

UFRRJ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS SBFis/UFRRJ.

TESE

Efeito do Enriquecimento Ambiental Perinatal de Fêmeas em Comportamentos
Relacionados à Ansiedade na sua Prole

Camila Mendonça Netto Jobim

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS SBFIS/UFRRJ.**

**EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PERINATAL DE
FÊMEAS EM COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE
NA SUA PROLE**

CAMILA MENDONÇA NETTO JOBIM

Sob a orientação do Professor
Fábio Fagundes da Rocha

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora** em
Ciências, no Programa Multicêntrico de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas.

Seropédica
Maio de 2016

636.0
89689 Jobim, Camila Mendonça Netto,
J62e 1985-
T Efeito do enriquecimento
 ambiental perinatal de fêmeas em
 comportamentos relacionados à
 ansiedade na sua prole / Camila
 Mendonça Netto Jobim. - 2016.
 74 f.: il.

 Orientador: Fábio Fagundes da
 Rocha.

 Tese (doutorado) -
 Universidade Federal Rural do Rio de
 Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
 Ciências Fisiológicas, 2016.

 Bibliografia: f. 67-74.

 1. Animais - Filhotes -
 Doenças - Teses. 2. Animais -
 Filhotes - Aspectos psíquicos -
 Teses. 3. Ansiedade - Teses. 4.
 Animais - Comportamento - Teses. 5.
 Enriquecimento ambiental (criação de
 animais) - Teses. 6. Influências pré-
 natais - Teses. I. Rocha, Fábio
 Fagundes da. II. Universidade Federal
 Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
 Graduação em Ciências Fisiológicas.
 III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CAMILA MENDONÇA NETTO JOBIM

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Fisiologia e Farmacologia.

TESE APROVADA EM 25.12.2016



Dr Fabio Fagundes da Rocha (Orientador – UFRRJ)
(Orientador)



Prof Dr Fabio da Silva de Azevedo Fortes (Membro Externo – UFZJ)



Prof Dr Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno – UFRRJ)



Prof Dr Fabricia Viana Fonseca (Membro Externo – UFRJ)



Prof Dr André de Souza Mecaui (Membro Externo, DCFis – UFRRJ)

Dedico esta tese a dois dos meus grandes amores: Isadora e Raphaela

AGRADECIMENTOS

Minha pequena Isadora, desde o primeiro dia que te tive comigo, tudo em minha vida é por você. Obrigada por ser essa menina linda e me inspirar e me incentivar a fazer da minha vida um recanto seguro para você crescer. Esta é uma etapa que venci por ver seus olhos sorrindo para mim.

Raphaela, sem você não teria seleção, disciplinas, experimentos e nem ânimo para seguir em frente quando o barco parecia afundar. Você foi imprescindível durante todos esses anos. Seu amor me faz bem.

Fábio, obrigada pela orientação, pela liberdade e confiança que teve em mim desde as primeiras conversas. Seu apoio e compreensão neste momento final me fortaleceram e aliviaram algumas das angústias que surgiram.

Cláudio, nunca vou esquecer do seu companheirismo. Serei sempre grata à sua ajuda nos experimentos, questões burocráticas, conversas e momentos de descontração. Assim como a gentileza, prestatividade e educação do Roberto nunca serão esquecidas. Ao Alex também deixo meu agradecimento pela ajuda com os experimentos.

Raquel, sua companhia, conversa, casa e descontração fizeram meus dias de rural melhores. Sua amizade foi uma conquista muito especial. Obrigada por tudo.

Professores, funcionários e alunos do DCF abrigada pela convivência tranquila e a simpatia de todos.

Família amada, todos vocês têm parcelas de contribuição nessa conquista e na suavização das tensões.

E por último, mas não menos importante, camundongos, espero que a vida de vocês tenha tido um propósito maior.

RESUMO

JOBIM, Camila Mendonça Netto. **Efeito do enriquecimento ambiental perinatal de fêmeas em comportamentos relacionados a ansiedade na sua prole.** 2016. 74p Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Os transtornos de ansiedade estão entre as doenças psiquiátricas mais comuns na sociedade. Eles se dão pela incapacidade do indivíduo em lidar com um evento estressor (físico ou emocional), podendo acometer desde a infância até a idade adulta. O desencadeamento da ansiedade no período perinatal pode acarretar em mudanças comportamentais ao longo da vida. Neste sentido, o enriquecimento ambiental é utilizado tanto como atenuante dos efeitos estressores quanto como preventivo. Sendo assim, buscou-se avaliar comportamentos relacionados à ansiedade de filhotes de fêmeas expostas ao enriquecimento ambiental durante o período perinatal. Para isso foram criados grupos de machos e fêmeas ao longo de três gerações-F0, F1 e F2. Em F0 foram montados 2 grupos, o padrão (P) e o enriquecido (E). Em F1 fêmeas que estavam em ambiente enriquecido durante o período perinatal foram passadas para o ambiente padrão formando o grupo enriquecimento-padrão (E-P). F2 então passou a ter grupos dos três grupos, P, E-P e E. Estes grupos foram submetidos a observações do comportamento materno, modelos de ansiedade, dosagem de corticosterona plasmática e a avaliação da expressão dos genes para os receptores AVP1a, AVP1b, CRH1, CRH2 e OT. Como resultados verificamos que o comportamento materno em F0 foi maior no grupo enriquecido (E) ($46,8 \pm 8,9\%$ P; $77,8 \pm 5,4\%$ E; $p=0,0138$), porém não em F1 ($68,4 \pm 4,1\%$ P; $71,1 \pm 6\%$ E-P; $78,1 \pm 3,1\%$ E; $F=0,8120$ $p=0,4689$). Foi constatado o efeito ansiolítico nos modelos comportamentais utilizados. No labirinto em cruz elevado-LCE, este efeito pode ser notado apenas no grupo E das três gerações avaliadas. No campo aberto CA, apenas o grupo E de F2 apresentou comportamentos relacionados a ansiedade significativamente diferentes dos demais grupos. O teste da caixa claro-escuro-CCE mostrou diferença entre os grupos E-P e E em relação ao grupo P na latência para explorar o ambiente claro em F1 e F2. E o teste da supressão da alimentação pela novidade-NSF indicou que os grupos são diferentes entre si na latência para se alimentar, o maior tempo foi de P, seguido de E-P e depois de E ($147,7 \pm 15,7s$; $101,4 \pm 8,8s$; $62,8 \pm 9,4s$; $F=13,0700$ $p=0,0001$ - Machos) ($143,7 \pm 11,4s$; $93,7 \pm 20,4s$; $38,3 \pm 5,3s$; $F=16,1900$ $p<0,0001$ - Fêmeas). Pode ser constatado o efeito transgeracional em CCE e NSF, onde a exposição da mãe ao enriquecimento influenciou o comportamento dos filhotes que não foram diretamente expostos ao ambiente enriquecido. Todos os resultados dos modelos comportamentais valem para machos e fêmeas e não há diferenças em relação ao gênero. Os parâmetros neuroendócrinos analisados não mostraram diferença significativa entre os grupos. Sugere-se então que o efeito transgeracional se deu apenas pela exposição das mães ao ambiente enriquecido no período perinatal e manifestou-se comportamentalmente.

Palavras-chave: Ansiedade, Enriquecimento Ambiental, Efeito Transgeracional.

ABSTRACT

JOBIM, Camila Mendonça Netto. **Perinatal environmental enrichment effects in anxiety like behaviors in females offspring**. 2016. 74p Tese (PhD in Physiological Science). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Anxiety is one of the most common psychiatric disorder in society. This disorders may occur as a result of an individual's inability to face a stress event (physical or emotional), which can happen in youth or adulthood. The exposure to stressors during the perinatal period can cause consequences for life. Thus environmental enrichment is used either as preventive or attenuating stressor events. The aim of this study was to evaluate the behavioural response related to anxiety on the offspring of females mice raised in an enriched environment during their perinatal period. Experimentally was created male and female groups during tree generation (F0, F1 and F2). Animals was raised in standard environment (P) and enriched environment (E) in F0. In the next generation (F1), females that was born in E was placed to P and composed the E-P group. Therefore, in F2 we had the P, E-P and E group. This group had their maternal behavior observed, submitted to behavioral models, plasmatic corticosterone assayed as well the expression of the AVP1a, AVP1b, CRH1, CRH2 and OT receptors. As results, we verify that the enriched environment only in F0 changed the maternal behavior ($46,8\pm 8,9\%$ P; $77,8\pm 5,4\%$ E; $p=0,0138$). The anxiolytic effect was noted in all the models applied. In elevated plus maze it was observed in E group during all the generation. Only in F2, the E group showed anxiolytic effect in open field test. On light-dark box, the E-P and E group was different of P in latency to explore the light part in F1 and F2. The last generation, F2, was tested and showed a different latency to eat the pellet in novelty suppressed feeding test. The E group had the shortest time to eat the pellet, followed by E-P and P had the biggest ($147,7\pm 15,7s$; $101,4\pm 8,8s$; $62,8\pm 9,4s$; $F=13,0700$ $p=0,0001$ - male) ($143,7\pm 11,4s$; $93,7\pm 20,4s$; $38,3\pm 5,3s$; $F=16,1900$ $p<0,0001$ - female). The transgeracional effect could be visualized in light-dark box and novelty suppressed feeding tests because the E-P group had their behavior similar to E even that had not been directly exposed to the enriched environment. There is no difference between sexes in results of the models. The neuroendocrine analyzes there no significate result. Then, we suggest that transgenerational effect is due to exposure of the dams to the environmental enrichment during perinatal period.

Key words: Anxiety, Environmental Enrichment, Transgenerational Effect.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema da atuação do eixo simpático-adrenal-medular (SAM) e hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) na resposta ao estresse. Adaptado de Zuardi em <http://rnp.fmrp.usp.br/~psicmed/doc/Fisiologia%20do%20estresse.pdf> (acessado em 10/01/16),.....17
- Figura 2: Esquema da sequência dos eventos para a liberação de ACTH para a circulação. Adaptado de Brunton e Russell (2008).....18
- Figura 3: Esquema da formação dos grupos experimentais e gerações. Nos quadros brancos estão mostrados os testes comportamentais a que foram expostos os grupos. CM= Observação do Comportamento Materno; CA = Campo Aberto; LCE= Labirinto em Cruz Elevado; CCE= Caixa Claro-Escuro; e NSF = “Novelty Supressed Feeding”- Supressão da alimentação pela novidade.28
- Figura 4: Comparação entre as caixas do grupo enriquecido (E) à esquerda e padrão (P) à direita. A- Visão lateral das caixas; e B- visão frontal superior.30
- Figura 5: Caixa com os itens de enriquecimento ambiental. A- Esquema ilustrando os itens e a sua disposição na caixa; e B- Foto real da caixa.30
- Figura 6: Caixas colocadas na estante com o sistema de câmeras de segurança montado para que cada câmera focalizasse uma caixa e as filmagens fossem feitas de forma sequencial e ininterrupta.32
- Figura 7: Comportamento materno- presença no ninho. A- Registro de FN (mãe fora do ninho); B- Registro de NN (mãe no ninho).....33
- Figura 8: Comportamento materno – cuidado. A- Registro de NNC (mãe no ninho exibindo comportamento materno); e B- registro de NNS (mãe no ninho não exibindo comportamento materno).....33
- Figura 9: Registros de comportamento materno. A- Lambadura (grooming); B- Amamentação em dorso arqueado; C- Amamentação passiva; e D- Amamentação cobertor.34
- Figura 10: Aparato de teste Labirinto em Cruz Elevado. A- Visão diagonal do aparato, dando destaque aos braços fechados por paredes transparentes e os braços abertos são paredes laterais configurando um espaço aversivo aos animais. B- Camundongo explorando o aparato durante o teste.....35
- Figura 11: Aparato do teste Campo Aberto mostrando as delimitações de quadrantes. Os quadrantes próximos às paredes de acrílico são os considerados quadrantes da periferia e o quadrante do meio, quadrante central. A- Visão frontal do aparato com um animal em teste; e B- visão superior do aparato.36
- Figura 12: Aparato do teste da Caixa Claro-Escuro. A- Visão superior dos compartimentos claro e escuro, com a tampa da caixa aberta após a seção de filmagem; e B- Compartimento claro, com seus quadrantes e na parede o orifício de transição entre os ambientes.37

Figura 13: Arenas do teste de Supressão da Alimentação pela Novidade. No centro das arenas estão posicionados os pellets de ração sobre a plataforma elevada forrada com papel. Abaixo das caixas a identificação do grupo experimental: P- padrão, E+P- Enriquecimento-Padrão e E- Enriquecimento.....	38
Figura 14: Cronograma dos modelos comportamentais	38
Figura 15: Comparação da frequência relativa dos registros de comportamento materno entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) nas fêmeas F0, mães de F1. [A] NN- no ninho $p=0,5947$ e [B] NNC- no ninho com cuidado $P=0,0138$. *Diferença significativa em relação ao grupo P.....	41
Figura 16: Comparação da frequência relativa dos registros de comportamento materno entre os grupos padrão (P), enriquecimento – padrão (E-P) e enriquecimento (E) nas fêmeas F1, mães de F2. [A] NN- no ninho $F=4,065$ $p=0,0425$ $p=0,0140$ e [B] NNC- no ninho com cuidado $F=0,8120$ e $p=0,4689$. * Diferença significativa em relação ao grupo P	42
Figura 17: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevado entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) das fêmeas F0. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($p=0,0347$); [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($p=0,1690$). *Diferença significativa em relação ao grupo P	43
Figura 18: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevada a entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) dos machos de 28 dias de F1. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($p=0,0305$); [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($p=0,0425$); [C] Número total de estiramentos-SAP ($p=0,0153$). *Diferença significativa em relação ao grupo P	44
Figura 19: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevada a entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) dos machos de 60 dias de F1. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($p=0,2162$); [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($p=0,0465$). *Diferença significativa em relação ao grupo P	45
Figura 20: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevada a entre os grupos padrão (P), enriquecimento-padrão (E-P) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias F1, mães de F2. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($F=4,921$ e $p=0,0325$); [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($F=4,247$ e $p=0,0381$). *Diferença significativa em relação ao grupo P.....	45
Figura 21: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevada a entre os grupos padrão (P), enriquecimento-padrão (E-P) e enriquecimento (E) dos machos de 60 dias F2. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($F=15,88$ e $p<0,0001$); [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($F=22,64$ e $p<0,0001$); [C] estiramentos-SAP ($F=5,341$ e $p=0,0106$). *Diferença significativa em relação ao grupo P. #Diferença significativa em relação ao grupo E-P.	46
Figura 22: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevada a entre os grupos padrão (P), enriquecimento-padrão (E-P) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias F2. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($F=4,161$ e $p=0,0317$)	

e [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($F=13,28$ e $p=0,0003$).
*Diferença significativa em relação ao grupo P. #Diferença significativa em relação ao grupo E-P.47

Figura 23: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de campo aberto entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) das fêmeas F0. [A] Velocidade média ($p=0,7926$); [B] Distância total percorrida ($p=0,3991$); e [C] Porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($p=0,6982$).48

Figura 24: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de campo aberto entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) dos machos de 28 dias de F1. [A] Velocidade média ($p=0,5972$); [B] Distância total percorrida ($p=0,6266$); e [C] Porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($p=0,2762$).49

Figura 25: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de campo aberto entre os grupos padrão (P), enriquecimento – padrão (E-P) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias de F1, mães de F2. [A] Velocidade média ($F=1,172$ e $p=0,3403$); [B] Distância total percorrida ($F=1,168$ e $p=0,3415$); [C] Porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($F=0,7663$ e $p=0,4846$); e [D] Quantidade de bolos fecais encontrados no aparato após o teste ($F=0,2149$ e $p=0,8094$).50

Figura 26: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de campo aberto entre os grupos padrão (P), enriquecimento – padrão (E-P) e enriquecimento (E) dos machos de 60 dias de F2. [A] Velocidade média ($F=0,4264$ e $p=0,6570$); [B] Distância total percorrida ($F=0,3732$ e $p=0,6919$); [C] Porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($F=3,781$ e $p=0,0352$ - Comparações P vs E-P $p=0,8939$; P vs E $p=0,0216$; E-P vs E $p=0,0230$). *Diferença significativa em relação ao grupo P. #Diferença significativa em relação ao grupo E-P. 51

Figura 27: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de campo aberto entre os grupos padrão (P), enriquecimento – padrão (E-P) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias de F2. [A] Velocidade média ($F=0,8879$ e $p=0,4264$); [B] Distância total percorrida ($F=0,6683$ e $p=0,5232$); e [C] Porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($F=4,577$ e $p=0,0224$ - Comparações P vs E-P $p=0,5556$; P vs E $p=0,0092$; E-P vs E $p=0,0339$). *Diferença significativa em relação ao grupo P. #Diferença significativa em relação ao grupo E-P. 52

Figura 28: Comparação dos parâmetros utilizados para a análise do teste da caixa claro-escuro entre os grupos padrão (P), e enriquecimento (E) dos machos de 28 dias de F1. [A] Tempo de latência para explorar a parte clara do aparato de teste ($p=0,0173$); [B] Número de transições entre os ambientes da caixa teste ($p=0,4957$); e [C] Frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa ($p=0,0932$). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P.53

Figura 29: Comparação dos parâmetros utilizados para a análise do teste da caixa claro-escuro entre os grupos padrão (P), e enriquecimento (E) dos machos de 60 dias de F1. [A] Tempo de latência para explorar a parte clara do aparato de teste ($p=0,0034$); [B] Número de transições entre os ambientes da caixa teste ($p=0,2643$); e [C] Frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa ($p=0,8583$). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P.54

Figura 30: Comparação dos parâmetros utilizados para a análise do teste da caixa claro-escuro entre os grupos padrão (P), enriquecido – padrão (P-E) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias de F1, mães de F2. [A] Tempo de latência para explorar a parte clara do aparato de teste (F=5,142 e p=0,0226 - Comparações P vs E-P p=0,0330; P vs E p=0,0106; E-P vs E p=0,4102); [B] Número de transições entre os ambientes da caixa teste (F=0,1728 e p=0,8432); e [C] Frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa (F=1,883 e p=0,1913). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P.55

Figura 31: Comparação dos parâmetros utilizados para a análise do teste da caixa claro-escuro entre os grupos padrão (P), enriquecido – padrão (P-E) e enriquecimento (E) dos machos de 60 dias de F2. [A] Tempo de latência para explorar a parte clara do aparato de teste (F=7,031 e p=0,0036 - Comparações P vs E-P p=0,0152; P vs E p=0,0010; E-P vs E p=0,2212); [B] Número de transições entre os ambientes da caixa teste (F=1,111 e p=0,3428); e [C] Frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa (F=2,410 e p=0,1076). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P.56

Figura 32: Comparação dos parâmetros utilizados para a análise do teste da caixa claro-escuro entre os grupos padrão (P), enriquecido – padrão (P-E) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias de F2. [A] Tempo de latência para explorar a parte clara do aparato de teste (F=4,825 e p=0,0219 - Comparações P vs E-P p=0,0196; P vs E p=0,0111; E-P vs E p=0,7785); [B] Número de transições entre os ambientes da caixa teste (F=5,211 e p=0,0151 - Comparações P vs E-P p=0,0113; P vs E p=0,0118; E-P vs E p=0,9109); e [C] Frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa (F=1,881 e p=0,1798). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P.....57

Figura 33: Comparação dos parâmetros analisados no teste de supressão da alimentação pela novidade entre os grupos padrão (P), enriquecimento-padrão (E-P) e enriquecimento (E) nos machos de F2. [A] Tempo em segundos para se alimentar do pellet de comida no centro da caixa teste (ANOVA F=13,07 e p=0,0001 – Comparações P vs E-P p=0,0085; P vs E p<0,0001; E-P vs E p=0,0251); [B] Porcentagem de perda de peso dos animais submetidos ao teste (F=0,0956 e p=0,9091); [C] Diferença de peso dos pellets de ração colocados na caixa teste antes e depois do teste (F=0,6111 e p=0,5496); e [D] Diferença de peso dos pellets de ração fornecidos aos animais ao final do teste (F=0,0668 e p=0,9355). * Diferença significativa em relação ao grupo P. # Diferença significativa em relação ao grupo E-P.58

Figura 34: Comparação dos parâmetros analisados no teste de supressão da alimentação pela novidade entre os grupos padrão (P), enriquecimento-padrão (E-P) e enriquecimento (E) nas fêmeas de F2. [A] Tempo em segundos para se alimentar do pellet de comida no centro da caixa teste (ANOVA F=16,19 e p<0,0001 – Comparações P vs E-P p=0,174; P vs E p<0,0001; E-P vs E p=0,0076); [B] Porcentagem de perda de peso dos animais submetidos ao teste (F=1,361 e p=0,2782); [C] Diferença de peso dos pellets de ração colocados na caixa teste antes e depois do teste (F=1,057 e p=0,3652); e [D] Diferença de peso dos pellets de ração fornecidos aos animais ao final do teste (F=1,928 e p=0,1704). * Diferença significativa em relação ao grupo P. # Diferença significativa em relação ao grupo E-P.....59

Figura 35: Comparação da concentração de corticosterona presente no plasma sanguíneo dos machos de 28 dias dos grupos padrão (P) e enriquecido (E) (p=0,6839).....60

Figura 36: Comparação da concentração de corticosterona presente no plasma sanguíneo dos machos de 60 dias dos grupos padrão (P), enriquecido-padrão (E-P) e enriquecido (E). [A]

Machos de 60 dias que passaram pelos testes ($F=2,541$ e $p=0,0998$); e [B] Machos de 60 dias limpos - que não passaram pelos testes ($F=0,3920$ e $p=0,06813$).60

Figura 37: Valores dos níveis de mRNA em quantificação relativa pelo método de RT-PCR. [A] Comparação da expressão de mRNA de CRH1 entre os grupos padrão (P) e enriquecido (E) ($p=0,5135$); e [B] Comparação da expressão de mRNA de CRH2 entre os grupos padrão (P) e enriquecido (E) ($p=0,5033$).61

Figura 38: Valores dos níveis de mRNA em quantificação relativa pelo método de RT-PCR. [A] Comparação da expressão de mRNA de V1aR entre os grupos padrão (P) e enriquecido (E) ($p=0,5614$); e [B] Comparação da expressão de mRNA de V1bR entre os grupos padrão (P) e enriquecido (E) ($p=0,4397$).61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de animais em cada grupo por cada geração e o total de animais utilizados ao longo de todo o experimento. Em F2 os animais não expostos são aqueles que não passaram por testes comportamentais de acordo com o descrito nos tópicos da descrição dos grupos. 28

LISTAS DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

ACTH	Adrenocorticotropic Hormone (Hormônio Adrenocorticotrófico)
AVP	Arginine Vasopressina (Vasopressina Arginina)
CA	Campo Aberto
CCE	Caixa Claro-Escuro
CM	Comportamento Materno
CONCEA	Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal
CRH	Corticotropin Releasing Hormone (Hormônio Liberador De Corticotrofinas)
CT	Cycle Threshold (Ciclo Limiar)
D0PN	Dia 0 Pós-Natal
D1PN	Dia 1 Pós-Natal
D21PN	Dia 21 Pós-Natal
D28PN	Dia 28 Pós-Natal
D60PN	Dia 60 Pós-Natal
D7PN	Dia 7 Pós-Natal
DataSUS	Sistema De Dados Online Do Ministério Da Saúde
DNA	cido Desoxirribonucleico
DSM	Manual Diagnóstico E Estatístico De Transtornos
E	Grupo Experimental Enriquecimento
EP	Grupo Experimental Enriquecimento-Padrão
FN	Mãe Fora Do Ninho
HHA	Eixo Hiptalamo-Hipófise-Adrenal
LCE	Labirinto Em Cruz Elevado
LTP	Long Time Potenciation (Mecanismo De Potenciação De Longa Duração)
NN	Mãe Em Cima Do Ninho
NNC	No Ninho Com Cuidado Materno
NNS	No Ninho Sem Cuidado Materno
NSF	Novelty Supressed Feeding (Supressão Da Alimentação Pela Novidade)
OTR	Receptor De Ocitocina
P	Grupo Experimental Padrão
PVC	Polyvinyl Chlorid (Policloreto De Vinil)
PVN	Paraventricular Nucleus (Núcleo Paraventricular Do Hiptalamo)
RNA	cido Ribonucleico
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain (Reação Em Cadeia Da Polimerase Em Tempo Real)
SAM	Eixo Simpático-Adrenal-Medular
SAP	Stretched Attend Posture (Estiramentos)
UcnI	Urocortina I
UcnII	Urocortina II
UcnIII	Urocortina III

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Ansiedade.....	16
1.2	Enriquecimento Ambiental	19
1.3	Período Perinatal e Comportamento Materno.....	21
1.4	Epigenética e efeito transgeracional	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral.....	26
3.2	Objetivos Específicos.....	26
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	Animais	27
4.2	Grupos Experimentais.....	27
4.3	Modelos Comportamentais	31
4.4	Parâmetros neuroendócrinos	38
4.5	Análise dos vídeos	39
4.6	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS	41
5.1	Modelos comportamentais	41
5.2	Parâmetros neuroendócrinos	59
6	DISCUSSÃO	62
6.1	Modelos comportamentais	62
6.2	Parâmetros neuroendócrinos	64
7	CONCLUSÕES.....	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ansiedade

Os transtornos de ansiedade estão entre as doenças psiquiátricas mais comumente encontradas na população (SAYERS, 2001). Em humanos, a ansiedade é percebida como um sentimento desagradável, caracterizado por um estado de alerta tenso e fisicamente exaustivo, com foco em um iminente e inevitável, embora não objetivamente aparente, perigo ou emergência juntamente com uma dolorosa consciência de incerteza sobre a possibilidade de resolver a situação (MARTIM, 1998). Em alguns casos, a ansiedade e o medo tem seus estados sobrepostos, porém o medo é mais frequentemente associado com picos de excitação autonômica necessárias para lutar ou fugir, pensamentos de perigo imediato, e comportamentos de fuga. Já a ansiedade está mais frequentemente associada com a tensão muscular e vigilância em preparação para perigo futuro e comportamentos de cautela ou esquiva.

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM (American Psychiatric Association, 2013), classifica os vários tipos de ansiedade patológicas como: transtorno de ansiedade de separação; mutismo seletivo; fobia específica; transtorno de ansiedade social (fobia social); transtorno de pânico; especificador de ataque de pânico; agorafobia; transtorno de ansiedade generalizada; transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento; transtorno de ansiedade devido a outra condição médica; outro transtorno de ansiedade especificado e transtorno de ansiedade não especificado. Esta classificação adota critérios operacionais ao invés de critérios subjetivos e baseia-se em observações de que síndromes específicas têm diferentes cursos naturais, histórias familiares e diferentes respostas aos tratamentos (BRANDÃO, 2005).

Baseado em estudos utilizando animais, apoiado pela abordagem eto-experimental desenvolvida por BLANCHARD; BLANCHARD (1988), GRAEFF (2007) define ansiedade como a emoção relacionada ao comportamento de avaliação de risco que é evocado em situações em que o perigo é incerto (ameaça potencial), seja porque o contexto é novo ou porque o estímulo do perigo esteve presente no passado, mas não está mais no meio ambiente. GRAY; MCNAUGHTON (2000) enfatizam que para que ocorra a ansiedade, é necessário um impulso para se aproximar do estímulo de perigo, gerando um conflito entre aproximação e evitação.

A psicologia demonstrou que certos tipos de perturbações mentais e comportamentais, como as das emoções intrínsecas a ansiedade, podem ocorrer em consequência da incapacidade de se fazer face adaptativamente a um acontecimento vital gerador de estresse (SAYERS, 2001). O estresse é parte da vida de todos os animais e não necessariamente é prejudicial; qualquer estímulo externo que ameace a homeostase pode ser considerado estressante (MOBERG; MENCH, 2000). O estresse passa a se tornar prejudicial a partir do momento que o indivíduo fica impossibilitado de retomar a sua homeostase. Isto acontece de acordo com a intensidade e a duração do fator estressante desencadeando respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais (KVETNANSKY; SABBAN; PALKOVITS, 2009).

Os principais sistemas responsáveis por manter ou restaurar a homeostase durante o estresse são os eixos simpático-adrenal-medular (SAM) e hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (

Figura 1). O SAM é o eixo de ativação via sistema nervoso autônomo simpático, que possui como resposta final a liberação rápida de catecolaminas. Já o HHA tem o hipotálamo e a hipófise como estruturas integrantes do sistema nervoso central e atuam na liberação de cortisol (ou corticosterona em roedores) pelo córtex da adrenal.

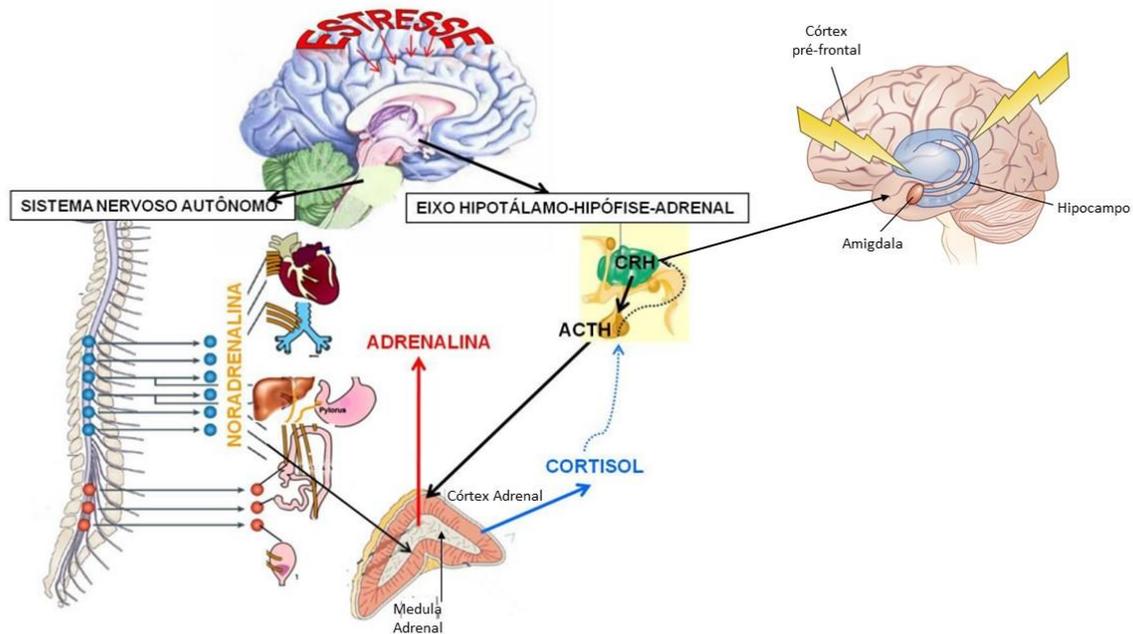


Figura 1: Esquema da atuação do eixo simpático-adrenal-medular (SAM) e hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) na resposta ao estresse. Adaptado de Zuardi em <http://nmp.fmrp.usp.br/~psicmed/doc/Fisiologia%20do%20estresse.pdf> (acessado em 10/01/16),

A exposição a estressores resulta na ativação de neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermediolateral que se projetam para os gânglios pré ou paravertebral que por sua vez se projetam para os órgãos efetores e células cromafins da medula da adrenal (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Esta ativação simpática representa a clássica resposta de “luta ou fuga” que geralmente aumenta os níveis circulantes de catecolaminas. A adrenalina, secretada principalmente pela medula da adrenal, e a noradrenalina, secretada principalmente de neurônios simpáticos, que dentre outros efeitos, induzem o aumento da frequência e força de contração cardíaca, vasoconstrição periférica e mobilização energética. O tônus do sistema parassimpático também pode ser modulado durante o estresse. Neste sistema, a ativação do núcleo pré-ganglionar craniosacral ativa o núcleo pós-ganglionar localizado nos órgãos efetores ou próximos a eles, e suas ações geralmente são opostas as do sistema simpático.

A resposta ao estresse via HHA, se dá através da secreção do hormônio liberador de corticotrofinas (CRH – do inglês *corticotropin releasing hormone*) e vasopressina arginina (AVP – do inglês *arginine vasopressin*) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN- do inglês *paraventricular nucleus*) para a circulação porta da eminência medial (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Estes hormônios estimulam os neurônios neurosecretores parvocelulares induzindo os corticotrofos da hipófise anterior a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH – do inglês *adrenocorticotrop hormone*) para a circulação, como mostrado na Figura 2.

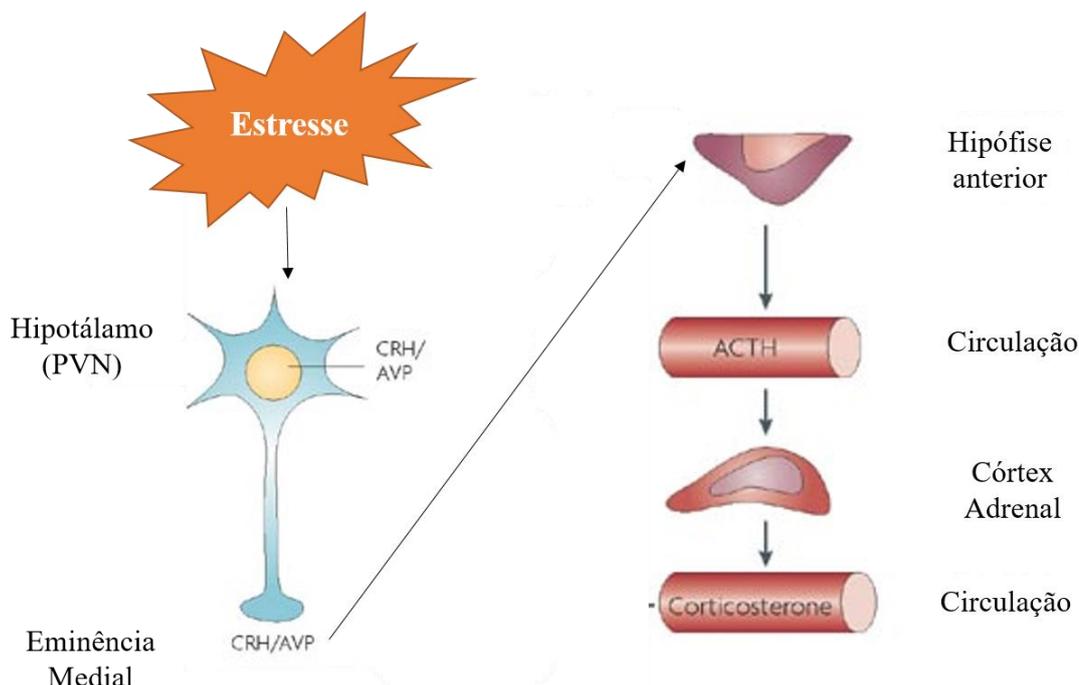


Figura 2: Esquema da sequência dos eventos para a liberação de ACTH para a circulação. Adaptado de BRUNTON; RUSSELL (2008).

A sensibilização da glândula adrenal pelo ACTH resulta na liberação de corticosterona pela zona fasciculata do córtex da adrenal facilitando desta forma as respostas características dos efeitos celular e metabólicos do estresse (WEISER; OSTERLUND; SPENCER, 2011). Contudo, o núcleo paraventricular também facilita a liberação direta de corticosterona (cortisol) através do eixo hipotálamo-medula-adrenal via inervação adrenocortical pelos neurônios pré-ganglionares da coluna intermediolateral da medula e indiretamente através de uma via alternativa envolvendo a liberação de prolactina (JAROENPORN et al., 2009).

De forma geral, a retroalimentação da liberação de CRH e AVP pelo hipotálamo acontece através da própria liberação destes hormônios e da ação dos glicocorticoides nos corticotrofos da hipófise e da sensibilização dos neurônios parvocelulares do hipotálamo. Outro ponto importante de controle feedback acontece através dos neurônios responsivos a glicocorticoides do hipocampo que se projetam para o hipotálamo. Estes neurônios afetam a atividade hipofisiotrófica dos neurônios de CRH e determinam a forma como a hipófise será responsiva aos glicocorticoides (SAPOLSKY; KREY; MCEWEN, 1986).

Enquanto componentes físicos estressores ativam diretamente o eixo HHA, estressores psicológicos requerem um processamento sensorial maior envolvendo estruturas do sistema límbico levando a uma regulação indireta do eixo HHA (HERMAN; CULLINAN, 1997). Estruturas do sistema límbico, tais como o córtex pré-frontal, insular e cingulado; amígdala; substância nigra; substância cinzenta periaquedutal; *locus ceruleus*; núcleo do trato solitário e núcleo parabraquial recebem projeções de neurônios de CRH originários do núcleo paraventricular do hipotálamo (LOW, 2011).

Nos mamíferos, a família do CRH inclui também a Urocortina I (UcnI), UcnII e UcnIII, assim como seus receptores CRH1 e CRH2 e o CRH ligado a proteína. Os membros desta família diferem em relação a sua distribuição nos tecidos e farmacologia e possuem um importante papel na regulação das respostas endócrinas e comportamentais ao estresse. BALE; VALE (2004) sugerem que enquanto o CRH aparenta ter um papel estimulante na responsividade ao estresse através da ativação do receptor CRH1, a UcnII e UcnIII possuem ação específica no receptor CRH2 balanceando a sensibilidade ao estresse. Para estes autores a

regulação da contribuição dos dois receptores, CRH1 e CRH2, na via de CRH no cérebro pode ser essencial na coordenação das respostas fisiológicas ao estresse.

No hipotálamo, a vasopressina (AVP) interage com o CRH promovendo a liberação de ACTH em resposta ao estresse. O aumento de sua produção fora do hipotálamo pode ser um importante fator que contribui para o processo de habituação neuroendócrina (GRAY; INNALA; VIAU, 2014). Na amígdala, sua ação excitatória pode contribuir para a resposta comportamental ao estresse (JOËLS; BARAM, 2009). Existem quatro tipos receptores ligados a proteínas G que podem ser ativados pela AVP: o V1a, o V1b, o V2 e o receptor de ocitocina (OTR). Sugere-se que os receptores V1a e OTR sejam os principais responsáveis pelas funções centrais de AVP e que V1b esteja relacionado a mediação da liberação de CRH e a termorregulação (HERNANDO et al., 2001).

Uma vez ativado o eixo HHA, a secreção de glicocorticoides auxilia os efeitos metabólicos e cardiovasculares da ativação simpática através da gliconeogênese a partir de aminoácidos e do aumento do armazenamento de glicogênio no fígado. Desta forma provendo o organismo de fontes de energia rapidamente mobilizáveis, além de facilitar a reação dos vasos sanguíneos à adrenalina e noradrenalina, aumentando ainda mais sua ação constritora. Para SQUIRES (2004) este hormônio tem função catabólica e mobiliza reservas energéticas para que o animal lide com as condições adversas.

Exposições crônicas ou prolongadas a estressores fazem com que os níveis circulantes dos hormônios liberados pelas glândulas periféricas (insulina, andrógenos e estrógenos) em resposta aos fatores hipofisários sejam diminuídos com exceção do cortisol/corticosterona. Desta forma não permitem a retomada da homeostase comprometendo o aporte energético e o metabolismo de proteínas e gorduras (PREISER et al. 2014), resultando em uma possível diminuição da atividade tireoidiana, do crescimento corporal e atividade reprodutiva. Assim como diminui a resistência a infecções em função de sua ação imunossupressora e anti-inflamatória, retarda também a formação do tecido cicatricial em feridas, além de aumentar a predisposição a úlcera gástrica e duodenal, além disso, o estresse persistente reduz a secreção de hormônio somatotrópico (BRANDÃO, 1995).

Por causa das consequências patológicas do estresse prolongado, dá-se atenção às respostas individuais nos padrões de secreção hormonal. Para HONESS; MARIN (2006) machos e fêmeas da mesma espécie possuem mecanismos diferentes para lidar com o estresse de forma que tal diferença auxilia no aumento do sucesso reprodutivo. Estudos com animais cativos têm mostrado que o estresse pode suprimir a libido, a secreção de testosterona e a espermatogênese em machos e, nas fêmeas, pode alterar a função ovariana, o desenvolvimento embrionário e a sobrevivência dos filhotes (BAHR et al., 2000).

1.2 Enriquecimento Ambiental

A fim de minimizar as respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse, o Enriquecimento Ambiental é um processo que cria um ambiente interativo e complexo permitindo ao animal, mantido em cativeiro apresentar um comportamento natural para a espécie (CARLSTEAD; SHEPHERDSON, 1994). Desta forma, busca melhorar a qualidade do cuidado a animais cativos pelo uso de estímulos ambientais necessários para o bem-estar psicológico e fisiológico, adequar o manejo a padrões éticos aceitáveis e incrementar a taxa reprodutiva (BOERE, 2001). De acordo com o conceito de melhoria do ambiente proposto por BUCHANAN-SMITH et al. (2005), a melhoria das condições de vida de um animal em cativeiro deve significar não apenas a diminuição de dor, estresse e outros eventos aversivos, mas também a constante procura em maximizar o bem-estar.

O uso do enriquecimento ambiental pode abranger vários métodos para a melhoria nas condições adversas da vida em cativeiro onde são utilizadas uma variedade de técnicas

originais, criativas e engenhosas que visam manter os animais ocupados através do oferecimento de oportunidades comportamentais e de ambientes mais estimulantes (SHEPHERDSON, 1998). BLOOMSMITH; BRENT; SCHAPIRO (1991) identificaram cinco principais tipos de enriquecimento: social, ocupacional, físico, sensorial e alimentar. O enriquecimento social visa a adequação do ambiente em relação as relações intra e interespecíficas dos animais cativos. O ocupacional disponibiliza aparatos que estimulam habilidades físicas e/ou cognitivas, como rodas de atividades e quebra-cabeças. Quando o ambiente onde o animal vive tem um aumento de tamanho ou adição de objetos que aumente os espaços utilizáveis e permitam o controle deste local, é dado o nome de enriquecimento ambiental do tipo físico. O enriquecimento sensorial é feito através da inserção de estímulos sensoriais aos animais respeitando o tipo de órgão sensorial e as pistas naturais que este animal se utiliza para explorar o ambiente. Já o enriquecimento alimentar visa a variação na forma, periodicidade, tipo e meios de obtenção do alimento aumentando o comportamento natural de forrageio dos animais.

Apesar de o enfoque inicial ser o bem-estar animal, o enriquecimento ambiental tem se mostrado uma excelente ferramenta para o estudo de alterações cerebrais dependentes da experiência (FOSTER; DUMAS, 2001; ICKES et al. 2000; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). Dentre os efeitos demonstrados estão a melhoria de aspectos cognitivos, como aprendizado e memória, a redução da ansiedade e a facilidade de recuperação frente a lesões cerebrais (FOX; MERALI; HARRISON, 2006).

BRENES SAENZ; VILLAGRA; FORNAGUERA TRIAS (2006) demonstraram um efeito antidepressivo e ansiolítico do enriquecimento ambiental em ratos e sugerem que a estimulação nos primeiros estágios de desenvolvimento pode desempenhar um papel protetor no comportamento e desenvolvimento do encéfalo. Neste sentido, estudos que utilizaram o enriquecimento ambiental após o nascimento e durante o desenvolvimento demonstraram menores índices de ansiedade e emocionalidade em ratos e camundongos submetidos a diferentes modelos comportamentais (CHAPILLON et. al, 1999; ROY et al. 2001, ROY et al, 2007). ASHOKAN; HEGDE; MITRA (2016) observaram a exposição ao enriquecimento ambiental por curtos períodos pode favorecer a resiliência contra efeitos mal adaptativos do estresse nos mediadores hormonais, neuronais e moleculares da ansiogênese.

Outros estudos que investigaram os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento de ratos adultos demonstraram que a técnica melhora o aprendizado em condições basais, e atenua os efeitos do estresse agudo (choque inescapável) sobre o aprendizado em relação aos animais mantidos em condições padrão que apresentaram piora sensível no aprendizado (LARSSON; WINBLAD; MOHAMMED, 2002). Além disso, foi mostrado uma reversão do efeito deletério na interação social (play behavior) de ratos que sofreram estresse no período pré-natal (MORLEY-FLETCHER, 2003). ARAI et al. (2009) demonstraram também que a exposição de camundongos jovens ao enriquecimento ambiental durante duas semanas induziu uma melhora no mecanismo de Potenciação de Longa Duração (LTP em inglês), associado à memória e aprendizado, representando uma melhoria duradoura nas transmissões sinápticas.

Apesar de exaustivos estudos, as ações sobre o eixo HHA ainda são objeto de discussão. WELBERG; THRIVIKRAMAN; PLOTSKY (2006) demonstraram que o enriquecimento ambiental moderado em ratos durante a prenhez e a lactação influencia a resposta do eixo HHA dos filhotes ao estresse quando submetidos a um estressor agudo (induzido pela compressão leve de ar sobre a face) após serem submetidos a um estressor constante (luz constante durante 4 dias consecutivos) e mostraram um aumento da concentração de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) apenas nas fêmeas. Em relação à corticosterona, alguns trabalhos demonstraram aumento basal deste hormônio em ratos e camundongos submetidos ao enriquecimento (MONCEK et al. 2004; HAEMISCH; VOSS; GARTNER, 1994; MARASHI

et al., 2003) enquanto outros não encontraram diferenças significativas (SCHRIJVER et al., 2002; PHAM et al., 1999).

Yang e colaboradores (2016) encontraram efeitos benéficos do enriquecimento ambiental na vulnerabilidade a epileptogênese límbica e na ansiedade, e estes efeitos foram acompanhados da reduzida expressão gênica de CRH. A regulação do CRH também está envolvida nos efeitos do enriquecimento ambiental revertendo o quadro de depressão fenotípica de animais em abstinência alcoólica (PANG et al. 2013).

1.3 Período Perinatal e Comportamento Materno

A definição de período perinatal encontrado no sistema de dados online do Ministério da Saúde (DataSus) diz que para humanos o período perinatal começa em 22 semanas completas (154 dias) de gestação (época em que o peso de nascimento é normalmente de 500 g), e termina com sete dias completos após o nascimento. Após os sete primeiros dias de nascimento, inicia-se o período neonatal que, por definição desta mesma base de dados, compreende as quatro primeiras semanas de vida (0 a 28 dias incompletos). Denomina-se período neonatal precoce a primeira semana completa ou os sete primeiros dias de vida, e período neonatal tardio, as três semanas seguintes.

Para estudos utilizando animais de experimentação, o período perinatal é considerado o período que envolve a gestação e amamentação dos filhotes. Este é composto por 4 etapas: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e período neonatal (CASTRO, 2006). Em camundongos, a gestação tem duração de 19 a 21 dias após a fecundação e a lactação ocorre em sequência por igual período. A puberdade destes animais é atingida aos 42 dias após seu nascimento e a maturidade sexual aos 60 dias (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

O período perinatal é um período do aumento de plasticidade, especificamente do sistema de resposta ao estresse, e, portanto, se torna particularmente sensível a estressores (DARNAUDÉRY; MACCARI, 2008). Então, eventos que ocorram neste início da vida, agindo através de desregulações hormonais da mãe e/ou comportamento materno, podem alterar a trajetória da programação do eixo HHA em resposta ao estresse. Assim sendo, intervenções na relação mãe-filhote podem afetar comportamentos emocionais e respostas ao estresse na vida adulta (HUOT et al., 2004).

A saúde mental é um fator importante no desenvolvimento e pode ter seu comprometimento logo durante a infância e adolescência. Pesquisas sugerem que a saúde psicossocial da mãe pode ter um importante efeito no relacionamento mãe-filho, e isso pode gerar consequências tanto a curto quanto a longo prazo para a saúde mental dos filhos (BARLOW et al., 2003).

O comportamento materno também pode influenciar o desenvolvimento dos substratos neurais que medeiam as respostas comportamentais e endócrinas ao estresse (CALDJI *et al.*, 1998) e a comportamentos defensivos nos filhotes (CALDJI; DIORIO; MEANEY, 2003; VAN HALSSET et al., 2012). O cuidado nas primeiras fases da vida em roedores é um poderoso determinante da reatividade emocional e da reatividade aos hormônios do estresse ao longo da vida, e aumento em ambos estão associados com declínio cognitivo e tempo de vida mais curto (FRANCIS et al, 1999). O comportamento materno de boa qualidade é tido como aquele com alta frequência de comportamentos de lambedura dos filhotes e amamentação em postura arqueada (arched back nursing), e está relacionado a uma prole que explora mais ambientes novos e menos reativa emocionalmente (MEANEY et al, 1994). WEAVER et al. (2004) demonstraram que o cuidado materno de boa qualidade (versus filhotes negligenciados) é fundamental para a programação epigenética pós-natal adequada da função do eixo HHA na idade adulta.

O enriquecimento ambiental parece ser um fator de promoção do comportamento materno. CHAMPAGNE; MEANEY (2007) descreveram que independente do grau de comportamento materno das mães, o enriquecimento ambiental induz um aumento nos níveis deste comportamento possivelmente correlacionado ao aumento da expressão de receptores para ocitocina na área pré-óptica medial. Este comportamento parece possuir uma característica transmissível, visto que filhotes fêmeas de mães com alto grau de comportamento materno são mais sensíveis a indução de receptores de Ocitocina frente ao estímulo estrogênico o que refletiria em uma maior expressão do comportamento maternal (CHAMPAGNE et al., 2001). Estes estudos reforçam a ideia que o comportamento maternal também pode induzir alterações epigenéticas responsáveis pela regulação do comportamento dos filhotes e sua futura prole (MASHOODH et al., 2012; BRANCHI et al., 2011; CURLEY et al., 2009, CHAMPAGNE; MEANEY, 2007). Foi demonstrado por BAYERL; HÖNIG; BOSCH, (2016) o envolvimento dos subtipos do receptor V1 no núcleo paraventricular do hipotálamo na mediação do comportamento materno e ansiedade.

A exposição a fatores estressantes durante o período perinatal pode ter consequências para toda a vida. Os efeitos da exposição exagerada à glicocorticoides e outros hormônios esteroides em um cérebro em desenvolvimento pode causar desequilíbrio em sua formação (MCEWEN, 1992). Em revisão recente, BABENKO; KOVALCHUK; METZ, (2015) apontam que a exposição a estressores durante a gestação pode ter consequências na saúde mental tanto de mães quanto de sua prole, indicando que estas experiências *in utero* ou em períodos recentes da vida pode aumentar o risco de transtornos neurológicos e psiquiátricos possivelmente via alteração da regulação epigenética. Esta alteração através da metilação do DNA pode influenciar a programação endócrina fetal e o desenvolvimento cerebral e respostas comportamentais ao longo de gerações em resposta a experiências estressantes e fatores ambientais hostis (FRANKLIN et al., 2010).

1.4 Epigenética e efeito transgeracional

O termo epigenética foi criado por Conrad Waddington na década de 40 para descrever a premissa de que os genes podem responder a alterações ambientais e em função delas moldar o fenótipo de tal maneira que este se torne vantajoso para aquele indivíduo, ao invés de vantajoso em uma escala evolutiva muito mais duradoura (BALE, 2015). No entanto, foi somente em 1975 que Holliday & Pugh propuseram que modificações químicas covalentes no DNA, incluindo a metilação, seriam os mecanismos moleculares por trás da hipótese de Waddington (JIRTLE; SKINNER 2007). Posteriormente, WOLFFE; MATZKE (1999) redefiniram a epigenética como o estudo de mudanças funcionais na expressão genética em resposta a fatores externos as quais ocorrem por meio principalmente da metilação do DNA e da remodelação da cromatina sem que haja mudança na sequência do DNA (alterações epigenéticas). Esta definição tem sido amplamente utilizada por neurocientistas, ainda que, recentemente, uma definição mais restritiva para epigenética tenha sido proposta por BERGER et al. (2009), segundo a qual tais mudanças funcionais na expressão genética sejam necessariamente herdáveis para serem consideradas alterações epigenéticas.

O avanço dos estudos em epigenética tem comprovado ainda dois pontos importantes: primeiramente que, ao contrário do que se pensava desde que a genética mendeliana desvendou os mecanismos evolutivos previstos por Darwin em sua consagrada teoria, a informação pode fluir tanto no sentido do DNA para o fenótipo quanto no sentido inverso; e, por consequência, uma vez que as informações enviadas pelo fenótipo podem influenciar o DNA, ainda que não estruturalmente mas apenas quimicamente, determinados aspectos fenotípicos adquiridos durante a vida de um indivíduo poderiam ser transmitidas para as próximas gerações (JENSEN, 2013). Em termos evolutivos, acredita-se ainda que a seleção natural possa atuar na variação

epigenética de tal modo que se configure um novo mecanismo evolutivo, independente de mutações genéticas (CROPLEY et al., 2012). JABLONKA (2009) e RICHARDS (2006), dentre outros autores, tem sugerido que tal fato poderia ser considerado uma interpretação modificada da teoria da evolução para incorporar o chamado “neo-lamarckismo”. O neo-lamarckismo considera que uma das quatro principais proposições de Lamarck em seu livro *Philosophie Zoologique* (1809), a habilidade de transmitir para a prole características adquiridas, seria possível de ser explicada pela epigenética. No entanto, esta abordagem ainda é bastante controversa e refutada por alguns autores por uma série de motivos como o fato de ser considerada uma forma superficial de descrever a herança epigenética transgeracional, ou o fato de que a ideia de herdar características adquiridas não seria original de Lamarck e sim o “senso comum” da época (PENNY, 2015).

Em princípio, qualquer exposição a fatores ambientais, sejam eles físicos, químicos, sociais ou nutricionais, por exemplo, têm o potencial de provocar alterações epigenéticas em um organismo. Estas mudanças ocorrem por meio de uma variedade de modificações moleculares tanto no DNA quanto na cromatina, dentre as quais se destacam: a metilação do DNA (ativação ou inativação de genes através da adição de grupos metil (CH₃) à base citosina), a regulação gênica por RNA não codificadores, tais como microRNAs e mecanismos que controlam a condensação da cromatina dentro do núcleo (JIRTLE; SKINNER, 2007).

Um aspecto de extrema relevância consiste no fato de que as alterações epigenéticas podem ser reproduzidas (herdadas) por células somáticas, fornecendo um mecanismo em potencial pelo qual a atuação de fatores ambientais pode provocar consequências de longo prazo na expressão gênica. Tais alterações podem ainda ocorrer em células germinativas/gametas e, portanto, serem transmitidas e expressas pelas futuras gerações mesmo que elas não sejam expostas aos fatores ambientais que induziram originalmente as alterações – o que é definido como efeito transgeracional (SKINNER, 2011).

Para que as alterações epigenéticas ocorram em células germinativas, é necessário que a exposição do indivíduo ao fator desencadeador da alteração ocorra em um período específico do desenvolvimento: no início da gestação, coincidente com o momento em que se inicia a determinação do sexo / diferenciação gonadal do feto (SKINNER et al., 2013). Usualmente ocorre neste período uma onda de desmetilação do genoma do feto seguida por outra onda de remetilação, estando o organismo, portanto particularmente sensível a fatores externos que possam induzir a alterações epigenéticas e consequente reprogramação celular (BALE, 2015). Em linhas gerais, o processo molecular se inicia com a indução de uma alteração epigenética nas células germinativas primordiais de um feto durante sua diferenciação gonadal a qual por sua vez promove uma alteração no epigenoma da célula germinativa; a célula germinativa então transmite este epigenoma alterado para o embrião como um todo, levando todos os tecidos e tipos celulares a conter esta alteração a qual poderá ser associada na fase adulta a uma doença, por exemplo (SKINNER et al, 2015). As formas pelas quais as alterações epigenéticas são transmitidas variam ainda em função do sexo e do tipo de fator desencadeador. Uma característica (no caso, a expressão de um fenótipo decorrente de uma alteração epigenética) pode ser transmitida somente pela fêmea ou somente pelo macho; tal característica pode ainda ser herdada por apenas um dos sexos (BALE, 2015). Dentre os fatores desencadeadores, tem sido observada a indução de alterações epigenéticas e efeito transgeracional em diversos grupos (ratos, camundongos, humanos, plantas e moscas) para: exposição a componentes tóxicos (tais como pesticidas), alterações na dieta alimentar e exposição ao estresse (SKINNER et al. 2013).

Assim como qualquer outra característica de um indivíduo, o comportamento também faz parte de seu fenótipo e, portanto, pode ser influenciado por alterações epigenéticas decorrentes de estímulos/fatores ambientais (JENSEN, 2013; JABLONKA, 2009). Estudos que buscam relacionar a epigenética ao comportamento, no entanto, ainda são escassos, como demonstrou LESTER I. (2011) em uma revisão que reuniu apenas 96 trabalhos científicos.

JENSEN (2013) sustenta que é relativamente óbvio o fato de que alguns estímulos específicos – por exemplo associados ao estresse ou a agressividade – irão causar modificações transitórias na expressão de genes de áreas cerebrais relevantes; modificações estas provavelmente mediadas por uma variedade de mecanismos e possibilitando respostas fisiológicas e comportamentais adequadas a tais estímulos. E ainda, que alguns destes mecanismos certamente se enquadrariam no conceito de alterações epigenéticas, tornando consistente a relação entre comportamento animal e epigenética.

Neste sentido, MEANEY (2001) investigou as consequências de longo prazo de diferentes graus de cuidado materno em ratos e verificou que a prole de mães que exerciam mais comportamentos relacionados ao cuidado materno (nursing e grooming) demonstrou uma maior resiliência em relação a fatores estressantes. Esta maior resiliência foi explorada em estudos posteriores (WEAVER *et al.* 2004), tendo sido verificado que ela estava relacionada a alterações epigenéticas que ocorreram modificando o padrão de expressão dos genes envolvidos no sistema de resposta ao estresse e também dos genes que regulam o desenvolvimento das sinapses no hipocampo. Tais alterações persistiram na fase adulta da prole e se mostraram reversíveis quando as mães eram trocadas entre os grupos experimentais (muito e pouco cuidado materno), demonstrando que seria o cuidado materno que o filhote de fato experimenta durante a vida o fator responsável pelas alterações epigenéticas (WEAVER *et al.* 2007). Na fase adulta destes indivíduos, a resposta da corticosterona ao estresse foi, inclusive, menor naqueles que experimentaram mais cuidado materno do que nos demais (WEAVER *et al.* 2007).

O enriquecimento ambiental por sua vez também constitui fator potencialmente indutor de alterações epigenéticas e subseqüentes modificações comportamentais. Em uma revisão sobre o impacto do enriquecimento ambiental na indução da plasticidade cerebral/neuronal, BARONCELLI *et al.* (2010) reuniu evidências de que no nível molecular, o enriquecimento ambiental provoca uma mudança na expressão de um grande conjunto de genes envolvido na estrutura neuronal, na excitabilidade, na transmissão sináptica e na plasticidade, modulando a síntese e secreção de neurotrofinas no cérebro e afetando os sistemas colinérgico, serotoninérgico e noradrenérgico. CHAMPAGNE; MEANEY (2007) verificaram ainda que a exposição de camundongos jovens ao enriquecimento ambiental revertia os efeitos negativos que o contato inadequado destes camundongos com suas mães pudesse ter tido na expressão de comportamentos de cuidado por estes indivíduos.

As alterações epigenéticas provocadas pelo enriquecimento ambiental podem também ter efeito transgeracional, como demonstrado por ARAI; FEIG (2011). Estes pesquisadores compilaram diversos estudos que demonstram que a melhoria da plasticidade sináptica e da formação de memória quando induzida pelo enriquecimento ambiental seria transmitida através das gerações, podendo as alterações epigenéticas ocorrer tanto por meio de alterações em células somáticas quanto em gametas. Outro trabalho desenvolvido por KIYONO *et al.* (1985) demonstrou que a exposição de ratas grávidas a ambientes enriquecidos melhorava tanto o desempenho destas ratas no teste do labirinto quanto o desempenho de sua prole. DELLE; ROSE (1987) verificaram posteriormente que o aprendizado adquirido por ratas fêmeas em função da exposição a ambientes enriquecidos era transmitido a sua futura prole, mesmo quando o enriquecimento era aplicado antes da gestação. Os mesmos resultados foram observados também na prole de mães que viveram em ambientes enriquecidos, mas que foi criada desde o nascimento por mães que não tiveram contato com o enriquecimento (DELLE; ROSE, 1987), indicando que o efeito produzido pelo enriquecimento ambiental foi transmitido a prole antes do nascimento, presumivelmente durante a gestação.

Considerando tais informações, pretendeu-se neste trabalho avaliar a eficácia do enriquecimento ambiental em comportamentos relacionados a ansiedade da prole de mães criadas em ambiente enriquecido durante o período perinatal.

2 JUSTIFICATIVA

Sendo a ansiedade um dos mais comuns transtornos psiquiátricos que acometem a sociedade atualmente, o presente trabalho justifica-se por utilizar um modelo animal para buscar alternativas aos alvos no tratamento farmacológico. A modulação de comportamentos relacionados à ansiedade medidos através de testes comportamentais e investigações hormonal e molecular em modelo animal é uma das vias de possibilidade de tratamento. Esta modulação comportamental acontece via exposição ao enriquecimento ambiental que interfere em vias fisiológicas que poderão vir a ser foco na terapêutica.

Da mesma forma, a busca por melhorias no ambiente em que mães geram e cuidam de seus filhotes pode acarretar em efeitos positivos na modulação do comportamento e funções fisiológicas de seus descendentes. A exposição a um ambiente enriquecido eleva a qualidade do comportamento que mães direcionam a seus filhotes reduzindo e assim a ansiedade destes desde a infância até a idade adulta. De forma mais longínqua, essa exposição a um ambiente melhor afeta também de forma positiva os descendentes que não foram expostos ao ambiente enriquecido, configurando o efeito transgeracional. Sendo assim, este trabalho fornece dados que auxiliam a fomentar as informações de programas de saúde da mulher e crianças na orientação para os cuidados com gestantes e puérperas.

Também pode ser de grande valia os conhecimentos sobre a forma como a técnica foi disponibilizada aos animais. Neste caso ela pode servir inclusive como orientação de manejo para a espécie *Mus musculus* em diversos sistemas de criação. Animais que assim sejam criados não terão as interferências comportamentais e moleculares advindas de um quadro comportamental semelhante a ansiedade.

Além disso, a comparação dos resultados obtidos através da utilização da mesma técnica de enriquecimento ambiental nos diferentes gêneros fornece uma ferramenta para elucidar possíveis diferenças comportamentais e fisiológicas relacionadas à ansiedade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o papel da exposição ao enriquecimento ambiental na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade em diferentes testes comportamentais, na resposta neuroendócrina e seu efeito transgeracional.

3.2 Objetivos Específicos

- Utilizar testes comportamentais para avaliar o efeito modulador do enriquecimento ambiental no comportamento relacionado à ansiedade em camundongos;
- Analisar o comportamento materno das fêmeas (F0 e F1) durante os 7 primeiros dias após o parto e a relação com o ambiente enriquecido;
- Verificar o efeito da exposição ao enriquecimento ambiental em fêmeas (F0e F1) após o período de amamentação;
- Avaliar o papel da exposição ao enriquecimento ambiental perinatal no comportamento de filhotes machos (F1) com 28 e 60 dias;
- Avaliar o papel da exposição ao enriquecimento ambiental perinatal no comportamento de filhotes machos e fêmeas (F2) com 60 dias;
- Quantificar a resposta da corticosterona à exposição ao enriquecimento ambiental perinatal de machos das gerações F1 e F2;
- Mensurar a expressão das subunidades A e B para o receptor AVP1, os receptores 1 e 2 de CRH e o receptor de OT.
- Detectar diferença na resposta hormonal entre animais expostos aos testes comportamentais e animais não expostos;
- Averiguar o possível efeito transgeracional da exposição ao enriquecimento ambiental.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Os animais utilizados neste trabalho, camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, foram cedidos pelo Biotério de Criação de Roedores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Para a realização do experimento, foram enviados ao biotério de experimentação 16 machos e 16 fêmeas com aproximadamente 21 dias acondicionados em caixas de polipropileno medindo 41x34x16cm separados por sexo. Ao atingirem aproximadamente 60 dias, (D60PN) estes animais foram colocados em casal de acordo com o grupo experimental. Ao nascer os filhotes, os machos foram retirados e as fêmeas por lá permaneceram durante as etapas do experimento. Na formação dos grupos das gerações seguintes, foram utilizados machos dos grupos padrão para acasalarem com as fêmeas de todos os grupos. Nestes casos, foram colocadas duas fêmeas para cada macho nas caixas correspondentes aos grupos experimentais. E próximo ao nascimento dos filhotes, os machos foram retirados das caixas e eutanasiados por decapitação e as fêmeas separadas nas caixas que correspondessem ao seu grupo experimental.

No biotério experimental, todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura, umidade, ruído e ciclo claro-escuro de 12 horas em estantes ventiladas. As fêmeas permaneceram com seus filhotes até 21 dias pós-natal (D21PN), quando se deu o desmame. Em todos os casos foi feita a sexagem dos filhotes ao nascer e a ninhada foi padronizada em 8 filhotes sendo 4 ± 1 machos e a quantidade complementar de fêmeas. E após o desmame, D21PN, em outra caixa foram colocados de 3 a 4 animais do mesmo sexo e filhotes da mesma fêmea, independente da condição experimental.

Todos os animais utilizados neste experimento, inclusive os que não foram submetidos a testes comportamentais e nem tiveram materiais biológicos coletados foram eutanasiados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro através do protocolo de número COMEP- 354/2013.

4.2 Grupos Experimentais

Este trabalho avaliou comportamentalmente três gerações expostas direta ou indiretamente ao enriquecimento ambiental conforme a Figura 3

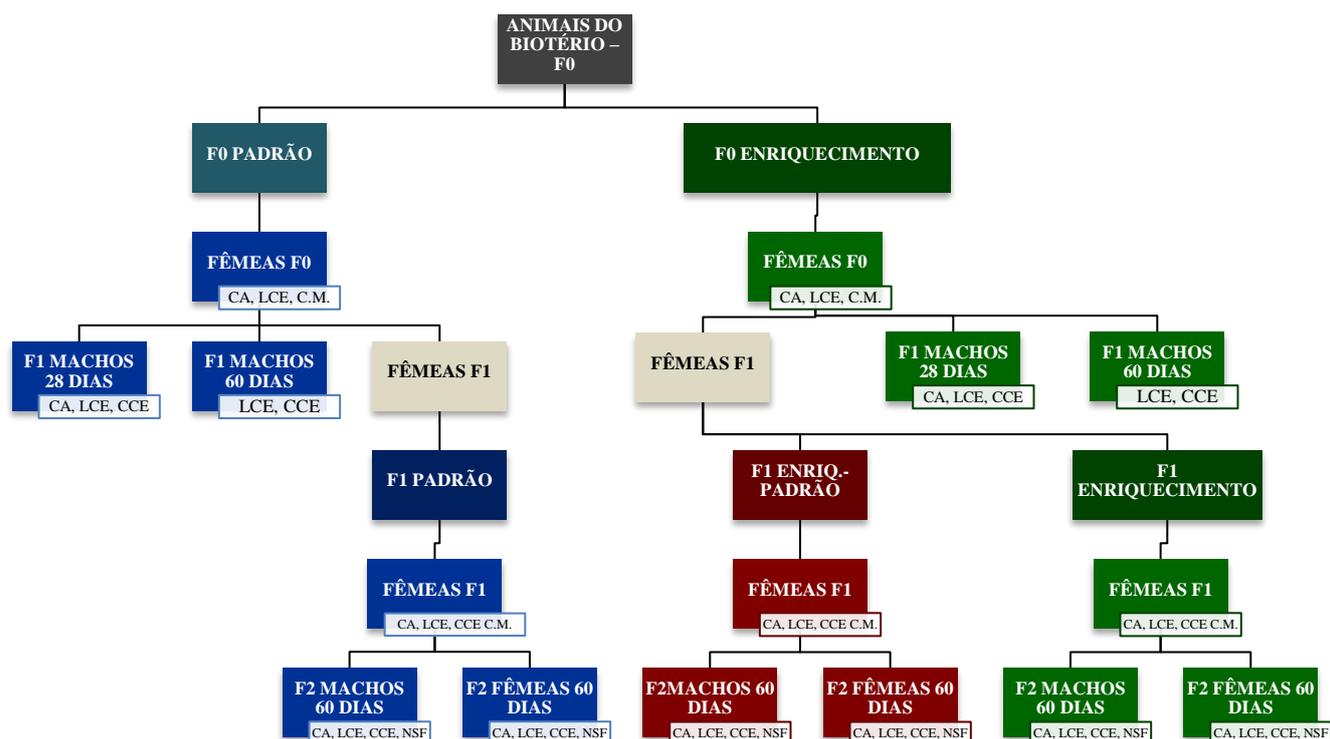


Figura 3: Esquema da formação dos grupos experimentais e gerações. Nos quadros brancos estão mostrados os testes comportamentais a que foram expostos os grupos. CM= Observação do Comportamento Materno; CA = Campo Aberto; LCE= Labirinto em Cruz Elevado; CCE= Caixa Claro-Escuro; e NSF = “Novelty Supressed Feeding”- Supressão da alimentação pela novidade.

A quantidade de animais por grupo em cada geração está apresentada na Tabela 1:
Tabela 1: Quantidade de animais em cada grupo por cada geração e o total de animais utilizados ao longo de todo o experimento. Em F2 os animais não expostos são aqueles que não passaram por testes comportamentais de acordo com o descrito nos tópicos da descrição dos grupos.

Geração	Grupo	Tamanho do Grupo
Fêmeas F0	Padrão	8
	Enriquecimento	5
F1 Machos 28 dias	Padrão	13
	Enriquecimento	12
F1 Machos 60 dias	Padrão	9
	Enriquecimento	12
Fêmeas F1	Padrão	6
	Enriquecimento - Padrão	6
	Enriquecimento	4
Machos F2 60 dias Teste	Padrão	10
	Enriquecimento - Padrão	12
	Enriquecimento	10
Machos F2 60 dias Não expostos*	Padrão	8
	Enriquecimento - Padrão	8
	Enriquecimento	8

	Padrão	8
Fêmeas F2 60 dias Teste	Enriquecimento - Padrão	8
	Enriquecimento	8
Fêmeas F2 60 dias Não expostos*	Padrão	9
	Enriquecimento - Padrão	8
	Enriquecimento	6
Total		178

4.2.1 Grupo padrão (P)

Os animais pertencentes ao grupo padrão (P), foram alojados durante toda a sua vida e em todas as gerações em caixas de policarbonato nas medidas de 30x20x13cm com água e alimento *ad libitum* e maravalha sobre o fundo (Figura 4). As três gerações analisadas possuíam o grupo padrão. Na geração F0, apenas as fêmeas foram analisadas, primeiramente tiveram seu comportamento materno avaliado e após o desmame de seus filhotes foram submetidas aos testes comportamentais. Na F1 foram analisados nos testes comportamentais indicados na Figura 3 os filhotes machos no dia 28 pós-natal (D28PN) e no dia 60 pós-natal (D60PN) e as fêmeas tiveram seu comportamento analisado da mesma forma que as fêmeas de F0. Para F2, tanto machos quanto fêmeas foram analisados nos testes comportamentais no D60PN. Nesta última geração, um grupo independente não foi exposto a testes comportamentais sendo o material biológico coletado para futura análise molecular.

4.2.2 Grupo enriquecimento (E)

O grupo Enriquecimento (E) foi uma adequação do modelo de enriquecimento ambiental proposto por MARASHI et al. (2003). Neste ambiente os animais foram alojados em caixas de policarbonato (as medidas de 49x34x16cm com a tampa em metal contendo uma parte 4,5 cm mais alta que a altura máxima da caixa, maravalha sobre o fundo e água e comida *ad libitum*, além dos itens de enriquecimento (Figura 4).



Figura 4: Comparação entre as caixas do grupo enriquecido (E) à esquerda e padrão (P) à direita. A- Visão lateral das caixas; e B- visão frontal superior.

Os itens selecionados para compor o ambiente enriquecido foram: um tubo de policloreto de vinil (PVC do inglês *Polyvinyl chlorid*) com as extremidades abertas medindo 7x7cm (comprimento x diâmetro), um tubo de PVC com uma das extremidades fechada medindo 16x7cm (comprimento x diâmetro), meio tubo com as extremidades abertas 5,5x7cm (comprimento x diâmetro), uma plataforma suspensa por fios de arame e presa a parte mais alta da tampa a 3cm da maravalha medindo 15,5x13,5 cm (largura x comprimento) e papel para aninhamento (Figura 5). Durante as trocas de caixa, o excesso de sujeira dos itens do enriquecimento era retirado, para que o cheiro característico de cada grupo não fosse perdido, e o papel de aninhamento repostos.

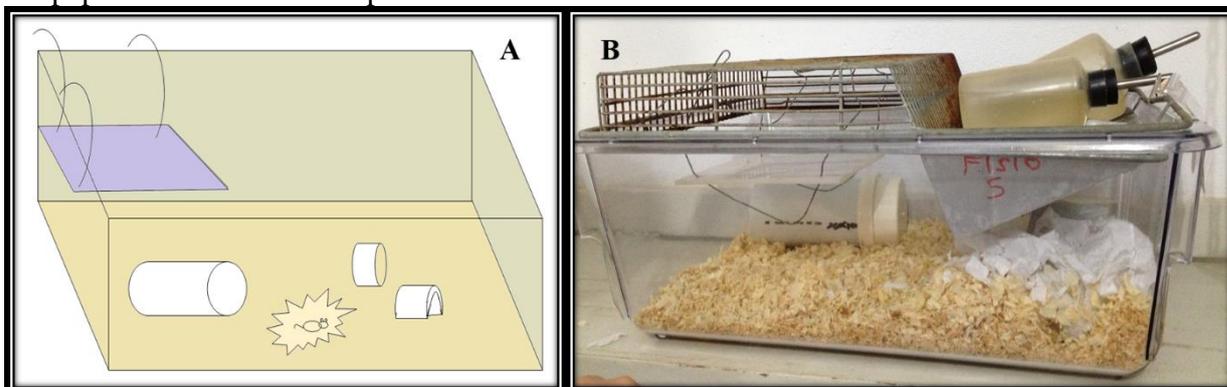


Figura 5: Caixa com os itens de enriquecimento ambiental. A- Esquema ilustrando os itens e a sua disposição na caixa; e B- Foto real da caixa.

Neste grupo os animais estiveram expostos ao tipo de ambiente descrito durante toda a vida. E foram submetidos aos testes comportamentais da mesma forma que no grupo padrão.

4.2.3 Grupo enriquecimento-padrão (EP)

O grupo enriquecimento-padrão foi formado a partir da geração F1. Para sua composição, fêmeas filhotes de F1 nascidas em ambiente enriquecido passaram para o ambiente padrão após o desmame D21PN. Neste ambiente permaneceram, acasalaram e tiveram seu comportamento analisado assim como as fêmeas mães dos outros grupos. Seus filhotes então, foram considerados expostos indiretamente ao enriquecimento ambiental. Sendo importante na avaliação do efeito transgeracional do enriquecimento ambiental.

A avaliação comportamental das mães e dos filhotes se deu de forma idêntica aos outros grupos. As fêmeas de F1 tiveram seu comportamento materno avaliado e após o desmame de seus filhotes foram submetidas aos testes comportamentais. E os filhotes (F2), tanto machos quanto fêmeas, foram submetidos aos testes comportamentais no D60PN. Nesta última geração também foi obtido material biológico de animais que não foram submetidos aos testes comportamentais para futura análise molecular. .

4.3 Modelos Comportamentais

4.3.1 Comportamento materno

No dia do nascimento, determinado como dia 0 pós-natal (D0PN), após a homogeneização da ninhada, a caixa de polipropileno foi trocada pela caixa de policarbonato cristal e foi levada para a sala onde foram feitas as filmagens do comportamento materno. As caixas eram colocadas em uma estante onde os registros eram feitos através de um sistema de câmeras de segurança onde cada caixa possuía uma câmera direcionada (Figura 6) que registrava continuamente durante 30 minutos no período do dia e outros 30 minutos no período noturno. No período noturno as imagens eram captadas com auxílio de uma lâmpada vermelha ligada pois nem todas as câmeras possuíam o recurso de infravermelho. Os registros começaram no D1PN e terminaram no D7PN totalizando 420 minutos de filmagens.



Figura 6: Caixas colocadas na estante com o sistema de câmeras de segurança montado para que cada câmera focalizasse uma caixa e as filmagens fossem feitas de forma sequencial e ininterrupta.

Para avaliar o comportamento materno foi utilizada metodologia adaptada de CHAMPAGNE et al. (2003). Para tal, as imagens foram posteriormente analisadas e o comportamento registrado a cada minuto. Os comportamentos registrados foram FN – mãe fora do ninho e NN – mãe sobre o ninho (Figura 7). Caso a fêmea estivesse no ninho era registrado se ela estava exibindo algum comportamento materno (comportamento direcionado a prole) – NNC ou se não estive com comportamentos direcionados a prole – NNS (Figura 8). Os resultados foram expressos em porcentagem da frequência de cada comportamento através da seguinte fórmula: % frequência = frequência registrada x 100 / total de registros.

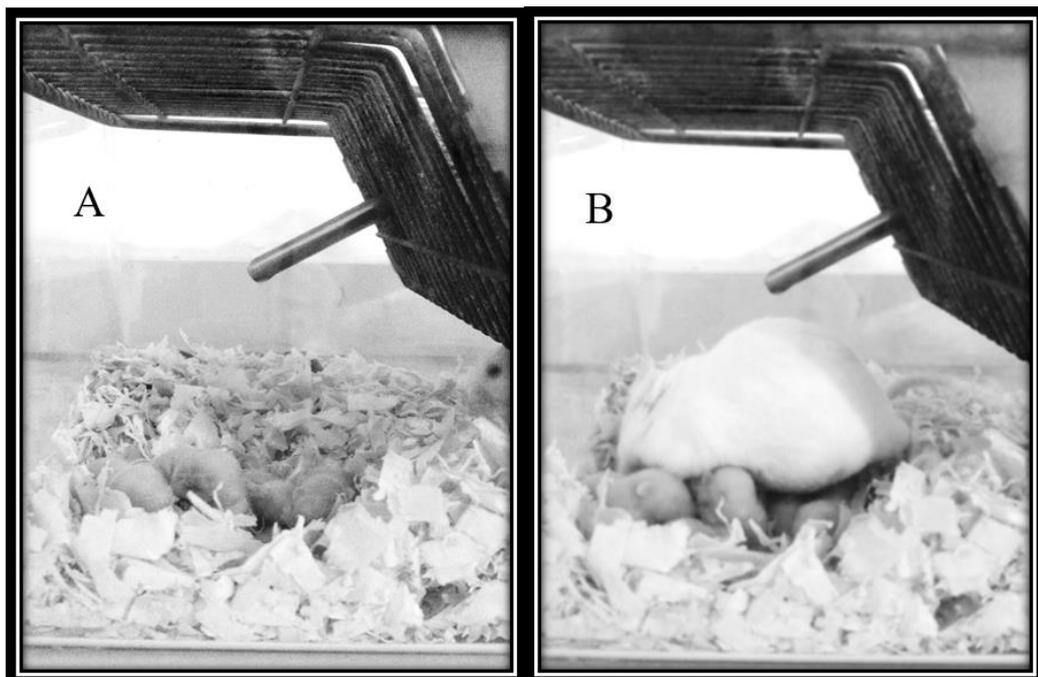


Figura 7: Comportamento materno- presença no ninho. A- Registro de FN (mãe fora do ninho); B- Registro de NN (mãe no ninho)



Figura 8: Comportamento materno – cuidado. A- Registro de NNC (mãe no ninho exibindo comportamento materno); e B- registro de NNS (mãe no ninho não exibindo comportamento materno).

Os comportamentos direcionados a prole que foram registrados durante as observações foram: mãe lambendo o filhote ou em grooming (tanto lambedura no corpo e anogenital foram incluídas) e mãe amamentando os filhotes. Neste caso, foram registrados o comportamento nas posições de dorso arqueado (fêmea com as costas arqueadas sobre os filhotes e as pernas estendidas), “cobertor” (quando a mãe está deitada sobre os filhotes e suas patas não estão estendidas) e em amamentação passiva (quando a fêmea está deitada de lado ou de costas e os filhotes estão amamentando) (Figura 9).



Figura 9: Registros de comportamento materno. A- Lamedura (grooming); B- Amamentação em dorso arqueado; C- Amamentação passiva; e D- Amamentação cobertor.

4.3.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste do labirinto em cruz elevado é baseado na tendência natural de roedores em explorar novos ambientes e sua inata evitação a ambientes abertos, desprotegidos e altos representados pelos braços abertos do aparato de teste. A exploração destes braços está diretamente relacionada ao grau de ansiedade do animal em teste, quanto maior a exploração, menor a ansiedade.

Este teste foi adaptado do descrito por LISTER (1987), e consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz grega (Figura 10). O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central medindo 5x5cm. A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados foram confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto.

No início do teste o animal foi colocado na plataforma central com a face virada para um dos braços fechados e este foi filmado por 5 min. As análises foram feitas a partir da filmagem e tiveram os seguintes parâmetros avaliados: porcentagens de entradas e de tempo despendido em braços abertos e o comportamento de avaliação de risco, “*stretch attend posture*” (estiramentos) (RODGERS; DALVI, 1997).

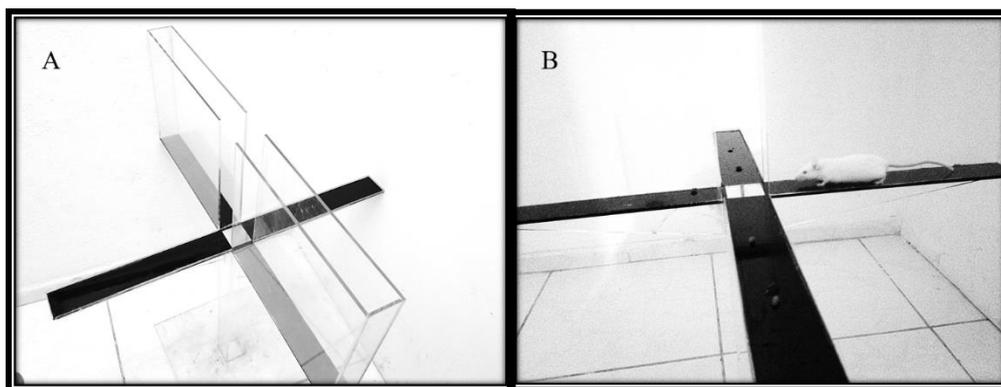


Figura 10: Aparato de teste Labirinto em Cruz Elevado. A- Visão diagonal do aparato, dando destaque aos braços fechados por paredes transparentes e os braços abertos são paredes laterais configurando um espaço aversivo aos animais. B- Camundongo explorando o aparato durante o teste.

A filmagem foi realizada por uma câmera posicionada perpendicularmente acima do aparato. O teste teve início às 8:00 da manhã conforme padronização prévia. A sala estava iluminada por uma luz vermelha. E o labirinto foi higienizado por uma solução de álcool a 10% entre a colocação de um animal e outro para que fosse retirada as pistas odoríferas que estes pudessem ter deixado, e assim não influenciar no comportamento do animal a ser testado em seguida e não interferir na análise dos resultados.

4.3.3 Campo aberto (CA)

O teste de campo aberto é realizado em estudos sobre ansiedade baseado na preferência espontânea que roedores tem por ambientes fechados. Desta forma, preferirão a periferia ao centro da arena de teste, isso por causa de uma tendência destes animais de permanecerem perto de superfícies verticais (tigmotaxia). O grau de tigmotaxia durante o período que o animal está sendo testado no campo aberto pode ser um parâmetro para avaliar seu grau de ansiedade (SIMON et al, 1994).

O teste foi realizado em uma caixa de acrílico medindo 30x30cm com paredes transparentes de 15 cm de altura e chão preto dividido em 9 quadrantes iguais (Figura 11). Os animais foram colocados no centro do campo aberto e avaliados durante os 5 minutos (ROCHA et al. 2011). Para avaliar a atividade locomotora dos animais foi analisada a velocidade média e distância percorrida. Além disso, a distância percorrida foi separada na porcentagem percorrida nos quadrantes periféricos e a porcentagem percorrida no centro, servindo de parâmetros para a avaliação do efeito ansiolítico do enriquecimento ambiental.

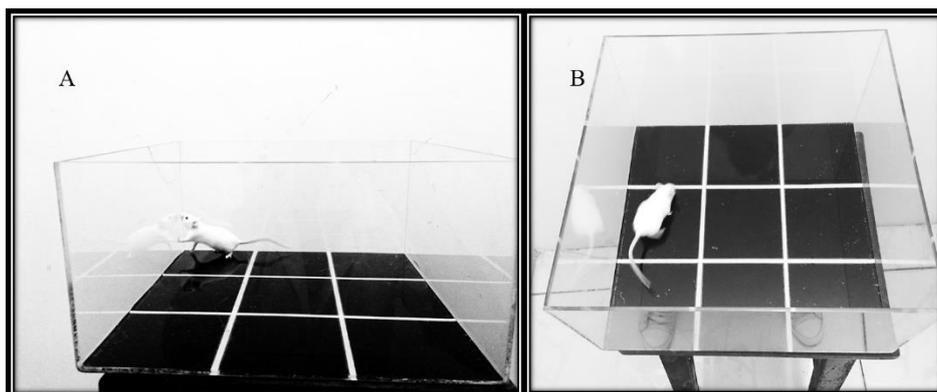


Figura 11: Aparato do teste Campo Aberto mostrando as delimitações de quadrantes. Os quadrantes próximos às paredes de acrílico são os considerados quadrantes da periferia e o quadrante do meio, quadrante central. A- Visão frontal do aparato com um animal em teste; e B- visão superior do aparato.

O aparato foi colocado em uma sala escura com a câmera posicionada acima em posição perpendicular ao centro. O teste teve início logo em seguida ao teste do labirinto em cruz elevado. E o aparato foi higienizado com uma solução de álcool a 10% para a retirada de odores entre um animal e outro para que não houvesse influência no resultado do teste.

4.3.4 Caixa claro-escuro

A caixa claro-escuro é um teste baseado na aversão inata dos roedores a ambientes iluminados e no comportamento espontâneo de exploração em resposta a estressores moderados, que são a luz e a novidade (BOURIN; HASCOËT, 2003). O teste consiste em uma caixa de acrílico composta de um compartimento iluminado a 400 ± 10 LUX medindo $200 \times 265 \times 260$ mm (A x L x C) e um compartimento escuro (A x L x C) $200 \times 265 \times 175$ mm (Figura 12). No início do teste os animais foram colocados no centro da parte escura do aparato de frente para a área clara e filmados por 10 minutos. Posteriormente puderam ser analisados os seguintes parâmetros: a latência para a primeira transição, o número de transições entre os dois compartimentos e o tempo de permanência na área clara (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). Entre o teste de um animal e outro, o aparato foi higienizado por uma solução de álcool a 10% a fim de retirar o odor deixado pelo animal durante a permanência na caixa.

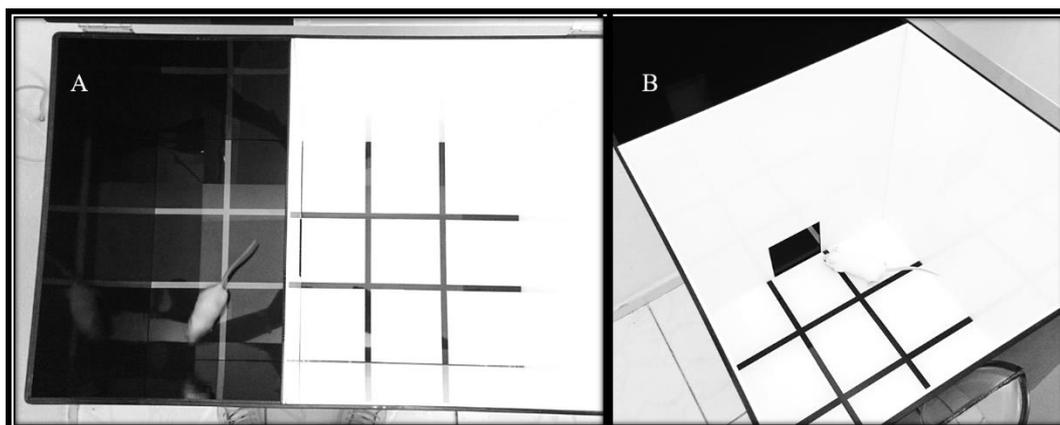


Figura 12: Aparato do teste da Caixa Claro-Escuro. A- Visão superior dos compartimentos claro e escuro, com a tampa da caixa aberta após a seção de filmagem; e B- Compartimento claro, com seus quadrantes e na parede o orifício de transição entre os ambientes.

4.3.5 Alimentação suprimida pela novidade

O teste realizado foi uma modificação do descrito por SANTARELLI et al. (2003). A modificação se deu a fim de atender as normas de bem-estar animal na experimentação, onde sugere-se que sejam reduzidos ao máximo o tempo de sofrimento do animal. O original foi descrito com a privação de alimentação por 24 horas, e para a realização os animais foram privados de alimentação por 16 horas antes do início do teste. Ao começar, os camundongos foram colocados na periferia de uma arena iluminada medindo de 49x34x16cm. Nesta arena havia dois *pellets* de ração, pesados previamente, amarrados a uma plataforma circular forrada com papel (Figura 13). Segundo SAMUELS; HEN (2011), uma latência maior para comer é usada para descrever animais mais ansiosos.

A arena esteve tampada durante todo o teste, sendo deixada apenas uma pequena abertura para a passagem de ar. Para cada animal foi montada uma caixa e um suporte dos pellets de ração para que não houvesse interferência de odor de um animal para o outro. O teste foi filmado por 10 minutos e posteriormente foi analisada a latência para ingestão do alimento, a diferença de peso dos pellets antes e depois do teste, a porcentagem de perda de peso dos animais submetidos ao teste e a diferença de peso dos pellets de ração fornecidos aos animais ao final do teste em caixas semelhantes às que eram mantidos ao longo do trabalho.

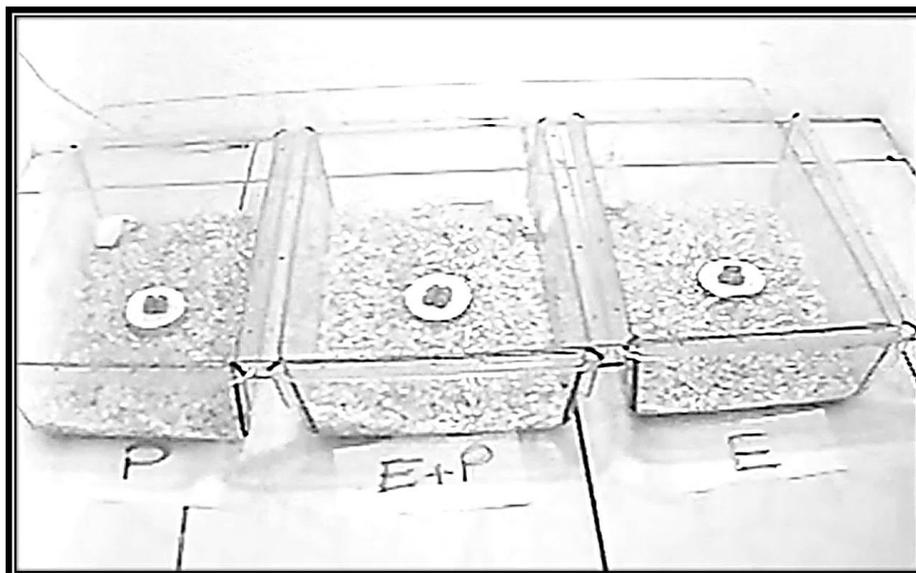


Figura 13: Arenas do teste de Supressão da Alimentação pela Novidade. No centro das arenas estão posicionados os pellets de ração sobre a plataforma elevada forrada com papel. Abaixo das caixas a identificação do grupo experimental: P- padrão, E+P- Enriquecimento-Padrão e E- Enriquecimento.

4.3.6 Cronograma

A sequência dos testes foi realizada de acordo com a Figura 14. O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) foi seguido na sequência pelo campo aberto (CA) no mesmo dia. Após um dia de intervalo os animais foram avaliados na caixa claro-escuro (CCE). Na geração F2, o teste da supressão da alimentação pela novidade (NSF) foi realizado dois dias após o teste CCE.

As eutanásias ocorreram 24 horas após o último teste ao qual o animal foi submetido.

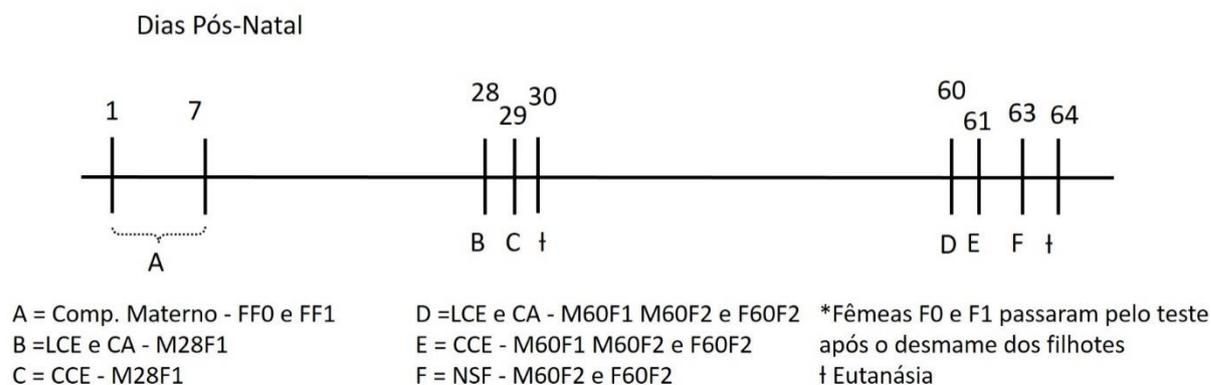


Figura 14: Cronograma dos modelos comportamentais

4.4 Parâmetros Neuroendócrinos

4.4.1 Corticosterona

A coleta do sangue para a análise de corticosterona ocorreu após a eutanásia por decapitação dos animais no período da manhã. Os animais expostos aos modelos comportamentais foram eutanasiados 24 horas após a exposição ao último teste. Já os animais não expostos a testes foram eutanasiados aos 60 dias. Após a decapitação o sangue foi coletado em um tubo do tipo *ependorf* devidamente identificado e colocado em um recipiente com gelo até o momento da centrifugação. Esta foi realizada em centrífuga com temperatura de 25°C, a

30000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi então colocado em um tubo tipo *ependorf* devidamente identificado e congelado a -20°C .

A análise hormonal se deu pelo método de Radioimunensaio utilizando o kit *ImmuChem*TM ^{125}I *Corticosterone RIA* do laboratório MP Biomedicals. Seguindo o protocolo contido no manual fornecido pelo fabricante, as amostras foram descongeladas e utilizados 10ul para ao ensaio. Ao final dos procedimentos de marcação com os reagentes presentes no kit, as amostras foram levadas ao contador de radiação Gama e obtidos os valores da corticosterona marcada.

4.4.2 Análise da expressão de receptores

Após a eutanásia por decapitação, os encéfalos foram rapidamente dissecados e coletadas as seguintes regiões: córtex frontal, hipocampo e amígdalas adotando como referência o atlas FRANKLIN; PAXINOS (2007). Imediatamente após a dissecação, os tecidos foram congelados em anidrido carbônico sólido, e depois estocados a -80°C para posterior processamento.

Para a análise molecular através do método quantitativo de Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR), apenas foram utilizadas amostras oriundas das amígdalas. O RNA total de cada amostra foi extraído utilizando-se Trizol (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante quantificado em nanoespectrofotômetro DS-11 (DeNovix). Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com DNase para evitar a contaminação com DNA e realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) em termociclador (Applied Biosystems®) utilizando-se kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®), sendo o cDNA obtido armazenado em freezer -20°C até utilização para as reações de PCR em tempo real.

A expressão do gene foi detectada pela utilização de sondas TaqMan (TaqMan Gene Expression assays) através do método de PCR em tempo real, usando o kit TaqMan® Fast Advanced PCR Master Mix (Applied Biosystems®). As amostras foram quantificadas em triplicata utilizando como controle interno o gene β -actina e as reações realizadas em equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados com base no valor de CT (cycle threshold ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge dado limiar, e expressos através dos valores comparativos (D) da expressão do gene alvo em relação ao gene padrão (β -actina) segundo a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LUONI; ROCHA; RIVA, 2014). Foram então avaliados os genes para os subtipos A e B do receptor AVP1, os receptores 1 e 2 de CRH e o receptor de OT, sendo as sondas e iniciadores adquiridos da Life Technologies. As sondas e iniciadores utilizados foram Mouse - ACTB (Actin, Beta) Endogenous Control (VIC®/MGB probe) - 4352341E; Mouse - Crhr1 - Mm00432670_m1; Mouse - Crhr2 - Mm00438303_m1; Mouse - Oxt1 - Mm01182684_m1; Mouse - Avpr1a - Mm00444092_m1; Mouse - Avpr1b - Mm01700416_m1.

4.5 Análise dos Vídeos

A análise dos vídeos dos modelos comportamentais foi realizada através do software SMART Video-Tracking da PanLab durante o período disponível para teste (*trial version*). Os vídeos do comportamento materno foram analisados manualmente tendo os registros anotados em tabela digital para posterior análise estatística. Todos os registros comportamentais foram realizados por pesquisadores experientes na função. Durante os registros dos testes o observador não tinha a informação do grupo ao qual o animal analisado era pertencente, teste cego. Exceto pelos vídeos que eram realizados diretamente nas caixas moradia. Ou quando foi

necessária a identificação dos grupos durante a filmagem, como no teste da alimentação suprimida pela novidade.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi feita através do software GraphHAd Prism versão 6. Para a análise entre dois grupos foi usado o teste t não pareado, e nas análises com os três grupos foi utilizado o teste ANOVA de uma via com múltiplas comparações (Uncorrected Fisher's LSD). E para a comparação entre gerações, foi utilizado o ANOVA de duas vias. Todos os resultados estão expressos em média e erro padrão da média. E o teste de múltiplas comparações só teve seu resultado considerado após a constatação de diferença significativa apontada pelo ANOVA.

Para os testes de análise estatística dos parâmetros fisiológicos, foi realizado o teste de ROUT para a eliminação de possíveis valores *outliers* previamente ao teste de comparação entre os grupos.

5 RESULTADOS

5.1 Modelos Comportamentais

5.1.1 Comportamento materno

Após a análise dos parâmetros registrados durante a observação do comportamento materno, pudemos verificar que os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) de fêmeas F0, mães de F1, não apresentaram diferença em relação ao tempo em que ficaram no ninho (NN) (Figura 15 A). O resultado do teste t foi $p=0,5947$ ($48\pm 5,1\%$; $43,8\pm 5,6\%$). Porém foi possível verificar que durante o tempo que passaram no ninho, as fêmeas F0 do grupo enriquecido (E) estiveram mais dedicadas ao cuidado com os filhotes ($46,8\pm 8,9\%$; $77,8\pm 5,4\%$; $p=0,0138$) (Figura 15 B).

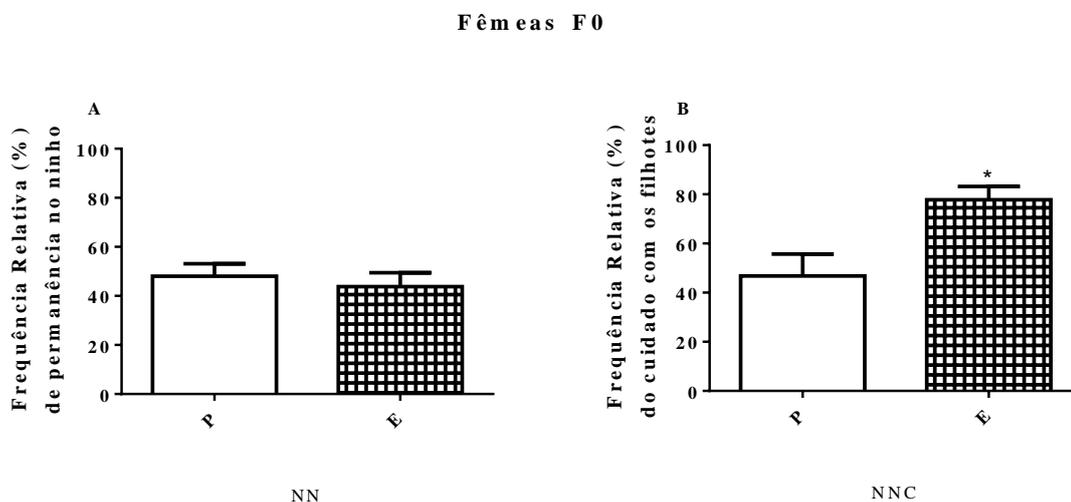


Figura 15: Comparação da frequência relativa dos registros de comportamento materno entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) nas fêmeas F0, mães de F1. [A] NN- no ninho $p=0,5947$ e [B] NNC- no ninho com cuidado $P=0,0138$. *Diferença significativa em relação ao grupo P

Já para as fêmeas F1, mães de F2, houve diferença na frequência relativa de tempo dentro do ninho ($62,2\pm 3,7\%$; $57,8\pm 2,9\%$; $48,4\pm 2,2\%$; $F=4,065$ $p=0,0425$). A diferença está no grupo E em relação ao grupo P ($p=0,0140$) quando realizadas múltiplas comparações entre os grupos como pode ser visualizada na Figura 16 A. Quando verificada a frequência relativa do cuidado materno dos três grupos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($68,4\pm 4,1\%$; $71,1\pm 6\%$; $78,1\pm 3,1\%$; $F=0,8120$ $p=0,4689$) (Figura 16).

Fêmeas F1

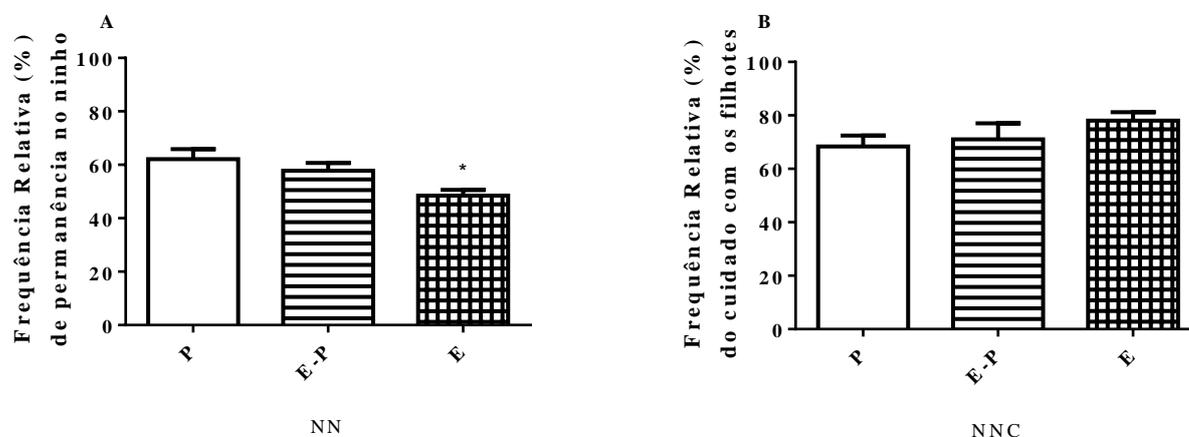


Figura 16: Comparação da frequência relativa dos registros de comportamento materno entre os grupos padrão (P), enriquecimento – padrão (E-P) e enriquecimento (E) nas fêmeas F1, mães de F2. [A] NN- no ninho $F=4,065$ $p=0,0425$ $p=0,0140$ e [B] NNC- no ninho com cuidado $F=0,8120$ e $p=0,4689$. * Diferença significativa em relação ao grupo P

A ausência de diferença significativa entre os grupos desta geração pode ser devido ao baixo número de fêmeas com filhotes no grupo E, foram 4 neste grupo e 6 nos outros. Além disso, a caixa do grupo enriquecimento favorecia que as mães se escondessem com os filhotes dentro dos tubos plásticos disponibilizados, assim como esconderem os ninhos das câmeras de filmagem com maravalha. Elas deslocavam boa parte da maravalha do chão da caixa para a parede onde estavam focalizadas as câmeras, dificultando ou impedindo a visualização do comportamento.

O ocorrido com este grupo pode ser por 2 motivos. 1- macro e micro ambiente durante a gestação e 21 dias pós natal (F0-P nasceu no biotério de criação e permaneceu no mesmo macro e micro ambiente por 21 dias enquanto os grupos de F1 foram gerados no biotério de experimentação); 2- condições do microambiente em que os animais cresceram (F0 cresceu em uma caixa grande com várias outras fêmeas até o momento em que foram separadas e colocadas em suas caixas – padrão ou enriquecidas- junto com 1 macho para o acasalamento e os grupos de F1 cresceram numa caixa padrão com 4 ± 1 fêmeas irmãs e continuaram na mesma caixa até o acasalamento quando permaneceram 2 mais o macho).

Desta forma nossos dados e análises nos permitem inferir que o enriquecimento favoreceu o cuidado materno em F0 e não foi significativo para o cuidado materno em F1.

5.1.2 Labirinto em cruz elevado

As fêmeas F0 foram o primeiro grupo testado. Dos parâmetros analisados foi encontrada diferença estatisticamente significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos ($13,7 \pm 2,1\%$; $22,1 \pm 2,3\%$; $p=0,0347$) e no tempo despendido nos braços abertos não foi encontrada diferença ($16,1 \pm 6\%$; $23,8 \pm 4,1$; $p=0,3699$) (Figura 17).

Fêmeas F0

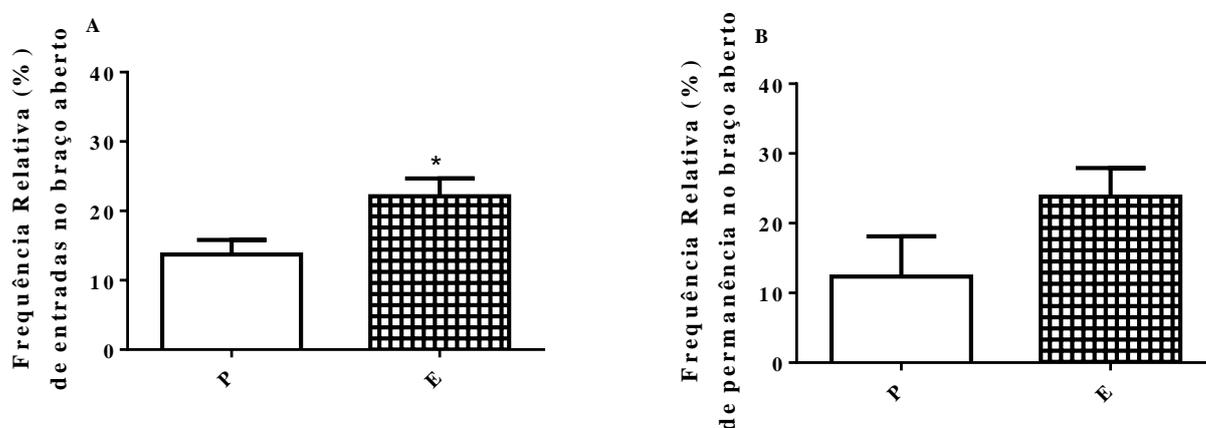


Figura 17: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevado entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) das fêmeas F0. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($p=0,0347$); [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($p=0,1690$). *Diferença significativa em relação ao grupo P

Em F1 podemos observar diferença significativa na porcentagem de entrada nos braços abertos ($34,5\pm 3,8\%$; $48,5\pm 4,7\%$; $p=0,0305$) e na porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos ($25,3\pm 2,8\%$; $36,6\pm 4,6\%$; $p=0,0425$) entre os grupos P e E, respectivamente, quando os machos com 28 dias foram testados (Figura 18 A e B), assim como na quantidade de comportamentos do tipo estiramento ($16,5\pm 3$; $6,6\pm 2,1$; $p=0,0153$) (Figura 18 C).

Machos 28 dias F1

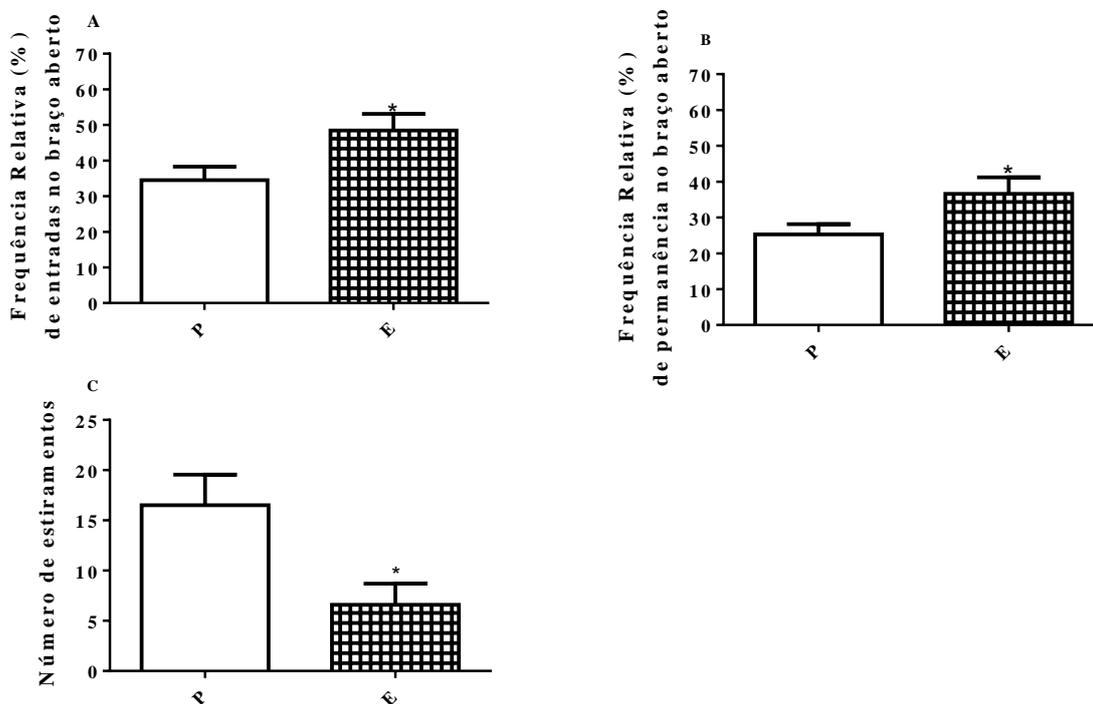


Figura 18: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevada a entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) dos machos de 28 dias de F1. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($p=0,0305$); [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($p=0,0425$); [C] Número total de estiramentos-SAP ($p=0,0153$). *Diferença significativa em relação ao grupo P

E entre os grupos dos machos com 60 dias houve diferença na porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos ($19,4 \pm 2,6\%$; $26,8 \pm 2,2\%$; $p=0,0465$) (Figura 19 B). Não houve diferença significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos ($23,6 \pm 0,8\%$; $25,3 \pm 0,9\%$; $p=0,1803$).

Machos 60 dias F1

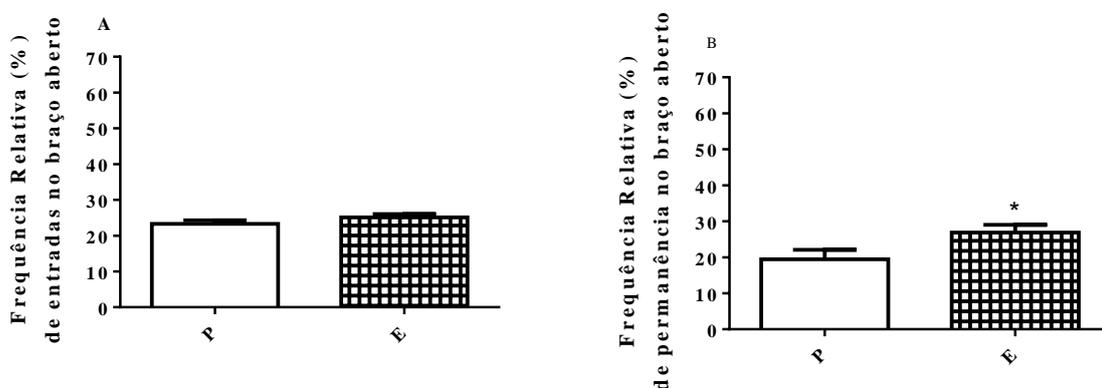


Figura 19: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevada a entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) dos machos de 60 dias de F1. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($p=0,2162$); [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($p=0,0465$). *Diferença significativa em relação ao grupo P

Já as fêmeas de F1 apresentaram diferença significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos ($11,3\pm 1,1\%$; $16,8\pm 1,5\%$; $16,7\pm 1,4\%$; $F=4,9210$ $p=0,0325$) (Figura 20 A) e na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos entre os grupos P, E-P e E ($6,1\pm 1,9\%$; $13,6\pm 1,8\%$; $14,9\pm 3,8\%$; $F=4,2470$ $p=0,0381$) (Figura 20 B).

Fêmeas 60 dias F1

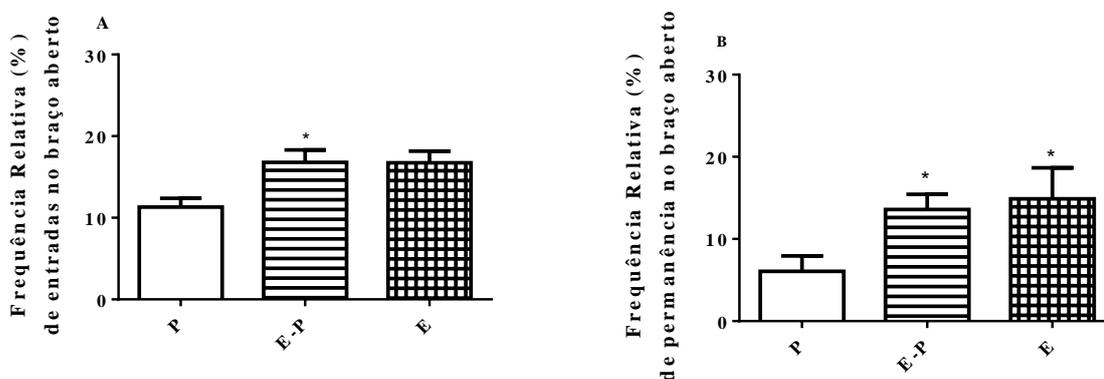


Figura 20: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevada a entre os grupos padrão (P), enriquecimento-padrão (E-P) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias F1, mães de F2. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($F=4,921$ e $p=0,0325$); [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($F=4,247$ e $p=0,0381$). *Diferença significativa em relação ao grupo P

Este resultado mostra que há um efeito residual no comportamento relacionado a ansiedade das fêmeas no teste de labirinto em cruz elevado do grupo E-P que foram trocadas de ambiente aos 21 dias pós-natal. Neste caso o enriquecimento perinatal influenciou o desempenho destes animais no teste.

Na segunda geração de animais expostos ao enriquecimento, os machos F2 apresentaram diferença significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos ($7,7\pm 2,3\%$;

6,1±1,5%; 18,8±1,2%; F=15,880 p<0,0001) (Figura 21 A), na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (5,9±2,3%; 2,8±0,9%; 20,1±2,4%; F=22,640 p<0,0001) (Figura 21 B) e na quantidade total de estiramentos - “*stretched attend posture*” (SAP) (32,8±2,5; 34,3±2,0; 25,1±1,8; F=5,341 p=0,0106), importante comportamento de avaliação de risco (Figura 21 D) entre os grupos P, E-P e E.

Machos 60 dias F2

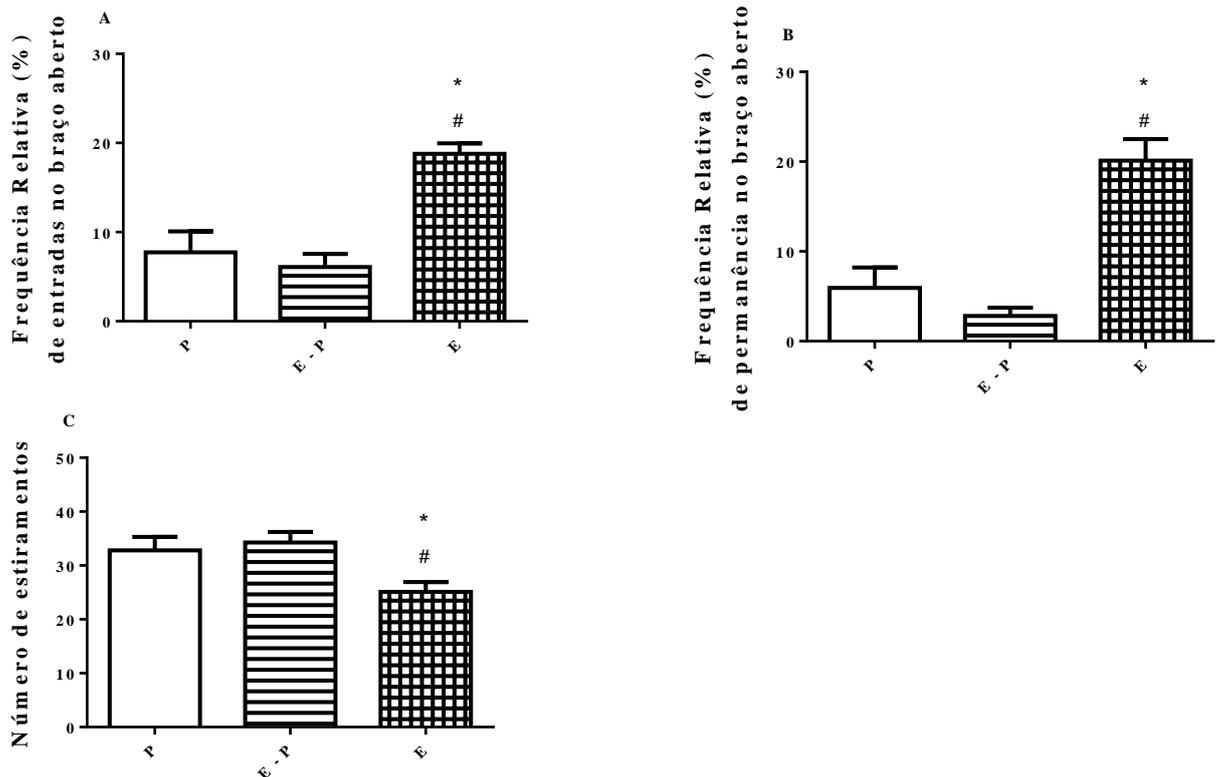


Figura 21: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevada a entre os grupos padrão (P), enriquecimento-padrão (E-P) e enriquecimento (E) dos machos de 60 dias F2. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto (F=15,88 e p<0,0001); [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos (F=22,64 e p<0,0001); [C] estiramentos-SAP (F=5,341 e p=0,0106). *Diferença significativa em relação ao grupo P. #Diferença significativa em relação ao grupo E-P.

Já as fêmeas da segunda geração, F2, apresentaram diferenças significativas entre os grupos P, E-P e E na porcentagem de entradas nos braços abertos (14,7±1,4%; 12,6±3,5%; 21,7±1,8%; F=4,1610 p=0,0317) (Figura 22 A) e na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (6,6±1,9%; 4,0±1,6%; 18,8±2,7%; F=13,280 p=0,0003) (Figura 22 B).

Fêmeas 60 dias F2

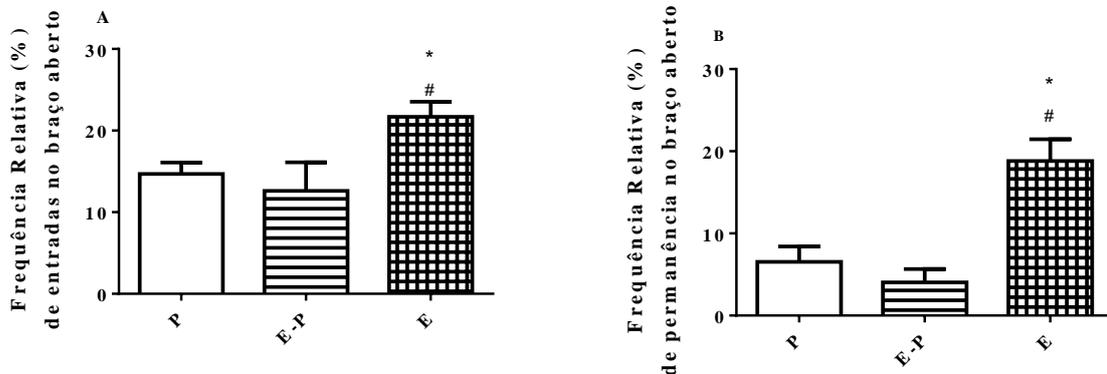


Figura 22: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevado a entre os grupos padrão (P), enriquecimento-padrão (E-P) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias F2. [A] Porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto ($F=4,161$ e $p=0,0317$) e [B] Porcentagem no tempo de permanência nos braços abertos ($F=13,28$ e $p=0,0003$). *Diferença significativa em relação ao grupo P. #Diferença significativa em relação ao grupo E-P.

As diferenças encontradas entre os grupos, tanto dos machos de F2 quanto no das fêmeas F2, nos mostra que não há influência da exposição das mães destes animais ao enriquecimento ambiental no comportamento da prole. A influência do enriquecimento ambiental nos resultados do teste de labirinto em cruz elevado só se dá através da exposição direta.

5.1.3 Campo aberto

O teste de campo aberto foi aplicado em todos os grupos e gerações estudados de acordo com a sequência dos testes explicadas na metodologia (Figura 14), porém os dados dos grupos de machos com 60 dias de F1 foi perdido. Apresentaremos então os resultados na sequência em que os testes foram realizados.

Nos grupos P e E de fêmeas de F0 não foi encontrada nenhuma diferença significativa nos parâmetros analisados (Figura 23), velocidade média ($7,0\pm 0,4\text{cm/s}$; $6,8\pm 0,4\text{cm/s}$; $p=0,7926$), distância total percorrida ($2220,0\pm 138,0\text{cm}$; $2048\pm 109,6\text{cm}$; $p=0,3991$); e porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($6,8\pm 0,4\%$; $6,6\pm 0,4\%$; $p=0,6982$).

Fêmeas F0

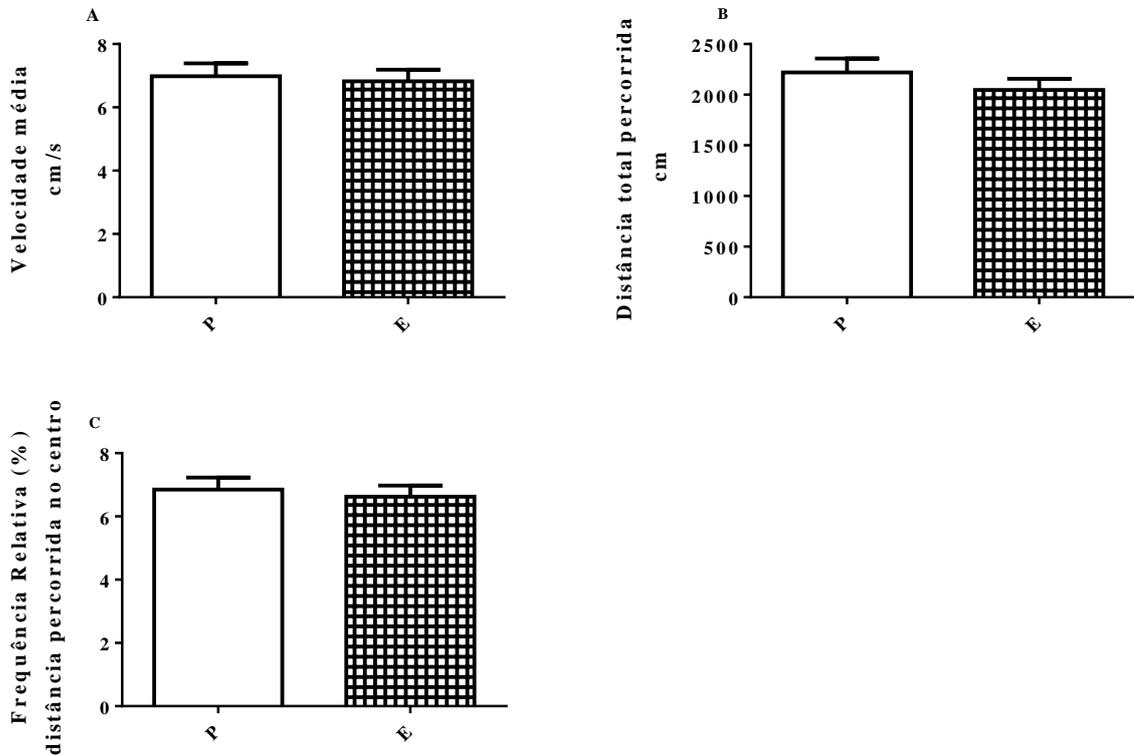


Figura 23: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de campo aberto entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) das fêmeas F0. [A] Velocidade média ($p=0,7926$); [B] Distância total percorrida ($p=0,3991$); e [C] Porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($p=0,6982$).

Também não foram encontradas diferenças nos grupos de machos F1 28 dias, velocidade média ($7,7 \pm 0,4$ cm/s; $7,4 \pm 0,4$ cm/s; $p=0,5972$), distância total percorrida ($2257,0 \pm 113,0$ cm; $2179,0 \pm 110,7$ cm; $p=0,6266$); e porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($8,2 \pm 1,0$ %; $9,8 \pm 1,0$ %; $p=0,2762$) (Figura 24).

Machos 28 dias F1

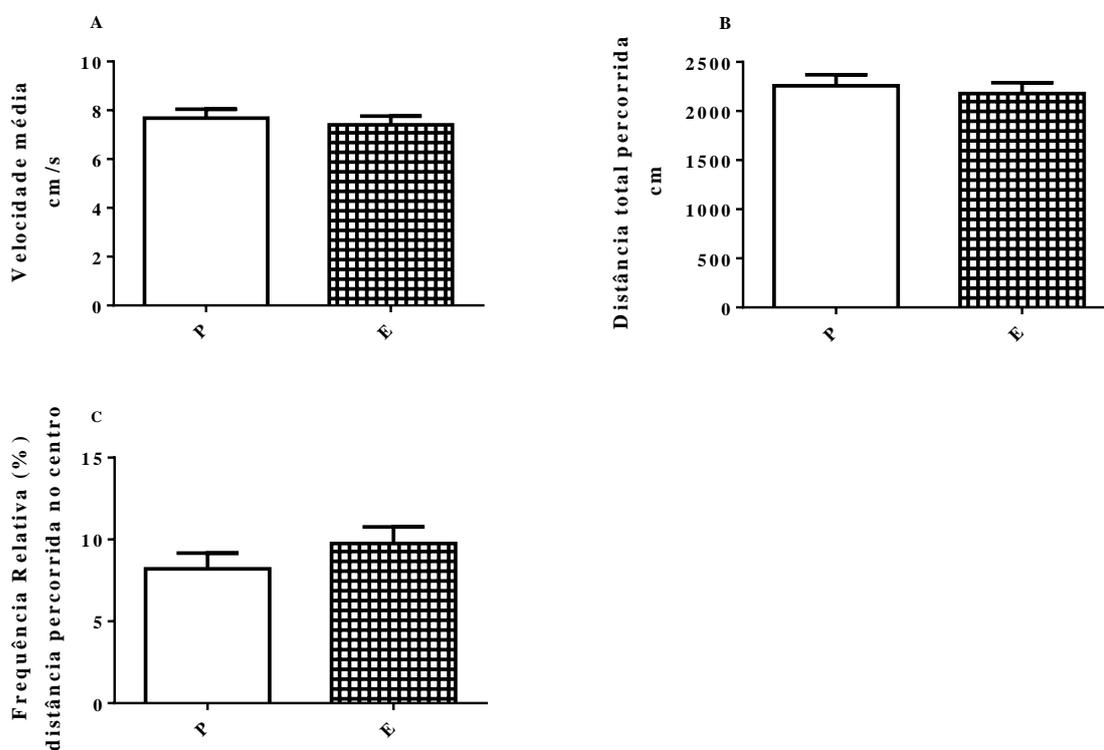


Figura 24: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de campo aberto entre os grupos padrão (P) e enriquecimento (E) dos machos de 28 dias de F1. [A] Velocidade média ($p=0,5972$); [B] Distância total percorrida ($p=0,6266$); e [C] Porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($p=0,2762$).

Assim como nas fêmeas F1, velocidade média ($6,6 \pm 0,5$ cm/s; $5,1 \pm 0,5$ cm/s; $6,3 \pm 1,5$ cm/s; $F=1,1720$ $p=0,3403$), distância total percorrida ($1986,0 \pm 143,7$ cm; $1528,0 \pm 147,8$ cm; $1885,0 \pm 465,5$ cm; $F=1,1680$ $p=0,3415$); e porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($10,8 \pm 2,0$ %; $13,6 \pm 2,0$ %; $15,7 \pm 4,6$ %; $F=0,7663$ $p=0,4846$) (Figura 25).

Fêmeas 60 dias F1

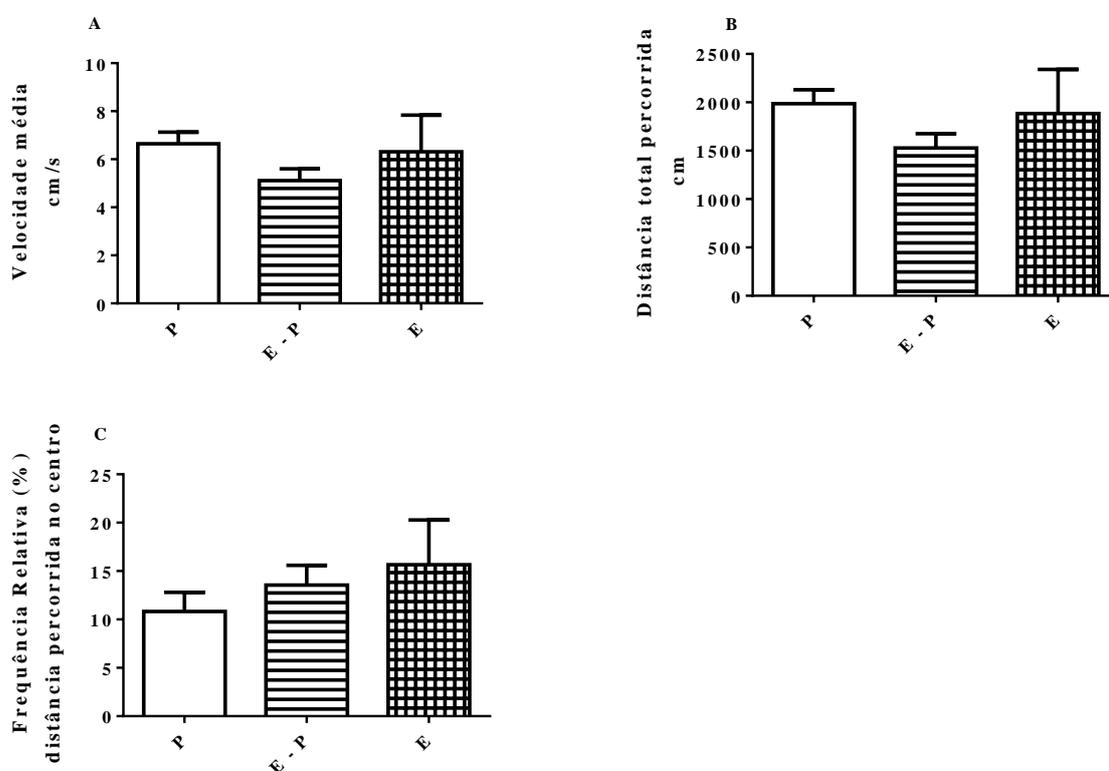


Figura 25: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de campo aberto entre os grupos padrão (P), enriquecimento – padrão (E-P) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias de F1, mães de F2. [A] Velocidade média ($F=1,172$ e $p=0,3403$); [B] Distância total percorrida ($F=1,168$ e $p=0,3415$); [C] Porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($F=0,7663$ e $p=0,4846$); e [D] Quantidade de bolos fecais encontrados no aparato após o teste ($F=0,2149$ e $p=0,8094$).

A Figura 26 mostra os resultados dos grupos de machos 60 dias de F2, velocidade média ($6,2\pm 0,4\text{cm/s}$; $6,7\pm 0,4\text{cm/s}$; $6,7\pm 0,4\text{cm/s}$; $F=0,4264$ $p=0,6570$), distância total percorrida ($1854\pm 130,8\text{cm}$; $1996,0\pm 130,8\text{cm}$; $1980,0\pm 112,6$; $F=0,3732$ $p=0,6919$) e porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($6,0\pm 1,1\%$; $6,2\pm 1,0\%$; $9,4\pm 0,6\%$; $F=3,7810$ $p=0,0352$). Sendo significativa a diferença na porcentagem da distância percorrida no centro.

Machos 60 dias F2

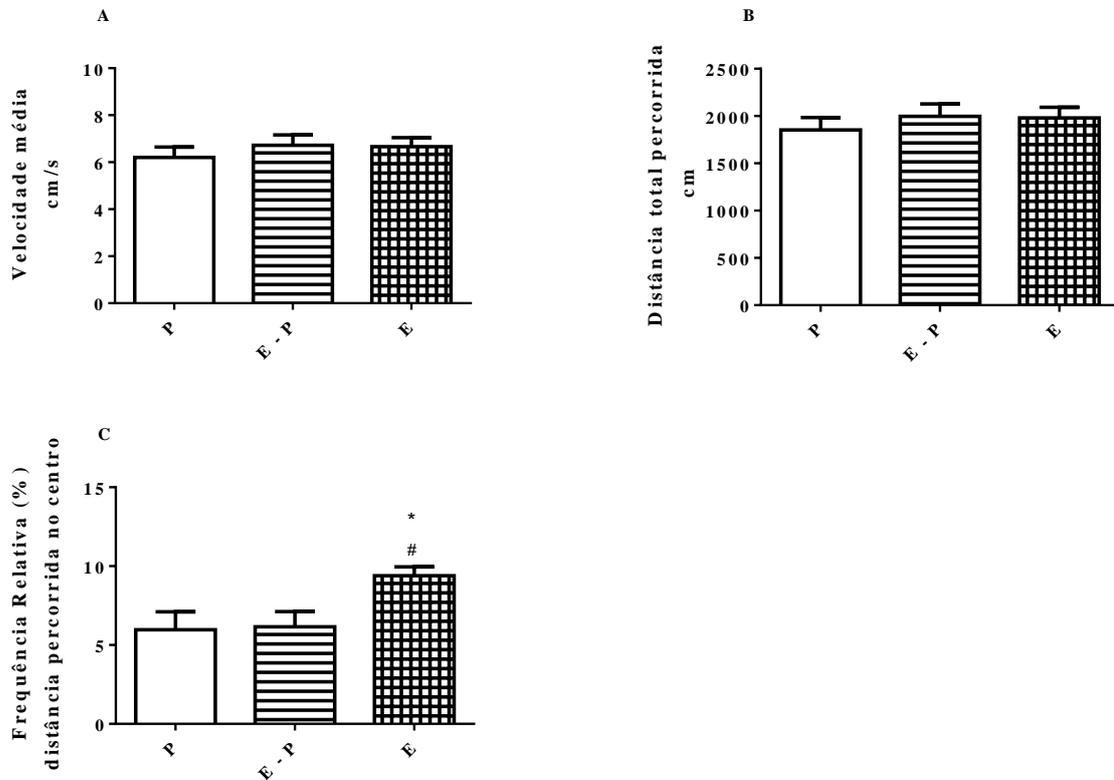


Figura 26: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de campo aberto entre os grupos padrão (P), enriquecimento – padrão (E-P) e enriquecimento (E) dos machos de 60 dias de F2. [A] Velocidade média ($F=0,4264$ e $p=0,6570$); [B] Distância total percorrida ($F=0,3732$ e $p=0,6919$); [C] Porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($F=3,781$ e $p=0,0352$ - Comparações P vs E-P $p=0,8939$; P vs E $p=0,0216$; E-P vs E $p=0,0230$). *Diferença significativa em relação ao grupo P. #Diferença significativa em relação ao grupo E-P.

Assim como as fêmeas F2 também apresentaram diferenças significativas entre os grupos P, E-P e E em relação a porcentagem da distância percorrida no centro do aparato de teste ($5,9\pm 1,2\%$; $6,6\pm 0,6\%$; $9,4\pm 0,6$; $F=4,577$ $p=0,0224$), e não houve diferença significativa na velocidade média ($7,0\pm 0,9\text{cm/s}$; $6,4\pm 0,3\text{cm/s}$; $5,8\pm 0,4\text{cm/s}$; $F=0,8879$ $p=0,4264$) e distância total percorrida no aparato ($1624,0\pm 237,3\text{cm}$; $1879,0\pm 323,5\text{cm}$; $1748\pm 114,4\text{cm}$; $F=0,6683$ $p=0,5232$). A Figura 27 mostra a diferença entre os grupos.

Fêmeas 60 dias F2

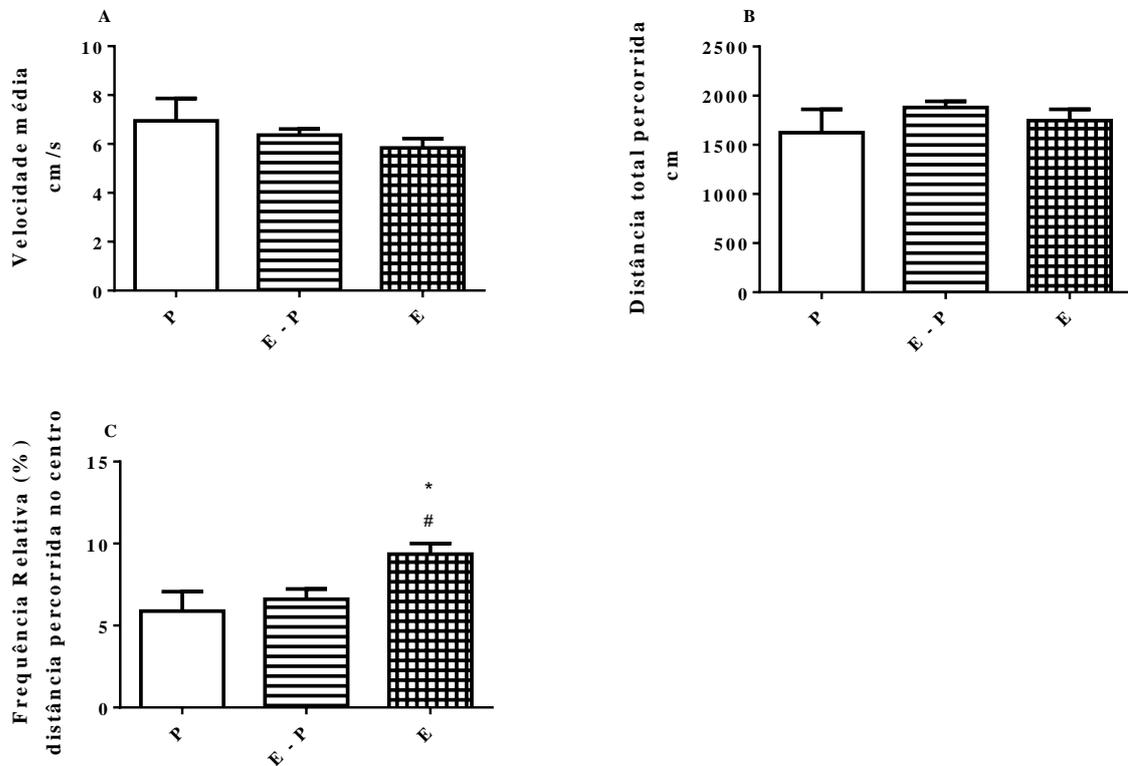


Figura 27: Comparação entre os parâmetros analisados no teste de campo aberto entre os grupos padrão (P), enriquecimento – padrão (E-P) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias de F2. [A] Velocidade média ($F=0,8879$ e $p=0,4264$); [B] Distância total percorrida ($F=0,6683$ e $p=0,5232$); e [C] Porcentagem da distância percorrida no centro do aparato ($F=4,577$ e $p=0,0224$ - Comparações P vs E-P $p=0,5556$; P vs E $p=0,0092$; E-P vs E $p=0,0339$). *Diferença significativa em relação ao grupo P. #Diferença significativa em relação ao grupo E-P.

5.1.4 Caixa claro-escuro

O teste da caixa claro-escuro começou a ser realizado a partir dos machos de 28 dias de F1. Neste grupo foi identificada diferença significativa no tempo de latência para os animais explorarem o lado claro do aparato ($10,1 \pm 1,4s$; $5,8 \pm 0,9s$; $p=0,0173$) (Figura 28 A), e não foram encontradas diferenças significativas no número de transições entre os ambientes da caixa teste ($p=0,4957$) e na frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa ($p=0,0932$).

Machos 28 dias F1

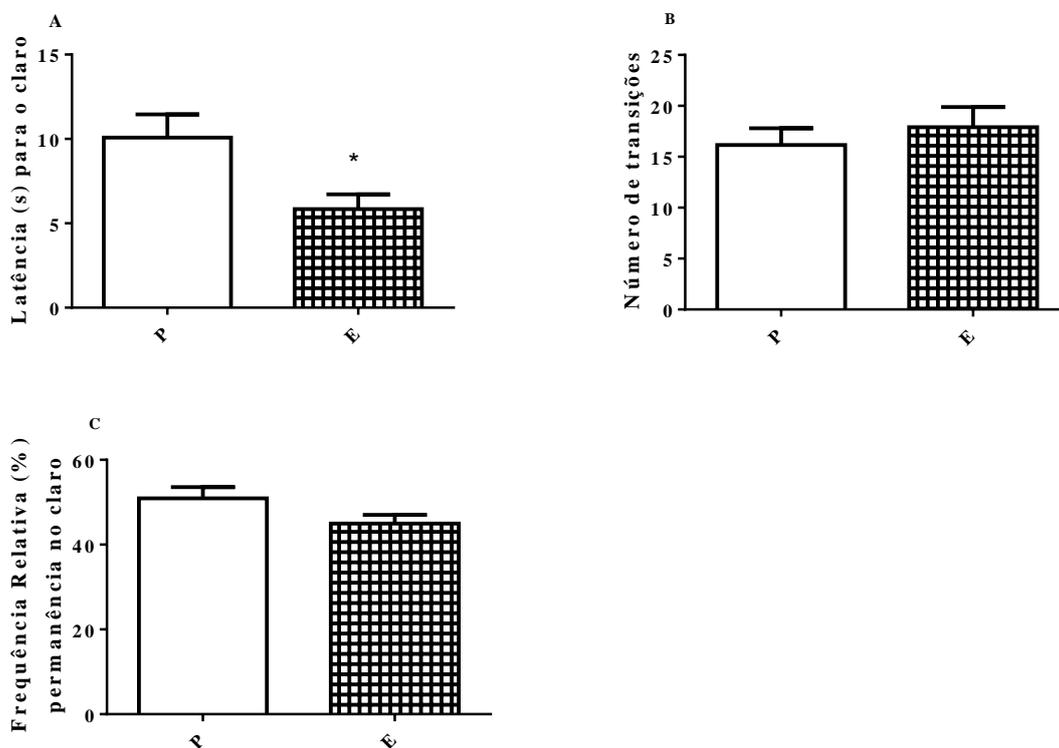


Figura 28: Comparação dos parâmetros utilizados para a análise do teste da caixa claro-escuro entre os grupos padrão (P), e enriquecimento (E) dos machos de 28 dias de F1. [A] Tempo de latência para explorar a parte clara do aparato de teste ($p=0,0173$); [B] Número de transições entre os ambientes da caixa teste ($p=0,4957$); e [C] Frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa ($p=0,0932$). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P.

Nos machos de 60 dias de F1 (Figura 29), os resultados encontrados só apontaram diferença significativa no tempo de latência para os animais explorarem o lado claro do aparato ($28,3\pm 3,1s$; $17,1\pm 1,8s$; $p=0,0034$), e não foram encontradas diferenças no número de transições entre os ambientes da caixa teste ($11,9\pm 0,9$; $13,2\pm 0,7$; $p=0,2643$) e na frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa ($47,0\pm 2,8$; $47,6\pm 2,0$; $p=0,8583$).

Machos 60 dias F1

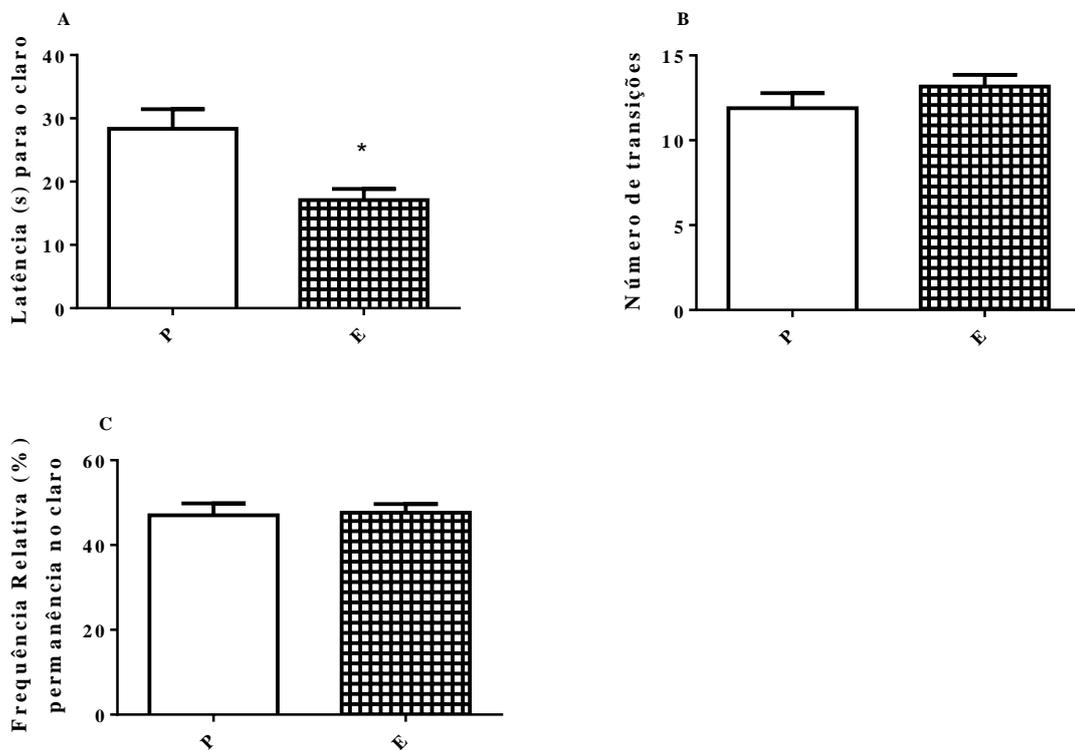


Figura 29: Comparação dos parâmetros utilizados para a análise do teste da caixa claro-escuro entre os grupos padrão (P), e enriquecimento (E) dos machos de 60 dias de F1. [A] Tempo de latência para explorar a parte clara do aparato de teste ($p=0,0034$); [B] Número de transições entre os ambientes da caixa teste ($p=0,2643$); e [C] Frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa ($p=0,8583$). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P.

As fêmeas de F1 também apresentaram diferença significativa na latência para a exploração do lado claro da caixa entre os grupos P, E-P e E ($36,2\pm 3,8s$; $23,5\pm 3,7s$; $18,5\pm 4,6s$; $F=5,1420$ $p=0,0226$) (Figura 30 A) e não apresentaram diferença significativa para o número de transições ($12,2\pm 1,2$; $11,2\pm 1,4$; $11,3\pm 1,5$; $F=0,1728$ $p=0,8432$) e a frequência relativa do tempo de permanência na parte clara da caixa ($47,9\pm 4,9\%$; $38,9\pm 2,9\%$; $47,8\pm 2,7\%$; $F=1,8830$ $p=0,1913$).

Fêmeas 60 dias F1

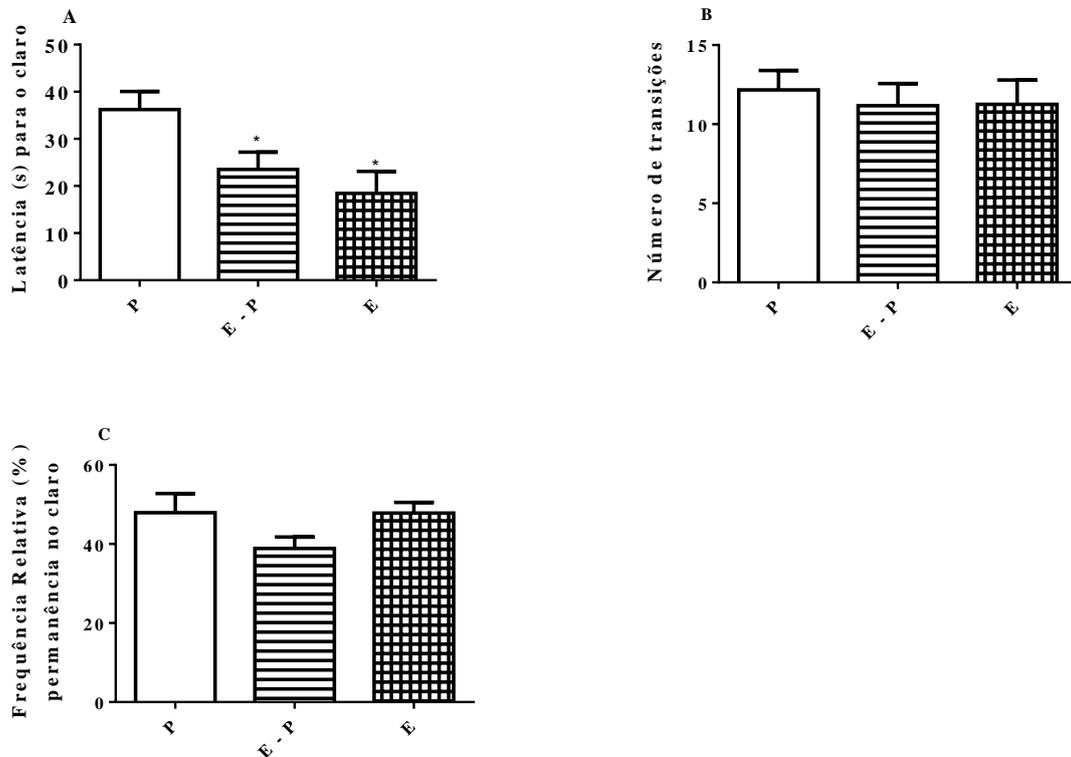


Figura 30: Comparação dos parâmetros utilizados para a análise do teste da caixa claro-escuro entre os grupos padrão (P), enriquecido – padrão (P-E) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias de F1, mães de F2. [A] Tempo de latência para explorar a parte clara do aparato de teste ($F=5,142$ e $p=0,0226$ - Comparações P vs E-P $p=0,0330$; P vs E $p=0,0106$; E-P vs E $p=0,4102$); [B] Número de transições entre os ambientes da caixa teste ($F=0,1728$ e $p=0,8432$); e [C] Frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa ($F=1,883$ e $p=0,1913$). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P.

Na segunda geração analisada, F2, também pudemos notar a diferença significativa no tempo de latência para a exploração do lado claro do aparato entre os grupos P, E-P e E nos machos (Figura 31 A) ($21,7\pm 2,6s$; $13,9\pm 2,0s$; $10,4\pm 1,6s$; $F=7,0310$ $p=0,0036$), não no número de transições ($10,4\pm 1,6$; $19,0\pm 1,8$; $16,0\pm 1,6$; $F=1,1110$ $p=0,3428$) nem na frequência relativa de permanência no lado claro da caixa ($43,6\pm 2,4\%$; $41,7\pm 2,3\%$; $47,9\pm 1,0\%$; $F=2,4100$ $p=0,1046$).

Machos 60 dias F2

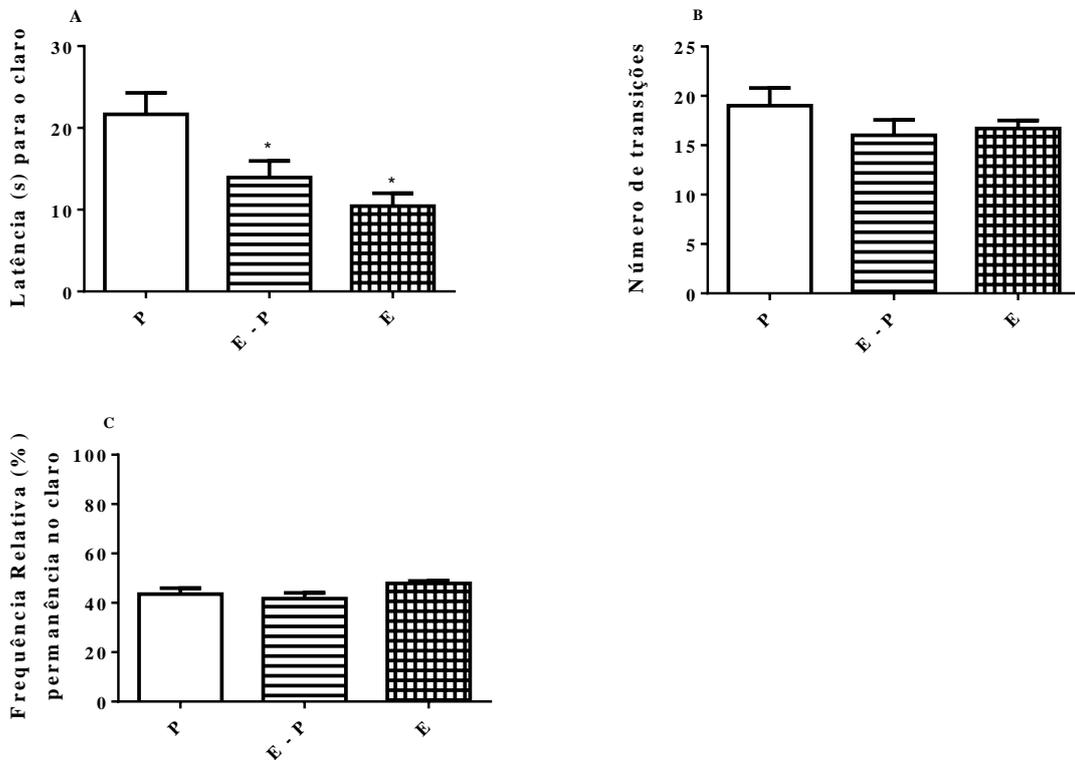


Figura 31: Comparação dos parâmetros utilizados para a análise do teste da caixa claro-escuro entre os grupos padrão (P), enriquecido – padrão (P-E) e enriquecimento (E) dos machos de 60 dias de F2. [A] Tempo de latência para explorar a parte clara do aparato de teste ($F=7,031$ e $p=0,0036$ - Comparações P vs E-P $p=0,0152$; P vs E $p=0,0010$; E-P vs E $p=0,2212$); [B] Número de transições entre os ambientes da caixa teste ($F=1,111$ e $p=0,3428$); e [C] Frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa ($F=2,410$ e $p=0,1076$). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P.

Os resultados encontrados para as fêmeas de F2 (Figura 32) mostram diferença significativa para a latência para o ambiente claro ($20,0 \pm 2,4s$; $12,0 \pm 2,5s$; $11,2 \pm 1,5s$; $F=4,8250$ $p=0,0219$) e o número de transições ($16,4 \pm 0,9$; $12,9 \pm 1,0$; $13,0 \pm 0,8$; $F=5,2110$ $p=0,0151$). Já a frequência relativa de permanência na parte claro do aparato não possui diferença significativa entre os grupos ($40,5 \pm 2,9\%$; $35,2 \pm 2,7\%$; $40,9 \pm 1,2\%$; $F=1,8810$ $p=0,1798$).

Fêmeas 60 dias F2

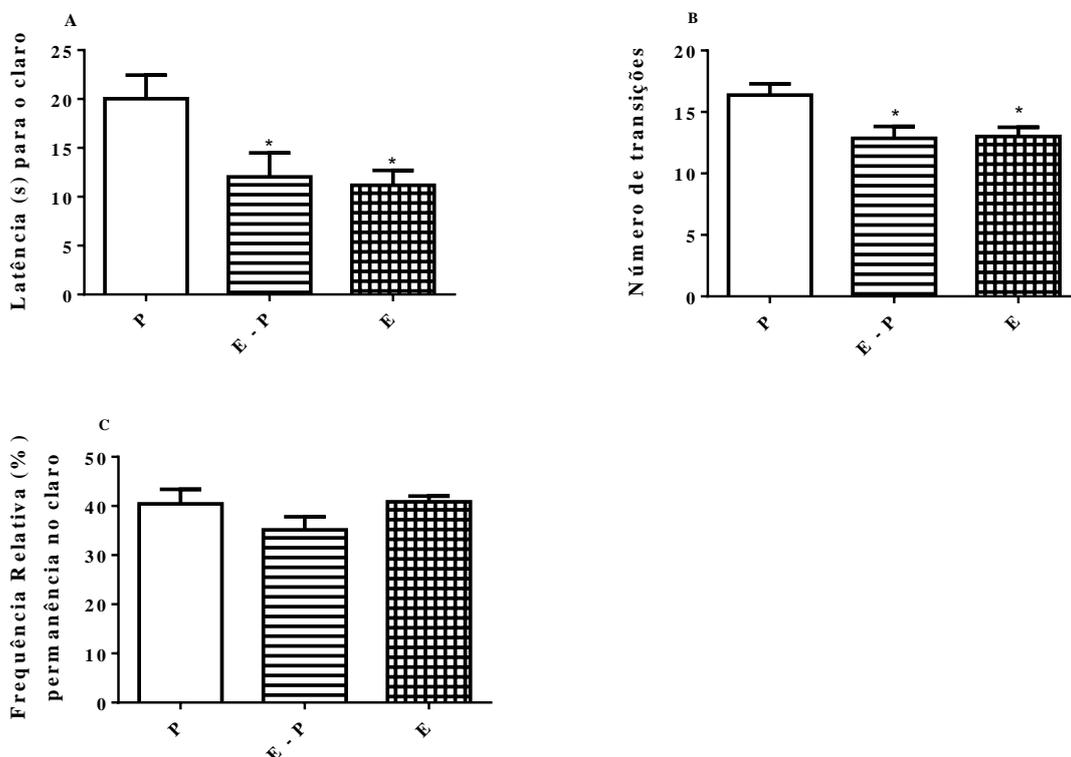


Figura 32: Comparação dos parâmetros utilizados para a análise do teste da caixa claro-escuro entre os grupos padrão (P), enriquecido – padrão (P-E) e enriquecimento (E) das fêmeas de 60 dias de F2. [A] Tempo de latência para explorar a parte clara do aparato de teste ($F=4,825$ e $p=0,0219$ - Comparações P vs E-P $p=0,0196$; P vs E $p=0,0111$; E-P vs E $p=0,7785$); [B] Número de transições entre os ambientes da caixa teste ($F=5,211$ e $p=0,0151$ - Comparações P vs E-P $p=0,0113$; P vs E $p=0,0118$; E-P vs E $p=0,9109$); e [C] Frequência relativa do tempo despendido na parte clara da caixa ($F=1,881$ e $p=0,1798$). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P.

Os resultados obtidos no teste da caixa claro-escuro nos mostram que tanto a exposição direta, quanto a indireta (grupo E-P) ao enriquecimento ambiental apresenta efeitos em relação a exploração do lado claro do aparato. Este fato se deve a atenuação dos comportamentos relacionados a ansiedade quando o animal é exposto ao enriquecimento ambiental.

5.1.5 Teste de supressão da alimentação pela novidade

Este modelo foi aplicado apenas nos animais da segunda geração (F2) buscando avaliar melhor o comportamento dos animais frente ao desafio de explorar um ambiente aversivo se alimentar. Nos machos há diferença significativa na latência para se alimentar do pellet de comida no centro da caixa entre os grupos P, E-P e E (Figura 33 A) ($147,7 \pm 15,7s$; $101,4 \pm 8,8s$; $62,8 \pm 9,4s$; $F=13,0700$ $p=0,0001$), não havendo, portanto, diferença significativa na porcentagem relativa de perda de peso dos animais submetidos ao teste ($12,6 \pm 1,4\%$; $12,8 \pm 0,5\%$; $13,2 \pm 1,1\%$; $F=0,0957$ $p=0,9091$), na diferença de peso dos pellets de ração colocados na caixa teste antes e depois do teste, expressada em porcentagem ($1,0 \pm 0,1\%$; $1,2 \pm 0,2\%$; $1,3 \pm 0,1\%$; $F=0,6111$ e $p=0,5496$), nem na diferença de peso dos pellets de ração fornecidos aos animais ao final do teste, também em porcentagem ($2,9 \pm 0,3\%$; $2,7 \pm 0,5\%$; $2,7 \pm 0,5\%$; $F=0,0668$ e $p=0,9355$).

Machos 60 F2

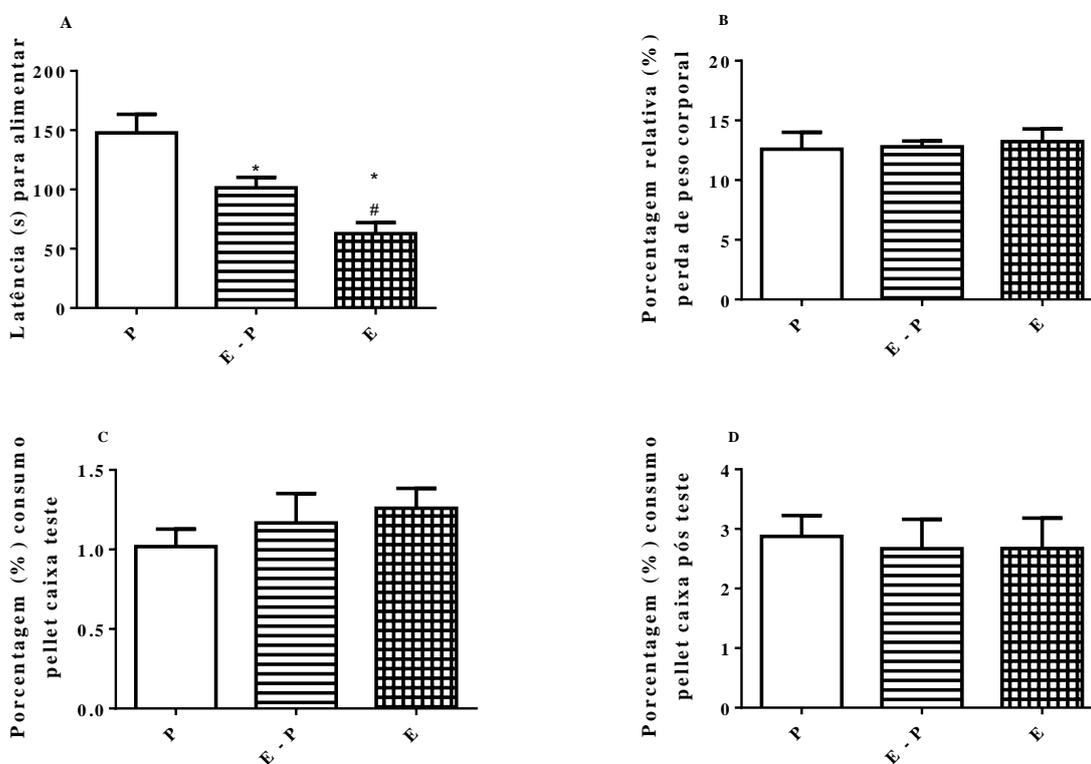


Figura 33: Comparação dos parâmetros analisados no teste de supressão da alimentação pela novidade entre os grupos padrão (P), enriquecimento-padrão (E-P) e enriquecimento (E) nos machos de F2. [A] Tempo em segundos para se alimentar do pellet de comida no centro da caixa teste (ANOVA $F=13,07$ e $p=0,0001$ – Comparações P vs E-P $p=0,0085$; P vs E $p<0,0001$; E-P vs E $p=0,0251$); [B] Porcentagem de perda de peso dos animais submetidos ao teste ($F=0,0956$ e $p=0,9091$); [C] Diferença de peso dos pellets de ração colocados na caixa teste antes e depois do teste ($F=0,6111$ e $p=0,5496$); e [D] Diferença de peso dos pellets de ração fornecidos aos animais ao final do teste ($F=0,0668$ e $p=0,9355$). * Diferença significativa em relação ao grupo P. # Diferença significativa em relação ao grupo E-P.

A como o encontrado para os machos de F2, os grupos experimentais de fêmeas em F2 apresentaram diferença significativa na latência para se alimentar do pellet de comida no centro da caixa (Figura 34 A) Figura 33 ($143,7\pm 11,4s$; $93,7\pm 20,4s$; $38,3\pm 5,3s$; $F=16,1900$ $p<0,0001$), não havendo, portanto, diferença significativa na porcentagem relativa de perda de peso dos animais submetidos ao teste ($12,2\pm 1,3\%$; $12,5\pm 0,8\%$; $10,2\pm 1,0\%$; $F=1,3610$ $p=0,2782$), na diferença de peso dos pellets de ração colocados na caixa teste antes e depois do teste, expressada em porcentagem ($1,2\pm 0,1\%$; $1,2\pm 0,2\%$; $1,5\pm 0,2\%$; $F=1,0570$ e $p=0,3652$), nem na diferença de peso dos pellets de ração fornecidos aos animais ao final do teste, também em porcentagem ($5,3\pm 1,1\%$; $4,7\pm 0,8\%$; $2,8\pm 0,7\%$; $F=1,9280$ e $p=0,1704$).

Fêmeas 60 dias F2

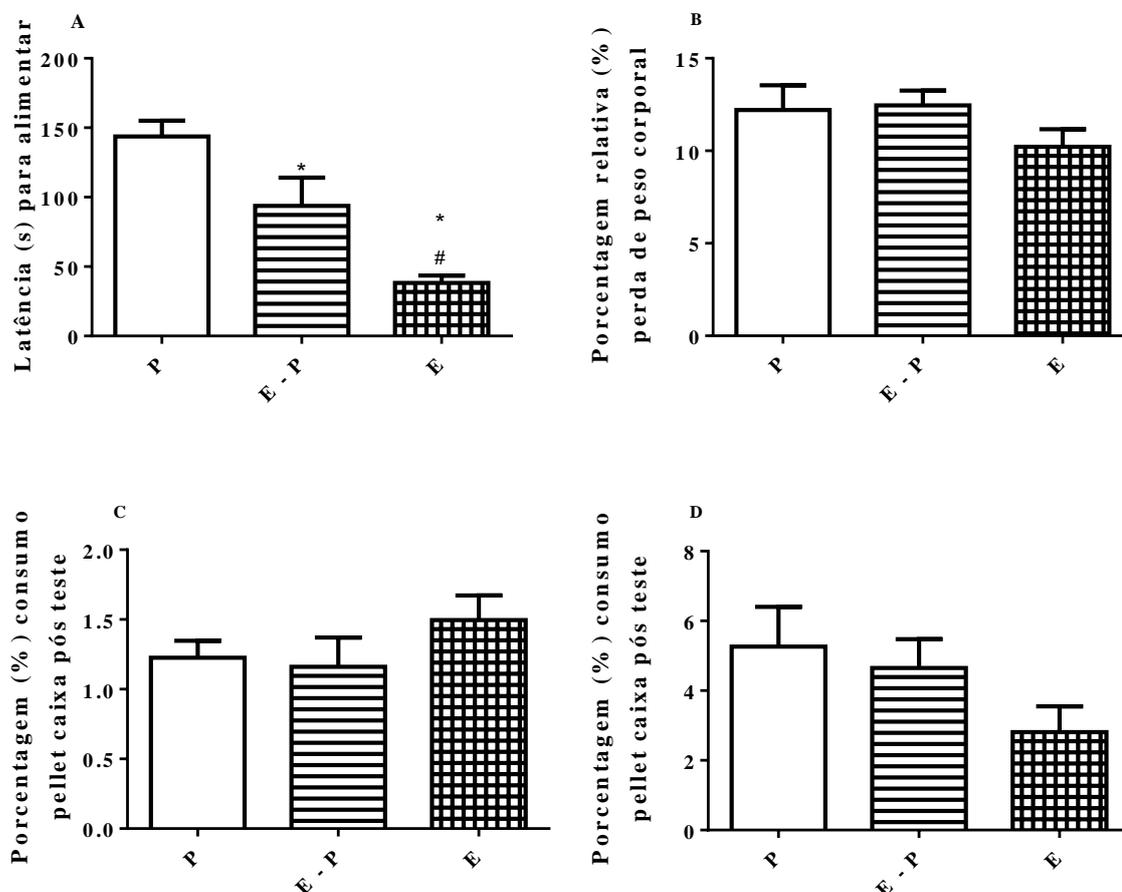


Figura 34: Comparação dos parâmetros analisados no teste de supressão da alimentação pela novidade entre os grupos padrão (P), enriquecimento-padrão (E-P) e enriquecimento (E) nas fêmeas de F2. [A] Tempo em segundos para se alimentar do pellet de comida no centro da caixa teste (ANOVA $F=16,19$ e $p<0,0001$ – Comparações P vs E-P $p=0,174$; P vs E $p<0,0001$; E-P vs E $p=0,0076$); [B] Porcentagem de perda de peso dos animais submetidos ao teste ($F=1,361$ e $p=0,2782$); [C] Diferença de peso dos pellets de ração colocados na caixa teste antes e depois do teste ($F=1,057$ e $p=0,3652$); e [D] Diferença de peso dos pellets de ração fornecidos aos animais ao final do teste ($F=1,928$ e $p=0,1704$). * Diferença significativa em relação ao grupo P. # Diferença significativa em relação ao grupo E-P.

Os resultados deste teste nos mostram que, assim como o teste da caixa claro-escuro, a exposição direta e/ou indireta ao enriquecimento ambiental possui efeito ansiolítico. Contudo, a diferença deste para o teste anterior é que a exposição indireta parece ter um efeito menor que a exposição direta.

5.2 Parâmetros Neuroendócrinos

5.2.1 Corticosterona

A análise estatística das dosagens de corticosterona dos machos com 60 dias (M60F1) da geração F1, não mostrou diferença significativa entre os grupos padrão (P) e enriquecido (E) ($80,5\pm 32,2\text{ng/ml}$; $98,3\pm 25,8\text{ng/ml}$; $p=0,6839$) (Figura 35).

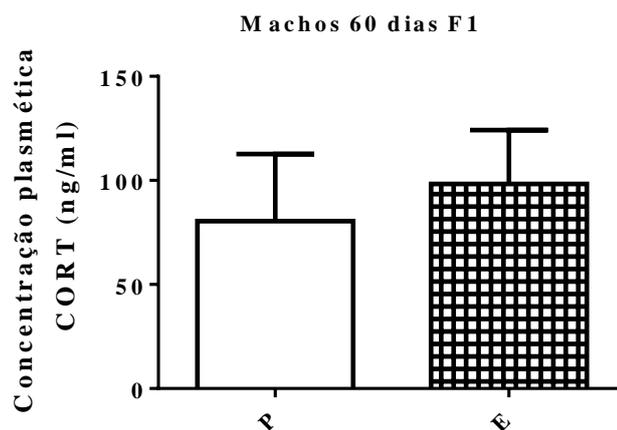


Figura 35: Comparação da concentração de corticosterona presente no plasma sanguíneo dos machos de 28 dias dos grupos padrão (P) e enriquecido (E) ($p=0,6839$).

Na geração F2, foi dosada a concentração de corticosterona nos machos de 60 dias (M60F2), tanto os machos que foram submetidos aos modelos comportamentais quanto os que não foram – 1 (Figura 36). Não houve diferença significativa entre os grupos padrão (P), enriquecido-padrão (E-P) e enriquecido (E) dos animais que passaram pelos testes ($43,4 \pm 8,1 \text{ ng/ml}$; $85,9 \pm 20,9 \text{ ng/ml}$; $52,8 \pm 9,3 \text{ ng/ml}$; $F=2,541$ e $p=0,0998$), nem dos animais que não passaram pelos testes ($46,3 \pm 9,1 \text{ ng/ml}$; $41,1 \pm 5,8 \text{ ng/ml}$; $37,0 \pm 6,2 \text{ ng/ml}$; $F=0,3920$ e $p=0,6813$).

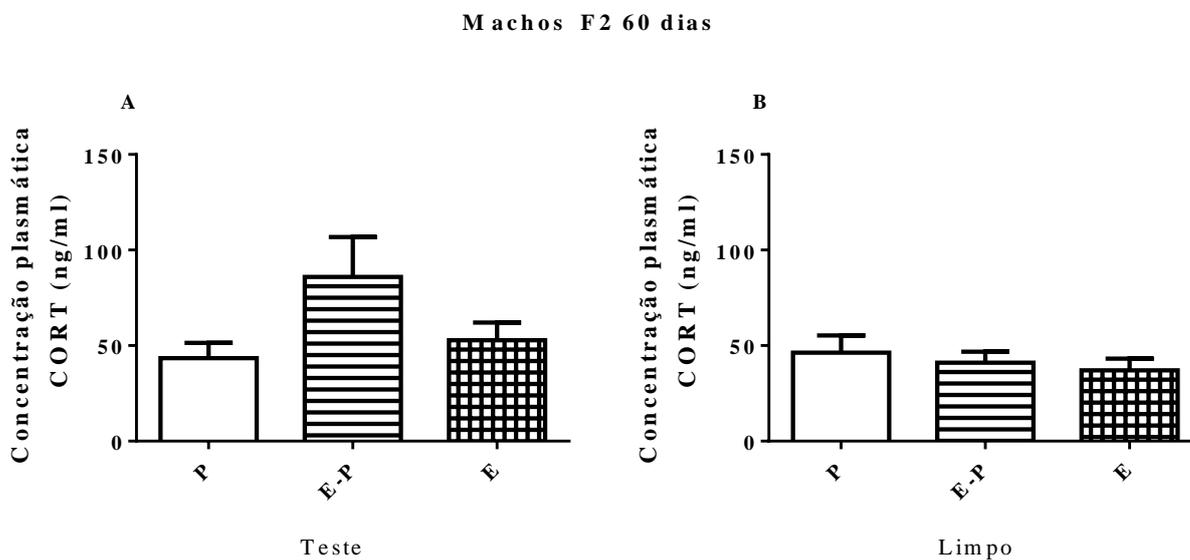


Figura 36: Comparação da concentração de corticosterona presente no plasma sanguíneo dos machos de 60 dias dos grupos padrão (P), enriquecido-padrão (E-P) e enriquecido (E). [A] Machos de 60 dias que passaram pelos testes ($F=2,541$ e $p=0,0998$); e [B] Machos de 60 dias limpos - que não passaram pelos testes ($F=0,3920$ e $p=0,06813$).

5.2.2 Análise da expressão de receptores

Os receptores 1 e 2 para CRH analisados a partir de amostra de material coletado da amígdala dos animais machos de 60 dias da geração F1 dos grupos padrão (P) e enriquecido

(E) tiveram a expressão gênica avaliada pelo método de RT-qPCR. Não foi encontrada diferença significativa para o CRH1 ($1,04 \pm 0,11$; $1,13 \pm 0,08$; $p=0,5135$) nem para o CRH2 ($0,41 \pm 0,10$; $0,49 \pm 0,06$; $p=0,5033$) (Figura 37).

Machos 60 dias F1

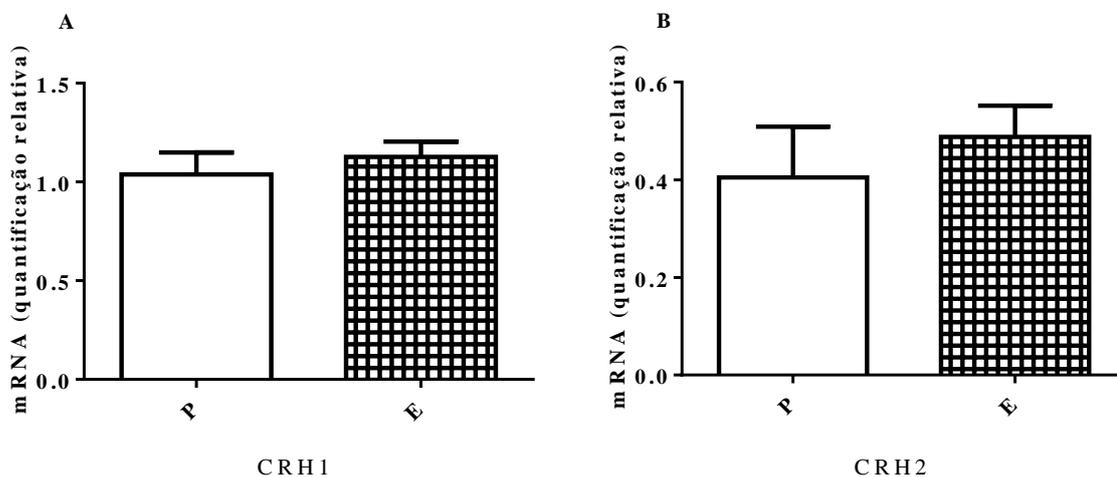


Figura 37: Valores dos níveis de mRNA em quantificação relativa pelo método de RT-PCR. [A] Comparação da expressão de mRNA de CRH1 entre os grupos padrão (P) e enriquecido (E) ($p=0,5135$); e [B] Comparação da expressão de mRNA de CRH2 entre os grupos padrão (P) e enriquecido (E) ($p=0,5033$).

A expressão dos receptores para vasopressina a partir de amostras coletada da amígdala dos animais machos de 60 dias da geração F1 dos grupos padrão (P) e enriquecido (E) também não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Para o receptor V1aR $p=0,5614$ ($1,02 \pm 0,11$; $0,94 \pm 0,10$) e V1bR $p=0,4397$ ($0,52 \pm 0,10$; $0,42 \pm 0,07$) (Figura 38).

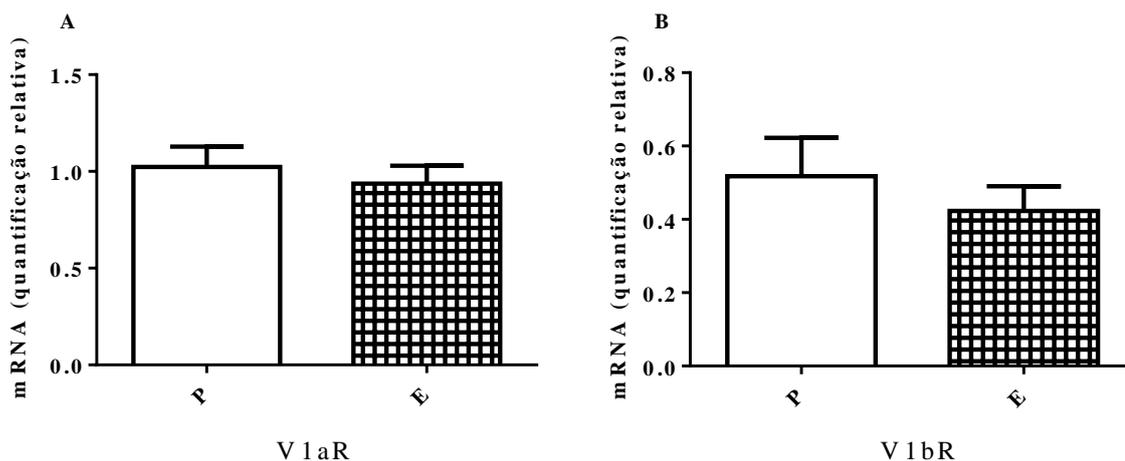


Figura 38: Valores dos níveis de mRNA em quantificação relativa pelo método de RT-PCR. [A] Comparação da expressão de mRNA de V1aR entre os grupos padrão (P) e enriquecido (E) ($p=0,5614$); e [B] Comparação da expressão de mRNA de V1bR entre os grupos padrão (P) e enriquecido (E) ($p=0,4397$).

Os receptores de ocitocina (OTR) não tiveram expressão detectável.

6 DISCUSSÃO

6.1 Modelos Comportamentais

6.1.1 Comportamento materno

Durante as primeiras análises comportamentais deste estudo foi verificado que os diferentes ambientes (padrão x enriquecido) não modificaram a frequência em que as fêmeas F0 estiveram no ninho. Tanto as fêmeas que criaram seus filhotes no ambiente padrão quando as que criaram no ambiente enriquecido apresentaram frequência relativa de NN (dentro no ninho) muito próximas, o que significa que as mães mantiveram contato com os filhotes por períodos semelhantes. Tal achado pode ser comparado ao que COUTELLIER et al (2008) obtiveram como resultado ao fornecerem dois ambientes diferentes a fêmeas para criarem seus filhotes. Estes autores propõem que a diferença nos ambientes não resultou em níveis menores de contato mãe-filhotes, e sim no estilo de cuidado.

Em nosso estudo, as fêmeas F0 apresentaram maior frequência relativa dos comportamentos maternos quando expostas ao ambiente enriquecido quando comparadas às fêmeas mantidas no ambiente padrão. Tal achado corrobora com os resultados de CHAMPAGNE; MEANEY (2007) que detectaram o aumento dos comportamentos de lambedura e *grooming* de fêmeas que apresentavam baixa frequência destes em ambiente padrão e ao serem colocadas em ambiente enriquecido aumentaram significativamente a exibição de tais comportamentos. Podemos inferir então, que nestas condições, o modelo de enriquecimento ambiental utilizado por nós, favorece o comportamento materno. Tal favorecimento pode se dar pela tentativa de imitar o ambiente natural de vida de um camundongo através do fornecimento de material para nidificação e esconderijos.

Nesta segunda fase do observação do comportamento materno, observação comportamental das fêmeas F1, foi possível observar que as fêmeas do grupo E apresentaram diferença estatisticamente significativa da frequência relativa dos registros de NN em comparação às fêmeas do grupo P e quando comparadas as frequências de NNC, não houve diferença significativa entre os grupos. Tais resultados não concordam com o observado na geração anterior, porém podem ser explicados pelo número reduzido de fêmeas pertencentes aos grupos. Enquanto na primeira geração observada os grupos possuíam em média 8 indivíduos, na geração F1 os grupos P e E-P tinham 6 animais e o E apenas 4. Consideramos este um tamanho amostral baixo para a análise estatística em estudos comportamentais, porém as condições durante o experimento, e o fato deste ter sido longo, não favoreceu o aumento da amostra.

Além da questão do tamanho amostral, as filmagens do grupo E ficou comprometida pelo próprio comportamento das fêmeas. Estas, ao ajeitarem os ninhos, encobriam as laterais da caixa com o material de forragem e dificultavam, e muitas vezes impossibilitaram, a filmagem e conseqüentemente o registro de seus comportamentos. Dessa forma, além de possuir o tamanho menor, o grupo E teve menos registros comportamentais.

Sendo assim, não poderemos fazer inferências sobre a influência do comportamento materno dos filhotes de F1 (F2) nos testes que visaram avaliar os comportamentos relacionados a ansiedade. O que será analisado a diante será a influência do ambiente em que os animais foram criados sobre seu desempenho nos modelos comportamentais.

6.1.2 Labirinto em cruz elevado

Os resultados encontrados para o modelo do labirinto em cruz elevada mostram que os animais criados no ambiente enriquecido apresentaram maior porcentagem relativa nos parâmetros relacionados a exploração dos braços abertos, tais como a frequência relativa de entradas e do tempo despendido nos braços abertos em todos os grupos testados (FF0, M28F1, M60F1, FF1, M60F2 E F60F2). Tais diferenças indicam que a exposição ao enriquecimento ambiental físico (modificação do ambiente em que os animais vivem) possui efeitos ansiolíticos, assim como o encontrado por CHAPILLON et al. (1999) e KULESSKAYA et al. (2011).

Não ter encontrado diferença significativa ente o grupo E-P e o P, pode ser um indicativo de que este teste não foi capaz de detectar algum possível efeito transgeracional do enriquecimento ambiental em comportamentos relacionados a ansiedade, embora seja usado como indicador de comportamentos relacionados a ansiedade em experimentos que avaliam o efeito transgeracional do enriquecimento ambiental (LI et al. 2016;).

6.1.3 Campo aberto

Tratamentos ansiogênicos tendem a aumentar o tempo de exibição de comportamentos de tigmotaxia, e ao contrário, tratamentos ansiolíticos tendem a diminuir o tempo de exibição deste comportamento diminuindo também o tempo em que animal passa explorando a periferia do campo aberto. Sendo assim, a diferença encontrada na porcentagem da distância percorrida no centro da arena por machos e fêmeas F2 do grupo E nos mostra o possível efeito ansiolítico da exposição ao enriquecimento ambiental.

O fato de apenas o grupo E da geração F2 apresentar maior porcentagem de distância percorrida no centro indica que o efeito ansiolítico medido por este teste só se dá após a exposição ao enriquecimento ambiental por toda a vida, já que estes animais viveram em ambiente enriquecido desde sua gestação.

PRUT; BELZUNG (2003) analisam o teste de campo aberto como um procedimento conveniente para avaliar comportamentos relacionados a ansiedade pois estes comportamentos são desencadeados ou mascarados por fatores geradores de estresse, como pelo fato do animal estar separado do seu grupo e por agorafobia (arena relativamente maior que o local onde o animal é criado). Em todos os casos, para a realização do teste, os animais foram separados momentaneamente de seu grupo, fator gerador de estresse para todos os grupos. Porém, no caso dos animais criados em ambiente enriquecido, o tamanho da arena não era maior que a caixa residência, portanto não houve a geração de estresse nos animais do grupo E ao se depararem com um ambiente novo, porém menor que suas caixas-residência. Então podemos inferir que efeito ansiolítico promovido pelo modelo de enriquecimento usado neste estudo possuiu efeito atenuador de estresse,

Não ter encontrado diferença significativa na distância total percorrida pelos animais no aparato de teste indica a não influência dos tipos de alojamento (padrão e enriquecido) na atividade locomotora dos grupos analisados. Segundo CHOLERIS et al. (2001), o teste do campo aberto é geralmente usado para avaliar se comportamentos não relacionados a ansiedade, como locomoção e sono, são afetados por tratamentos que possuem efeitos ansiolíticos em outras avaliações comportamentais de ansiedade, como por exemplo o labirinto em cruz elevada e o teste de transição claro-escuro (chamado de caixa claro-escuro em nosso estudo). Sendo assim, este resultado será importante para a posterior análise dos outros aparatos-teste.

6.1.4 Caixa claro-escuro

Os grupos que estiveram expostos ao enriquecimento ambiental tiveram menor latência para a exploração do ambiente novo, mesmo que este se mostrasse aversivo por conta da alta

luminosidade, em relação ao grupo criado em ambiente padrão. Assim como a exposição direta ao enriquecimento (grupo E), filhotes (grupo E-P) criados por mães que nasceram e permaneceram em ambiente enriquecido até o desmame (21 dias pós-natal) também apresentaram menor tempo de latência para explorar o ambiente claro em comparação ao grupo P. Estes resultados corroboram com o encontrado por SCHRIJVER et al. (2002), onde ratos criados em ambiente enriquecido tiveram um período curto de exploração do ambiente escuro, diminuindo a latência para explorar o ambiente claro pois segundo estes autores, animais criados em ambientes enriquecidos possuem um grau maior de rapidez para se adaptarem a condição teste. A menor latência para explorar o ambiente claro também foi encontrada por HUGHES; OTTO (2013) como resultado do efeito ansiolítico do enriquecimento ambiental para ratos.

O achado para o grupo EP da geração F2 sugere que a exposição perinatal das mães ao enriquecimento ambiental influenciou na resposta comportamental dos filhotes no teste. Mesmo estes animais não tendo sido expostos diretamente ao enriquecimento ambiental, sua resposta comportamental se assemelhou a dos animais expostos (grupo E). Resultado semelhante foi descrito por CURLEY et al (2009), onde filhotes de mães criadas em ambiente socialmente enriquecido, mesmo não tendo as mesmas condições, demonstraram ser menos ansiosos do que filhotes de mães criadas em ambiente padrão. Neste trabalho, os autores atribuem o resultado ao comportamento materno, o que não pode ser feito em nosso trabalho. Porém podemos inferir que, independentemente dos resultados do comportamento materno, o efeito ansiolítico do ambiente enriquecido durante o período perinatal das mães Fêmeas F1 (grupo E-P) permaneceu na geração seguinte.

6.1.5 Supressão da alimentação pela novidade

Neste teste pôde ser observada diferença entre os três grupos da geração F2. Houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos, sendo o grupo P o que apresentou a maior latência para se alimentar do pellet na caixa teste, seguido pelo grupo E-P e posteriormente o grupo E apresentando a menor latência. Assim sendo, podemos inferir que o grupo E possui o comportamento menos ansioso que o grupo E-P seguido pelo grupo P que se mostrou mais ansioso neste teste. RIAZ et al. (2015), em um experimento de estresse crônico moderado imprevisível, obtiveram resultados com maior latência para alimentação do grupo tratado quando comparado ao grupo controle. Vale salientar que protocolos de estresse crônico moderado aumentam comportamentos relacionados a ansiedade dos animais, assim como comportamentos relacionados a depressão (BONDI et al, 2008).

O conflito gerado entre comer e se expor a um ambiente novo e aversivo (iluminado) é o que faz com que os animais mais ansiosos tenham a maior latência para se alimentar. Em nossos resultados podemos observar que o ambiente iluminado foi um fator menos aversivo para os animais expostos ao enriquecimento direta ou indiretamente do que para aqueles criados em ambiente padrão. Estes resultados mostram que possivelmente houve um componente regulador de comportamentos relacionado a ansiedade que passou das fêmeas F1 para seus filhotes machos e fêmeas (F2).

6.2 Parâmetros Neuroendócrinos

6.2.1 Corticosterona

Pelos resultados obtidos para os machos de 60 dias, tanto de F1 quanto de F2, não houve diferença significativa na concentração de corticosterona presente no plasma sanguíneo destes animais. A exposição ao enriquecimento ambiental não alterou o padrão secretório deste hormônio e a exposição aos modelos comportamentais também não foi um fator influenciador.

Considerando a exposição aos modelos comportamentais um fator estressante, a expectativa seria o aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona nos animais que foram expostos a esta situação quando comparados aos animais não submetidos a testes. Porém, CROFTON; ZHANG; GREEN, (2015) argumentam que a corticosterona não pode ser considerada igual a estresse. Para os autores, este hormônio é liberado por uma série de eventos que não inclui estresse, como por exemplo ser secretada após estímulos de recompensa; pode ter seu padrão de secreção atenuado por estresse crônico; e respostas comportamentais a administração pura de corticosterona não mimetiza respostas ao estresse.

6.2.2 Análise da expressão de receptores

Considerando a importância da amígdala nas respostas de medo e ansiedade e a prévia demonstração que o enriquecimento ambiental pode reduzir a expressão do receptor CRH1 na amígdala tendo possível relação com seu efeito ansiolítico (SZTAINBERG et al., 2010). Assim como a influência do comportamento materno na ligação de receptores para ocitocina e V1a para vassopressina, sugerindo redução de sua expressão (FRANCIS et al., 2002) e o fato de que antagonistas de receptores v1b administrados na amígdala basolateral induzem efeito ansiolítico (SALOMÈ et al. 2006) resolvemos analisar a expressão destes receptores na amígdala. Nossos resultados demonstraram baixa expressão do receptor OTR na amígdala limitando a análise quantitativa. A análise da expressão dos receptores para CRH e AVP não indicou diferenças significativas entre os grupos analisados, desta forma não foi possível estabelecer uma correlação entre o efeito ansiolítico observado na análise comportamental e a alteração na expressão destes receptores. Uma limitação do nosso estudo foi o fato de analisarmos a expressão destes receptores na amígdala total. Estudos têm mostrado que diferentes manipulações influenciam expressão destes receptores, assim como suas funções podem estar relacionadas a áreas específicas da amígdala. Sendo a expressão de CRH1 reduzida pelo enriquecimento ambiental pós-natal na amígdala basolateral (SZTAINBERG et al., 2010, SOTNIKOV et al., 2014) e central, mas não na amígdala lateral e medial (SOTNIKOV et al., 2014). Da mesma forma a injeção de SSR149415 (antagonista do receptor V1b) na amígdala basolateral induziu efeito ansiolítico em ratos, não sendo este fenômeno observado quando a injeção era realizada na amígdala medial ou central (SALOMÈ et al. 2006). Por outro lado, foi demonstrada uma alta expressão de receptores OTR na amígdala central (HUBER; VEINANTE; STOOP, 2005), sendo que a injeção de ocitocina diretamente nesta região induz efeito ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado, sendo este efeito revertido por antagonistas do receptor OTR (LÁSZLÓ et al., 2016). Em nosso estudo não observamos uma expressão significativa da expressão de OTR, o que provavelmente poderia ser explicado pela análise da expressão na amígdala global, visto que a amígdala central compreende uma pequena parcela da mesma. Desta forma, considerando os resultados obtidos, será necessário um estudo diferencial da expressão destes receptores nas diferentes áreas da amígdala para confirmação destes resultados.

7 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que o modelo de enriquecimento ambiental utilizado foi eficiente em diminuir comportamentos relacionados a ansiedade tanto em animais expostos ao enriquecimento no período perinatal (M28F1-grupo E e F60F1-grupo E-P) quanto em animais expostos durante toda a vida (M60F1-grupo E, F60F1-grupo E, M60F2-grupo E, F60F2-grupo E). Assim como também foi eficiente para animais que não foram expostos diretamente ao enriquecimento (M60F2-grupo E-P, F60F2-grupo E-P). Para este último grupo podemos sugerir que tal fato se deve a um efeito transgeracional do enriquecimento. O efeito ansiolítico não parece estar relacionado a alterações na expressão dos receptores para peptídeos hipotalâmicos analisados.

O efeito transgeracional foi observado mesmo não tendo diferença no comportamento materno entre os grupos F60F1. Este resultado contraria os achados de CHAMPAGNE; MEANEY (2007) que atribuem o comportamento menos ansioso da prole ao elevado comportamento materno das mães. Porém podemos ressaltar que a exposição perinatal ao enriquecimento tanto teve efeito em seu comportamento frente aos testes de ansiedade, quanto o de seus filhotes que não foram criados em ambiente enriquecido. Sobre o efeito transgeracional, BALE (2015) diz que este acontece após a modificação epigenética envolvida no neurodesenvolvimento e maturação após experienciadas situações em períodos chave (durante a fase inicial ou tardia da gestação) que irão reprogramar o epigenoma e se incorporados as células germinativas.

Para futuros estudos é sugerido que sejam feitas análises de marcadores epigenéticos para confirmar que o efeito encontrado no grupo E-P de M60F2 e F60F2 seja realmente advindo da incorporação de mudanças no epigenoma das mães.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APA. 2013. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. In: Association, A.P. (Ed.), Washington DC.

ASHOKAN, A.; HEGDE, A.; MITRA, R. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. **Psychoneuroendocrinology**, v. 69, p. 189-196, 7// 2016.

BABENKO, O.; KOVALCHUK, I.; METZ, G.A. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 48, p. 70-91. 2015.

BAHR, N.I.; PALME, R.; MOHLE, U.; HODGES, J.K.; HEISTERMANN, M. Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. **General and comparative endocrinology**, v. 117, p. 427-438. 2000.

BALE, T.L.; VALE, W.W. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 44, p. 525-557. 2004.

BALE, T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 16, p. 332-344. 2015.

BARLOW, J.; COREN, E.; STEWART-BROWN, S. Parent-training programmes for improving maternal psychosocial health. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4 2003

BAYERL, D.S.; HÖNIG, J.N.; BOSCH, O.J. Vasopressin V1a, but not V1b, receptors within the PVN of lactating rats mediate maternal care and anxiety-related behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 305, p. 18-22. 2016.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental Approaches to the Biology of Emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, p. 43-68. 1988.

BLOOMSMITH, M. A., BRENT, L. Y. & SCHAPIRO, S. J. Guidelines for developing and managing an environmental enrichment program for nonhuman-primates. **Laboratory Animal Science**, v. 41, p. 372-7. 1991

BOERE, V. Environmental enrichment for neotropical primates in captivity. **Ciência Rural**, v. 31, p. 543-551. 2001.

BONDI, C.O.; RODRIGUEZ, G.; GOULD, G.G.; FRAZER, A.; MORILAK, D.A. Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 320-331. 2008.

BOURIN, M.; HASCOET, M. The mouse light/dark box test. **European journal of pharmacology**, v. 463, p. 55-65. 2003.

BRANCHI, I.; D'ANDREA, I.; SIETZEMA, J.; FIORE, M.; DI FAUSTO, V.; ALOE, L.; ALLEVA, E. Early social enrichment augments adult hippocampal BDNF levels and survival of BrdU-positive cells while increasing anxiety- and "depression"-like behavior. **Journal of neuroscience research**, v.83, p. 965-973. 2006.

BRANDÃO, M.L. Comportamento Emocional. In Brandão, M.L (Eds) **Psicofisiologia**, Belo Horizonte : Editora Atheneu P 105-126. 1995,

BRANDÃO, M.L., As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 124-124. 2005.

BRENES SAENZ, J.C.; VILLAGRA, O.R.; FORNAGUERA TRIAS, J. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. **Behavioural brain research**, v. 169, p. 57-65. 2006.

BRUNTON, P.J. E RUSSELL, J.A., The expectant brain: adapting for motherhood. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 11-25. 2008.

CALDJI, C.; DIORIO, J.; MEANEY, M.J. Variations in maternal care alter GABA(A) receptor subunit expression in brain regions associated with fear. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 1950-1959. 2003.

CALDJI, C.; TANNENBAUM, B.; SHARMA, S.; FRANCIS, D.; PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 5335-5340. 1998.

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

CASTRO, V.L. 2006. Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos a Agroquímicos. **Documentos eletrônicos - Embrapa Meio Ambiente 13** (http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMA/7465/1/circular_13.pdf - acessado em 05/04/2016)

CHAMPAGNE, F.; DIORIO, J.; SHARMA, S.; MEANEY, M.J. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 12736-12741. 2001.

CHAMPAGNE, F.A.; FRANCIS, D.D.; MAR, A.; MEANEY, M.J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology e behavior**, v. 79, p. 359-371. 2003.

CHAMPAGNE, F.A.; MEANEY, M.J. Transgenerational effects of social environment on variations in maternal care and behavioral response to novelty. **Behavioral neuroscience**, v. 121, p. 1353-1363. 2007

CHAPILLON, P.; MANNECHE, C.; BELZUNG, C.; CASTON, J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. **Behavior genetics**, v. 29, p. 41-46. 1999.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlórdiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and bibehavioral reviews**, v. 25, p. 235-260. 2001.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.11-23. 2007

COUTELLIER, L.; FRIEDRICH, A.C.; FAILING, K.; MARASHI, V.; WURBEL, H. Effects of rat odour and shelter on maternal behaviour in C57BL/6 dams and on fear and stress responses in their adult offspring. **Physiology e behavior**, v. 94, p. 393-404. 2008.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 13, p. 167-170. 1980.

CROFTON, E.J.; ZHANG, Y.; GREEN, T.A. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. **Neuroscience e Bibehavioral Reviews**, v. 490 p. 19-31. 2015

CROPLEY, J.E.; DANG, T.H.; MARTIN, D.I.; SUTER, C.M. The penetrance of an epigenetic trait in mice is progressively yet reversibly increased by selection and environment. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 279 (1737), p. 2347-2353. 2012.

CURLEY, J.P.; DAVIDSON, S.; BATESON, P.; CHAMPAGNE, F.A. Social enrichment during postnatal development induces transgenerational effects on emotional and reproductive behavior in mice. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 3, p. 25. 2009.

DARNAUDÉRY, M.; MACCARI, S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. **Brain Research Reviews**, v. 57(2), p. 571-585. 2008.

FOSTER, T.C.; DUMAS, T.C. Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience. **Journal of neurophysiology**, v. 85, p. 1377-1383. 2001.

FOX, C.; MERALI, Z., HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural brain research**, v. 175, p. 1-8. 2006.

FRANCIS, D.D.; YOUNG, L.J.; MEANEY, M.J.; INSEL, T.R. Naturally occurring differences in maternal care are associated with the expression of oxytocin and vasopressin (V1a) receptors: gender differences. **Journal of neuroendocrinology**, v. 14(5), p. 349-353. 2002.

FRANCIS, D.; DIORIO, J.; LIU, D.; MEANEY, M.J. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, v. 286, p. 1155-1158. 1999.

FRANKLIN, T.B.; RUSSIG, H.; WEISS, I.C.; GRAFF, J.; LINDER, N.; MICHALON, A.; VIZI, S.; MANSUY, I.M. Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. **Biological psychiatry**, v.68, p. 408-415. 2010.

GRAEFF, F.G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, S3-6. 2007.

GRAY, M.; INNALA, L.; VIAU, V. Central vasopressin V1A receptor blockade alters patterns of cellular activation and prevents glucocorticoid habituation to repeated restraint stress exposure. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17(12), p. 2005-2015. 2014.

GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system**. Oxford University Press, Oxford. 2003.

HAEMISCH, A.; VOSS, T.; GARTNER, K. Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. **Physiology e behavior**, v. 56, p. 1041-1048. 1994.

HERMAN, J.P.; CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in neurosciences**, v. 20(2), p. 78-84. 1997.

HERNANDO, F.; SCHOOTS, O.; LOLAIT, S.J.; BURBACH, J.P.H. Immunohistochemical Localization of the Vasopressin V1b Receptor in the Rat Brain and Pituitary Gland: Anatomical Support for Its Involvement in the Central Effects of Vasopressin. **Endocrinology**, v. 142(4), p. 1659-1668. 2001

HONESS, P.E.; MARIN, C.M.; Behavioural and physiological aspects of stress and aggression in nonhuman primates. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v.30, p. 390-412. 2006.

HUBER, D.; VEINANTE, P.; STOOP, R. 2005. Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. **Science**, v. 308(5719), p. 245-248.

HUGHES, R.N.; OTTO, M.T. Anxiolytic effects of environmental enrichment attenuate sex-related anxiogenic effects of scopolamine in rats. **Progress in neuro-psychopharmacology e biological psychiatry**, v.40, p. 252-259. 2013.

HUOT, R.L.; GONZALEZ, M.E.; LADD, C.O.; THRIVIKRAMAN, K.V.; PLOTSKY, P.M. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29(2), p. 279-289. 2004

ICKES, B.R.; PHAM, T.M.; SANDERS, L.A.; ALBECK, D.S.; MOHAMMED, A.H.; GRANHOLM, A.C. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Experimental neurology**, v. 164, p. 45-52. 2000.

JABLONKA, E.; RAZ, G. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. **The Quarterly review of biology**, v. 84(2), p. 131-176. 2009.

JAROENPORN, S.; NAGAOKA, K.; OHTA, R.; WATANABE, G.; TAYA, K. 2009. Prolactin induces phosphorylation of the STAT5 in adrenal glands of Hatano rats during stress. **Life sciences**, v. 85, p. 172-177.

JOELS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 459-466, 06. 2009.

KVETNANSKY, R.; SABBAN, E.L.; PALKOVITS, M. Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 535-606. 2009.

LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A.H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 73, p. 193-207. 2002.

LASZLO, K.; KOVACS, A.; ZAGORACZ, O.; OLLMANN, T.; PECZELY, L.; KERTES, E.; LACY, D. G.; LENARD, L. Positive reinforcing effect of oxytocin microinjection in the rat central nucleus of amygdala. **Behavior Brain Research**, v. 296, p. 279-285. 2016.

LISTER, R.G. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92, p. 180-185.

LOW M. J. Neuroendocrinology In **Williams Textbook Of Endocrinology**, Eds.Melmed, Shlomo Williams, Robert Hardin Edition: 12th Ed. United States Philadelphia : Elsevier/Saunders. 2001

MARASHI, V.; BARNEKOW, A.; OSSENDORF, E.; SACHSER, N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. **Hormones and behavior**, v. 43, p. 281-292. 2003

MARTIN, P. Animal models sensitive to anti-anxiety agents. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 98, p. 74-80. 1998.

MASHOODH, R.; FRANKS, B.; CURLEY, J.P.; CHAMPAGNE, F.A. Paternal social enrichment effects on maternal behavior and offspring growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109(2), p. 17232-17238. 2012.

MCEWEN, B.S. Steroid hormones: effect on brain development and function. **Hormone research**, v. 37(3), p. 1-10. 1992.

MEANEY, M.J.; DIORIO, J.; FRANCIS, D.; LAROCQUE, S.; O'DONNELL, D.; SMYTHE, J.W.; SHARMA, S.; TANNENBAUM, B. Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. The role of serotonin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, p. 260-273; discussion 274, 289-293. 1994.

MONCEK, F.; DUNCKO, R.; JOHANSSON, B.B.; JEZOVA, D. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. **Journal of neuroendocrinology**, v. 16, p. 423-431. 2004.

MORLEY-FLETCHER, S.; REA, M.; MACCARI, S.; LAVIOLA, G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HHA axis reactivity in rats. **The European journal of neuroscience**, v. 18, p. 3367-3374. 2003.

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

PANG, T.Y.; DU, X.; CATCHLOVE, W.A.; RENOIR, T.; LAWRENCE, A.J.; HANNAN, A.J. Positive environmental modification of depressive phenotype and abnormal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in female C57BL/6J mice during abstinence from chronic ethanol consumption. **Frontiers in Pharmacology**, v.4 2013.

PENNY, D. Epigenetics, Darwin, and Lamarck. **Genome Biology and Evolution**, v. 7(6), p.1758-1760. 2015.

PHAM, T.M.; ICKES, B.; ALBECK, D., SODERSTROM, S.; GRANHOLM, A.C.; MOHAMMED, A.H. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. **Neuroscience**, v. 94, p. 279-286. 1999.

PREISER, J.C.; ICHAI, C.; ORBAN, J.C.; GROENEVELD, A.B.J. Metabolic response to the stress of critical illness. **British Journal of Anaesthesia**, v. 113(6), p. 945-954. 2014.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463(1-3), p. 3-33. 2003.

RICHARDS, E.J. Inherited epigenetic variation [mdash] revisiting soft inheritance. **Nature Reviews Genetics**, v. 7(5), p. 395-401. 2006.

ROCHA, F.F.; ALMEIDA, C.S.; SANTOS, R.T.D.; SANTANA, S.A.; COSTA, E.A.; PAULA, J.R.D.; VANDERLINDE, F.A.; Anxiolytic-like and sedative effects of *Hydrocotyle umbellata* L., Araliaceae, extract in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 115-120. 2011.

RODGERS, R.J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 21, p. 801-810. 1997.

ROY, V.; BELZUNG, C.; DELARUE, C.; CHAPILLON, P. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiology e behavior**, v. 74, p. 313-320. 2001.

ROY, V.; MERALI, Z.; POULTER, M.O.; ANISMAN, H. Anxiety responses, plasma corticosterone and central monoamine variations elicited by stressors in reactive and nonreactive mice and their reciprocal F1 hybrids. **Behavioural brain research**, v. 185, p. 49-58. 2007.

SALOME, N.; STEMMELIN, J.; COHEN, C.; GRIEBEL, G. Differential roles of amygdaloid nuclei in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of the V1b receptor antagonist, SSR149415, in rats. **Psychopharmacology**, v. 187(2), p. 237-244. 2006.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A.; BATTAGLIA, F.; DULAWA, S.; WEISSTAUB, N.; LEE, J.; DUMAN, R.; ARANCIO, O.; BELZUNG, C.;

HEN, R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v.301, p. 805-809. 2003.

SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C.; MCEWEN, B.S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. **Endocrine reviews**, v. 7, p. 284-301. 1986.

SAYERS, J. The world health report 2001 — Mental health: new understanding, new hope. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, p. 1085-1085. 2001.

SCHRIJVER, N.C.; BAHR, N.I.; WEISS, I.C.; WURBEL, H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HHA activity in adult rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 73, p. 209-224. 2002.

SHEPHERDSON, D. J. Tracing the Path of Environmental Enrichment in Zoos, p.1-12. In: Sheperdson, D., Mellen J.D., Hutchins M. (Eds.). **Second Nature. Environmental Enrichment for Captive Animals**. Washington D.C. , Smithsonian Institution. 312 p. 1998.

SKINNER, M.K. GUERRERO-BOSAGNA, C.; HAQUE, M.; NILSSON, E.; BHANDARI, R.; MCCARREY, J. R. Environmentally induced transgenerational epigenetic reprogramming of primordial germ cells and the subsequent germ line. **PloS one**, v. 8(7). 2013.

SOTNIKOV, S. V.; CHEKMAREVA, N. Y.; SCHMID, B.; HARBICH, D.; MALIK, V.; BAUER, S.; KUEHNE, C.; MARKT, P. O.; DEUSSING, J. M.; SCHMIDT, M. V.; LANDGRAF, R. Enriched environment impacts trimethylthiazoline-induced anxiety-related behavior and immediate early gene expression: critical role of Crhr1. **European Journal of Neuroscience**, v. 40(4), p. 2691-2700. 2014

SZTAINBERG, Y.; KUPERMAN, Y.; TSOORY, M.; LEBOW, M.; CHEN, A. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. **Molecular Psychiatry**, v. 15(9), p. 905-917. 2010.

ULRICH-LAI, Y.M.; HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, p. 397-409. 2009.

VAN HASSELT, F.N.; DE VISSER, L.; TIESKENS, J.M.; CORNELISSE, S.; BAARS, A.M.; LAVRIJSEN, M.; KRUGERS, H.J.; VAN DEN BOS, R.; JOELS, M. Individual variations in maternal care early in life correlate with later life decision-making and c-fos expression in prefrontal subregions of rats. **PloS one**, v. 7, 2012.

WEAVER, I.C.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F.A.; D'ALESSIO, A.C.; SHARMA, S.; SECKL, J.R.; DYMOV, S.; SZYF, M.; MEANEY, M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, p. 847-854. 2004.

WEISER, M.J.; OSTERLUND, C.; SPENCER, R.L. Inhibitory effects of corticosterone in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) on stress-induced adrenocorticotrophic hormone secretion and gene expression in the PVN and anterior pituitary. **Journal of neuroendocrinology**, v. 23, p. 1231-1240. 2011.

WELBERG, L.; THRIVIKRAMAN, K.V.; PLOTSKY, P.M. Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HHA axis differentially in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, p. 553-564. 2006.

YANG, M.; OZTURK, E.; SALZBERG, M.R.; REES, S.; MORRIS, M.; O'BRIEN, T.J.; JONES, N.C. Environmental enrichment delays limbic epileptogenesis and restricts pathologic synaptic plasticity. **Epilepsia**, v. 57(3), p. 484-494. 2016.