de artigo e deverá ser submetido à revista: *Applied Animal Behaviour Science*. O objetivo foi avaliar os comportamentos ligados a ansiedade dos animais frente a dois tipos de enriquecimento: o físico e o social . O Capítulo III, denominado **AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA NEURONAL DE COELHOS EM AMBIENTE ENRIQUECIDO**, apresenta-se redigido em formato de artigo e deverá ser submetido à revista: *Brain Behavioural Evolution*. O objetivo foi avaliar a morfologia neuronal de animais com e sem enriquecimentos físico e social.

### Referências Bibliográficas:

AMERICAN RABBIT BREEDERS ASSOCIATION – ARBA. Breeders. Disponível em: <<http://www.arba.net/breeds.htm>>. Acesso em: 25 de agosto de 2011.

AUBERT, J. M. e DUPERRAY, J. Effects of cage density on the performance and health of the growing rabbit. **Journal of Applied Rabbit Research**, Corvallis, v. 15, p. 656-660, 1992.

BARROS, T. F. M. Desempenho e comportamento de coelhos em crescimento em gaiolas enriquecidas. 2011. 66f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu. 2011.

BARROS, T. F. M. et AL. Comportamento e bem-estar de coelhos em crescimento em gaiolas enriquecidas. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 49ª, 2012, Brasília, **Painel...** Brasília-DF, 2012.

BAUMANN, P. et al. Use of cat-flap at the nest entrance to mimic natural conditions in the breeding of fattening rabbits. **Animal Welfare**, Wheathampstead, v.14, p. 135-142, 2005.

BEAULIEU, C., COLONNIER, M. Effect of the richness of the environment on the cat visual cortex. **The Journal of comparative neurology**, Quebec, v. 266, p. 478–494, 1987.

BENAROYA-MILSHTEIN, N. et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **The European Journal of Neuroscience**, v.20(5), p.1341-1347, 2004.

BENNETT, E.L., ROSENZWEIG, M.R., DIAMOND, M.C. Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. **Science**, Nova York v.163, p.825–6, 1969.

BENNETT, E. L. et al. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, Philadelphia, v. 85, p. 139–152, 2006.

BESSEL, W.; TINZ, J.; REITER, K. The preference of fattening rabbits for perforated plastic floor and deep litter under different ambient temperature. In: SYMPOSIUM ON HOUSING AND DISEASES OF RABBITS, FURBEARING ANIMALS AND PET ANIMALS, 12th, 2001, Celle. **Proceedings...** Celle: S. Matthes, 2001. p. 128-129.

BIGLER, L., OESTER, H. Group housing for male rabbits. . In: WORLD RABBIT CONGRESS, 6th, 1996, Toulouse. **Proceedings...**, Toulouse: WRC, 1996. p. 411-415.

BOSSO, P.L. Tipos de enriquecimento. Fundação Parque Zoológico de São Paulo Disponível em <http://www.zoologico.sp.gov.br/peca2.htm> (acessado em 23/Out/2015).

BRENES, J.C., et al. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex ventral striatum. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, Sanofi, v. 89, p. 85–93, 2008.

BRENES, J.C., et al. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. **Behavior Brain Research**, Netherlands, v.197, p.125-137, 2009.

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

BROOM, D.M., MOLENTO, C.F.M. Bem-estar animal: Conceito e questões relacionadas-Revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.9, n.2, p.1-11, 2004.

BRUEL-JUNGERMAN, E., et al. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **The European journal of neuroscience**, Orsey v. 21, p. 513-521, 2005.

CHU, L-RU., GARNER, J., MENCH, A. A behavioral comparison of New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) housed individually or in pairs in conventional laboratory cages, **Applied Animal Behaviour Science**, New York, v.85, p.121-130, 2004.

COQ, J., XERRI, C. Environmental enrichment alters organization features of the forepaw representation in the primary somatosensory cortex of adults rats. **Experimental Brain Research**, Heidelberg v. 121, p. 191-204, 1998.

COUILARD-DESPRESS, S., et al. Ageing abolishes the effects of fluoxetine on neurogenesis. **Molecular psychiatry**, London, v.14, p.856-864, 2009.

CRUZ, A.P.M., et al. Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v.13(3), p.269-78, 1997.

CRUZ, A.P.M. e LANDEIRA-FERNANDES, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: Métodos em psicopatologia, 2012. Disponível em: [http://www.nnce.org/Arquivos/Artigos/2012/cruz\\_etal\\_2012.pdf](http://www.nnce.org/Arquivos/Artigos/2012/cruz_etal_2012.pdf). (Acessado em 23/out/2015).

DAL BOSCO, A.; CASTELLINI, C.; BERNARDINI, M. Productive performance and carcass and meat characteristics of cages or pen raised rabbits. **World Rabbit Science**, Valencia, v. 8, p. 579-583, 2002.

DALLE ZOTTE, A. et al. Rabbit preference for cages and pens with or without mirrors. **Applied Animal Behaviour Science**, New York, v. 116, p. 2738-278, 2009a.

DALLE ZOTTE, A. et al. Response of fattening rabbits reared under different housing conditions. 2. Carcass and meat quality. **Livestock Science**, New York, v. 122, p. 39-47, 2009b.

DALLE ZOTTE, A.; JEKKEL, G.; MILISTS, G. Examination of the meat quality of growing rabbits reared on wire net or combined (wire net/straw) floor at different stocking densities. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 56., 2010, Jeju. **Proceedings ...** Jeju: ICoMST, 2010. S-IVA.01.

DE PASSILÉ, A. M., et al. Dairy calves' discrimination of people based on previous handling. **Journal of animal science**, Lennoxville, v.74, p.969-974, 1995.

DEL ARCO, A., et al. Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. **Brain Research**, Netherlands, v. 176, p. 267-73, 2007.

DELFOUR, F.; MARTEN, K. Mirror image processing in three marine mammal species: killer whales (*Orcinus orca*), false killer whales (*Pseudorca crassidens*) and California sea lions (*Zalophus californianus*). **Behavior Proceedings**, Toulouse, v. 53, p. 181-190, 2001.

DIAMOND, M. C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R. 1964. The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. **Behavior Brain Research**, Netherlands, 123, 111-119.

DIAMOND, M. C. Enriching heredity. The impact of the environment on the anatomy of the brain. **The Free Press**, New York, 1988.

DIXON, L.M. et al. The effects of spatial restriction on the behavior of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Applied Animal Behavior Science**, New York, v. 5, p. 302-308, 2010.

DRESHER, B. Deformations of vertebral column in breeding rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 6., 1996, Toulouse. **Proceedings...**, Toulouse: WRC, 1996. p. 417-421.

ENGINEER, N. D., et al. Environmental enrichment improves response strength, threshold, selective and latency of auditory cortex neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 92, p. 73-82, 2004.

ESCORIHUELA, R. M., et al. Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adults rats. **Behavior Brain Research**, Netherlands, v. 61, p. 169-173, 1995.

ERNFORS, P., et al. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*, Cambridge, v. 5, p.511-26, 1990.

EUROPEAN FOOD AND SAFETY AUTHORITY. The impact of the current housing and husbandry systems on the health and welfare of farmed domestic rabbits. **EFSA Journal**, Parma, v. 267, p. 37-43, 2005.

FAHERTY, C. J., et al. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. **Developmental Brain Research**, Philadelphia, v. 141, p. 55–61, 2003.

FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL. FAWC updates the five freedoms. **Veterinary Record**, London, v. 131, p. 357, 1991.

FERRANTE, V., et al. Rabbits kept in cages and in floor pens: reaction in the open field test. **Journal of Applied Rabbit Research**, Corvallis, v. 15, p. 700-707, 1992.

FILIOU, E. et al. Fear level and behaviour of growing rabbits housed in individual, bicellular in collective cages. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 10<sup>th</sup>, 2012, Sharm El-Sheikh. **Proceedings...** Sharm El-Sheikh: WRSA, 2012, p. 1107-1111.

FINZI, A., et al. Fattori di stress nel coniglio. **Coniglioltura**, v.2, p. 50-51, 1986.

FRANCIS, D. D., et al. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 22, p. 7840-7843, 2002.

GARTHE, A., BERH. J., KEMPERMANN, G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. **PLoS One 4: e5464**, 2009.

GALANI R, et al. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. **Neurobiology of Learning and Memory**, Philadelphia, v.88, p.1–10, 2007.

GALANI R, et al. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. **Neurobiology of Learning and Memory**, Philadelphia v.88, p.1–10, 2007.

GALLAZZI, D. Allevamento e svezzamento del coniglio su lettiera permanente. **Coniglioltura**, v.12, p. 35-38, 1985.

GORDON, N.S., et al. Socially-induced brain ‘fertilization’: play promotes brain derived neurotrophic factor transcription in the amygdala and dorsolateral frontal cortex in juvenile rats. **Neuroscience Letters**, Philadelphia, v. 341, p. 17–20, 2003.

GUNN, D., MORTON, D. B. Inventory of the behavior of New Zealand White rabbits in laboratory cages, **Applied Animal Behaviour Science**, New York, v. 45, p.277- 292, 1995.

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

HANSEN, L. T. e BERTHELSEN, H. The effect of environmental enrichment on the behavior of caged rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Applied Animal Behaviour Science**, New York, v.68, p.163-178, 2000.

HARCOURT-BROWN, F. Textbook of rabbit medicine. Oxford: Butterworth Heinemann, 2002. p. 111-112.

HARVEY, W. Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus, Frankfurt, W. Fitzeri, 1638.

HEBB, D. The effects of early experience on problem solving at maturity. **American Psychologist**, Washington, v.2, p.306-307, 1947.

HEBB, D. O. The organization of behavior: A neuropsychological Theory. **Wiley**, New York. 1949.

HECKER, M. M. Estimulação tátil em coelhos do grupo genético Botucatu e seus efeitos no desempenho, temperamento e reprodução. 2013. 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias, Unesp, Jaboticabal, 2013.

HOY, S. e VERGA, M. Welfare indicators. In: COST and ILVO. Recent Advances in Rabbit Sciences, Belgium, p.71-74, 2006

ICKES, B.R., et al. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neu-rotrophin levels in rat brain. **Experimental Neurology**, Philadelphia v.164, p.45–52, 2000.

JEKKEL, G., et al. Analysis of the behaviour of growing rabbits housed in deep litter at different stage of rearing. . In: WORLD RABBIT CONGRESS, 9<sup>th</sup>, 2008, Verona. **Proceedings...** Verona: WRC, 2008, p. 1189-1193.

JOHANSSON, B. B., BELICHENKO, P. V. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, London, v. 22, p. 89-96, 2002.

JORDAN, D. et al. Environmental enrichment in growing rabbits. In: COST and ILVO. Recent Advances in Rabbit Sciences, Belgium, p.113-119, 2006.

KEMPERMANN, G. et al. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, London, v. 386, p. 493–495, 1997.

KERMAUNER, A. et al. The influence of environmental enrichment with different kind of wood on carcass quality of individually caged rabbits. In: International Symposium: Animal Science, 12; Days: Animal Production According to Ecological, Ethological Norms, Bled, 2004, Slovenia, **Acta agriculture Slovenica...**, Slovenia, 2004, suppl. 1, p.81-86.

KOWALSKA, D.; BIELANSKI, P.; PIETRAS, M. Suitability of behavioural tests for determining the ways rabbits function in the environment and their relationship with some productive traits, In: WORLD RABBIT CONGRESS, 9., 2008, Verona, **Proceedings...** Verona: WRC, 2008. p.1195-1200

LAMBERTINI, L.; VIGNOLA, G.; ZAGHINI, G. Alternative pen housing system for fattening rabbits: effects of group density and litter. **World Rabbit Science**, Valencia, v. 9, p. 141-147, 2001.

LAZZARONI, C., BIAGINI, D., LUSSIANA, C. Different rearing systems for fattening rabbits: Performance and carcass characteristics. **Meat science**, London, v. 82, p. 200-204, 2009.

LEGGIO, M.G., et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behavior Brain Research**, Netherlands, v.163, p.78-90, 2005.

LEHMAN, M. Social behavior in young domestic rabbit under semi-natural conditions. **Applied Animal Behaviour Science**, New York, v. 32, p. 269-292, 1991.

LIDFORS, L. et al. Behavioural effects of environmental enrichment for individually caged rabbits. **Applied Animal Behaviour Science**, New York, v.52, p.157-169, 1997.

LIEBERWIRTH, C., et al. Social isolation impairs adult neurogenesis in the limbic system and alters behaviors in female prairie voles. **Hormones and Behavior**, London v. 62, p. 357-366, 2012.

LU, L., et al. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. **Experimental Neurology**, Philadelphia, v.183, p.600-9, 2003.

LUZI, F. et al. Effect of environmental enrichment on productive performance and welfare aspects in fattening rabbits. **Italian Journal of Animal Science**, Pavia, v. 2, n. 1, p. 438-440, 2003a.

LUZI, F. et al. Effect of environmental enrichment and group size on performance and carcass traits in rabbits. In: ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR ANIMAL PRODUCTION, 54., 2003. **Book of Abstracts...** Rome: Honing, 2003b. p. 203.

MAERTENS, L., VAN OECKEL. The fattening of rabbits in pens: effect of housing and gnawing material on performance and carcass quality. In: SYMPOSIUM ON HOUSING AND DISEASES OF RABBITS, FURBEARING ANIMALS AND PET ANIMALS, 12, 2001, Celle, **Proceedings...**, Celle, 2001 p.156-161.

MAERTENS, L.; TUYTTENS, F.; VAN PUOCKE, E. Group housing of broiler rabbits: performance in enriched vs. barren pens. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 8., 2004, Puebla. **Proceedings...** Puebla: WRC, 2004. p. 1247-1250.

MARTINOWICH, K., LU, B. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, London, v.33, p.73-83, 2008.

MATICS, Z. et al. Examination free choice of rabbits among different floors (Preliminary results). In: HUNGARIAN CONFERENCE ON RABBIT PRODUCTION, 15, 2003, **Proceedings...**, Kaposvár, 2003, p. 135-143.

MCDERMOTT, C., KELLY, J.P. Comparison of the behavioural pharmacology of the Lister-Hooded with 2 commonly utilized albino rat strains. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, Philadelphia, v.32, p.1816-1823, 2008.

MCNAUGHTON, N. JUNIOR, H.Z. Theoretical approaches to the modeling of anxiety in animals. In: Blanchard, **Handbook of Anxiety and Fear**, v.17, p.11-27, 2007.

MEDINA, M. P. Efeitos do enriquecimento ambiental no comportamento e bem-estar de animais de laboratório convencionais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Faculdade de veterinária, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p.15-30, ago. 2011.

MEIJSSER, F. M., et al. An analysis of the open-field performance of sub-adult rabbits. **Applied Animal Behaviour Science**, New York, v. 54, p. 147-155, 1989.

MELLO, H.V. e SILVA, J. F. Criação de Coelho. Viçosa: UFV. 2003. p. 259.

MIRABITO, L. et al. Logement des lapins en engraissement en gage de 2 ou 6 individus: Etude du budget-temps. **Journées de la Recherche Cunicole**, Paris, p 55-58, 1999.

MOARES, K.L. et al. Enriquecimento ambiental e comportamento em cativeiro do lobo marinho subantártico (*Arctocephalus tropicalis*) (GRAY, 1872) no aquário de São Paulo. **Revista Ceciliana**, Santa Cecília, v.4(1), p.90-96, 2012

MOHAMMED, A. H., et al. Environmental enrichment and the brain. **Progress in Brain Research**, Philadelphia, v.138, p. 109-133, 2002.

MORISSE, J. P.; MAURICE, R. Influence of stocking density or group size on behavior of fattening rabbits kept under intensive conditions. **Applied Animal Behavior Science**, New York, v. 54, p. 351-357, 1997.

MORISSE, J. P.; BOILLETOT, E.; MARTRENCAR, A. Preference testing in intensively kept meat production rabbits for straw on wire grid floor. **Applied Animal Behavior Science**, New York, v. 64, p. 71-80, 1999.

MORMEDE, P. Neuroendocrine stress responses. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 164(10), p. 723-741, 1988.

MYKYTOWYCZ, R. et al. An experimental study of aggression in captive European rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.). **Behaviour**, Cambridge, v. 52, p. 104-123, 1974.

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

NILSSON, M., et al. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. **Journal of Neurobiology**, San Francisco. v. 39, p.569-78, 1999.

NITHIANANTHARAJAH, J., HANNAN, A.J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 7, p. 697–709, 2006.

OHL, F. Testing for anxiety. *Clin. Neurosci. Res.*, v. 3(4-5), p. 233-238, 2003.

OROVA, Z. et al. Free choice of growing rabbits between deep litter and wire net floor pens. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 8., 2004, Puebla. **Proceedings...** Puebla: WRC, 2004. p. 1263-1265.

OLSSON, M. A. et al. Implicit Measures in Social Cognition Research: Their Meaning and Use. **Annual Review of Psychology**. Columbus, v.54, p. 297-327, 2003.

PEÑA, Y., et al. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse and learning in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology**, Philadelphia, v. 34, p. 1390-1404, 2009.

PERCACCIO, C. R., et al. Sensory experience determines enrichment-induced plasticity in rat auditory cortex. **Brain Research**, Netherlands v. 1174, p. 76-91, 2007.

PHAM, T. M., et al. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handling rats. . **Behavior Brain Research**, Netherlands, v. 103, p. 63-70, 1999.

PINTO, W. B. V. R., et al. Teste de labirinto em cruz elevado: Aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. **RESBCAL**, v. 1 (1), p. 102-120, 2011.

PLOTNIK, J. M.; de WALL, F. B. M.; REISS, D. Self-recognition in an Asian elephant. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Hanover, v. 103, n. 45, p. 17053-17057, 2006.

POSTOLLEC, G. et al. Influence de l'apport d'une structure d'enrichissement (plateforme) sur les performance zootechniques et le comportement dels lapins d'engraissement élevés en parc. **Journées de la Recherche Cunicole**, v.10, p. 173-176, 2003.

PREECE, M.A., et al. Region specific changes in forebrain 5-hydroxytryptamine1A and 5-hydroxytryptamine2A receptors in isolation-reared rats: an in vitro autoradiography study. **Neuroscience**, Philadelphia, v. 123, p. 725–732, 2004.

PRINCZ, Z. et al. Effect of gnawing sticks on the welfare of growing rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 9, ETHOLOGY AND WELFARE, 2008, Verona, **Proceedings...**, Verona, 2008, p.1221- 1224.

PRINCZ, Z. et al. Behaviour of growing rabbits under various housing conditions. **Applied Animal Behavior Science**, New York, v. 111, p. 342-356, 2009.

QUINTON, J. F. Novos animais de estimação: pequenos mamíferos. São Paulo: Rocca, 2005. p. 69-93.

RAMIREZ-RODRIGUEZ, G. et al. Environmental enrichment induces neuroplastic changes in middle age female Balb-C mice and increases the hippocampal levels of BDNF, P-AKT and P-MAPK  $\frac{1}{2}$ . **Neuroscience**, Philadelphia, v.260, p.158-170, 2014.

RAMPON, C., et al. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 12880–12884, 2000a.

RAMPON, C. et al. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. **Nature Neuroscience**, London, v. 3, p. 238–244, 2000b.

RASMUNSON, S., et al. Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. **Brain Research**, Netherlands., v. 53, p. 285–90, 1998.

RENNER, M. J., ROSENZWEIG, M. R. Enriched and impoverished environments. Effects on brain and behavior. Springer-Verlag, New York, 1987.

RICHARDSON, V. C. G. Rabbits: health, husbandry and diseases. Oxford: Blackwell Publishing: 2000. 30 p.

RISEDAL, A., et al. Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. **Brain Research**, Netherlands., v. 58, p. 315–321, 2002.

RIZZI, C., CHIERICATO, G.M. Effect of environmental conditions on productive and physiological responses in growing rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 9, ETHOLOGY AND WELFARE, 2008, Verona, **Proceedings...**, Verona, 2008, p. 1233-1237.

RODGRES, R.J., et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v.30(3), p. 289-304, 1997.

ROSENZWEIG, M.R., BENNETT, E.L., Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behavior and Brain Research**, Netherlands v.78, p.57-65, 1996.

RUSHEN, J., et al. Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. **Applied Animal Behaviour Science**, New York, v. 73 (1), p. 1-14, 2000.

SALE, A. et al. Enriched environment and acceleration of visual system development. **Neuropharmacology**, Philadelphia, v. 47, p. 649–660, 2004.

SALE, A., et al. Enrich the environment to empower the brain. **Trends in Neurosciences**, Philadelphia, v. 32 (4), p. 233-239, 2009.

SCHILHAB, T. S. S. What mirror self-recognition in nonhumans can tell us about aspects of self. **Biology and Philosophy**, Dordrecht, v. 19, p. 111-124, 2004.

SILOTO, E. V. et al. Temperatura e enriquecimento ambiental sobre o bem-estar de coelhos em crescimento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 528-533, 2009.

SIMPSON, J, KELLY, J.P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. **Behavior and Brain Research**, Netherlands, v. 222, p. 246–264, 2011.

STAUFFACHER, M. Group housing and enrichment cages for breeding, fattening and laboratory rabbits. **Animal Welfare**, Wheathampstead , v. 1, p. 105-125, 1992.

STRANAHAN, A.M., et al. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. . **Nature Neuroscience**, London, v. 9, p. 526–533, 2006.

SWAISGOOD, R.R., SHEPHERDSON, D.J. Scientific Approaches to Enrichment and Stereotypies in Zoo Animals: What’s Been Done and Where Should We Go Next? **Zoo Biology**; v.24, p.499-518, 2005.

SZENDRŐ, Z. et al. Effect of group size and stocking density on productive, carcass, meat quality and aggression traits of growing rabbits. **World Rabbit Science**, Valencia, v. 17, p. 153-172, 2009.

SZENDRŐ, Z.; DALLE ZOTTE, A. Effect of housing conditions on production and behavior of growing meat rabbits: A review. **Livestock Science**, New York, v. 137, n. 1, p. 296-303, 2010.

SZENDRŐ, Z. New perspectives of housing reproducing and growing rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 10<sup>th</sup>, 2012, Sharm El-Sheikh. **Proceedings...** Sharm El-Sheikh: WRSA, 2012, p. 979-996.

TANTI, A. et al. Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus. **Neuropharmacology**, Philadelphia, v.63, p.374-384, 2012.

TROCINO, A. et al. Group housing of growing rabbits: effect of stocking density and cage floor on performance, welfare, and meat quality. **World Rabbit Science**, Valencia, v.13, p.138-139, 2004.

TROCINO, A. et al. Effect of cage floor and stocking density on growth performance and welfare of group-housed rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 9, ETHOLOGY AND WELFARE, 2008, Verona, **Proceedings...**, Verona, 2008, p.1251- 1256.

TROCINO, A. e XICCATO, G. Animal welfare in reared rabbits: a review with emphasis on housing systems. **World Rabbit Science**, Valencia, v.14, p.77-93, 2006.

VAN PRAAG, H., et al. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews**, London, v.1, p.191-198, 2000.

VERGA, M. Intensive rabbit breeding and welfare: development of research, trends and applications. **World Rabbit Science**, Valencia, v. 1B, n. 8, p. 491-509, 2000.

VERGA, M. et al. Effects of housing and environmental enrichment on performance and behaviour fattening rabbits. **World Rabbit Science**, Valencia, v. 13, p. 139-140, 2004.

VERGA, M. et al. Behaviour of growing rabbits. In: MAERTENS, L.; P. COUDERT. P. (Eds.). Recent advances in rabbit sciences. Melle: COST and ILVO, 2006. p. 91-97, 2006.

VERGA, M. et al. Effects of husbandry and management systems on physiology and behavior of farmed and laboratory rabbits. **Hormones and Behavior**, Philadelphia, v.52, p.122-129, 2007.

VERVAECKE, H. et al. Development of hierarchy and rank effects in weaned growing rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **World Rabbit Science**, Valencia, v. 18, p. 139-149, 2010.

VERWER, C.M., et al. Handling effects on body weight and behaviour of group-housed male rabbits in a laboratory setting, **Applied Animal Behaviour Science**, New York, v. 117, p. 93–102, 2009.

XICCATO, G., et al. Influence de l'effectif et de La densité par Cage sur les performances productives, La qualité bouchère et La comportement chez Le lapin. **Journées de la Recherche Cunicole**, v.8, p 59-62, 1999.

ZEFERINO, C.P., et al., Genetic group×ambient temperature interaction effects on physiological responses and growth performance of rabbits, **Livestock Science**, Philadelphia, v.140,p.177-183,2011.

ZHU, J., et al. Environmental enrichment enhances sensitization to GBR 12935-induced activity and decreases dopamine function in the medial prefrontal cortex. **Behavior and Brain Research**, Netherlands,, v. 148, p. 107–17, 2004.

ZHU, J., et al. Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. **Journal of Neurochemistry**, Chichester v. 93, p. 1434–43, 2005.

ZUCCA, D. et al. Effects of environmental enrichment and group size on behaviour and production in fattening rabbits. In: WORLD RABBIT ETHOLOGY AND WELFARE CONGRESS, 9., 2008, Verona. **Proceedings...** Verona: WRC, 2008. p. 1281-1286.

## **CAPITULO II**

## **AVALIAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS LIGADOS À ANSIEDADE DE COELHOS EM AMBIENTE ENRIQUECIDO**

### **Resumo**

O estudo foi realizado com 56 coelhos do grupo genético Botucatu desmamados com 35 dias de idade e acompanhados até atingirem 79 dias. O objetivo foi avaliar a ansiedade de coelhos em crescimento frente a dois tipos de enriquecimento: o ambiental e o social. Os animais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de 2 x 2 (com ou sem enriquecimento físico e com ou sem enriquecimento social), com 4 repetições. Os animais com enriquecimento social foram alojados em oito gaiolas coletivas, seis por gaiola; já os animais privados do contato social foram alojados em oito gaiolas individuais. Chapas galvanizadas foram instaladas nas paredes laterais destas gaiolas para evitar o contato visual entre os animais. Metade das gaiolas (individuais e coletivas), definidas ao acaso, foi enriquecida com pedaços de eucalipto dependurados no teto da gaiola. A avaliação da ansiedade foi realizada com o uso do labirinto em cruz elevado, por meio dos comportamentos de locomoção e os relacionados à ansiedade (imobilização). Realizou-se a observação do tempo de latência até mover-se para um dos braços, bem como o número de entradas e o tempo gasto em cada um dos braços abertos e fechados. Duas observações foram realizadas, cada uma com duração de 5 minutos: a primeira aos 49 e a segunda aos 77 dias de idade. Houve avaliação do desempenho de crescimento dos animais (ganho de peso, consumo e conversão alimentar). Os coelhos alojados sem enriquecimento social permaneceram mais tempo tanto nos braços abertos quanto nos braços fechados, que os animais em grupo. Contudo os animais com enriquecimento social demoraram menos tempo para entrar nos braços abertos, bem como para chegar até o final dos mesmos, além de apresentarem maior número de mergulhos. Nos animais alojados em grupo, os mais velhos fizeram mais tentativas de entrar nos braços abertos que os mais jovens. Por outro lado, os animais isolados apresentaram a resposta oposta: os mais jovens apresentaram uma maior frequência de tentativas de entrada nos braços abertos do que os mais velhos. Os coelhos alojados em ambiente fisicamente enriquecido apresentaram pior conversão alimentar do que aqueles em ambiente não-enriquecido. Tanto o enriquecimento físico como o social diminuíram a ansiedade dos animais. O ambiental apresentou efeitos benéficos sobre os animais mais jovens e o social sobre os mais velhos.

**Palavras-chave:** comportamento, enriquecimento, coelhos, labirinto em cruz elevado, desempenho.

## EVALUATION OF ANXIETY RABBITS WITH PHYSICAL AND SOCIAL ENRICHMENTS

### Abstract

The study was carried out with 56 rabbits from the Botucatu genetic group weaned at 35 days of age and followed up to 79 days of age. The objective was to evaluate the anxiety of growing rabbits using two types of enrichment: physical and social. The animals were assigned to a completely randomized design with a 2 x 2 factorial arrangement (with or without physical enrichment and with or without social enrichment), with four replicates. The animals with social enrichment were allocated six per cage in eight wire cages whereas the animals deprived of social contact were housed in eight individual wire cages. Galvanized sheets were adapted to the lateral parts of these cages to avoid the visual contact with other animals. Half the cages, randomly chosen, were enriched with eucalyptus sticks hung to the cage ceiling. The evaluation of anxiety was conducted using the elevated plus maze, through the locomotor activity and immobilization behaviors. The latency time to enter one of the arms, as well as the number of entries into and the time spent in each of the arms (open and closed) were recorded. Two observations were made, with the duration of 5 minutes each: the first at 49 and the second at 77 days of age. Growth performance was also assessed (average daily gain, feed consumption and feed conversion). The rabbits housed without social enrichment stayed longer both in the open and closed arms than the animals housed in groups. However, the later showed shorter latency to enter the open arms as well as to reach the end of the open arm, besides presenting a higher number of head dipping. Group-housed animals made more entries into the open arms when they were older than when they were younger. Isolated animals, on the other hand, showed the opposite response: a higher number of entries into the open arms when they were younger than when they were older. The rabbits in physically enriched environment showed worse feed conversion than those in non-enriched environment. Both, physical and social enrichments, reduced anxiety. Younger animals benefitted from the physical enrichment, whereas social enrichment showed positive effects on older animals.

**Palavras-chave:** behavior, enrichment, rabbits, elevated plus maze, performance.

## **Introdução**

Baseando-se no comportamento gregário dos coelhos silvestres, os coelhos de laboratório e os das criações comerciais deveriam ser criados em grupos, tanto em fase reprodutiva como em fase de crescimento. Os coelhos de laboratório normalmente são criados em gaiolas individuais e acabam sofrendo com a privação do contato social e com o empobrecimento sensorial causado pelo ambiente empobrecido. Isto pode acarretar sintomas psicológicos de estresse, como a automutilação (Chu et.al., 2004). A qualidade de vida dos animais criados em grupos é significativamente melhor quando comparada à de um animal alojado sozinho em uma gaiola (Gunn e Morton, 1995). Animais criados em grupos são mais ativos, passam a maior parte do tempo se movimentando, explorando o ambiente e interagindo entre eles.

Mesmo em um ambiente favorável, alojar coelhos em gaiolas convencionais dificilmente satisfará todas as suas necessidades comportamentais, por tratar-se de espécie adaptada a ambientes complexos. Portanto, isto pode resultar em aumento do estresse e manifestação de comportamentos estereotipados, tais como: morder as barras da gaiola e realizar excessivos cuidados corporais (Hansen e Berthelsen, 2000). Para evitar este problema, vários tipos de enriquecimento vêm sendo estudados, levando em consideração a produtividade, o comportamento e o bem-estar dos animais (Princz et. al., 2008b).

O uso de pedaços de madeira, feno ou cubos de capim para estimular o hábito de roer provaram ser úteis (Verga et. al., 2007), pois diminuem a agressividade dos animais (Trocino e Xiccato, 2006). Lidfors (1997) alojou machos em gaiolas enriquecidas com diferentes tipos de materiais (graveto de madeira, ou feno, ou cubos de capim) e pôde observar uma diminuição do comportamento anormal e uma interação mais frequente com o enriquecimento das gaiolas.

A adaptação do coelho ao ambiente em que ele é criado pode ser obtida por meio da observação de sua resposta comportamental aos chamados "testes comportamentais". O teste do labirinto em cruz elevado é um dos testes animais de ansiedade mais utilizados por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo. Validado inicialmente por Handley e Mithani em 1984, é baseado no comportamento natural dos animais, não oferecendo nenhum tipo de punição aos mesmos. O aparato utilizado neste teste, é constituído por dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços circundados por paredes (braços fechados). Foi a princípio utilizado para avaliar o

comportamento de ratos. Os autores do teste observaram que os animais, ao serem colocados no centro do aparato, demonstravam clara tendência a explorar os braços fechados, em detrimento dos abertos. A exposição dos ratos a situações naturalmente ameaçadoras, representadas no modelo pela altura e pelo espaço aberto, explicaria a maior aversão para explorar os braços abertos. O labirinto em cruz elevado é um teste para ansiedade amplamente utilizado tanto para a descoberta de novos agentes ansiolíticos, quanto para investigar as bases psicológicas e neuroquímicas da ansiedade (McDermott e Kelly, 2008). O ambiente enriquecido passa a ter outro objetivo, que não somente melhorar o bem-estar, mas também de gerar um ambiente mais estimulante.

O estudo teve como objetivo avaliar os comportamentos ligados a ansiedade, de coelhos em crescimento, frente a dois tipos de enriquecimento: o físico e o social.

## **Material e Métodos**

Dois estudos foram conduzidos na área de Produção de Coelhos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, com coelhos pertencentes ao grupo genético Botucatu, que é uma linhagem sintética originada de híbridos Norfolk 2000 (Moura et al., 2001).

### *Ensaio piloto para padronização da observação dos comportamentos realizados no labirinto em cruz elevado.*

Foram selecionados 32 coelhos machos, com cinco semanas de idade, que foram acompanhados até atingirem 12 semanas (79 dias). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas de arame galvanizado, medindo 0,80 x 0,60 x 0,45 m, e foram dispostas lado a lado, quatro por gaiola, tendo o cuidado de se alojar separadamente irmãos quando possível. Tiveram livre acesso à ração peletizada e água potável, durante todo o período experimental. Foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos, (com ou sem enriquecimento físico) e quatro repetições (Figura 1). Metade das gaiolas, definidas ao acaso, foi enriquecida com dois pedaços de eucalipto com 15 x 3 x 3 cm, dependurados no teto da gaiola: um próximo à lateral direita e outro próximo à lateral esquerda de cada gaiola, e permaneceu na gaiola durante todo o período experimental. Sua altura foi regulada semanalmente, de acordo com o tamanho dos animais, entre 20 e 30 cm do piso. Os animais permaneceram duas

semanas nas gaiolas com enriquecimento, antes da primeira observação do comportamento no labirinto em cruz elevado (Figura 2).

O labirinto em cruz elevado foi confeccionado em madeira pintada de verde, para facilitar a limpeza, e elevado 0,60 m acima do chão. Ele consistiu de dois braços abertos opostos de 0,60 x 0,30 m e dois braços fechados com as mesmas dimensões, com 0,30m de paredes elevadas. Cada animal foi colocado no centro do labirinto em cruz e foi observada a permanência nos braços abertos e fechados, a latência para primeira entrada nos braços abertos e para chegada ao fim do braço aberto, mais as frequências de tentativas de entrada no braço aberto, de mergulhos (quando o coelho olha para baixo estando no braço aberto) e de posição bipedal/ levantamento (realizada nos dois braços). O animal foi considerado como tendo mudado de braço quando todas as quatro patas atravessaram o limiar do braço. Comportamentos de locomoção e os relacionados à ansiedade (imobilização) foram avaliados. Cada observação durou 5 min. O labirinto foi cuidadosamente limpo com álcool etílico hidratado depois de cada observação. As observações foram realizadas em dois dias consecutivos, em duas idades: aos 49 e 79 dias, das 7:00 às 9:30h, período em que os animais estavam mais ativos. Metade dos animais de todas as gaiolas (16 animais) foi observada no primeiro dia e a outra metade no segundo dia totalizando os 32 animais. As observações foram realizadas por dois observadores, que se posicionaram próximos ao labirinto, com auxílio de cronômetros.

Também foi avaliado o desempenho dos animais (ganho de peso, consumo e conversão alimentar). Eles foram pesados na desmama, com 35 dias, e ao final do período experimental com 79 dias. A estimativa do consumo de alimento foi feita por meio da pesagem da ração oferecida e das sobras, semanalmente. Foram estimados o ganho médio diário, o peso e a conversão alimentar (índice que mede o consumo de ração pelo ganho de peso do animal).

#### *Análises Estatísticas do Ensaio Piloto*

Os dados obtidos pela observação do comportamento dos animais no labirinto em cruz (contagens de tempo e de movimentos dos animais) foram analisados empregando-se um modelo log-linear e distribuição de Poisson (Kaps e Lamberson, 2004). Estas análises foram implementadas com o auxílio do procedimento GENMOD do SAS (2003) nas duas idades (49 e 79 dias) separadamente. Os modelos, em parcelas subdivididas (gaiola contendo quatro coelhos), incluíram os efeitos fixos de gaiola

dentro de tratamento e de tratamento. As médias ajustadas foram contrastadas e consideradas diferentes quando  $P < 0,05$ .

Na avaliação do desempenho (ganho de peso, consumo e conversão alimentar) a unidade experimental foi a gaiola. Os animais foram pesados no início (na desmama, com cinco semanas de idade) e no final do experimento (com doze semanas de idade). Foi realizada, também a estimativa do consumo por meio da pesagem semanal da ração oferecida e das sobras. As análises de variância das características de desempenho foram implementadas com o auxílio do procedimento GLM do SAS (2003). O modelo incluiu o efeito fixo de tratamento e do erro aleatório. O peso a desmama foi incluído no modelo de análise das demais características de desempenho (peso final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar) como covariável.

#### *Avaliação da ansiedade frente a dois tipos de enriquecimento: social e ambiental.*

Foram utilizados 56 coelhos machos, desmamados com cinco semanas de idade, que foram acompanhados até atingirem 79 dias. Os animais tiveram livre acesso à ração peletizada e água potável, durante todo o período experimental. Foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de 2 x 2 (com ou sem enriquecimento físico e com ou sem enriquecimento social) totalizando 4 tratamentos, com 4 repetições. Os animais com acesso ao enriquecimento social foram alojados em oito gaiolas coletivas, seis por gaiola. As gaiolas de arame galvanizado mediam 0,80 x 0,60 x 0,45 m e foram dispostas lado a lado. Os animais privados do contato social foram alojados em gaiolas individuais, de arame galvanizado, com as medidas 0,33 x 0,60 x 0,45 m, dispostas a lado a lado, com uma distância de 0,33 m entre elas. Chapas galvanizadas pintadas de cinza, com o intuito de evitar o reflexo do próprio animal, foram adaptadas às laterais das gaiolas para evitar o contato visual entre eles.

Metade das gaiolas (individuais e coletivas), definida ao acaso, foi enriquecida. Para isto, as gaiolas coletivas foram equipadas com dois enriquecimentos cada uma e as gaiolas individuais com um enriquecimento. Os enriquecimentos físicos usados foram os mesmos já descritos no estudo piloto. Os animais permaneceram em contato com enriquecimento físico durante 24 horas uma vez por semana. Após esse período, o enriquecimento físico foi retirado de todas as gaiolas. O enriquecimento usado anteriormente foi descartado e toda semana era oferecido um novo pedaço de madeira. Essa permanência do enriquecimento nas gaiolas aconteceu um dia antes de cada uma das observações do comportamento no labirinto em cruz elevado.

A avaliação da ansiedade foi feita conforme descrito anteriormente no estudo piloto. Foram selecionados, ao acaso, três animais de cada uma das gaiolas coletivas para a realização do teste no labirinto nas duas observações. As médias dessas três observações por gaiola foram usadas nas análises. Todos os animais das gaiolas individuais foram observados. Metade dos animais das gaiolas isoladas (4) e metade dos animais das gaiolas coletivas (12), foram observados no primeiro dia e a outra metade no segundo dia totalizando os 32 animais. Também foi avaliado o desempenho dos animais (ganho de peso, consumo e conversão alimentar).

#### *Análises Estatísticas*

As variáveis geradas na observação do comportamento dos animais no labirinto em cruz (contagens de tempo e de movimentos dos animais) foram testadas quanto à premissa de distribuição normal com o auxílio do procedimento UNIVARIATE do SAS (2003). As variáveis que seguiram a distribuição normal, foram submetidas à análise de variância no procedimento MIXED do SAS (2003). Os modelos em parcelas subdivididas no tempo, incluíram os efeitos fixos do enriquecimento físico, do enriquecimento social, da idade (sub-parcelas) e das interações duplas entre esses efeitos. Dois erros aleatórios foram definidos (Kaps e Lamberson, 2004): 1) a variância entre coelhos dentro de tratamentos e 2) a variância entre medidas (idades) de cada coelho. O primeiro erro aleatório foi usado para testar os efeitos do enriquecimento físico, do enriquecimento social e da interação entre esses dois efeitos. O segundo erro aleatório foi usado para testar o efeito da idade e das interações envolvendo o efeito de idade.

Para as variáveis que se desviaram da distribuição normal foi adotado um modelo log-linear e distribuição de Poisson (Kaps e Lamberson, 2009). As análises foram implementadas com o auxílio do procedimento GENMOD do SAS (2003). Os modelos, em parcelas subdivididas no tempo incluíram os efeitos fixos do enriquecimento físico, do enriquecimento social, da idade (sub-parcelas) e das interações duplas entre esses efeitos. As médias ajustadas foram contrastadas e consideradas diferentes quando  $P < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

### *Ensaio Piloto*

#### *1. Avaliação da ansiedade*

Aos 49 dias de idade, observou-se que a latência para a primeira entrada no braço aberto foi menor nos animais alojados em gaiolas com enriquecimento físico (Tabela 1). Não foi observada nenhuma diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos no tempo permanência nos braços abertos e fechados, na latência para chegada ao fim do braço aberto, na frequência de tentativas de entrada no braço aberto, nas frequências de mergulhos e na frequência da posição bipedal/levantamento, provavelmente por ser o primeiro contato do animal com o labirinto em cruz. Sendo assim, o animal que teve contato com enriquecimento apresentou uma resposta exploratória mais ágil e, portanto, menor índice de ansiedade.

Rushen et. al. (2001) afirmaram que alta atividade locomotora e a atividade exploratória durante o teste são considerados sinais de boa adaptação, ao passo que a imobilidade representa uma reação de adaptação passiva vista de forma negativa, pois indica que o animal apresentou temperamento mais ansioso, resultado de maior nível de estresse. A característica positiva observada nos animais mais jovens foi a maior atividade exploratória.

Aos 79 dias, o grupo que teve acesso ao enriquecimento permaneceu mais tempo nos braços fechados (Tabela 1) apresentando. Nas demais características observadas não houve diferença entre os grupos.

Resultado semelhante foi encontrado por Brennes et al. (2009) onde os ratos alojados sem a presença do enriquecimento físico permaneceram mais tempo no braço aberto. Tanto coelhos como ratos são presas e tem a tendência natural de se esconder ou de procurar lugares mais fechados. A presença do enriquecimento não foi estímulo suficiente frente ao instinto de se proteger. Contudo, foi justamente a falta de um ambiente estimulante, que acabou por estimular o comportamento exploratório dos animais alojados sem o enriquecimento.

De acordo com Rushen et. al., (2001), a atividade locomotora de um coelho durante o teste de campo aberto pode depender da necessidade de explorar o ambiente novo à procura de alimento e abrigo (um comportamento positivo de adaptação), ou ser derivada a partir do instinto de escapar de um predador (um comportamento negativo do medo). Sendo assim, os coelhos em gaiolas não enriquecidas apresentaram um

comportamento positivo ao procurar um ambiente mais estimulante ao que ele foi criado.

Linartevichi (2013) observou que ratos e camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado exploraram quantitativamente mais os braços fechados, quando comparados com os abertos. Assim, é possível medir parâmetros que revelam a aversão natural de roedores a espaços abertos. Morato (2006) afirmou que o ambiente novo provocou aumento tanto no impulso de explorar, como do medo, originando um conflito entre explorar e proteger-se. Sendo assim, o contato com o enriquecimento não foi estimulante o suficiente para diminuir a aversão/medo, nos animais mais velhos, ao explorarem um ambiente mais aberto.

Cascardo et. al. (2010) relataram que os roedores geralmente evitam os braços abertos e muitas teorias sobre isso têm sido elaboradas. Até o momento, no entanto, a principal origem dos estímulos aversivos presentes nos braços abertos do labirinto em cruz elevado não está plenamente estabelecida.

## *2. Desempenho dos coelhos*

Não houve diferença entre o grupo enriquecido e o não enriquecido nas características do peso final, ganho de peso e consumo de ração. Porém, a conversão alimentar foi pior no grupo enriquecido (Tabela 2).

Esta piora na conversão no grupo enriquecido provavelmente se deve ao maior gasto energético ao roer o enriquecimento e ao maior tempo despendido nesta atividade. Maertens e van Oeckel (2001), relataram que os coelhos que mostraram interesse por pedaço de madeira por um longo período de tempo ingeriram menos alimento por dia. Segundo Dal Bosco et al. (2002) e Kustos et al. (2003) coelhos que cresceram com enriquecimento ambiental atingiram o peso de abate em um período mais longo de tempo, ou seja, esses animais gastaram mais energia na presença do enriquecimento o que elevou o gasto calórico, aumentando o tempo para que atingissem o peso de abate necessário. Fato semelhante ocorreu no presente estudo em que os coelhos que cresceram com enriquecimento ambiental, tiveram uma pior conversão alimentar, quando comparado aos animais não enriquecidos.

*Avaliação da ansiedade frente a dois tipos de enriquecimento: social e ambiental.*

### *1. Avaliação da ansiedade*

Não houve efeito da interação enriquecimento físico x social sobre as características, sendo assim, os dois fatores foram considerados separadamente. Não foi observado efeito do enriquecimento físico sobre as características avaliadas no teste do labirinto em cruz elevado (Tabela 3). Já o enriquecimento social apresentou efeito sobre o tempo total de permanência tanto nos braços abertos quanto nos braços fechados. Os animais isolados permaneceram mais tempo, tanto nos braços abertos quanto nos braços fechados, que os animais com o enriquecimento (Tabela 3).

Os animais em grupo demoraram mais tempo para entrar nos braços abertos, bem como para chegar até o final dos mesmos. Além de apresentarem número maior de mergulhos, evidenciando com maior frequência o comportamento exploratório que os animais sem o enriquecimento (Tabela 3).

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) da interação enriquecimento social x idade dos animais sobre a frequência de tentativas de entrada nos braços abertos. Quando mais velhos (79 dias), os animais com enriquecimento fizeram mais tentativas de entrar nos braços abertos que os mais jovens (42 dias). Já dentre os animais sem o enriquecimento, os mais jovens fizeram maior número de tentativas de entrada nos braços abertos do que os mais velhos (Figura 3). Entrar e sair diversas vezes dos braços abertos, realizar o mergulho e chegar até o final do labirinto são comportamentos representativos da atividade exploratória. Animais que apresentam alta frequência de ir para o braço aberto indicam que estão bem adaptados ao ambiente em que vivem, não apresentando sinais de estresse e ansiedade. No presente estudo, este foi o caso dos animais com enriquecimento social, ou seja, criados em grupos.

Ravenelle et al. (2013) ao estudar ratos de linhagens com alto nível de ansiedade observaram que os animais criados em grupos fizeram mais entradas nos braços abertos que os animais isolados. Peña et al. (2009) notaram que machos e fêmeas, alojados em grupos entraram mais vezes nos braços abertos, além de chegaram até o final dos mesmos, diferentemente dos animais isolados. Sendo assim, tanto a frequência de tentativas de entradas como a entrada em braço aberto são comportamentos representativos da atividade exploratória, indicativas de menor ansiedade.

Segundo McNaughton e Zangrossi (2008) o teste de labirinto em cruz elevado apresenta uma motivação positiva gerada pela oportunidade de locomoção em todos os braços em um novo ambiente, diferente daquele a que o animal está acostumado. Um estudo conduzido por Hall e colaboradores (1997) descreveu que o isolamento aumenta a preferência por novos ambientes que sejam favoráveis e menos aversivos. De qualquer

modo, alta atividade locomotora pode estar relacionada a menor nível de ansiedade, visto que nos estudos feitos em ratos, nem a habituação e nem o confinamento nos braços abertos fizeram o animal se acostumar com braços abertos (Treit et al., 1993). Somente quando um ansiolítico, como o diazepam, foi usado, os animais permaneceram mais tempo nos braços abertos (Pinto et al., 2011).

A partir dos resultados observados no presente estudo, podemos perceber que a idade e o enriquecimento social influenciaram o número de tentativas de entrada nos braços abertos. Podemos observar que, em animais jovens (pouco tempo isolados), quando alojados isoladamente tentaram, com maior frequência, entrar nos braços abertos em comparação com os animais alojados em grupo. Contudo, quando ficaram mais velhos (maior tempo privado do contato social), essa frequência de tentativa se inverteu e os animais criados em grupos tentaram entrar mais vezes nos braços abertos. Não é descrita na literatura uma explicação para tal resultado. É possível que, por causa da falta do enriquecimento social, os animais tenham ficado mais ansiosos, uma vez que o coelho é um animal gregário. Já os animais com enriquecimento social teriam se beneficiado do contato de outros coelhos, ao longo do tempo, o que acabou por estimular o comportamento exploratório nesses animais.

## *2. Desempenho dos coelhos*

Houve efeito do enriquecimento social no peso final dos animais e no ganho de peso médio diário. Para essas características os animais isolados apresentaram melhor desempenho (Tabela 4). Sobre a conversão alimentar houve efeito da interação ( $P < 0,05$ ) enriquecimento social x ambiental. Nos animais isolados com enriquecimento ambiental a conversão alimentar foi maior do que nos animais sem enriquecimento. Já nos animais com enriquecimento social não houve diferença na conversão alimentar causada pela presença do enriquecimento ambiental (Figura 4). Para as demais características não foi observado efeito do tipo de enriquecimento (Tabela 4).

O maior ganho de peso nos animais sem enriquecimento social se deveu, provavelmente, a dois fatores: a falta de competição e a falta de oportunidade de expressar comportamentos sociais. Eles, por estarem sozinhos, não tiveram a competição pelo alimento e, por isso, despenderam menos energia nesta competição por alimento. A falta de companhia fez com que eles se movimentassem menos e ainda não tivessem a oportunidade de manifestar os comportamentos sociais (como o allogrooming e brincadeiras), contribuindo para ganhar mais peso em relação aos animais

criados em grupo. Este efeito do enriquecimento social foi semelhante ao relatado por Maertens e De Groot (1984) e Xiccato et al. (1999) que observaram que o ganho diário, peso final e o consumo de ração diminuíram à medida que aumentou o tamanho do grupo. Szendro (2012) também chegou à mesma conclusão de que coelhos em gaiolas individuais tiveram maior peso final e maior ganho de peso. Os animais alojados em grupos passaram menos tempo descansando e mais tempo sendo ativos. Eles gastaram mais tempo se movimentando e explorando o ambiente (Szendro, 2012). Além disso, segundo Princz et al. (2008b) gastaram mais energia realizando comportamentos sociais (allo-grooming e interações agonísticas repetitivas).

Uma maior conversão alimentar dos animais isolados com enriquecimento físico pode ser atribuída ao maior gasto energético e ao maior tempo gasto na exploração. Animais privados de enriquecimento físico e social não têm estímulo algum para se movimentarem, sendo assim quase não gastam energia, e acabam convertendo energia ingerida em massa corporea. Mesmo em contato com o enriquecimento físico, e movimentando mais, foram mais eficazes na conversão, indicando que as interações sociais gastam mais energia.

Assim como observado no presente estudo nos animais com enriquecimento social, há outros trabalhos que não apontaram nem melhora nem piora no desempenho ao usar o enriquecimento físico. Zucca et al. (2008) afirmaram que o enriquecimento físico não influenciou o desempenho dos animais quando estudaram o efeito deste tipo de enriquecimento e do tamanho do grupo em coelhos em crescimento. Hansen e Berthelesn, (2000), Jordan et al.(2006), Princz et al. (2007, 2008 a,b) e Verga et al. (2004), também não detectaram qualquer efeito do enriquecimento físico sobre o desempenho dos coelhos.

A piora no desempenho dos animais com enriquecimento social (menor ganho de peso e peso final), com enriquecimento físico (maior conversão alimentar) e sem enriquecimento social e físico (maior conversão alimentar) pode ser considerada como um motivo, principalmente econômico, para não se usar o enriquecimento, já que animais com algum tipo de enriquecimento, seja físico ou social, teriam que ficar alojados por mais tempo consumindo mais ração e trazendo um certo prejuízo para o produtor. Contudo deve-se sempre levar em conta o bem-estar desses animais. Uma vez que o mercado consumidor está cada vez mais preocupado com o tipo de criação que teve o animal.

## **Conclusão**

Tanto o enriquecimento físico como o social diminuíram a ansiedade dos animais. Podemos observar que o tempo de ação e a duração do benefício do enriquecimento físico na redução da ansiedade apareceu de forma mais rápida e menos duradoura, pois se mostrou mais efetivo nos animais jovens. Já o benefício do uso do enriquecimento social apareceu de forma mais lenta, uma vez que os resultados apareceram nos animais mais velhos. Contudo não pudemos afirmar se estes benefícios foram duradouros, havendo a necessidade de estudos posteriores para determinação da sua duração na redução da ansiedade dos animais.

O uso do enriquecimento, seja ele físico ou social, pode parecer à primeira vista desvantajoso economicamente, uma vez que os animais enriquecidos tiveram uma piora em algumas características de desempenho como o ganho de peso, peso final e conversão alimentar. Contudo se o produtor for consciente e estiver focado num mercado onde há essa preocupação com o bem-estar animal, pode haver uma compensação financeira com o valor que se agrega ao produto final, onde os animais foram criados de maneira ética com uma preocupação com seu bem-estar.

## Referências

BRENES, J.C., et al. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behavior Brain Research*, v.197, p.125-137, 2009.

CASCARDO, G. M. et al. Papel da visão e do tato na aversão aos braços abertos do labirinto em cruz elevado, um modelo animal de ansiedade. Universidade Estadual de Londrina: Centro de Ciências Biológicas, Guarapuava, p.1-5, ago. 2010.

CHU, L-RU., GARNER, J., MENCH, A. A behavioral comparison of New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) housed individually or in pairs in conventional laboratory cages, *Applied Animal Behaviour Science*, v.85, p.121-130, 2004.

DAL BOSCO A., CASTELLINI C., MUGNAI C. Rearing rabbits on a wire net floor or straw litter: behaviour, growth and meat qualitative traits. *Livest Prod Sci*, v. 75, p.149-56, 2002.

GUNN, D., MORTON, D. B. Inventory of the behavior of New Zealand White rabbits in laboratory cages, *Appl Anim Behav Sci*, 45, 277- 292, 1995.

HALL, F. S., et al. The effects of isolation-rearing on preference by rats for a novel environment. *Physiol. Behav.*, v. 62, p. 299-303, 1997.

HANDLEY, S. L., MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze - exploration model of "fear"- motivated behavior. *Naunyn Schmeidebergs Arch Pharmacol.*, v. 327 (1), p. 1-5, 1984.

HANSEN, L. T.; BERTHELSEN, H. The effect of environmental enrichment on the behavior of caged rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Applied Animal Behavior Science*, New York, v. 68, p. 163-178, 2000.

JORDAN, D. et al. Environmental enrichment in growing rabbits. In: COST and ILVO. *Recent Advances in Rabbit Sciences*, Belgium, p.113-119, 2006.

KAPS, M., LAMBERSON, W.R. 2009.Repeated Measures,pp.405-443. In: Kaps M. and Lamberson W.R. *Biostatistics for animal science*. 2<sup>nd</sup> ed. Wallingford: CABI Publishing.

KUSTOS, K. et al. Effect of stocking density, the material of botton and feedingon performance of growing rabbits. In: *Hungarian Conference on Rabbit Production, 15th* , 2003, *Procedings...*Kaposvar, Hungary, p. 123-8.

LIDFORS, L. et.al. Behavioral effects of environmental enrichment for individually caged rabbits. *Appl Anim Behav Sci*, 52, 157-169, 1997.

LINARTEVICH, V. F. Envolvimento da síntese protéica no hipocampo dorsal na tolerância ao efeito ansiolítico do midazolam observada na terceira exposição ao labirintoem cruz elevado em ratos. 2013. 110 f. Tese (Doutorado) - Curso de

Farmacologia, Departamento de Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MAERTENS, L., VAN OECKEL. The fattening of rabbits in pens: effect of housing and gnawing material on performance and carcass quality. In: SYMPOSIUM ON HOUSING AND DISEASES OF RABBITS, FURBEARING ANIMALS AND PET ANIMALS, 12, 2001, Celle, Proceedings..., Celle, 2001 p.156-161.

MCDERMOTT, C., KELLY, J.P. Comparison of the behavioural pharmacology of the Lister-Hooded with 2 commonly utilized albino rat strains. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v.32, p.1816-1823, 2008.

MCNAUGHTON, N., ZANGROSSI, H. J. Theoretical approaches to the modeling of anxiety in animals. *Handbook of Anxiety and Fear*, v. 17, p. 11-27, 2008.

MOURA, A.S.A.M.T. et al. Variance components and response to selection for reproductive, litter and growth traits through a multi-purpose index. *World Rabbit Sci*, 9, 2, 77-86, 2001.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. Universidade São Paulo: USP, São Paulo, v. 4, n. 17, p.159-174, 2006.

PEÑA, Y., et al. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 34, p. 1390-1404, 2009.

PINTO, W. B. V. R., et al. Teste de labirinto em cruz elevado: Aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. *RESBCAL*, v. 1 (1), p. 102-120, 2011.

PRINCZ, Z. et al. Application of gnawing stick in rabbit housing. *World Rabbit Sci*. 15, 29-36, 2007.

PRINCZ, Z. et al. Effect of gnawing sticks on the welfare of growing rabbits. In: *Proceedings of the 9<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Verona, Italy. Ethology and Welfare*, p.1221- 1224, 2008a.

PRINCZ, Z. et.al. Behaviour of growing rabbits under various housing conditions. *Appl Anim Behav Sci*, 111, 342-356, 2008b.

RUSHEN, J.; MUNKSGAARD, L.; MARNET, P. G.; DE PASSILLE, A. M. Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 73 (1), p.1-14, 2001.

RAVENELLE, R., et al. Environmental enrichment effects on the neurobehavioral profile of selective outbred trait anxiety rats. *Behavioural Brain Research*, v.252, p. 49-57, 2013.

SAS 2003. SAS/STAT. User's guide. Version 8.02. SAS Institute Incorporation, Cary, USA.

SZENDRŐ, Z. New perspectives of housing reproducing and growing rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 10<sup>th</sup>, 2012, Sharm El-Sheikh. Proceedings... Sharm El-Sheikh: WRSA, 2012, p. 979-996.

TREIT, D., et al. Anxiogenic stimuli in the elevated plus maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 44, p. 463-469, 1993.

TROCINO, A.; XICCATO, G. Animal welfare in reared rabbits: a review with emphasis on housing systems. *World Rabbit Sci*, 14, 77-93, 2006.

VERGA, M., et al. Effect of housing and environmental enrichment on performance and behaviour in fattening rabbits. In: Proceedings of the 8th World Rabbit Congress., Puebla, Mexico, 1283-1288, 2004.

VERGA, M. et al. Effects of husbandry and management systems on physiology and behavior of farmed and laboratory rabbits. *Hormones and Behavior*, v.52, p.122-129, 2007.

XICCATO G., et al. Influence de l'effectif et de la densité par Cage sur les performances productives, la qualité bouchère et le comportement chez le lapin. *Journées de la Recherche Cunicole*, v. 8, p. 59-62, 1999.

ZUCCA, D., et al. Effects of environmental enrichment and group size on behaviour and production in fattening rabbits, In: Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona, Italia, p.1281-1286, 2008.



**Figura 1:** Gaiolas com enriquecimento físico.



**Figura 2:** Labirinto em cruz elevado utilizado na observação.

**Tabela 1.** Comportamentos dos coelhos, do ensaio piloto, no teste de labirinto em cruz elevado aos 49 e 79 dias.

Comportamento	Enriquecido	Não enriquecido	Valor de P
49 dias			
TBA (seg)	4,97 ± 0,17	4,98 ± 0,17	0,990
TBF (seg)	3,94 ± 0,27	3,86 ± 0,30	0,837
T1BA (seg)	3,07 ± 0,41	4,02 ± 0,25	0,048
TFBA (seg)	3,46 ± 0,32	4,14 ± 0,23	0,090
TENT (frequência)	1,47 ± 0,18	1,37 ± 0,18	0,702
MERG (frequência)	1,85 ± 0,20	1,83 ± 0,19	0,906
LEV (frequência)	0,63 ± 0,32	0,14 ± 0,55	0,198
79 dias			
TBA (seg)	2,73 ± 0,60	4,70 ± 0,19	< 0,001
TBF (seg)	5,05 ± 0,17	4,27 ± 0,27	0,017
T1BA (seg)	3,23 ± 0,34	3,00 ± 0,41	0,674
TFBA (seg)	3,33 ± 0,55	4,12 ± 0,34	0,204
TENT (frequência)	0,85 ± 0,24	1,14 ± 0,20	0,350
MERG (frequência)	0,90 ± 0,42	1,76 ± 0,22	0,051
LEV (frequência)	1,21 ± 0,30	1,03 ± 0,35	0,705

Legenda: TBA: tempo em braço aberto. TBF: tempo em braço fechado. T1BA: tempo decorrido até a primeira tentativa de entrada no braço aberto. TFBA: tempo decorrido até a chegada no final do braço aberto. TENT: número de tentativas de entrar no braço aberto. MERG: mergulhos. LEV: levantamento bipedal.

**Tabela 2.** Desempenho dos coelhos, do ensaio piloto, em crescimento de acordo com o enriquecimento ambiental.

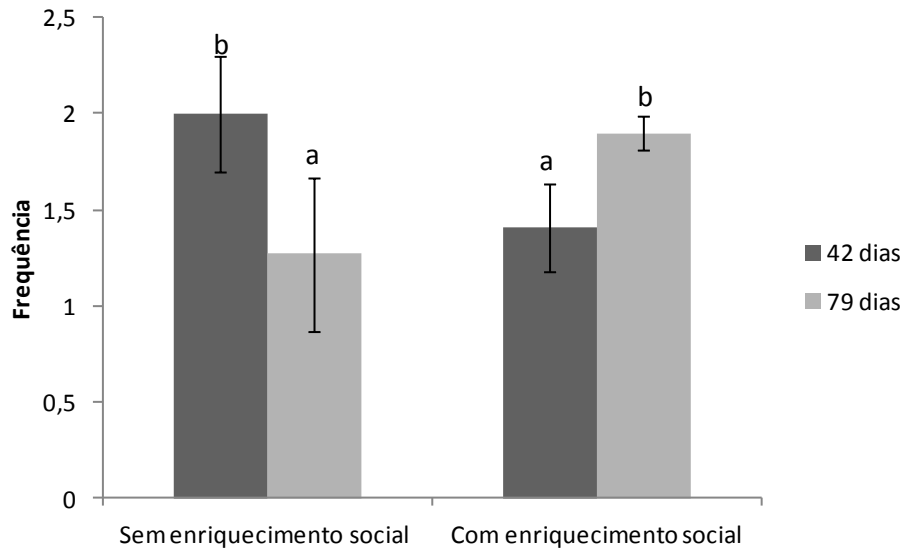
Característica	Enriquecido	Não Enriquecido	EPM	Valor de P
Peso inicial (g)	794	881	28	0,073
Peso final (g)	2524	2691	63	0,161
Ganho de Peso (g/d)	39,2	43,1	1,5	0,161
Consumo de ração (g/d)	114,0	114,3	2,9	0,943
Conversão alimentar	2,91 <sup>a</sup>	2,64 <sup>b</sup>	0,06	0,015

EPM: Erro médio padrão. <sup>a,b</sup> Médias diferem entre si.

**Tabela 3.** Comportamentos dos coelhos no teste de labirinto em cruz elevado

Características	Enriquecimento Físico			Enriquecimento Social		
	Com	Sem	Valor de P	Sem	Com	Valor de P
TBA (seg) <sup>1</sup>	2,44 ± 0,46	3,97 ± 0,43	0,216	2,00 ± 0,60 <sup>a</sup>	4,41 ± 0,16 <sup>b</sup>	0,004
TBF (seg) <sup>2</sup>	190,61 ± 19,47	151,41 ± 19,47	0,180	208,13 ± 19,47 <sup>b</sup>	133,89 ± 19,47 <sup>a</sup>	0,019
T1BA (seg) <sup>1</sup>	2,82 ± 0,29	3,16 ± 0,53	0,606	2,40 ± 0,63 <sup>a</sup>	3,60 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,022
TFBA (seg) <sup>1</sup>	3,16 ± 0,36	3,35 ± 0,54	0,771	2,45 ± 0,67 <sup>a</sup>	4,05 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,005
MERG (freq) <sup>1</sup>	0,63 ± 0,23	0,99 ± 0,28	0,416	0,06 ± 0,31 <sup>a</sup>	1,55 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,004
LEV (freq) <sup>2</sup>	5,34 ± 1,13	5,84 ± 1,13	0,759	6,37 ± 1,13	4,80 ± 1,13	0,343

<sup>1</sup>Genmod: teste qui-quadrado; <sup>2</sup>Mixed: teste F;<sup>a,b</sup> Médias diferem entre si; Legenda: TBA: tempo em braço aberto. TBF: tempo em braço fechado. T1BA: tempo decorrido até a primeira tentativa de entrada no braço aberto. TFBA: tempo decorrido até a chegada no final do braço aberto. TENT: número de tentativas de entrar no braço aberto. MERG: mergulhos. LEV: levantamento bipedal.

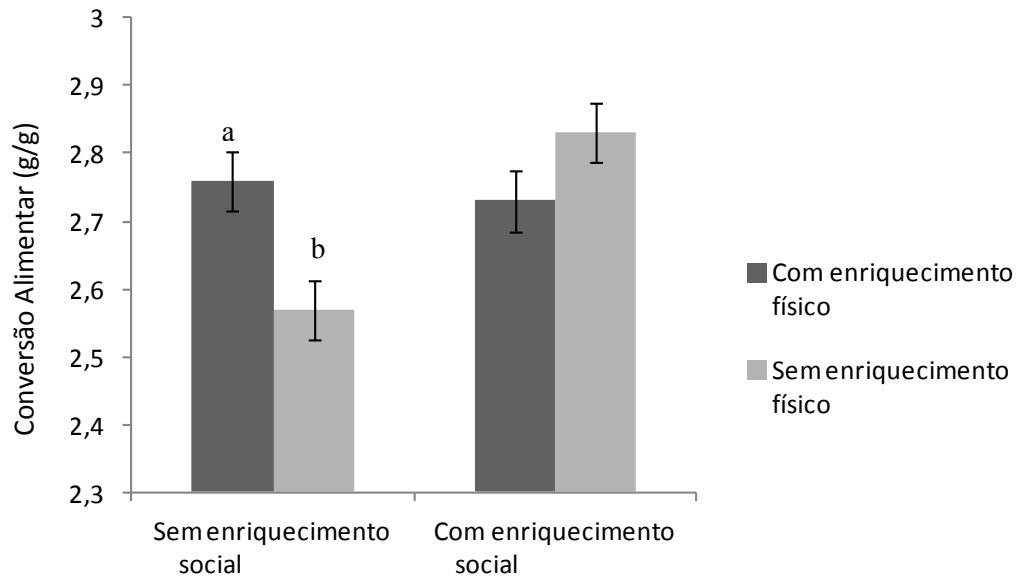


**Figura 3.** Efeito da interação do enriquecimento social x idade, sobre o numero de tentativas de entrada no braço aberto ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Desempenho dos coelhos em crescimento de acordo com o tipo de enriquecimento.

Características	Enriquecimento Físico				Enriquecimento Social			
	Com	Sem	EPM	Valor de P	Sem	Com	EPM	Valor de P
Peso a desmama (g)	838,1	834,1	6,1	0,651	833,7	838,5	6,1	0,592
Peso final (g)	2331,6	2395,9	34,0	0,207	2420,2 <sup>a</sup>	2307,2 <sup>b</sup>	34,0	0,037
Consumo médio diário (g)	117,3	120,3	2,4	0,404	120,8	116,8	2,4	0,268
Ganho médio diário (g)	42,7	44,6	0,9	0,170	45,3 <sup>a</sup>	42,0 <sup>b</sup>	0,9	0,027

EPM: Erro médio padrão. <sup>a,b</sup> Médias diferem entre si



**Figura 4.** Efeito da interação enriquecimento social x físico sobre a conversão alimentar ( $P < 0,01$ ).

### **CAPÍTULO III**

## AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA NEURONAL DE COELHOS EM CRESCIMENTO EM AMBIENTE ENRIQUECIDO

### Resumo

O ambiente enriquecido se constitui numa forma diferenciada de alojar coelhos, mais semelhante ao da vida natural, e pode resultar em maior interação social, estimulação cognitiva, aprendizagem espacial e atividade motora. O enriquecimento tem demonstrado diversos efeitos fisiológicos comportamentais e morfológicos no cérebro de roedores. Em coelhos, mesmo sendo uma espécie adaptada a usar ambientes complexos, ainda não há estudos sobre o desenvolvimento neuronal em ambientes enriquecidos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a morfologia neuronal do córtex cerebral em duas áreas primárias, motora e somatossensorial, de coelhos em crescimento, frente a dois tipos de enriquecimento: o físico e o social. Foram utilizados 56 coelhos machos, pertencentes ao grupo genético Botucatu, desmamados com 35 dias de idade, até atingirem em média 84 dias. Foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições: isolado sem enriquecimento físico (ISE), isolado com enriquecimento físico (ICE), em grupo sem enriquecimento físico (GSE) e em grupo com enriquecimento físico (GCE). Os animais com enriquecimento social foram alojados em oito gaiolas coletivas, seis por gaiola; já os animais privados do contato social foram alojados em oito gaiolas individuais. Chapas galvanizadas foram instaladas nas paredes laterais destas gaiolas para evitar o contato visual entre os animais. Metade das gaiolas (individuais e coletivas), definidas ao acaso, foi enriquecida com pedaços de eucalipto dependurados no teto da gaiola. Aos 84 dias de idade, foi escolhido ao acaso um animal de cada uma das repetições de todos os tratamentos, totalizando 16 animais, que foram destinados ao estudo morfológico. Os animais foram perfundidos e os encéfalos foram processados pelo método de Golgi. Os neurônios da camada piramidal interna foram analisados utilizando o software Fiji e os *plugins Simple Neurite Tracer* e *Sholl Analysis*. Na área pré-central (motora) houve efeito do tratamento apenas em duas características: número de raios que intersectam pelo menos uma vez um dendrito e a distância do último raio intersectante do soma. Animais ISE apresentaram maior número de raios intersectantes e maior distância do último raio, que os animais em GCE ( $P < 0,05$ ). Os demais tratamentos não diferiram desses dois. Portanto, os animais em ISE apresentaram uma maior dispersão dendrítica que os em GCE. Já na área pós-central (somatossensorial) não houve diferença entre os tratamentos para nenhuma das características estudadas. O enriquecimento ambiental não melhorou as características morfológicas nas áreas motoras e somatossensorial dos cérebros dos coelhos. Contudo, como ainda não há trabalhos nesta espécie, relacionando os tipos de ambiente enriquecido e as mudanças morfológicas neuronais, faz-se necessários mais estudos nesta área para chegarmos a uma conclusão definitiva sobre como o ambiente enriquecido afeta morfológicamente os neurônios do córtex cerebral dos coelhos.

**Paravras chave:** morfologia, córtex, coelho, ambiente enriquecido, método de Golgi

## EVALUATION OF THE NEURONAL MORPHOLOGY OF GROWING RABBITS IN ENRICHED ENVIRONMENT

### Abstract

The enriched environment is a distinctive way of housing rabbits, more similar to natural conditions and it may result in improved social interaction, cognitive stimulation, spatial learning and motor activity. Environmental enrichment has shown physiological, behavioral and morphological effects on rodents' brains. In rabbits, despite the fact that the species is adapted to use complex environments, no studies on the effects of environmental enrichment on the neuronal development were reported. Therefore, the present study had the objective of evaluating the brain cortex neuronal morphology in two primary areas, motor and somato-sensorial, of growing rabbits with two modes of enrichment: physical and social. Fifty-six weaned male rabbits from the Botucatu genetic group weaned at 35 days were used up to 84 days of age. The animals were assigned to a completely randomized design with four treatments and four replicates: isolated without physical enrichment (ISE), isolated with physical enrichment (ICE), in group without physical enrichment (GSE) and in group with physical enrichment (GCE). The animals with social enrichment were housed in eight collective cages, six per cage, whereas the ones deprived of social contact were housed in individual cages. Galvanized sheets were adapted to the lateral parts of these cages to avoid the visual contact with other animals. Half the cages, randomly chosen, were enriched with eucalyptus sticks hung to the cage ceiling. At 84 days of age, one animal from each replicate was chosen at random to be used in the morphological study. The animals were perfused and the brains were processed using the Golgi method. The neurons from the internal pyramidal layer were analyzed using the Fiji software and the plugins *Simple Neurite Tracer* and *Sholl Analysis*. In the pre-central (motor) area treatment effects were detected on two traits: the number of radii that intercept at least once a dendrite and the distance between the last intersecting radius and the soma. The ISE animals showed a higher number of intersecting radii and longer distance of the last radius than the animals in GCE ( $P < 0.05$ ). The other two treatments were not different from these two. Therefore, the animals in ISE showed a greater dendritic dispersion than the ones in GCE. In the post-central area (somato-sensorial), no difference among treatments was detected for any of the analyzed traits. Environmental enrichment did not improve the morphological traits in the motor and somato-sensorial areas of the rabbits' brains. However, because no studies were yet developed relating the enriched environment and neuronal morphological changes, it is necessary that more studies are carried out in this area so that we can conclude definitively how the enriched environment affects morphologically the neurons of rabbits' brain cortex.

**Keywords:** morphology, cortex, rabbit, enriched environment, Golgi method

## **Introdução**

O ambiente enriquecido se constitui numa forma de criação diferenciada, mais semelhante ao da vida natural. No entanto, a partir de observações feitas em ratos e camundongos (Mohammed, et al., 2002) e em coelhos (Princz, et al., 2009), verificou-se que o animal, ao interagir com o novo ambiente enriquecido, acabou explorando, também, novas maneiras de utilizar tal enriquecimento. O ambiente enriquecido passou então a ter outra função, a estimulação cognitiva.

Ao longo de décadas, diversos tipos de enriquecimento ambiental foram desenvolvidos tais como: incluir maior número de companheiros de gaiola, usar gaiolas maiores, com piso modificado, com objetos que variam em cor e textura e que são alterados ao longo do tempo, bem como túneis e rodas (para roedores), gerando um ambiente semelhante ao natural quanto a diversidade de informações sociais e sensoriais (Kotloski e Sutula, 2015). Estas modificações resultam em maior interação social, estimulação cognitiva, aprendizagem espacial e atividade motora para os animais (Kotloski e Sutula, 2015). O enriquecimento ambiental tem demonstrado diversos efeitos moleculares da regulação genica, fisiológicos, morfológicos e em níveis comportamentais no cérebro (Kotloski e Sutula, 2015).

Estudos feitos com camundongos, ratos, gatos e macacos mostraram que, ao ter contato com o enriquecimento, os cérebros desses animais sofreram diversas modificações (Salle, et al., 2009). As primeiras modificações cerebrais estudadas foram as morfológicas. Ratos e camundongos criados em ambiente enriquecido apresentaram maior peso cerebral, com aumento na espessura cortical (Diamond, et al., 1964; Beaulieu e Colonnier, 1987). O ambiente enriquecido induziu aumento no tamanho do soma neuronal (Faherty et al., 2003), no número de ramificações dendríticas (Fiala et al., 1978; Leggio, et al., 2005), no número de espinhos (Globus et al., 1973), e sinapses (Rosenzweig e Bennett, 1996). Johansson e Belichenko (2002) verificaram um aumento no córtex somatossensorial devido a uma maior ramificação dendrítica e na densidade da coluna cortical em ratos adultos, após 3 semanas em ambiente enriquecido, em comparação com o grupo controle.

Em coelhos, mesmo sendo uma espécie adaptada a usar ambientes complexos em vida livre, ainda não há estudos sobre as mudanças morfológicas em ambientes enriquecidos. Contudo, Barros (2012) verificou que coelhos machos de 77 dias, quando alojados em gaiolas com o enriquecimento, tiveram um aumento do peso cerebral em

relação aos alojados em gaiolas convencionais. Também não há estudos sobre as possíveis alterações morfológicas do neurônio de coelhos alojados em grupo ou individualmente, em gaiolas providas ou não do enriquecimento. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a morfologia neuronal do córtex cerebral em duas áreas primárias, motora e somatossensorial, de coelhos em crescimento, frente a dois tipos de enriquecimento: o físico e o social.

## **Material e Métodos**

Pesquisa aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Protocolo nº 181/2012-CEUA

### *Protocolo de anestesia dos animais*

Para realização dos pilotos experimentais e estudo morfológico do córtex cerebral foram necessárias abordagens cirúrgicas nos animais que foram sempre realizadas após comprovar a anestesia. O protocolo de anestesia foi iniciado com a indução anestésica, 40 minutos antes da cirurgia administrando-se Tramal (cloridrato de tramadol 5%, 0,2 ml/kg) e Meloxicam (0,1 ml/Kg), seguida de injeção intramuscular de solução anestésica contendo dopalen (cloridrato de ketamina a 10%, 1,5ml/kg), anasedan (xilasina a 2%, 0,6ml/Kg) e acepram (acepromasina 0,2%, 0,5ml/kg) no momento da cirurgia. Durante a cirurgia, foi aplicado, por via intravenosa, 0,5 mL de solução anestésica, sempre que o animal demonstrava sinais de dor.

### *Avaliação da morfologia neuronal*

Foram utilizados 56 coelhos machos pertencentes ao grupo genético Botucatu, que é uma linhagem sintética originada de híbridos Norfolk 2000 (Moura et al., 2001), desmamados com 35 dias de idade, até atingirem, em média, 84 dias. Os animais permaneceram alojados na área de Produção de Coelhos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu. Foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições: Isolado sem enriquecimento físico (ISE), Isolado com enriquecimento físico (ICE), Grupo sem enriquecimento físico (GSE) e Grupo com enriquecimento físico (GCE). Os animais expostos ao enriquecimento social foram alojados em oito gaiolas coletivas de arame galvanizado (0,80 x 0,60 x 0,40 m), seis animais por gaiola; já os animais que foram

privados do contato social foram alojados em oito gaiolas de arame galvanizado individuais (0,33 x 0,60 x 0,40 m). Chapas galvanizadas foram colocadas nas paredes laterais destas gaiolas individuais para evitar o contato visual com outros animais. Metade das gaiolas (individuais e coletivas), definidas ao acaso, foi enriquecida com pedaços de eucalipto dependurados no teto da gaiola. Para isto, as gaiolas coletivas foram equipadas com dois enriquecimentos cada uma e as gaiolas individuais com um enriquecimento. Os enriquecimentos, confeccionados em eucalipto com 15 x 3 x 3cm, foram dependurados no teto da gaiola: um próximo à lateral direita e outro próximo à lateral esquerda nas gaiolas coletivas e próximo ao fundo da gaiola nas gaiolas individuais. Sua altura foi regulada, de acordo com a altura dos animais, entre 20 e 30 cm do piso. Os animais permaneceram em contato com enriquecimento durante 24 horas, uma vez por semana. Após esse período, o enriquecimento foi retirado de todas as gaiolas. O enriquecimento usado anteriormente foi descartado e toda semana era oferecido um novo pedaço de madeira.

Aos 84 dias de idade, foi escolhido ao acaso um animal de cada uma das repetições de todos os tratamentos, totalizando 16 animais, que foram destinados ao estudo morfológico, que ocorreu no laboratório de Neuromorfologia do Departamento de Anatomia, no Instituto de Biociências da Unesp em Botucatu. Foi avaliada a morfologia dos neurônios piramidais da na área somatossensorial primária (pós-central) e área motora primária (pré-central). Para tanto, após a anestesia, os animais foram perfundidos com paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,125%, o encéfalo foi coletado e reduzido a um bloco (4 mm de espessura), na altura do infundíbulo. Os blocos foram incubados em agitação e protegidos da luz, por seis dias em uma solução contendo dicromato de potássio a 3 %. Decorrido este tempo, os blocos foram lavados com nitrato de prata a 0,25% e incubados (em agitação e protegidos da luz) em nitrato de prata a 1,5% por dois dias. Após a incubação, os blocos foram lavados em água destilada e cortados em vibrátomo de forma sequencial em secções de 100 µm de espessura. As lâminas foram desidratadas e cobertas com Entelan.

As lâminas foram analisadas utilizando um microscópio Zeiss Scope A1, câmera digital AxionCam MRc e o software Axion Vision. As imagens dos neurônios piramidais foram obtidas centralizando-se o soma no centro do campo de forma que toda a extensão de sua arborização dendrítica estivesse contida no mesmo campo de observação. As imagens foram capturadas com objetiva de 40x em planos focais sequenciais e equidistantes e com variação de 3,26 µm no eixo “z”. Após a captura,

foram selecionados apenas os neurônios piramidais que estavam com os seus somas localizados em planos focais no terço médio do eixo “z”. Para cada tratamento foram analisados cinco neurônios.

As imagens capturadas foram analisadas utilizando o software Fiji (Schindelin et al., 2012) e os *plugins Simple Neurite Tracer* (Longair et al., 2011) e *Sholl Analysis* (Ferreira et al., 2014). O *plugin Simple Neurite Tracer* permite o rastreamento semi-automático em 3 dimensões dos prolongamentos neuronais a partir de imagens adquiridas em forma de stacks. O plugin possui ferramentas para análise e visualização 3D dos resultados. O *plugin Sholl Analysis* para Fiji (uma versão do ImageJ focado na análise de imagem biológica) automatiza a análise *Sholl* em um neurônio. A técnica *Sholl* descreve o padrão de ramificação dos dendritos e axônios plotando o número de ramos em função da distância a partir de um local definido, geralmente o soma célula (Sholl, 1953). O plug-in executa a técnica *Sholl* diretamente em imagens 2D e 3D de células marcadas e isoladas, obtidas tanto em microscopia de campo claro como fluorescência. Seu algoritmo interno é baseado em como a análise de *Sholl* é feita à mão, ou seja, ele cria uma série de esferas concêntricas ao redor da soma do neurônio, e conta quantas vezes os prolongamentos do neurônio cruzam com a circunferência dessas esferas.

Para a avaliação morfológica dos neurônios foram analisadas as seguintes características: ramificação primária, número de raios intersectantes, soma das intersecções, média de intersecções, máximo de intersecções ocorridas em um mesmo raio, distância entre o soma e o raio onde se teve o maior número de intersecções, índice de ramificação e distância do último raio intersectante.

As características das análises morfológicas foram submetidas à análise de variância com o auxílio do procedimento GLM do SAS (2003). O modelo incluiu o efeito fixo de tratamento e o erro aleatório. As comparações entre médias foram realizadas pelo pós-teste de Tukey.

## **Resultados e Discussão**

A morfologia dos neurônios piramidais da camada interna do córtex cerebral nas áreas primárias, motora e somatossensorial, de todos os tratamentos, estão apresentadas nas figuras 1 e 2. Na área pré-central (motora) houve efeito do tratamento apenas em duas características analisadas, no número de raios que intersectam pelo menos uma vez

um dendrito e a distância do último raio intersectante do soma (Tabela 1 e Figura 1). Animais isolados e sem enriquecimento (ISE) apresentaram maior número de raios intersectantes e maior distância do último raio, que os animais em grupo com enriquecimento (GCE) ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1). Os demais tratamentos não diferiram desses dois. Os animais ISE apresentaram uma maior dispersão dendrítica que os em GCE. Já na área pós-central (somatossensorial) não houve diferença entre os tratamentos para nenhuma das características estudadas (Tabela 2 e Figura 2).

Para explicar estes resultados aventamos a hipótese de que tanto o enriquecimento físico como o social acabaram se tornando obstáculos para a movimentação dos animais dentro das gaiolas. Os animais ISE tiveram mais espaço para se movimentar na gaiola do que os animais em GCE que, além de estarem alojados em grupos de seis por gaiola, tinham dois enriquecimentos ocupando espaço físico, limitando a sua livre movimentação. O tipo de enriquecimento físico também pode ter influenciado essa menor dispersão dendrítica nos animais em GCE. O pedaço de madeira tinha como objetivo promover o hábito de roer, contudo não estimulou a atividade física, ao contrário: o animal fica estacionado para poder interagir com o enriquecimento, usando os membros anteriores

O ambiente enriquecido acabou não sendo eficiente para alterar as características morfológicas dos neurônios da área sensitiva. O pedaço de madeira, mesmo sendo um objeto diferente do ambiente ao qual o animal está acostumado, não estimulou os sentidos táteis do animal, na área estudada. Nem mesmo a presença do companheiro estimulou essa área nos coelhos. Contudo, numericamente, podemos ver uma tendência de que os animais em GCE apresentaram maior complexidade da arborização dendrítica, por terem maior soma de intersecções, do que os animais em GSE (Tabela 2). Segundo Bozicovich et al. (no prelo) coelhos mantidos em grupos na presença do enriquecimento físico demonstraram menor interação social do que aqueles criados sem o enriquecimento. Segundo esses autores, o enriquecimento atuou como uma distração para os animais. Sendo assim, seria de se esperar que os animais GCE tivessem uma maior arborização pois passaram a ter o contato com algo diverso ao que eles estavam acostumados, no caso, os companheiros de gaiola.

Gelfo et al. (2009) estudaram o efeito do uso do enriquecimento em ratos Wistar, sobre o efeito do enriquecimento na área somatossensorial. Os autores notaram que o enriquecimento aumentou tanto o comprimento como a arborização dendrítica na III camada, mas não na camada V. Nesta camada não houve diferença entre o controle e os

ratos com enriquecimento físico e social.. Eles concluíram que o enriquecimento estimula o circuito córtico-cortical, mas não o circuito córtico-subcortical. Rozenzweig et al. (1978) ao estudarem ratos com enriquecimento e isolados também não observaram resultados diferentes entre os tratamentos.

Já Faherty e colaboradores (2003) estudaram a relação do exercício físico e do ambiente enriquecido com o córtex motor. Eles usaram camundongos *C57Bl/6J* machos distribuídos em três tratamentos: caixas convencionais, caixas convencionais com acesso a roda e caixas enriquecidas com rodas e sistemas de túneis. Não foram observadas diferenças morfológicas entre tratamentos no córtex motor. Resultado semelhante foi encontrado por Kolb et al (2003) ao trabalharem com ratas alojadas em grupos de 3 animais por caixa e em grupos de 6 animais alojados em gaiolas maiores com pontes, rampas, túneis e brinquedos. Também não observaram diferenças entre os grupos na área motora. Mesmo diante desses resultados não podemos afirmar que o enriquecimento não tem efeito na área motora. Gelfo et al. (2009) relataram efeito positivo do uso do enriquecimento em ratos Wistar. O grupo enriquecido apresentou uma maior arborização e comprimento dendrítico quando comparado com o controle.

## **Conclusão**

O enriquecimento ambiental não melhorou as características morfológicas nas áreas motoras e somatossensorial dos coelhos. Contudo, ainda não há trabalhos nesta espécie, relacionando os efeitos e os tipos de ambiente enriquecido e as mudanças morfológicas neuronais. Faz-se necessário mais estudos nesta área para chegarmos a uma conclusão definitiva sobre como o ambiente enriquecido afetaria morfológicamente o córtex dos coelhos. Ademais, o número de repetições (neurônios) por tratamento foi muito pequena no presente estudo e se o tamanho da amostra fosse aumentado, resultados diferentes poderiam ter sido obtidos.

## Referências

BARROS, T. F. M., Comportamento e bem-estar de coelhos em crescimento em gaiolas enriquecidas. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 49<sup>a</sup>, 2012, Brasília, *Anais...*Brasilia, 2012.

BENNETT, E.L., ROSENZWEIG, M.R., DIAMOND, M.C. Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. *Science*, v.163, p.825–6, 1969.

BEAULIEU, C., COLONNIER, M. Effect of the richness of the environment on the cat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* v. 266, p. 478–494, 1987.

BOZICOVICH, T.F.M., et al. Effect of environmental enrichment and composition of the social group on the behavior and welfare of growing rabbits. (no prelo).

DIAMOND, M. C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R. The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *Jour. Comp Neurol.*, Philadelphia, 123, 111-119, 1964.

FAHERTY, C. J., et al. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Developmental Brain Research*, v. 141, p. 55–61, 2003.

FERREIRA, T. A., et al. Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Meth*, v.11, n.10, p.982-984, 2014.

FIALA, B.A., et al. Environmental complexity modulates growth of granule cell dendrites in developing but not adult hippocampus of rats, *Exp. Neurol*, v.59, p.372–383, 1978.

FLEISCHHAUER, K., et al. A revised Cytoarchitectonic Map of the neocortex os the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Anat. Embryol*, v.161, p. 121-143, 1980.

GELFO, F., et al. Layer and regional effects of environmental enrichment on the pyramidal neuron morphology of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.91, p.353–365, 2009.

HOBBELEN, J.F. e VAN HOF, M.W. Monocular pattern discrimination in rabbits with unilateral lesions of the motor cortex. *Phycology & Behavior*, v. 21, p. 119-124, 1977.

JOHANSSON, B. B., BELICHENKO, P. V. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 22, p. 89-96, 2002.

KOLB, B., et al. Environmental Complexity has Different Effects on the Structure of Neurons in the Prefrontal Cortex Versus the Parietal Cortex or Nucleus Accumbens. *SYNAPSE*, v.48, p.149–153, 2003.

KOTLOSKI, R.J. e SUTULA, T.P. Environmental enrichment: Evidence for na unexpected. *Experimental Neurology*, v.264, p. 121-126, 2015.

LEGGIO, M.G., et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behavior Brain Research*, v.163, p.78-90, 2005.

LONGAIR M.H. Simple Neurite Tracer: Open Source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics*, 2011

LU, L., et al. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol*, v.183, p.600-9, 2003.

MOHAMMED, A. H., et al. Environmental enrichment and the brain. *Progress in Brain Research*, v.138, p. 109-133, 2002.

MOURA, A.S.A.M.T. et al. 2001. Variance components and response to selection for reproductive, litter and growth traits through a multi-purpose index. *World Rabbit Sci*, 9, 2, 77-86.

READER, T. A., et al. Distribution of monoamines and metabolites in rabbit neostriatum, hippocampus and cortex. *Brain Research Bulletin*, v. 23, p. 237-247, 1989.

PRINCZ, Z. et al. Behaviour of growing rabbits under various housing conditions. *Applied Animal Behavior Science*, New York, v. 111, p. 342-356, 2009.

ROSENZWEIG, M.R., et al. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Research*, v.153, p.563-576, 1978.

ROSENZWEIG, M.R., BENNETT, E.L., Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavior and Brain Research*, v.78, p.57-65, 1996.

SALE, A., et al. Enrich the environment to empower the brain. *Trends in Neurosciences*, v. 32 (4), p. 233-239, 2009.

SAS 2003. SAS/STAT. User's guide. Version 8.02. SAS Institute Incorporation, Cary, USA.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, v. 9(7), p.676-682, 2012.

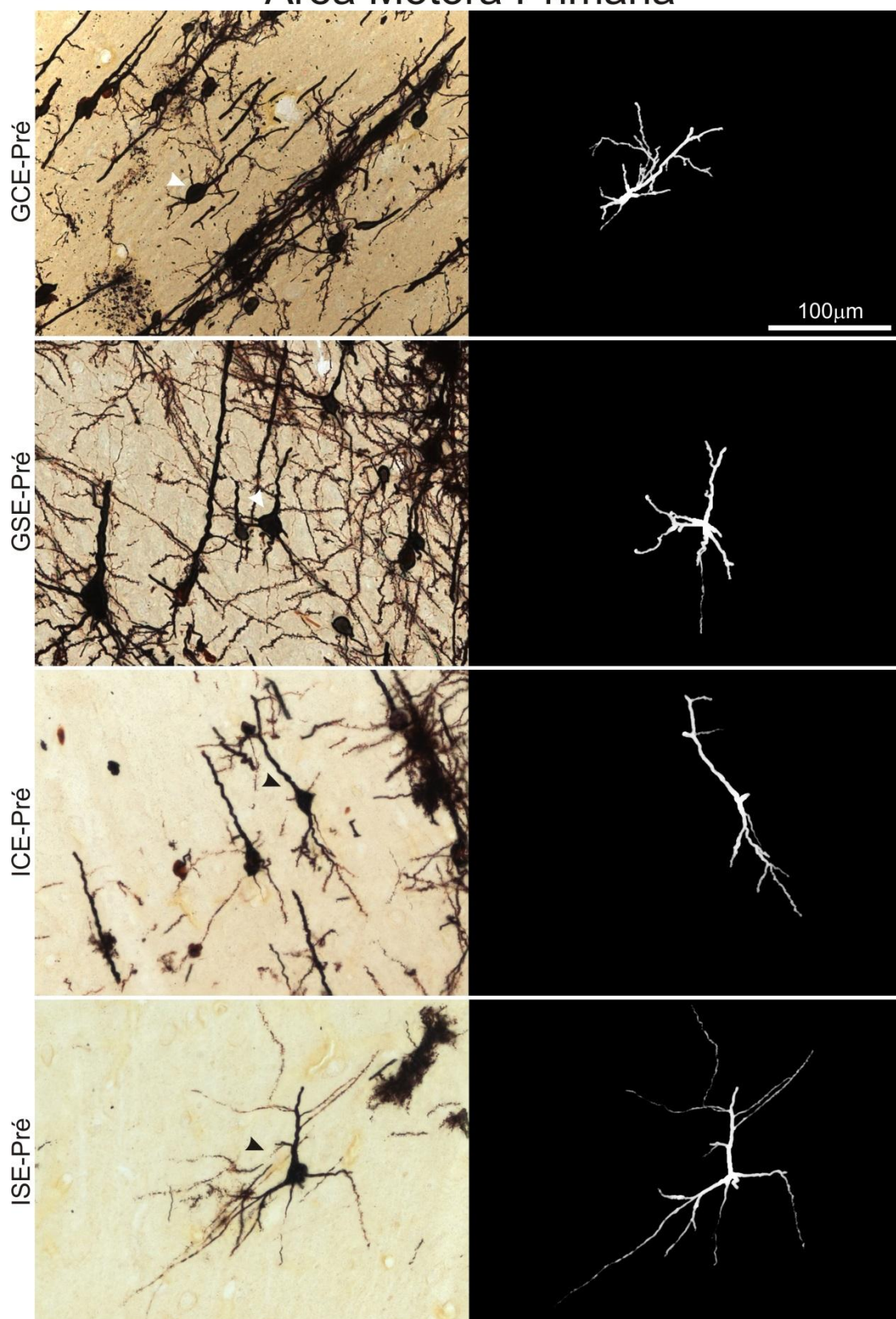
SHEK, J.W. et. al. Atlas of the Rabbit Brain and Spinal Cord. Nova York: Karger, 1968.

SHOLL, D.A. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat.* v.87, p.387-406, 1953.

URBAN, I. e RICHARD, P. A Stereotaxic Atlas of the New Zealand Rabbit's Brain Springfield: C.C. Thomas, 1972.

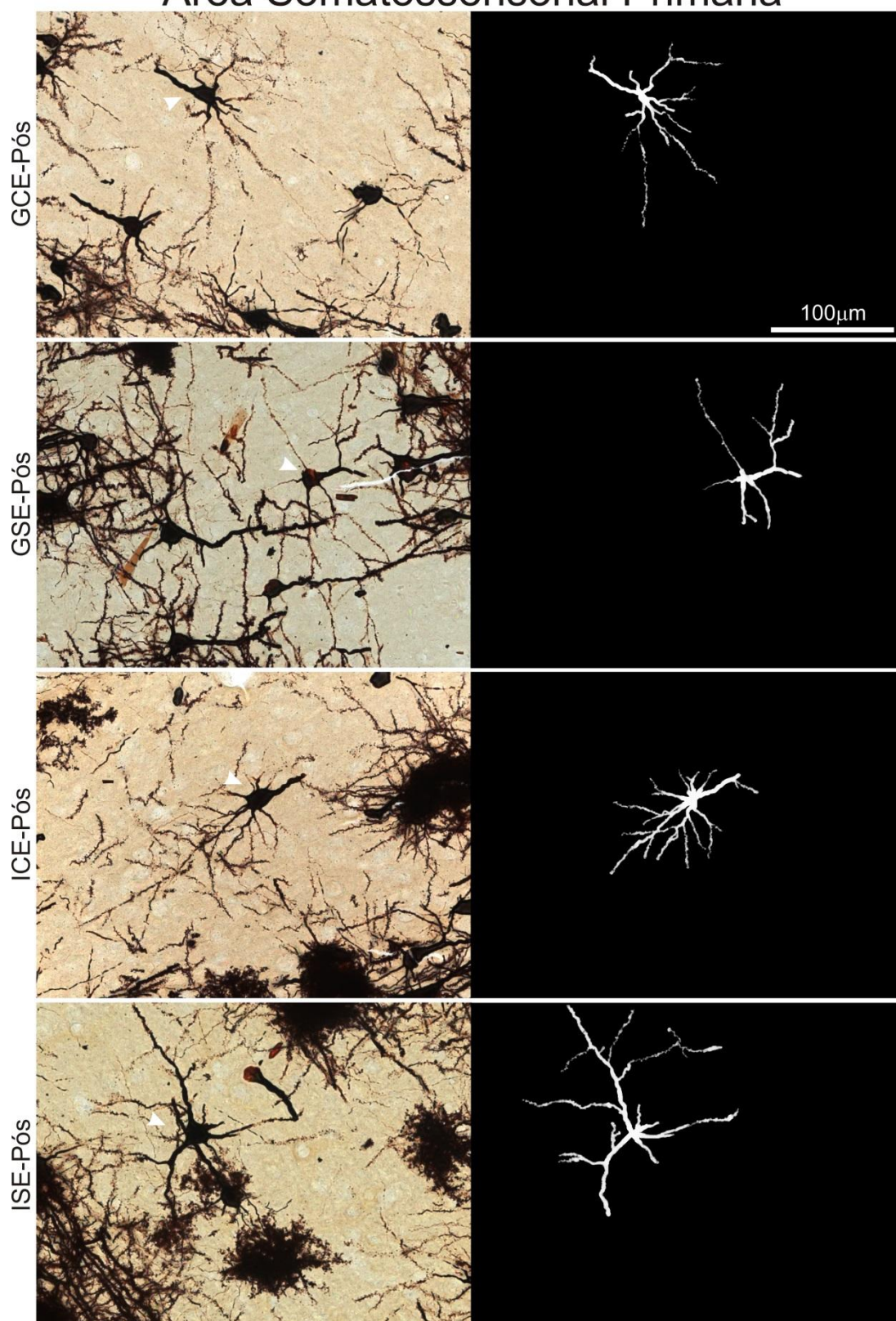
VAN PRAAG, H., et al. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews*, v.1, p.191-198, 2000

## Área Motora Primária



**Figura 1.** Morfologia dos neurônios piramidais da área cortical motora primária em todos os tratamentos. À esquerda, fotomicrografias de campo claro. A cabeça de seta indica o neurônio selecionado para o estudo. À direita, imagens dos modelos 3D dos prolongamentos neuronais a partir do soma. A barra de calibração é válida para todas as imagens. Legenda: GCE, grupo com enriquecimento; GSE, grupo sem enriquecimento; ICE, isolado com enriquecimento; ISE, isolado sem enriquecimento.

## Área Somatossensorial Primária



**Figura 2.** Morfologia dos neurônios piramidais da área cortical somatossensorial primária em todos os tratamentos. À esquerda, fotomicrografias de campo claro. A cabeça de seta indica o neurônio selecionado para o estudo. À direita, imagens dos modelos 3D dos prolongamentos neuronais a partir do soma. A barra de calibração é válida para todas as imagens. Abreviaturas dos tratamentos: GCE-Pré, grupo com enriquecimento; GSE-Pré, grupo sem enriquecimento ; ICE-Pré, isolado com enriquecimento; ISE-Pré, isolado sem enriquecimento.

**Tabela 1.** Características morfológicas de neurônios piramidais da área pré-central (motora) do córtex frontal de coelhos em crescimento.

Características	Tratamentos				Valor de P
	GCE	GSE	ICE	ISE	
Ramificação primária	5,80 ± 1,14	5,00 ± 1,14	5,20 ± 1,14	6,80 ± 1,14	0,69
Número de raio intersectante	272,80 ± 45,05 <sup>b</sup>	367,60 ± 45,05 <sup>ab</sup>	367,20 ± 45,05 <sup>ab</sup>	475,40 ± 45,05 <sup>a</sup>	0,04
Soma das intersecções	999,00 ± 227,14	1612,00 ± 227,14	1401,60 ± 227,14	1951,20 ± 227,14	0,06
Média de intersecções	3,77 ± 0,52	4,36 ± 0,52	3,96 ± 0,52	4,11 ± 0,52	0,88
Máximo de intersecções	8,60 ± 1,53	10,40 ± 1,53	11,20 ± 1,53	12,40 ± 1,53	0,38
Raio do máximo de intersecções	20,59 ± 7,53	30,67 ± 7,53	34,26 ± 7,53	35,28 ± 7,53	0,51
Índice de ramificação	1,62 ± 0,40	2,34 ± 0,40	2,30 ± 0,40	1,95 ± 0,40	0,57
Último raio intersectante	79,52 ± 11,54 <sup>b</sup>	104,00 ± 11,54 <sup>ab</sup>	103,90 ± 11,54 <sup>ab</sup>	131,64 ± 11,54 <sup>a</sup>	0,04

<sup>a,b</sup> Médias diferem entre si; Legenda: GCE: grupo com enriquecimento; GSE: grupo sem enriquecimento; ICE: isolado com enriquecimento; ISE: isolado sem enriquecimento.

**Tabela 2.** Características morfológicas de neurônios piramidais da área pós-central (somato-sensorial) do córtex parietal de coelhos em crescimento.

Características	Tratamentos				Valor de P
	GCE	GSE	ICE	ISE	
Ramificação primária	4,600 ± 0,73	5,00 ± 0,73	7,40 ± 0,73	5,20 ± 0,73	0,06
Número de raio intersectante	398,40 ± 47,95	316,20 ± 47,95	430,00 ± 47,95	376,80 ± 47,95	0,42
Soma das intersecções	2067,00 ± 243,91	1236,20 ± 243,91	2031,8 ± 243,91	1748,60 ± 243,91	0,10
Média de intersecções	5,04 ± 0,53	3,87 ± 0,53	5,00 ± 0,53	4,89 ± 0,53	0,37
Máximo de intersecções	11,60 ± 1,17	10,20 ± 1,17	12,60 ± 1,17	10,60 ± 1,17	0,49
Raio do máximo de intersecções	37,67 ± 8,76	28,10 ± 8,76	31,64 ± 8,76	44,51 ± 8,76	0,58
Índice de ramificação	2,56 ± 0,27	2,17 ± 0,27	1,75 ± 0,27	2,08 ± 0,27	0,26
Último raio intersectante	111,63 ± 12,29	90,82 ± 12,29	120,00 ± 12,29	106,36 ± 12,29	0,42

<sup>a,b</sup> Médias diferem entre si; Legenda: GCE: grupo com enriquecimento; GSE: grupo sem enriquecimento; ICE: isolado com enriquecimento; ISE: isolado sem enriquecimento.

## **CAPÍTULO IV**

## IMPLICAÇÕES

O bem-estar dos coelhos pode ser drasticamente afetado pelo tipo de criação e manejo. Indicadores fisiológicos e comportamentais são usados para determinar as reações dos animais aos estressores físicos e psicológicos. Um importante desafio para os criadores é evitar o estresse dos animais e suas consequências negativas sobre a produção, mesmo do estresse inevitável, como a desmama e o transporte. Uma possível forma de maximizar o bem-estar é a melhoria do ambiente em que o animal é criado e o uso do enriquecimento ambiental. Ele pode reduzir os efeitos negativos do tédio provocado pela falta de estímulos causada pelo ambiente pobre.

Existem diversos tipos de enriquecimento físico no mercado atualmente. Por exemplo, as gaiolas com plataformas elevadas são usadas para fêmeas reprodutoras como uma maneira de se afastarem um pouco da ninhada, feno prensado, usado para satisfazer o hábito de roer desses animais. Entretanto, estes enriquecimentos requerem um pouco mais de investimento por parte do produtor. Há outros tipos que o próprio criador pode fazer e instalar com o mínimo de custo. É o caso dos pedaços de madeira. Eles podem ser confeccionados em pinus ou eucalipto, ou podem ser usados os pedaços que se encontram na propriedade, como galhos de árvores. Para se evitar a contaminação fecal recomenda-se que eles sejam presos por fio de arame na lateral ou no teto da gaiola.

Pedaços de madeira têm sido muito utilizados para evitar o estresse em coelhos em crescimento, reduzindo o comportamento agressivo e diminuindo o número de lesões causadas por brigas, em animais com mais de 70 dias. O uso desse tipo de enriquecimento tem se mostrado eficaz na redução dos comportamentos ligados à ansiedade, principalmente nos animais mais jovens. Apesar disso, o uso desse tipo de enriquecimento pode acarretar piora no desempenho dos animais, como uma piora na conversão alimentar. Contudo, se o produtor for consciente e estiver focado num mercado onde há essa preocupação com o bem-estar animal, pode haver uma compensação financeira com o valor que se agrega ao produto final, onde os animais foram criados de maneira ética com uma preocupação com seu bem-estar.

Outro tipo de enriquecimento que não requer gastos extras para o produtor é social. No Brasil, as granjas cunículas já adotam o modelo de se agrupar os animais em crescimento. Todavia, é quando os animais estão mais velhos, que o uso desse tipo de enriquecimento é mais benéfico, diminuindo a expressão dos comportamentos ligados à

ansiedade. Em animais adultos, principalmente machos, há o problema de brigas geradas pela disputa de hierarquia. Uma solução para esse problema seria alojá-los em gaiolas individuais posicionadas lado a lado, pois assim eles poderiam ao menos ver o companheiro. No caso de animais mantidos em biotérios, este tipo de enriquecimento poderia ser de grande valia uma vez que normalmente estão em ambiente extremamente pobre.

Atualmente os coelhos de biotério são usados como modelos experimentais quase que exclusivamente para pesquisas na área da ortopedia e, principalmente, na área odontológica. No entanto, eles são capazes de usar ambientes complexos, o que poderia melhorar a sua capacidade de aprendizado e memória. Atualmente não existem muitos estudos relacionando o uso do enriquecimento ambiental e seu efeito sobre a neuromorfologia, restringindo o uso desses animais apenas para estudos relacionados a visão. Em comparação com os roedores, há poucos estudos envolvendo o enriquecimento e as alterações que o seu uso pode acarretar nas diversas áreas no cérebro dos lagomorfos, tornando as comparações detalhadas mais difíceis.

A partir do momento que esta espécie começar a ser mais estudada em sua neuroanatomia ela pode se tornar, assim como os roedores, um modelo animal tanto em pesquisas como na didática. A justificativa é que os coelhos tem um temperamento menos agressivo que os roedores, além de serem maiores o que facilitaria o ensino, por uma melhor visualização de técnicas como perfusão e cirúrgicas.

## APÊNDICE

### ***Padronização de métodos de estudo da morfologia neuronal***

Com o intuito de realizar treinamento nas técnicas de avaliação morfológica do sistema nervoso central foi feita a perfusão de fêmea adulta (com mais de um ano de idade) de 4,4 kg. A perfusão ocorreu no Laboratório de Neuromorfologia do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu.

Após anestesia, foi aberta a caixa torácica para introdução da cânula no coração. A perfusão foi realizada com solução salina (250 mL no fluxo de 80mL/ minuto), seguida de solução fixadora composta de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,125% em tampão fosfato (TF) 0,1M pH 7.4 (2000 mL no fluxo de 50mL/ minuto). Após a perfusão, o encéfalo foi coletado e crioprottegido em solução de sacarose a 30% em TF 0,1M, durante 48 horas a 4°C. Na sequência, o encéfalo foi seccionado em micrótomo de congelamento, preparando-se 10 séries de cortes coronais de 40 µm de espessura. Foram montadas lâminas sequenciais dos cortes, de três séries, para análise do córtex parietal na área somatossensorial primária (área pós-central, Poc 1) e do córtex frontal na área motora primária (área pré-central, Prc 1) segundo Fleischhauer et al. (1980). Em seguida, os cortes foram corados utilizando o método de Nissl. O método de Nissl consiste em realizar a desidratação dos cortes montados em lâminas por meio de banhos de álcool etílico de concentração crescente (de 50% a 100%), dissolução dos lipídeos com dois banhos de xilol, reidratação dos cortes por meio de banhos de álcool etílico de concentração decrescente (de 100% até a água destilada), coloração com tionina (Fisher #T-409), nova desidratação com álcool etílico, imersão em três banhos de xilol e montagem da lamínula com Permount (Fisher Scientific). Os cortes corados foram analisados utilizando o microscópio Zeiss Scope A1, câmera digital AxionCam MRc e o software Axion Vision.

Os critérios utilizados para identificação das áreas corticais foram obtidos a partir da análise de informações dos estudos de Hobbelen e Van Hof (1977); Fleischhauer, et. al. (1980) e Reader, et. al. (1989) e dos atlas de Urban e Richard (1972) e Shek et al. (1986). As áreas pré e pós-central foram identificadas em secções coronais do telencéfalo posicionadas 20,5 mm anteriormente ao meato acústico externo (Figura 1a). A determinação localização da área motora primária no córtex frontal (Prc 1), assim como da área somatossensorial primária no córtex parietal (Poc 1), foi feita segundo o trabalho de Fleischhauer et al. (1980) (Figura 1b e 1c).

Ao analisar a área motora primária (Prc 1) observa-se que o córtex cerebral apresenta a estrutura típica de seis camadas. A camada IV é denominada camada granular interna e constituída por pequenas células dispersas. Já a camada V é denominada camada piramidal interna, contendo grandes células piramidais. Pode – se observar que a camada V possuiu mais neuronios, quando comparada com a camada IV (Figura 1d). A área somatossensorial primária (Poc 1) caracteriza-se por apresentar a camada granular (camada IV) bem desenvolvida, enquanto as células piramidais da camada V tornam-se menores e um pouco menos numerosas, o que inclusive dificulta a distinção entre as camadas V e VI (Figura 1e).

#### *Piloto: Cirurgias de lesão eletrolítica e marcação*

Foram realizadas duas cirurgias estereotáxicas, uma para determinar as coordenadas cirúrgicas das áreas de interesse e a outra para provar dois traçadores neuronais e determinar qual seria utilizado no estudo. O estudo de Fleischauer et.al. (1980) foi usado para delimitação das áreas a serem estudadas com base em critério citoarquitetônicos. Para encontrar as coordenadas estereotáxicas das áreas delimitadas nas secções histológicas, foram realizadas comparações das secções coronais do encéfalo com os atlas de Urban e Richard (1972) e Shek et.al. (1986). Com este estudo, foi possível estabelecer que o nível ântero-posterior, onde estão o córtex somatossensorial e motor primários, encontra-se 20,5 mm anteriormente à linha interaural (Figura 1). Além disso, foi preciso definir o ângulo de inclinação da cabeça do animal no aparelho estereotático e as coordenadas dorso-ventrais e médio-laterais. Para a determinação da inclinação, comparamos as imagens de cortes coronais do trabalho de Fleischauer et.al. (1980) com as imagens de cortes coronais do atlas de Urban e Richard (1972), que usa 18° de inclinação. Assim, concluímos que o atlas tem uma inclinação menor que a usada no trabalho. A partir da descrição metodológica do atlas, do trabalho (Fleischauer et.al. 1980) e com a observação de estruturas similares entre as duas referências foi possível definir que a inclinação usada por Fleischauer (1980) deveria ser aproximadamente 14° maior que o atlas. Portanto, acreditamos que a inclinação da cabeça no aparelho esterotáxico usada por Fleischauer et al. (1980) foi de 32° anteriormente. Com base nesta análise, decidimos utilizar a inclinação de 30° em nossos casos experimentais.

As coordenadas dorso-ventrais e médio-laterais foram obtidas a partir da observação das preparações histológicas realizadas previamente para identificação das

áreas corticais primárias pré (motora) e pós central (somatossensorial, Fig 1c). Devido à maior proximidade de nossas áreas de interesse com o bregma, acreditamos que fosse mais indicado a utilização desta referência em lugar da linha interaural. Assim, para transformar as coordenadas obtidas inicialmente para a referência a partir do bregma, posicionamos a cabeça de um animal (previamente sacrificado em outros experimentos do laboratório) no aparelho estereotáxico e anotamos a correspondência das coordenadas a partir dos pontos craniométricos lambda (que coincide com a linha interaural) e bregma.

Para comprovação das coordenadas estereotaxicas definidas, foram realizadas lesões eletrolíticas nas áreas corticais de interesse. Para este objetivo foi usado um coelho macho com 2,1kg e 80 dias de idade. Após anestesia, o animal foi posicionado no aparelho estereotáxico com inclinação anterior da cabeça de 30°. Realizou-se uma incisão sagital mediana na pele da cabeça desde o nível da pupila até o osso occipital. O aparelho foi calibrado com as seguintes coordenadas cirúrgicas, a partir do bregma: para o córtex pré-central, AP= +2,26, DV= -1,39 e ML= -1,21; para o córtex pós-central, AP= +2,26, DV= -4,5 e ML= -9,74. Para o acesso cirúrgico do eletrodo de lesão, foram realizados dois orifícios do lado direito da calota craniana com a broca esférica odontológica, as meninges foram removidas e o córtex cerebral foi exposto. Em seguida, o eletrodo de lesão (A-M Systems, #572700) foi introduzido nas coordenadas indicadas e foram realizadas as lesões eletrolíticas com corrente negativa de 25  $\mu$ A por 2 minutos no córtex pré-central e por 3 minutos no córtex pós-central. Após a lesão, o animal foi perfundido e o encéfalo foi coletado, crioprotégido, cortado de forma seriada e os cortes histológicos foram corados pelo método de Nissl como descrito previamente.

Ao comparar a área de lesão eletrolítica (Figura 2) com a Figura 1e pode-se verificar que a lesão foi realizada na área de interesse e, assim, obteve-se a confirmação de que as coordenadas cirúrgicas e a angulação da cabeça do animal no aparelho estereotáxico foram corretamente estabelecidas.

Comprovada a eficácia das coordenadas estereotaxicas, foi realizado um piloto experimental para provar o resultado da marcação neuronal obtida após a injeção dos traçadores neuronais na áreas de interesse, para preenchimento retrógrado dos neurônios. O objetivo deste piloto experimental foi estudar a arborização dendrítica dos neurônios corticais, empregando dois tipos de traçadores: BDA com NMDA e Fluorogold. Neste experimento foi usado um coelho macho com 3 kg. Após anestesia, o animal foi posicionado no aparelho estereotáxico, como descrito anteriormente, e

utilizando as mesmas coordenadas estereotáticas das lesões eletrolíticas, foram realizados quatro orifícios na calota craniana, dois do lado direito e dois do lado esquerdo, para acesso cirúrgico de uma seringa Hamilton acoplada a uma bomba de infusão (ultramicropump III, World precision Instruments). No lado direito do encéfalo foi injetado 0,1 µl BDA a 5% com 10 nM de NMDA e no lado esquerdo foi aplicada uma injeção de 0,1 µl de Fluorogold. Após a cirurgia, o animal foi suturado e foi administrado Baytril 10% (enrofloxacino 10mg/ kg, 0,30 mL diluído em 0,70 mL de água para injeção). Após 10 dias, o animal foi perfundido, o encéfalo foi coletado, crioprottegido, cortado e os cortes foram armazenados em solução anti-congelante a -20C°.

Apesar das injeções de neurotraçadores atingirem as áreas previamente definidas no estudo citoarquitetônico, o preenchimento dos neurônios foi insatisfatório e não permitiu identificar a arborização dendrítica dos soma retrogradamente marcados. Acreditávamos que a quantidade de neurotraçadores utilizada (de 0,1 µL) não havia sido suficiente para preenchimento dos neurônios nas áreas de interesse. Por este motivo, foram realizadas outras duas cirurgias para injeção de neurotraçadores, com injeção de maior quantidade, tanto de BDA quanto de Fluorogold (1 µL em cada injeção), na tentativa de mapeamento retrógrado dos neurônios de projeção córtico-cortical. Nestes experimentos foram usados coelhos machos entre 2,250 kg e 2,500 kg. Após anestesia, os animais foram posicionados no aparelho esterotáxico, como descrito anteriormente, e utilizando as mesmas coordenadas estereotáticas das lesões eletrolíticas, foram realizados dois orifícios na calota craniana de cada animal, do lado direito, para acesso cirúrgico de uma seringa Hamilton acoplada a uma bomba de infusão (ultramicropump III, World precision Instruments). Com intuito de melhorar o preenchimento dos somas retrogradamente marcados, a quantidade de neurotraçadores injetada foi aumentada em 10 vezes. Assim, foram injetados 1 µl BDA a 5% na área pós-central e na área pré-central foi aplicada injeção de 1 µl de Fluorogold. Após a cirurgia, a incisão foi suturada e foi administrado Baytril 10% (enrofloxacino 10 mg/ kg). Depois de oito dias, os animais foram perfundidos, os encéfalos foram coletados, crioprottegidos, cortados e os cortes foram armazenados em solução anti-congelante a -20C°.

Apesar da área onde se injetou o BDA ter sido bem marcada por um grande depósito de traçador, ainda assim o preenchimento dos somas e dendritos não foi satisfatório para análise da morfologia neuronal com BDA (Figura 3A e 3C). Além disso, não foi possível observar os somas retrogradamente marcados com Fluoro-Gold.

### *Padronização do Método de Golgi*

Como alternativa ao método de preenchimento retrógrado dos somas neuronais com neurotraçadores, foi realizada também a padronização da técnica de marcação pelo método de Golgi, que permite estudar a morfologia neuronal incluindo a arborização dendrítica, pela impregnação por prata. Foram realizados três experimentos distintos para a padronização do método de Golgi.

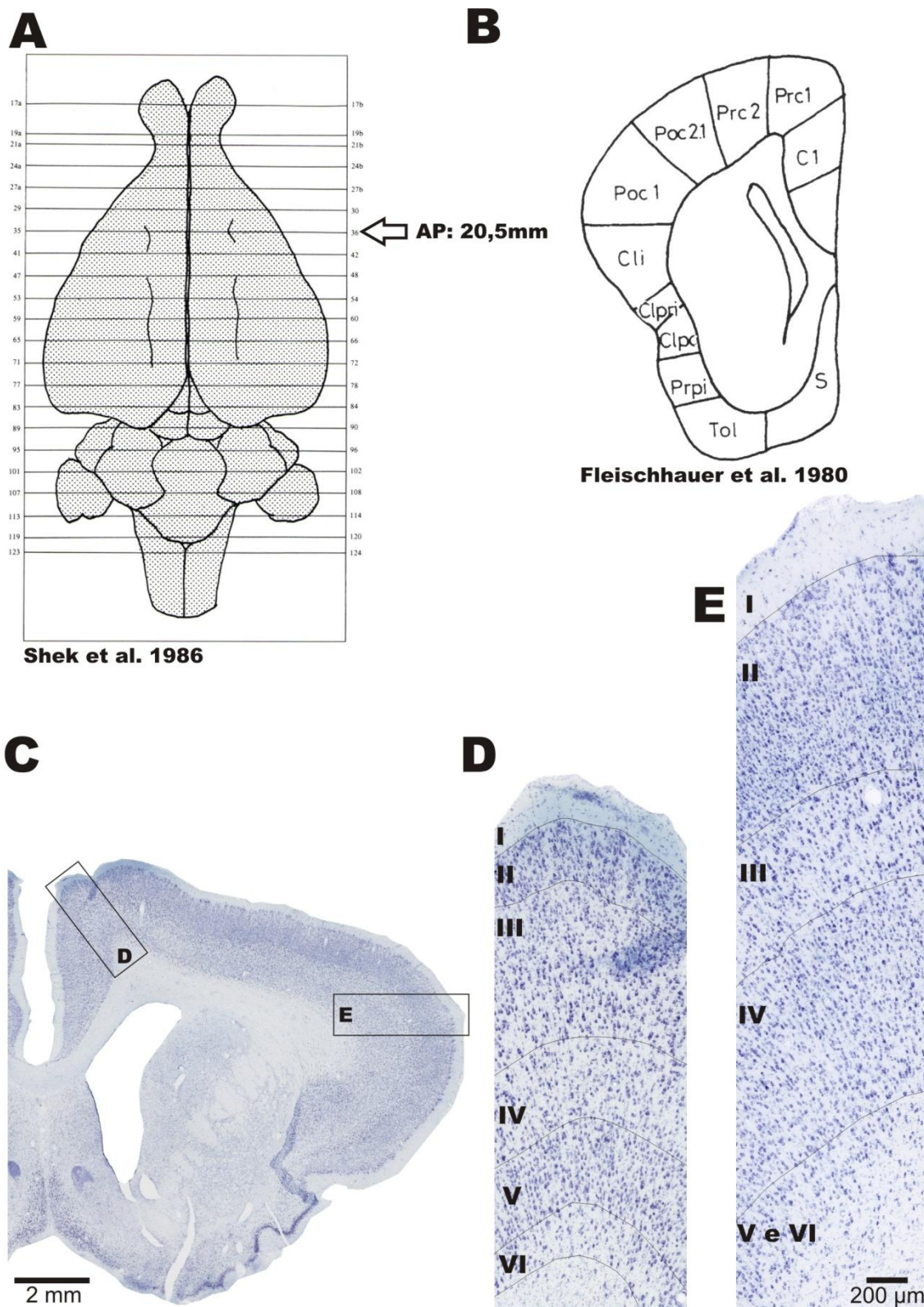
No primeiro experimento foi utilizado um coelho macho de 2,530 kg, que após anestesia, foi perfundido com paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,125%, sendo o encéfalo coletado e reduzido a um bloco (4 mm de espessura), na altura do infundíbulo. O bloco foi lavado com água destilada e os hemisférios divididos por um corte no plano mediano. Ambos os hemisférios foram incubados em agitação e protegidos da luz, em uma solução contendo 0,25 g de dicromato de potássio em 8 mL de água purificada e 2 mL de tetróxido de ósmio a 1%. Um dos hemisférios permaneceu incubado por seis dias e o outro por 10 dias. Decorrido este tempo, os blocos foram lavados com nitrato de prata a 0,25% e incubados em nitrato de prata a 0,75% por dois dias, protegidos de luz e em agitação. Após este período, o bloco foi lavado em água destilada e cortado em vibrátomo de forma sequencial em secções de 50, 100 e 200  $\mu\text{m}$  de espessura.

No segundo experimento, foi utilizado um coelho macho com 2,690 kg. Após anestesia, o animal foi perfundido com paraformaldeído a 4% e ácido pícrico a 1%, o encéfalo foi coletado e reduzido a um bloco (4 mm de espessura), imediatamente posterior ao infundíbulo. O bloco foi lavado com água destilada e foi incubado em agitação e protegido da luz, por seis dias em uma solução contendo dicromato de potássio a 3 %. Decorrido este tempo, o bloco foi lavado com nitrato de prata a 0,25% e incubado, em agitação e protegido da luz, em nitrato de prata a 1,5% por dois dias.

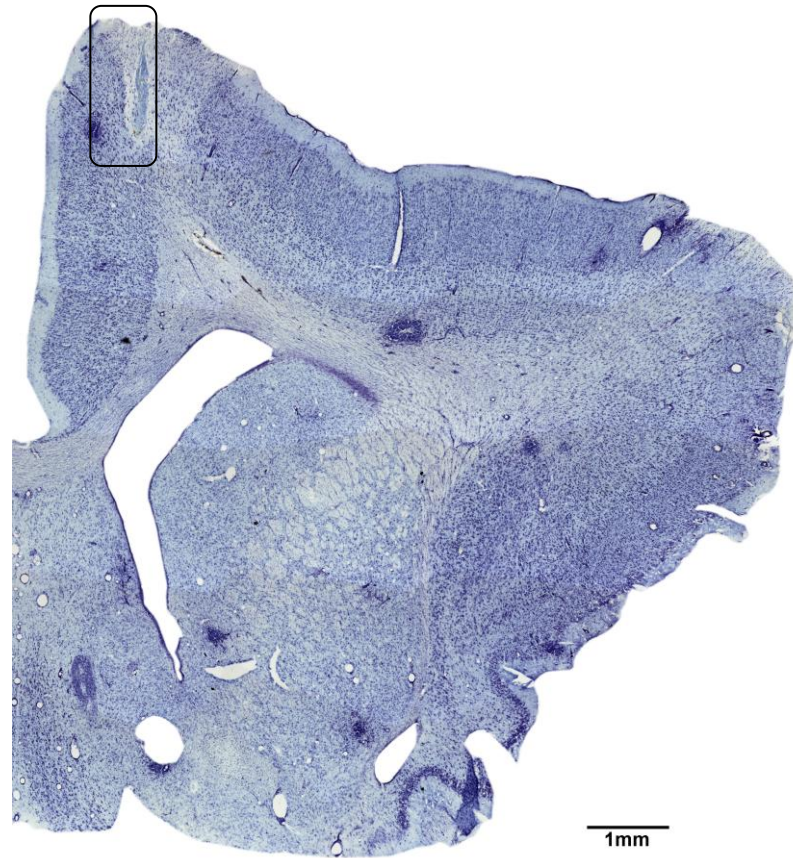
Para a realização do terceiro experimento foram utilizados dois blocos adicionais do mesmo encéfalo utilizado no primeiro experimento. Os blocos foram incubados em agitação e protegidos da luz, por seis dias em uma solução contendo dicromato de potássio a 3 %. Decorrido este tempo, os blocos foram lavados com nitrato de prata a 0,25% e incubados, em agitação e protegidos da luz, em nitrato de prata a 1,5%. Um dos blocos permaneceu incubado por um dia e o outro por dois dias. Após a incubação, os blocos foram lavados em água destilada e cortados em vibrátomo de forma sequencial, em secções de 100  $\mu\text{m}$  de espessura.

Os encéfalos processados com o método de Golgi apresentaram marcação dos neurônios e arborização dendrítica com maior nitidez e por maior extensão (Figura 3B e

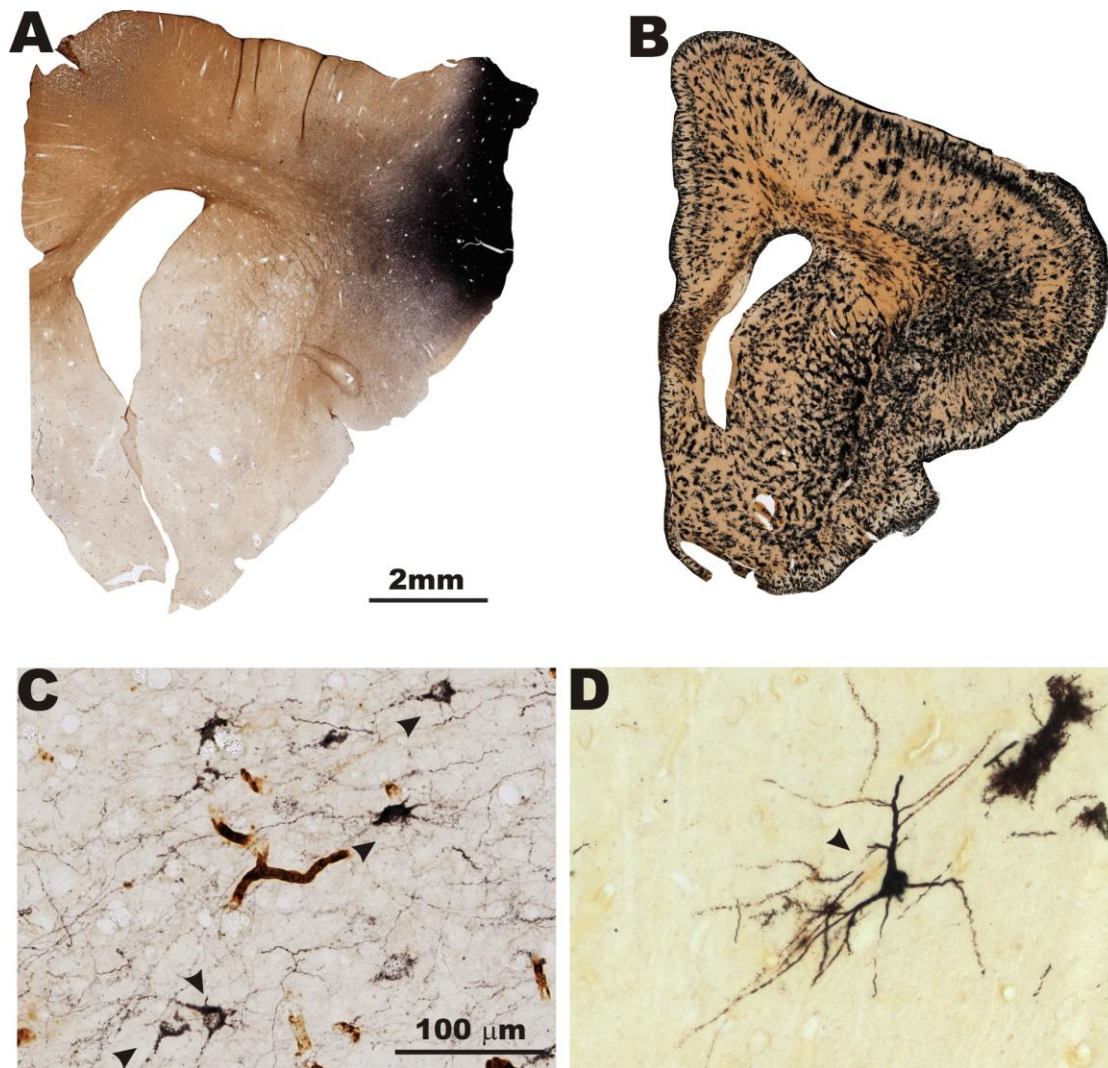
3D). Por este motivo, foi tomada a decisão de realizar as análises morfométricas a partir das secções histológicas obtidas após o processamento do material para o método de Golgi.



**Figura 1.** Identificação das áreas corticais pré e pós-central. **A.** Esquema da vista dorsal do encéfalo do coelho, com indicação do nível ântero-posterior (AP) da secção coronal de interesse. **B.** Mapa citoarquitetônico de uma secção coronal do telencéfalo no nível AP=20,5 mm (extraído de Fleischhauer et al., 1980). **C.** Foto micrografia de secção coronal do telencéfalo no nível AP=20,5 mm, indicando as áreas corticais pré (D) e pós-central (E). **D.** Fotomicrografia da área cortical pré-central (Prc 1), com delimitação das camadas corticais. **E.** Foto micrografia da área cortical pós-central (Poc 1), com delimitação das camadas corticais. Barra de calibração em E também é válida para D.



**Figura 2.** Fotomicrografia de secção coronal do telencéfalo, evidenciando a lesão eletrolítica no córtex pré-central, segundo as coordenadas estereotáxicas estabelecidas.



**Figura 3** :Resultado da padronização das técnicas morfológicas para estudo da morfologia neuronal. Em A, fotomicrografia de corte coronal do encéfalo do coelho, processado para evidenciação do FG e do BDA, no nível da área de injeção de BDA (negro) nas áreas corticais sensitivas primária e secundária. Em B, fotomicrografia de corte coronal do encéfalo do coelho, processado pelo método de Golgi, no mesmo nível de “A”. Em C, as cabeças de seta indicam os somas de neurônios corticais marcados com BDA e um pequeno esboço de sua arborização dendrítica. Em D, a cabeça de seta indica um neurônio cortical marcado pelo método de Golgi. Observa-se o soma e a arborização dendrítica marcados com nitidez e por maior extensão.