

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

TESE

**Enriquecimento ambiental perinatal, seu impacto
sobre o comportamento análogo à ansiedade e
implicações transgeracionais.**

Cláudio da Silva Almeida

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**

**ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PERINATAL, SEU IMPACTO
SOBRE O COMPORTAMENTO ANÁLOGO À ANSIEDADE E
IMPLICAÇÕES TRANSGERACIONAIS.**

CLÁUDIO DA SILVA ALMEIDA

Sob a Orientação do Professor
Fábio Fagundes da Rocha

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

Seropédica, RJ
Julho de 2016

636.08968

A447e

T

Almeida, Cláudio da Silva, 1984-

Enriquecimento ambiental perinatal, seu impacto sobre o comportamento análogo à ansiedade e implicações transgeracionais / Cláudio da Silva Almeida. - 2016.

87 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. 75-87.

1. Animais - Doenças - Teses. 2. Ansiedade - Teses. 3. Animais - Comportamento - Teses. 4. Enriquecimento ambiental (criação de animais) - Teses. 5. Influências pré-natais - Teses. 6. Camundongos - Teses. I. Rocha, Fábio Fagundes da, 1975- 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

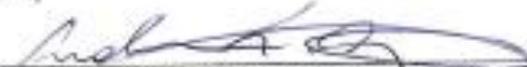
CLÁUDIO DA SILVA ALMEIDA

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.

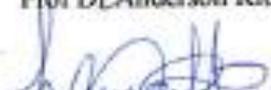
TESE APROVADA EM 27.07.2016



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



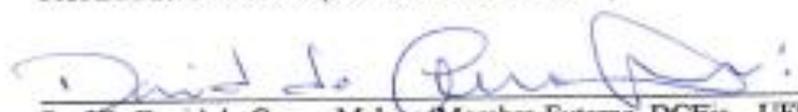
Prof Dr Anderson Ribeiro Carvalho (Membro Externo – UERJ)



Prof Dr Luis Carlos Reis (Membro Interno – UFRRJ)



Prof Dr Pablo Pandolfo (Membro Externo – UFF)



Prof Dr David do Carmo Malvar (Membro Externo, DCFis – UFRRJ)

DEDICATÓRIA

Dedico a meu Pai, Vicente Bastos de Almeida (1945-2012†) in memoriam, minha Mãe, Maria Eunice da Silva Almeida, Minha irmã, Eulina, Meu irmão Carlos e minhas Sobrinhas: Isabel, Carol e Sophia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo que fez por mim tanto neste período de doutorado quanto em todo resto da minha vida, e por me dar forças para buscar o que eu julgava inalcançável.

À minha Família por todo amor.

Ao Meu Orientador Fábio Fagundes da Rocha, por todos os ensinamentos, ajuda, direcionamento e contribuição desenvolvimento do meu senso crítico científico.

A Roberto Laureano Melo, por sempre discordar de mim, mostrando outros pontos de vista e colaborando para meu desenvolvimento como pesquisador.

A Raphaelau Lau, por ser meu braço direito no trabalho.

A Alex Sander Nunes, por toda a dedicação no trabalho.

Aos Professores Wellington Côrtes, Professores Luís Carlos Reis e André de Souza Mecawi pelos ensinamentos e apoio

Aos Técnicos Raquel Souza, Ipojucan e por todo apoio

Aos alunos: Ana Paula, Ayda Scheneider, Bruna Sbano, César Rafael, Evandro Valentin, Damáris Felix, Fernando Seara, Jéssica Corrêa, Jéssica Lima, Lívia Monteiro, Lilian, Marissa Carvalho, Phelipe Fontanezi, Poliana, Rafael Sonoda, Raoni, Rodrigo Rodrigues, Rômulo Aguiar, Wellington Vilela, Wallace Viana.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As agências de fomento: Capes, CNPQ e Faperj pelo suporte financeiro.

RESUMO

ALMEIDA C. S. Enriquecimento ambiental perinatal, seu impacto sobre comportamento análogo à ansiedade e implicações transgeracionais. Seropédica. 2016. Transtornos de ansiedade são condições psiquiátricas de alta prevalência na população e que promovem grande sofrimento aos pacientes acometidos. Estas doenças não tem etiologia completamente compreendida, mas é sabido que fatores ambientais e genéticos estão envolvidos. Por conta disso, realizamos estudos para avaliar se um ambiente mais complexo poderia impactar sobre o comportamento análogo a ansiedade de camundongos, e se estes efeitos comportamentais poderiam ser transferidos a próxima geração. Para realizar este estudo, fêmeas de camundongo no momento da cópula foram colocadas em ambiente padrão ou enriquecido, e permaneceram com suas proles nos respectivos ambientes até o desmame. Sendo assim, os animais da geração F1 tiveram duas condições experimentais: vida perinatal em ambiente padrão (AP) ou enriquecimento ambiental perinatal (AE). Após o desmame, todos os animais da geração F1 permaneceram em ambiente padrão. Quando os animais atingiram a maturidade tiveram o comportamento análogo à ansiedade avaliado. Para produzir a geração F2, fêmeas criadas apenas em ambiente padrão foram acasaladas com outros machos da geração F1, sendo machos AP dando origem ao grupo AP + AP ou machos AE dando origem ao grupo AE + AP, sendo que todos os animais da geração F2 foram mantidos em ambiente padrão. Quando os animais da geração F2 atingiram a maturidade, também tiveram seu comportamento análogo à ansiedade avaliado. A análise estatística de todo o estudo foi feita através de teste t de Student. Os resultados obtidos na geração F1 foram os seguintes: os machos AE apresentaram aumento da distância percorrida em metros ($15,5 \pm 1,1$) vs. ($11,7 \pm 1,0$) e de comportamentos de exploração vertical ($46,6 \pm 3,8$) vs. ($33,3 \pm 3,4$) no teste do campo aberto. Aumento nas porcentagens de tempo despendido ($31,2 \pm 3,7$) vs. ($13,2 \pm 5,2$) e de entradas nos braços abertos ($41,8 \pm 4,5$) vs. ($23,6 \pm 6,6$), redução de comportamentos de avaliação de risco ($15,3 \pm 2,1$) vs. ($27,5 \pm 2,9$) e aumento nas entradas nos braços fechados ($14,5 \pm 1,5$) vs. ($8,6 \pm 1,1$) no teste do labirinto em cruz elevado. No teste da caixa claro-escuro apresentaram aumento de transições ($20,2 \pm 3,7$) vs. ($10,9 \pm 2,1$), quadrantes percorridos no lado claro ($55,4 \pm 9,5$) vs. ($28,3 \pm 5,0$) e de comportamentos de exploração vertical ($5,8 \pm 1,5$) vs. ($2,1 \pm 0,8$). Já na geração F2, os machos AE + AP não apresentaram aumento da distância percorrida em metros no teste do campo aberto ($11,0 \pm 0,7$) vs. ($13,6 \pm 1,0$). Aumento da porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos ($25,7 \pm 4,3$) vs. ($9,3 \pm 3,1$) e redução nos comportamentos de avaliação de risco ($10,7 \pm 1,3$) vs. ($21,3 \pm 2,3$) no teste do labirinto em cruz elevado. Portanto, conclui-se que o enriquecimento ambiental perinatal promove efeitos ansiolíticos e de maior atividade exploratória em camundongos machos, e este efeito ansiolítico é parcialmente transferido apenas para descendentes machos dos reprodutores do grupo AE.

Palavras chave: Ansiedade, transmissão transgeracional, camundongos.

ABSTRACT

ALMEIDA C. S. Perinatal environmental enrichment, impacts on anxiety-like behavior and transgenerational implications. *Seropédica*. 2016. Anxiety disorders are psychiatric conditions that promote great suffering in affected patients. The etiology of these diseases is not completely understood, but is known that environmental and genetic factors are involved. Because of this, we performed studies to evaluate if a more complex environment can impact in mice anxiety-like behavior, and if these behaviors effects are transfer to next generation. To perform this study, female mice at the copulation were placed in standard or enriched environments, and remained with your offspring up to weaning. Therefore, the animals of F1 generation had two possible experimental conditions, perinatal life in standard conditions (AP) or perinatal environmental enrichment (AE). After weaning all animals of F1 generation remained in standard environment. When reached maturity this animals were evaluated the anxiety-like behaviors. To produce the F2 generation, female mice originate only standard environment are breed to others male from F1 generation, being AP males originate the AP+AP group, being AE males originate the AE+AP group, all animals of F2 generation were remained in standard condition. When animals of F2 generation reached maturity were evaluated the anxiety-like behaviors. Statistical analyze of all study was by Student t test. The results of F1 generation were as follows: AE males presents increasing in ambulation measured in meters ($15,5 \pm 1,1$) vs. ($11,7 \pm 1,0$) and the vertical exploratory behavior ($46,6 \pm 3,8$) vs. ($33,3 \pm 3,4$) in the open field test. Increasing in percents of time spend ($31,2 \pm 3,7$) vs. ($13,2 \pm 5,2$) and entries in open arms ($41,8 \pm 4,5$) vs. ($23,6 \pm 6,6$), reduction of risk assesement behaviors ($15,3 \pm 2,1$) vs. ($27,0 \pm 2,9$) and increasing in entries of closed arms ($14,5 \pm 1,5$) vs. ($8,6 \pm 1,1$) in the plus maze test. In the light-dark box test presents increasing in transitions ($20,2 \pm 3,7$) vs. ($10,9 \pm 2,1$), crossed quadrants in the light side ($55,4 \pm 9,5$) vs. ($28,3 \pm 5,0$) and the vertical exploratory behavior ($5,8 \pm 1,5$) vs. ($2,1 \pm 0,8$).Already in F2 generation, the AE+AP males did not present increasing in ambulation in the open field test measured in meters ($11,0 \pm 0,7$) vs. ($13,6 \pm 1,0$). Increasing in percents of time spend in open arms ($25,7 \pm 4,3$) vs. ($9,3 \pm 3,1$) and reduction in risk assesement behaviors ($10,7 \pm 1,3$) vs. ($21,3 \pm 2,3$) in the plus maze test. Therefore, it is concluded that the perinatal environmental enrichment promote ansiolytic-like effects and increasing in exploratory activity in male mice. Being the ansiolytic-like effect is transferred to male decedents of the sires of the AE group.

Palavras chave: Ansiedade, transmissão transgeracional, camundongos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência de transtornos de ansiedade em 12 meses.....	2
Figura 2: Áreas encefálicas envolvidas com comportamentos defensivos	8
Figura 3: Córtex pré-frontal de camundongo.....	9
Figura 4: Amígdala.....	10
Figura 5: Substância cinzenta periaquedutal.....	12
Figura 6: Receptor GABA _A	14
Figura 7: Fluxograma geral dos experimentos.....	24
Figura 8: Cronograma experimental.....	24
Figura 9: Ambiente Padrão	25
Figura 10: Ambiente enriquecido.....	26
Figura 11: Campo Aberto	27
Figura 12: Labirinto em cruz elevado.....	28
Figura 13: Caixa claro-escuro.....	29
Figura 14: Supressão da alimentação pela novidade.....	30
Figura 15: Dissecção de córtex frontal de camundongos.....	31
Figura 16: Resultados do campo aberto dos machos da geração F1.....	35
Figura 17: Resultados do campo aberto das fêmeas da geração F1.....	37
Figura 18: Resultados do labirinto em cruz elevado dos machos da geração F1.....	39
Figura 19: Resultados do labirinto em cruz elevado das fêmeas da geração F1.....	40
Figura 20: Resultados da caixa claro-escuro dos machos da geração F1.....	42
Figura 21: Resultados da caixa claro-escuro das fêmeas da geração F1.....	44

Figura 22: Resultados da supressão da alimentação pela novidade dos machos e das fêmeas da geração F1.....	45
Figura 23: Resultados do campo aberto dos machos da geração F2.....	47
Figura 24: Resultados do campo aberto das fêmeas da geração F2.....	49
Figura 25: Resultados do labirinto em cruz elevado dos machos da geração F2.....	51
Figura 26: Resultados do labirinto em cruz elevado das fêmeas da geração F2.....	52
Figura 27: Resultados da caixa claro-escuro dos machos da geração F2.....	54
Figura 28: Resultados da caixa claro-escuro das fêmeas da geração F2.....	55
Figura 29: Resultados da supressão da alimentação pela novidade dos machos e das fêmeas da geração F1.....	56
Figura 30: Resultados da expressão gênica no córtex frontal.....	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Classificação dos transtornos de ansiedade.....	1
Tabela 2: Primers utilizados.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

5-HT_{1A} = receptor para serotonina do tipo 1 a

BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro

CRH = Hormônio liberador de corticotrofina

DNA = ácido desoxirribonucleico

F0 = Geração original.

F1 = Primeira geração

F2 = Segunda geração

G = medida de força centrífuga equivalente à força da gravidade.

GABA = Ácido gama amino butírico

GABA_A = receptor para GABA do tipo A

GABA_B = receptor para GABA do tipo B

GABA_C = receptor para GABA do tipo C

GAD = Glutamato descarboxilase

HHA = eixo hipotálamo hipófise adrenal

LPS = Lipopolissacarídeo de parede bacteriana

NPY = Neuropeptídeo Y

PVC = cloreto de polivinila

pm = peso molecular

RNA_m = ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR = Reação de cadeia de polimerase em tempo real

s. = segundos

SAP = *Stretched Attention Postures* (Postura estirada de atenção)

SNC = Sistema nervoso central

VGAT = transportador vesicular de GABA

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 transtornos de ansiedade.....	1
1.2 Modelos animais de ansiedade.....	4
1.3 Aspectos neuroanatômicos e implicação GABAérgica da ansiedade.....	7
1.4 Enriquecimento ambiental perinatal e ansiedade.....	16
1.5 Transferência transgeracional do comportamento análogo à ansiedade.....	19
2. Objetivos.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. Métodos.....	22
3.1 Animais e delineamento experimental.....	22
3.1.1 Descrição dos ambientes.....	25
3.2 Avaliação comportamental.....	26
3.2.1 Teste do campo aberto.....	27
3.2.2 Teste do labirinto em cruz elevado.....	27
3.2.3 Teste da caixa claro-escuro.....	28
3.2.4 Teste da supressão da alimentação pela novidade.....	29
3.3 Eutanásia e dissecação.....	30
3.4 Reação da cadeia de polimerase em tempo real (real time RT-PCR).....	31
3.5 Análise estatística.....	34
4. Resultados.....	34
4.1 GERAÇÃO F1.....	34
4.1.1 Teste do campo aberto.....	34
4.1.2 Teste do labirinto em cruz elevado.....	38
4.1.3 Teste da caixa claro-escuro.....	41
4.1.4 Teste da supressão da alimentação pela novidade.....	45
4.2 GERAÇÃO F2.....	45
4.2.1 Teste do campo aberto.....	45
4.2.2 Teste do labirinto em cruz elevado.....	50
4.2.3 Teste da caixa claro escuro.....	53
4.2.4 Teste da supressão da alimentação pela novidade.....	56

4.3 Expressão Gênica no córtex frontal.....	56
5. Discussão.....	59
5.1 Efeitos do enriquecimento ambiental perinatal em machos	59
5.2 Efeitos do enriquecimento ambiental perinatal em fêmeas.....	66
5.3 Efeitos transgeracionais do enriquecimento ambiental perinatal em machos.....	69
5.4 Ausência de efeitos transgeracionais nas fêmeas da prole.....	73
6. Conclusão.....	74
7. Referências bibliográficas.....	75

INTRODUÇÃO

1.1 Transtornos de ansiedade

Os transtornos de ansiedade em suas diversas manifestações (tabela 1) estão entre as doenças psiquiátricas mais prevalentes na população mundial, com prevalência estimada em 7,3 % (Who (2001); Kessler *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2012; Olesen *et al.*, 2012; Who, 2015), já as prevalências no Brasil e Estados Unidos são maiores e estão mostradas graficamente na figura 1. Além de apresentarem alta comorbidade entre si e com outros transtornos neuropsiquiátricos, como transtornos de humor e o abuso de drogas psicoativas, os transtornos de ansiedade também são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de outras doenças (Castillo *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2015). Dentre as manifestações mais comuns estão os transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social e o transtorno de pânico.

Tabela 1 – Classificação dos Transtornos de ansiedade segundo a Associação de Psiquiatria Norte-americana (DSM-5, 2013)

- Transtorno de Ansiedade de Separação
 - Mutismo Seletivo
 - Fobia Específica
 - Transtorno de Ansiedade 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
 - Transtorno de Ansiedade Não Especificado
-

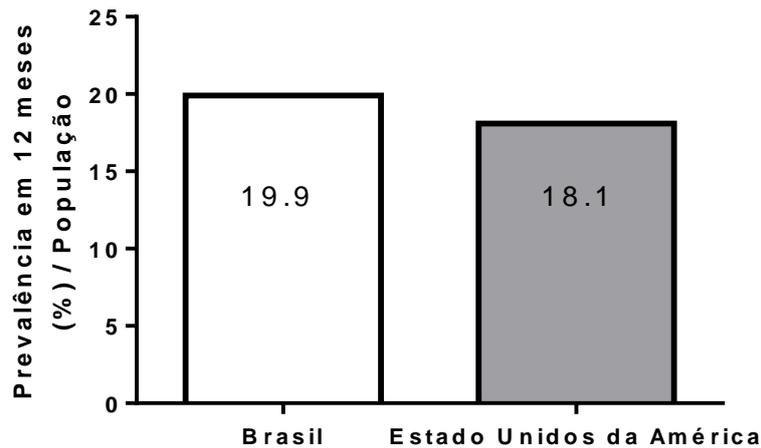


Figura1: Prevalência percentual em 12 meses em relação à população total. Dados de referência no Brasil retirados de Andrade *et al.* (2012) e dos Estados Unidos da América, retirados de Kessler *et al.* (2005).

Para o paciente, transtornos de ansiedade promovem grande sofrimento e perda de qualidade de vida. De modo geral, dentre os sintomas que os pacientes podem apresentar estão, dificuldades de relacionamento social, isolamento social além de sintomas somáticos e neurovegetativos como taquipnéia, tensão muscular, tremores, vigilância aumentada, náuseas e vômitos (Castillo *et al.*, 2000). Além disso, estes pacientes podem apresentar redução da expectativa de vida (Walker *et al.*, 2015). Um dado relevante consiste no fato de que, estas doenças causam grandes impactos financeiros para os pacientes acometidos e para os sistemas de saúde pública, tanto por perda de dias de trabalho quanto pelo custo do tratamento, o que pode colaborar ainda mais para agravamento da doença e perda de qualidade de vida do paciente (Olesen *et al.*, 2012).

Quanto ao tratamento, existem formas eficazes para grande parte dos pacientes acometidos por transtornos de ansiedade. A terapêutica é baseada em tratamentos farmacológicos que podem ou não estar associados à psicoterapia (Strine *et al.*, 2015). Dentre as principais classes de fármacos utilizados podemos destacar: benzodiazepínicos, antidepressivos, antipsicóticos atípicos, anticonvulsivantes, beta bloqueadores e a buspirona (agonista parcial de receptor 5-HT_{1A}) (Arikian e Gorman, 2001; Perna *et al.*, 2016). Apesar de sua eficácia, muitos problemas estão associados à terapêutica utilizada, com destaque para o desenvolvimento de dependência e tolerância aos benzodiazepínicos, e a longa latência para aparecimento do efeito terapêutico dos

antidepressivos no tratamento de transtornos de ansiedade, além da possível refratariedade às diferentes formas de tratamento (tanto farmacológica quanto psicoterápica) que alguns pacientes apresentam (Singewald, Nicolas, 2007).

Historicamente, a primeira descrição de transtornos mentais como doenças ocorreu no Egito antigo (no ano de 1900 antes de Cristo) presente no Papiro Kahum, citado em Tasca *et al.* (2012). Já a primeira descrição dos transtornos de ansiedade foi realizada em 1620 por Robert Burton em seu livro “The anatomy of melancholia”, citado em Berrios (1999). Etimologicamente, a palavra ansiedade deriva do termo grego *Anshein* que significa estrangular, sufocar e oprimir (Graeff, 2006). Vale salientar que tanto o medo quanto à ansiedade são sentimentos que ocorrem naturalmente em resposta à ameaça, portanto são respostas fisiológicas. Porém, enquanto o medo está relacionado com a presença de um estímulo aversivo real e há apenas o estímulo para o afastamento do que cria aversão, na ansiedade o risco é potencial, ou seja, a novidade ou memória de outras situações de risco que promove este comportamento defensivo (a ansiedade). Além disso, na ansiedade ocorre o conflito entre a aproximação e o afastamento do potencial perigo (Graeff, 2007).

Partindo do entendimento que a ansiedade é uma resposta fisiológica, alguns autores estabelecem que a ansiedade possa ser considerada patológica quando for exagerada e interferir na qualidade de vida do indivíduo (Castillo *et al.*, 2000; Singewald, N., 2007). Complementarmente, outros autores acreditam que os transtornos de ansiedade podem ser considerados como desordens defensivas em que a avaliação de perigo é feita de maneira falha nos indivíduos acometidos, deflagrando assim comportamentos defensivos exagerados (Rodgers e Dalvi, 1997; Castillo *et al.*, 2000). Seguindo este raciocínio, Castillo e colaboradores definem que nos transtornos de ansiedade os sintomas de ansiedade são a causa primária da doença, e estes não decorrem de outras condições psiquiátricas como esquizofrenia ou depressão (Castillo *et al.*, 2000). Apesar de apresentarem uma definição bem consistente, a etiologia destas doenças não é totalmente compreendida, e podem ter seu desenvolvimento influenciado tanto por fatores genéticos quanto ambientais. Neste contexto, há relatos de que os transtornos de ansiedade podem ser uma característica neurobiológica transmitida para os descendentes (Castillo *et al.*, 2000; Hettema *et al.*, 2001), apresentando uma taxa de herdabilidade estimada de 30 a 50 % (Hettema *et al.*, 2001).

Considerando diversos fatores que podem influenciar o desenvolvimento de transtornos de ansiedade, eventos ocorridos durante o desenvolvimento, como estresse, têm sido apontados como importantes fatores predisponentes (Stout e Nemeroff, 1994; Meyer-Lindenberg e Tost, 2012). Neste contexto, tem sido observado que quando estes eventos estressores ocorrem em períodos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), tais como, a infância e a adolescência, podem predispor o desenvolvimento dessas doenças tanto no momento do estresse quanto na vida adulta (Castillo *et al.*, 2000). Sendo assim, o estudo de como eventos ocorridos em momentos anteriores ao completo desenvolvimento do SNC podem impactar sobre a ansiedade são de fundamental importância para o refinamento e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Adicionalmente, é possível ainda que estes eventos ainda possam impactar na ansiedade da prole, sendo este o tema do presente trabalho.

1.2 Modelos animais de ansiedade

Neste contexto, a utilização de modelos animais para o estudo de doenças neuropsiquiátricas é útil, pois parte do princípio que os mecanismos de defesa primários foram conservados ao longo do processo de evolução. Em função disto, modelos animais tentam correlacionar alterações comportamentais e fisiológicas com estados emocionais específicos e tem contribuído de forma significativa para a descoberta de novos fármacos e compreensão dos mecanismos envolvidos em diferentes doenças (Campos *et al.*, 2013). Atualmente, é conhecido que transtornos de ansiedade envolvem uma grande diversidade de manifestações em resposta a diferentes estímulos e diferentes modelos tendem a refletir diferentes aspectos relacionados a estes comportamentos de defesa.

Considerando o estudo da neurobiologia da ansiedade, o uso de modelos animais apresenta diversas vantagens, dentre elas, a possibilidade de realizar pesquisas com grande número de indivíduos, melhor controle de histórico de estresse, a possibilidade de realizar manipulações genéticas, bem como, permite tipos de investigação que seriam eticamente inaceitáveis em humanos. Por outro lado, devemos considerar algumas desvantagens da utilização de animais neste tipo de pesquisa, dentre as quais podemos destacar que, em outros animais as respostas corticais possam não ser tão bem definidas como as existentes em humanos (Singewald, Nicolas, 2007). Apesar disso, diversos estudos em roedores mostram a importância do córtex frontal na regulação de

comportamentos análogos à ansiedade (Albrechet-Souza *et al.*, 2009; Adhikari *et al.*, 2015).

Diversos modelos animais de comportamentos análogos à ansiedade se baseiam na movimentação e ocupação de espaços do aparato experimental pelo animal. Sendo assim, um dos primeiros modelos a ser relatado foi o teste do campo aberto. Este teste foi descrito pela primeira vez por Hall (1934), sendo também utilizado para a avaliação da movimentação espontânea do animal (Olivares *et al.*, 2012). Quando um animal é exposto a um ambiente desconhecido, como o aparato do campo aberto, ele tende a explorá-lo para obtenção de informação espacial sobre este novo ambiente. Após um período prolongado de exposição ou exposições sucessivas ao aparato o animal desenvolve habituação ao teste do campo aberto, por já ter conhecimento espacial do ambiente (Bolivar *et al.*, 2000). Vale salientar ainda que, este é um modelo realizado em diferentes espécies animais com adaptações, dentre elas podemos destacar: cães, gatos e aves. Por conta disso, este é o modelo comportamental mais utilizado em pesquisas com animais (Walsh e Cummins, 1976; Prut e Belzung, 2003).

Entretanto, o modelo mais utilizado para a avaliação de comportamentos análogos a ansiedade é o teste do labirinto em cruz elevado (Arabo *et al.*, 2014). Este modelo baseia-se nas observações de Montgomery no labirinto em Y que percebeu a aversão de roedores a ambientes abertos e elevados. O teste do labirinto em cruz elevado foi descrito pela primeira vez por Handley e Mithani em 1980 (citado em (Rodgers e Dalvi, 1997)) e validado de maneira etológica, fisiológica e farmacológica para ratos por Pellow e colaboradores (Pellow *et al.*, 1985), sendo posteriormente validado para camundongos por Lister (1987).

Apesar de se acreditar inicialmente que o teste do labirinto em cruz elevado apenas estava relacionado ao medo incondicionado (Pellow *et al.*, 1985), deve ser considerada a possibilidade de aprendizado pelos animais durante o teste, como defendida por alguns autores. Isto porque a aversão aos braços abertos aumenta com o passar do tempo, quando este é avaliado minuto a minuto (Carobrez e Bertoglio, 2005). Adicionalmente, esta ideia de aprendizado durante o teste é reforçada pelo fenômeno de tolerância de primeiro ensaio, que é a perda de efeito ansiolítico de drogas benzodiazepínicas em uma segunda exposição ao labirinto em cruz elevado. (File *et al.*, 1990).

Outro modelo largamente utilizado é o teste da caixa claro-escuro (Bourin e Hascoët, 2003). Este modelo foi inicialmente descrito por Crawley e Godwing (1980) e se baseia na observação da inibição do comportamento exploratório de roedores noturnos quando estes são expostos a ambientes iluminados. Sendo o conflito criado pelo ambiente iluminado (aversivo) e o ambiente escuro (Young e Johnson, 1991).

Baseado em outra situação de conflito, o teste da supressão da alimentação pela novidade tem sua origem na observação da inibição comportamental da alimentação em roedores quando colocados em um ambiente desconhecido em relação a roedores já habituados a este ambiente. Segundo Yoshioka (1932), isso ocorre por conta da exposição ao novo ambiente que promoveria medo e /ou comportamentos análogos à ansiedade. Apesar disso, a validação farmacológica deste teste ocorreu posteriormente, podendo caracterizar este como um modelo de comportamentos análogos à ansiedade (Bodnoff *et al.*, 1989). Este teste tem sido refinado ao longo dos anos, diminuindo o tempo de privação de alimentos de 48 horas (Bodnoff *et al.*, 1989) chegando a protocolos de privação de alimento de 12 horas (Yang *et al.*, 2015), na intenção de diminuir o estresse e desconforto possivelmente causado pela privação de alimentos a estes animais.

Vários são os motivos em comum para a grande utilização dos modelos de ansiedade aqui descritos, tais como: (1) Simplicidade e baixo custo dos equipamentos utilizados, (2) não haver necessidade de treinamento, estimulação nociva ou privação de água ou alimento (Crawley e Goodwin, 1980; Pellow *et al.*, 1985), (3) se basear no comportamento espontâneo do animal, (4) discriminar efeitos agudos de benzodiazepínicos, (5) ser bidirecional, ou seja, ser sensível a manipulações de caráter ansiolítico ou ansiogênico (Pellow *et al.*, 1985). Neste contexto, o teste da supressão da alimentação pela novidade é o único que não apresenta a vantagem (2) já que é necessária a privação de alimento (Yang *et al.*, 2015).

Todos estes modelos descritos refletem respostas naturais e não-condicionadas (não exigem treinamento prévio) de roedores. São testes de conflito, onde os animais são expostos a situações onde devem escolher entre um comportamento que naturalmente poderá lhe trazer algum benefício (motivação), apresentando, no entanto, um risco potencial (semelhante ao que ocorre na natureza). Apesar desta característica semelhante dos modelos propostos, tem sido mostrado que os substratos neurais

envolvidos nestes diferentes testes são diversos e podem refletir diferentes estados de ansiedade. No entanto, também podem ocorrer algumas sobreposições dos substratos neurobiológicos envolvidos nos diferentes modelos de ansiedade. Por isso, tem sido proposto na literatura que a avaliação em diferentes modelos possa produzir resultados mais bem definidos, reduzindo a possibilidade de resultados “falso positivos” ou “falso negativos” (Ramos, 2008).

Um ponto de discussão na literatura é a realização de diferentes modelos isoladamente ou sucessivamente. Se por um lado, é possível que a exposição a um modelo possa modificar a resposta no modelo seguinte, como relatado em animais previamente expostos ao labirinto em cruz elevado quando submetidos ao teste da caixa claro-escuro, que apresentam redução de comportamentos análogos à ansiedade (Rodgers e Shepherd, 1993), a utilização de baterias de testes comportamentais apresenta uma vantagem ética importante por conta da redução do número de animais utilizados, além de viabilizar a avaliação comportamental em fenótipos com alto custo operacional como animais geneticamente modificados (McIlwain *et al.*, 2001), ou mesmo, estudos de longa duração (Olivares *et al.*, 2012).

1.3 Aspectos neuroanatômicos e implicação GABAérgica na ansiedade

Do ponto de vista neuroanatômico, algumas áreas do SNC têm seu envolvimento com a neurobiologia da ansiedade bem descrito, tanto em humanos quanto em animais. Dentre elas, podemos destacar o córtex pré-frontal (Mobbs *et al.*, 2007; Albrechet-Souza *et al.*, 2009), a amígdala (Davis, 1992; Singewald e Sharp, 2000) e a substância cinzenta periaquedutal (Singewald e Sharp, 2000; Mobbs *et al.*, 2007).

O córtex pré-frontal medial é composto dos córtices infralimbíco, pré-limbíco e cíngulo anterior. Esta região se conecta a outras áreas envolvidas na regulação de comportamentos defensivos tais como: hipocampo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal. Do ponto de vista neurobiológico, o córtex pré-frontal é a área mais alta de controle hierárquico relacionado a comportamentos defensivos, regulando a atividade de outras áreas do SNC envolvidas com estes comportamentos (Mobbs *et al.*, 2007; Adhikari *et al.*, 2015), como representado esquematicamente na figura 2 a seguir.

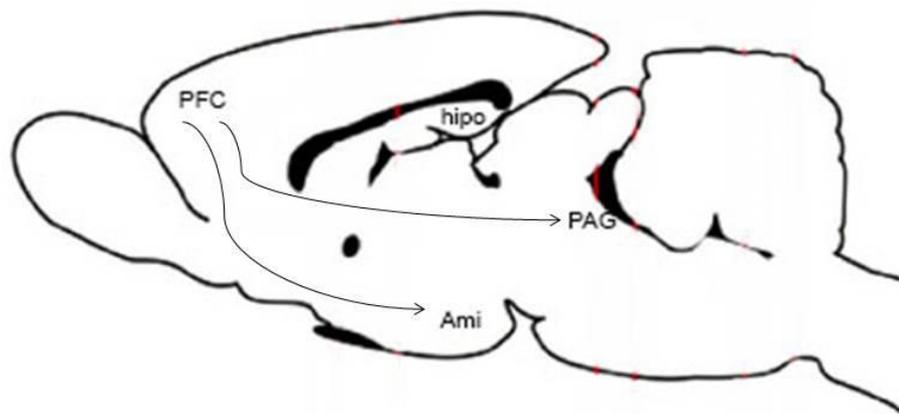


Figura 2: Representação esquemática de encéfalo de camundongo em corte sagital, adaptado de (Silvani e Dampney, 2013). Estão destacadas algumas áreas envolvidas com a regulação de comportamentos defensivos, tais como: PFC = córtex pré-frontal, Hipo = hipocampo, Ami = Amígdala e PAG = Substância cinzenta peri-aquedutal.

O córtex pré-frontal dorsomedial (composto pelos córtices cingulado anterior e pré-límbico) é a porção do córtex pré-frontal com maior quantidade de projeções axonais para a amígdala que promove a ativação da amígdala basolateral. Já as projeções do córtex pré-frontal ventromedial (composto pelo córtex infralímbico) para a amígdala basolateral promovem redução da atividade da amígdala basolateral. (Adhikari *et al.*, 2015). A representação esquemática do córtex pré-frontal em camundongos esta representada na figura 3 a seguir.

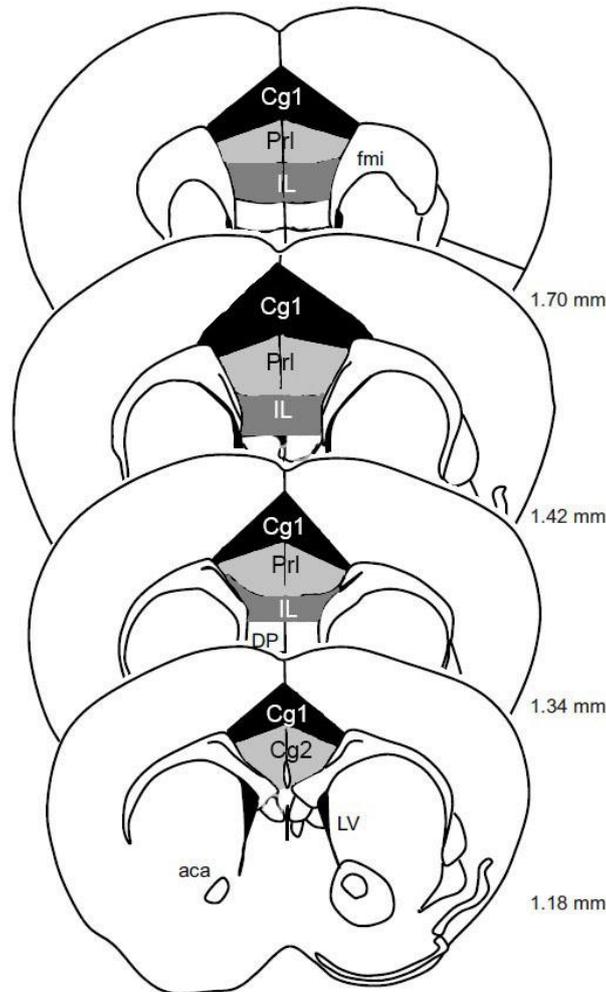


Figura 3: Representação esquemática de cortes coronais do córtex pré-frontal de camundongos em diversos cortes coronais, adaptado de Morawska e Fendt (2012). As legendas significam: Cg1 = Córtex cingulado área 1, Cg2 = Córtex cingulado área 2, Pr1 = Córtex Pré-límbico, IL Córtex Infra-límbico, LV = Ventrículo Lateral, DP = Córtex Penducular Dorsal, aca = Comissura anterior parte anterior e fmi = Forceps menor do corpo caloso. As indicações ao lado da figura mostram a distância em milímetros de Bregma, no sentido cranial.

Em humanos, o córtex pré-frontal é responsável pelo planejamento de estratégias defensivas e da tomada de decisão em situações aversivas. Estudos com ressonância magnética funcional em humanos mostram a inibição da substância cinzenta periaquedutal promovidos pelo córtex pré-frontal, levando assim ao controle de respostas ao medo e ansiedade frente a situações aversivas (Mobbs *et al.*, 2007).

Adicionalmente, camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado apresentam ativação celular aumentada no córtex pré-frontal, resposta esta reduzida quando da utilização de benzodiazepínicos em doses ansiolíticas, que promovem respostas de

preferência por regiões do aparato utilizado e em comportamentos de avaliação de risco neste modelo (Albrechet-Souza *et al.*, 2009). Sendo estes exemplos da participação do córtex pré-frontal na regulação de comportamentos defensivos.

Outra região do encéfalo de importância central na neurobiologia dos comportamentos defensivos é a amígdala. A amígdala é uma estrutura bilateral localizada nos lobos temporais dividida em 13 partes, podendo ainda ser didaticamente subdividida em três grandes complexos: complexo basolateral (composto pelos núcleos basolateral, lateral e basal acessório), complexo centromedial (consistindo nos núcleos central, medial e a parte amigdalóide do núcleo leito da estria terminal e ainda outros núcleos como núcleo intercalar, área amigdal anterior e área amígdalo-hipocampal) e complexo corticomedial (que tem diversos núcleos sendo eles: núcleo lateral do trato olfatório, núcleo leito do trato olfatório, núcleo cortical e o córtex pré-amigdalóide) (Sah *et al.*, 2003). Apesar de muitos núcleos que compõem o complexo amigdalóide receberem e emitirem projeções para outras áreas encefálicas, a principal entrada de informações para a amígdala é o complexo é basolateral, e a principal saída é o núcleo central da amígdala (Davis, 1992). Um esquema da organização anatômica da amígdala em roedores esta apresentado na figura 3 abaixo.

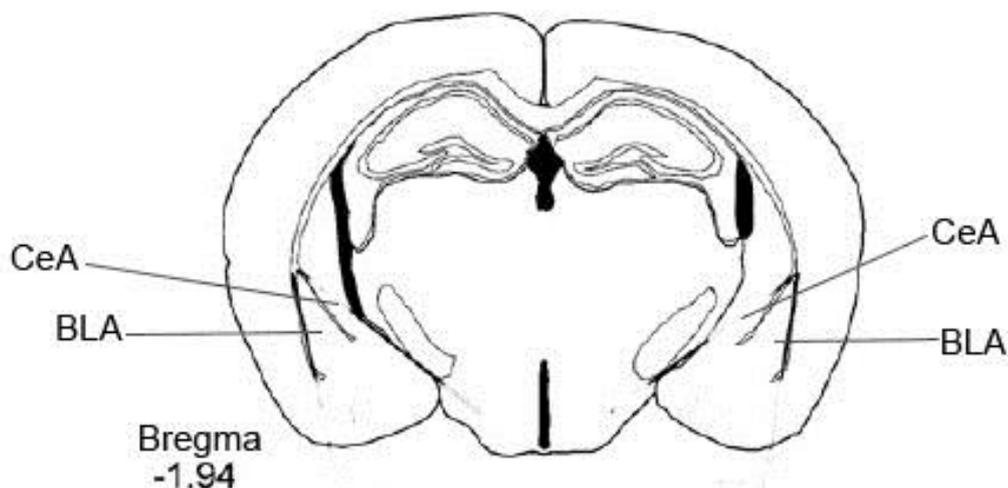


Figura 4: Representação esquemática de corte coronal da amígdala de camundongo em Bregma -1.94, adaptado de Janitzky *et al.* (2009). As legendas significam: BLA = Núcleo basolateral da amígdala e CeA = Núcleo central da amígdala.

Em humanos o núcleo central, o complexo basolateral da amígdala e o núcleo leito da estria terminal são ativados em resposta a ameaças próximas (Mobbs *et al.*, 2007). Adicionalmente, estudos com animais mostram que o complexo basolateral da amígdala também está envolvido com a resposta a comportamentos defensivos condicionados e incondicionados (Smith *et al.*, 2012) e na formação e retenção de memórias aversivas (Nikolaev *et al.*, 2002). O complexo basolateral da amígdala contém ainda grandes quantidades de neurônios GABAérgicos, sendo o ácido gama aminobutírico (GABA) de fundamental importância para a extinção de memórias aversivas (Müller *et al.*, 2015). O núcleo central da amígdala recebe muitas projeções de neurônios situados em núcleos do complexo basolateral, participando do circuito intra-amigdalar responsável pelo processamento de respostas de medo e ansiedade. O núcleo central da amígdala parece estar envolvido principalmente com as respostas comportamentais autonômicas e endócrinas decorrentes do medo e ansiedade (Davis, 1992). Adicionalmente a redução da transmissão glutamatérgica no núcleo basolateral da amígdala pode promover efeitos ansiogênicos (Linden *et al.*, 2004).

Mais uma região de grande importância na regulação de comportamentos defensivos é a substância cinzenta periaquedutal, que é localizada ao redor do aqueduto cerebral no mesencéfalo, sendo esta, uma região que recebe muitas projeções do córtex pré-frontal, núcleo central da amígdala, núcleo leito da estria terminal e associada e todas estas regiões tem sido implicadas na coordenação de respostas autonômicas defensivas (Mobbs *et al.*, 2007). Em humanos, a substância cinzenta periaquedutal é ativada em resposta a ameaças próximas, sendo que a região da substância cinzenta periaquedutal mais relacionada com as respostas defensivas é a porção dorso lateral (Messanvi *et al.*, 2013). Além disso, quando esta área é submetida a estimulações elétricas em animais, estes apresentam aumento de comportamentos análogos à ansiedade em ratos, para revisão ver (Graeff *et al.*, 1993). Soma-se a isso, que a inibição da atividade glutamatérgica nesta região promove efeitos ansiolíticos (Kincheski e Carobrez, 2010) assim como, a administração de fármacos que induzem ansiedade e/ou medo em animais aumenta o número de células imunorreativas para c-fos na substância cinzenta periaquedutal (Singewald e Sharp, 2000).

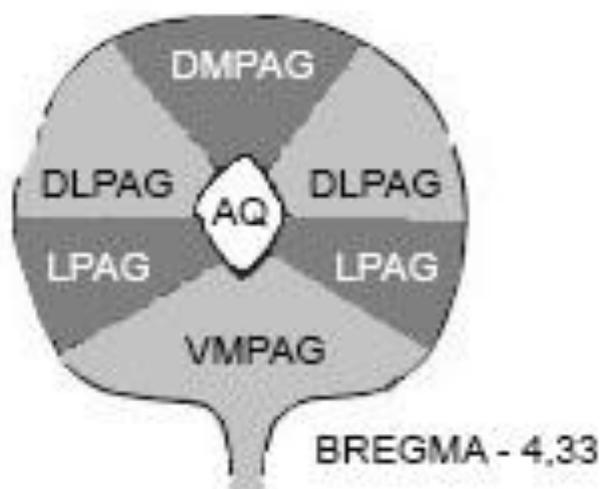


Figura 5: Representação esquemática de cortes coronais da substância cinzenta periaquedutal em Bregma -4.33, adaptado de Tovote *et al.* (2016). As legendas significam : AQ = Aqueduto cerebral, DMPAG = Porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal, DLPAG = Porção dorso-lateral da substância cinzenta periaquedutal, LPAG = Porção lateral da substância cinzenta periaquedutal e VMPAG = Porção ventromedial da substância cinzenta periaquedutal.

Diversos sistemas de neurotransmissores parecem estar envolvidos na integração das respostas defensivas, integrando os estímulos nas áreas descritas. Neste sentido, dentre os possíveis candidatos à participação nestes efeitos estão as neurotrofinas como BDNF e NGF, componentes do eixo hipotálamo hipófise adrenal, como hormônio liberador de corticotrofina e seus receptores, além da expressão de receptores para glicocorticoides, o sistema serotoninérgico e também sistemas de aminoácidos como glutamato e GABA.

O ácido gama aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos adultos (Müller *et al.*, 2015; Janik *et al.*, 2016). Este neurotransmissor está envolvido com diversos processos desempenhados pelo SNC tais como: regulação das atividades neurovegetativas (Guyenet, 2006), ritmicidade circadiana, controle motor e controle do comportamento emocional (Stork *et al.*, 2000). Além disso, o sistema GABAérgico no córtex pré-frontal parece ser altamente modulado pela experiência no início da vida (Chocyk *et al.*, 2013; Lussier e Stevens, 2016).

O GABA é sintetizado a partir do glutamato pela enzima ácido glutâmico d Descarboxilase (GAD) que tem duas isoformas com nomes oriundos dos seus

respectivos pesos moleculares, a saber: GAD₆₅ (pm = 65400 Dáltons) e GAD₆₇ (pm = 66600 Dáltons) (Soghomonian e Martin, 1998) sendo estas codificadas por dois genes diferentes *gad2* e *gad1*, respectivamente (Lange *et al.*, 2014). A GAD₆₇ que é localizada no citoplasma parece ser responsável pela produção de GABA envolvido em processos metabólicos. Além disso, ela responde pelas maiores quantidades de GABA no SNC em desenvolvimento (Müller *et al.*, 2015). Já a GAD₆₅ parece estar envolvida com a liberação sináptica de GABA (Lange *et al.*, 2014) e tem sua localização na membrana sináptica. Esta isoforma é responsável pela produção de maiores quantidades de GABA no SNC de adultos (Müller *et al.*, 2015).

Após a síntese, o GABA é armazenado em vesículas, processo este dependente do transportador vesicular de GABA (VGAT) (Buddhala *et al.*, 2009). Quando liberado na fenda sináptica o GABA interage com receptores do tipo GABA_A, GABA_C (ionotrópicos) ou GABA_B (metabotrópico) (Bormann, 2000). Esta visão geral do sistema GABAérgico é importante para a seleção de alvos de estudo, visto que, este sistema de neurotransmissão parece ter envolvimento fundamental na neurobiologia da ansiedade, tanto na regulação fisiológica destes comportamentos (Crestani *et al.*, 1999), bem como, no tratamento farmacológicos de transtornos de ansiedade (Arikian e Gorman, 2001).

Neste sentido, experimentos com animais apresentam algumas informações que sugerem a participação das isoformas de GAD no desenvolvimento de transtornos de ansiedade. Por exemplo, quando camundongos *knockout* para GAD₆₅ são expostos a condicionamento aversivo desenvolvem características análogas ao transtorno de estresse pós-traumático, para revisão ver (Müller *et al.*, 2015). Adicionalmente, ratos menos exploradores no labirinto em cruz elevado apresentam redução na expressão das duas isoformas de GAD no córtex frontal (Nelovkov *et al.*, 2006). Do mesmo modo, camundongos *knockout* para GAD₆₅ apresentam aumento de comportamentos análogos à ansiedade nos modelos do campo aberto e do labirinto em zero elevado (Kash *et al.*, 1999). Estes animais também apresentam aumento de comportamentos análogos à ansiedade no modelo da caixa claro-escuro (Stork *et al.*, 2000), bem como perda do efeito ansiolítico do diazepam neste modelo (Kash *et al.*, 1999; Stork *et al.*, 2000). Além disso, a exposição a estressores no período pré-natal pode reduzir a contagem de células imunorreativas para GAD₆₇ no córtex pré-frontal que é acompanhado do

aumento de comportamentos análogos à ansiedade em camundongos (Lussier e Stevens, 2016).

Considerando o receptor $GABA_A$, o mesmo possui estrutura pentamérica, sendo associado a um canal de Cl^- . Neste receptor, além do sítio do ligante principal, o GABA, existem vários sítios alostéricos que alteram sua atividade, tais como o sítio para benzodiazepínicos e o sítio de ligação para neuroesteróides, entre outros, para revisão ver (Olsen, 2014). O complexo receptor pode ser composto por diversas subunidades proteicas, a saber: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π e ρ 1-3 (Rudolph e Möhler, 2006). Esta grande variedade de subunidades faz com que ocorra uma população de receptores $GABA_A$ muito heterogênea e com características farmacológicas diversas. A maior parte da população de receptores $GABA_A$ presentes no SNC tem a conformação mais comum 2α , 2β e 1γ (Heldt e Ressler, 2010). Sendo que a segunda conformação mais comum de subunidades componentes do receptor $GABA_A$ é 2α , 1β e 2γ (Caldji *et al.*, 2003).

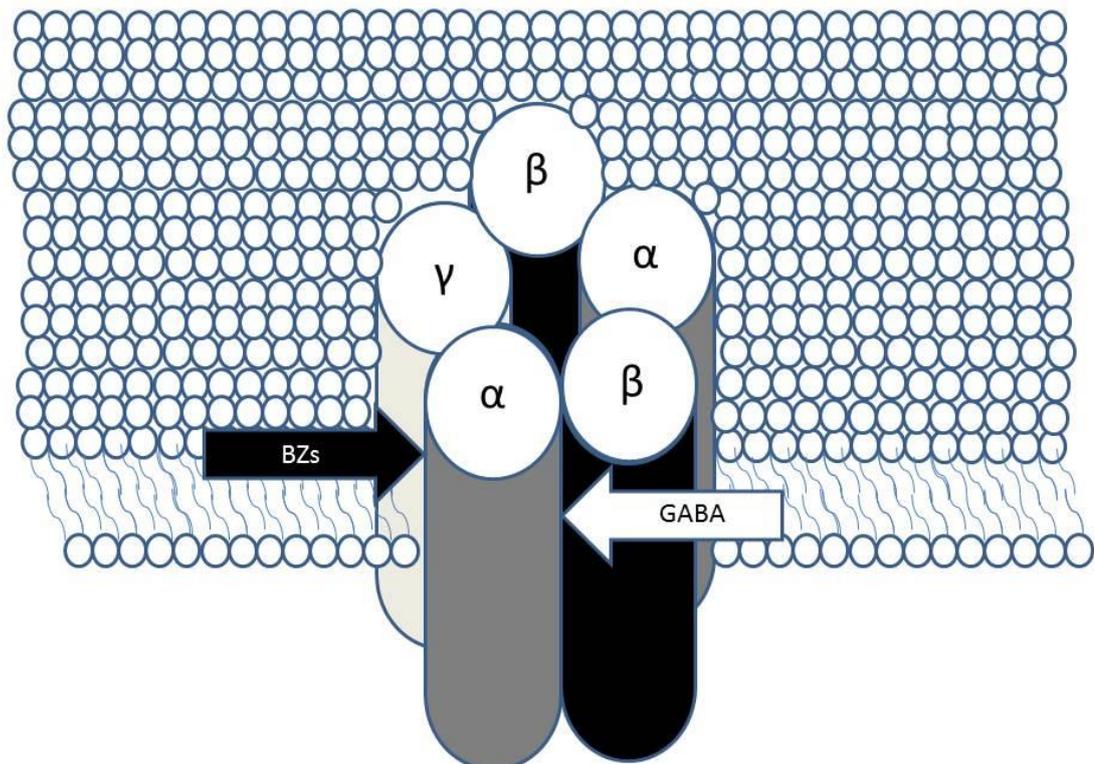


Figura 6: Representação esquemática do receptor $GABA_A$ com sua composição mais comum, contendo duas subunidades α , duas β e uma γ . Os sítios de ligação para o GABA (localizado na interface entre subunidades α e β) está indicado com a seta branca, bem como, o sítio de ligação de benzodiazepínicos (localizado na interface entre as subunidades α e γ) está indicado pela seta preta.

Neste contexto, as subunidades do tipo α são de fundamental importância, pois nela se localiza o sítio de ligação para o GABA. Além disso, na interface entre subunidades α e γ se localiza o sítio de ligação para benzodiazepínicos. Considerando a afinidade de ligação de benzodiazepínicos clássicos (exemplos: diazepam e alprazolam) aos receptores GABA_A, quando estes receptores são compostos por subunidades α_1 , α_2 , α_3 e α_5 estas afinidades são iguais. Apenas quando receptores GABA_A contém subunidade α_4 estes benzodiazepínicos clássicos não se ligam nos receptores (Caldji *et al.*, 2003). Já quando se leva em conta a sensibilidade das subunidades α a benzodiazepínicos, evidências experimentais têm imputado a interação com receptores contendo subunidade α_1 , as ações sedativas desta classe de fármacos. Enquanto as subunidades α_2 e α_3 parecem estar presentes em receptores GABA_A envolvidos com às ações ansiolíticas de benzodiazepínicos. Além disso, os receptores GABA_A contendo subunidades α_5 podem estar envolvidos com efeitos amnésicos promovidos por esta classe de fármacos (Rudolph e Möhler, 2006).

Neste sentido, há evidências de que camundongos manipulados geneticamente de forma que seus receptores GABA_A contendo subunidades α_2 insensíveis aos benzodiazepínicos, não apresentam respostas ansiolíticas quando tratados com estes fármacos. Já quando esta manipulação foi realizada para insensibilizar as subunidades α_3 do receptor GABA_A os animais continuaram a apresentar resposta ansiolítica quando administrados com benzodiazepínicos. Isso mostra a importância da subunidade α_2 na modulação do comportamento análogo à ansiedade (Löw *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2012). Além disso, há relatos de que a expressão proteica de subunidades α_2 no córtex pré-frontal e no núcleo central da amígdala pode ser aumentada em ratos por protocolos de separação materna durante o período perinatal, dados que mostram que esta subunidade pode ser modulada pelo estresse perinatal (Gondré-Lewis *et al.*, 2016). Por outro lado, outros estudos mostram que subunidade α_3 do receptor GABA_A também pode ter sua expressão modulada pelo estresse e também estar relacionada à ansiedade, visto que a submissão de ratos a estresse no período pré-púbere reduz o número de células imunorreativas para a subunidade α_3 do receptor GABA_A nos núcleos basolateral, central, lateral, basomedial e medial da amígdala, sendo que estes animais apresentam comportamentos análogos à ansiedade aumentados (Tzanoulinou *et al.*, 2014).

Outra subunidade de interesse é a γ_2 que é parte integrante do sítio de ligação de benzodiazepínicos (Laloux *et al.*, 2012). Apesar da subunidade γ_1 também poder compor este sítio de ligação (Caldji *et al.*, 2003). Evidências experimentais mostram que animais transgênicos que tem expressão reduzida de receptores γ_2 apresentam aumento de comportamentos análogos à ansiedade nos testes do labirinto em cruz elevado e da caixa claro-escuro (Crestani *et al.*, 1999). Adicionalmente, esta também parece ser uma subunidade que tem sua expressão modulada por estressores no início da vida, já que ratos submetidos a estresse no período perinatal apresentam redução da expressão da subunidade γ_2 na amígdala (Laloux *et al.*, 2012). Mais uma observação neste sentido, é que filhotes de ratas com grande quantidade de comportamentos maternos de lambadura e limpeza apresentam aumento da expressão de receptores γ_2 no complexo basolateral e no núcleo central da amígdala. Bem como, aumento da expressão gênica de subunidade γ_1 nos núcleos central e lateral da amígdala (Caldji *et al.*, 2003). Deste modo, percebe-se que o sistema GABAérgico pode ter a expressão de diversas proteínas chave para o seu funcionamento modulada por estressores, e isso pode estar envolvido na predisposição ou resiliência ao desenvolvimento de transtornos de ansiedade em momentos posteriores aos eventos estressores.

1.4 Enriquecimento ambiental perinatal e ansiedade

Neste contexto, é importante ressaltar que eventos ocorridos no início da vida têm grande impacto no comportamento do indivíduo adulto e têm sido correlacionados com a manifestação de doenças neuropsiquiátricas em humanos (Castillo *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2010) e transtornos comportamentais em animais (Lussier e Stevens, 2016). O período perinatal em roedores pode ser dividido em período embrionário e o período do nascimento até o desmame. Sendo que em roedores os processos de crescimento rápido do SNC ocorrem principalmente entre 3 e 4 semanas de vida, tendo seu pico aos 10 dias de vida pós-natal (Viberg *et al.*, 2008). Já em humanos, este crescimento rápido do SNC ocorre mais pronunciadamente entre o terceiro trimestre de gestação e o segundo ano de vida (Viberg *et al.*, 2008). Alguns destes processos plásticos do SNC são; diferenciação e migração celular, neurogênese, gliogênese, apoptose (Kempermann *et al.*, 1997), estabelecimento de sinapses, crescimento de espinhas dendríticas e potenciação de longa duração (Chocyk *et al.*, 2013). No entanto, mesmo não sendo o momento de maior desenvolvimento do SNC, períodos gestacionais anteriores a estes tanto em roedores quanto em humanos podem impactar no comportamento na vida adulta

(Laureano-Melo *et al.*, 2015). Isso porque mesmo em momentos anteriores a este período de grande aumento no número de células no SNC alguns sistemas de neurotransmissores já começam a se desenvolver, tais como o sistema GABAérgico (Lussier e Stevens, 2016).

Considerando estes fatos, o estudo de mecanismos que levam à programação do desenvolvimento sistema nervoso e suas consequências na vida adulta tem sido apontada como uma importante estratégia para compreensão da neurobiologia e tratamento de algumas doenças. Para abordar o tema, diversos protocolos têm sido realizados, incluindo a indução de estresse em animais no período perinatal por diferentes manipulações tais como: separação materna (Chocyk *et al.*, 2013), submissão das mães a estresse de contenção (Laloux *et al.*, 2012) e exposição à substâncias (Laureano-Melo *et al.*, 2015). Neste sentido, uma manipulação no início da vida que tem sido estudada, porém ainda não é completamente compreendida, é o enriquecimento ambiental perinatal.

O enriquecimento ambiental pode ser definido como a forma de manejo de animais cativos, que intenciona proporcionar maiores oportunidades dos animais desenvolverem comportamentos semelhantes àqueles realizados por seus semelhantes na natureza. Isso porque neste tipo de condição de criação é permitida maior chance de interação social e com elementos inanimados, tentando assim criar uma condição mais próxima da que os animais encontrariam em sua vida natural (Baumans, 2005; Shyne, 2006).

Protocolos de criação de animais em ambiente enriquecido têm sido utilizados na intenção de melhorar a qualidade de vida (Baumans, 2005; Shyne, 2006) e reduzir a frequência de comportamentos estereotipados de animais cativos (Shyne, 2006; Sztainberg *et al.*, 2010), geralmente associados a transtornos comportamentais (Marashi *et al.*, 2003).

Segundo Baumans (2005) existem dois tipos de enriquecimento ambiental para animais de laboratório, sendo: (1) Enriquecimento social, que pode ser com contato ou sem contato entre os animais. Este ainda pode ser entre animais da mesma espécie ou de espécies diferentes. (2) Enriquecimento físico, que pode ser realizado com o aumento da complexidade do ambiente de vida incluindo o aumento do tamanho da caixa residência onde o animal é alojado, a adição de elementos inanimados, a presença de material para a confecção de ninhos ou mesmo a alteração da alimentação.

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 (Kempermann *et al.*, 1997; Ickes *et al.*, 2000; Foster e Dumas, 2001). Sendo que o primeiro a trabalhar com enriquecimento ambiental do ponto de vista neurobiológico foi Donald Hebb, no fim da década de 1940. Ele demonstrou que ratos que viviam em um ambiente mais variado tinham melhor aprendizado que animais que viviam no laboratório em condições padrão de criação, citado em (Simpson e Kelly, 2011). Mesmo com as críticas da falta de controle dos experimentos de Hebb, estes trabalhos foram o ponto de partida para diversos estudos que demonstraram alterações comportamentais, que podem estar relacionados com mudanças morfológicas no SNC como a espessura do córtex e alterações bioquímicas no cérebro (Nithianantharajah e Hannan, 2006).

Considerando o impacto do enriquecimento ambiental no comportamento, diversos trabalhos têm demonstrado um efeito ansiolítico imputado à criação de animais em ambientes mais complexos (Chapillon *et al.*, 1999; Fox *et al.*, 2006). No entanto, não existe consenso sobre este efeito, visto que outros estudos com enriquecimento ambiental não mostram efeitos ansiolíticos (Roy *et al.*, 2001) ou mesmo mostram que o enriquecimento ambiental pode induzir efeitos ansiogênicos (Zhu *et al.*, 2006; Rosenfeld e Weller, 2012; Mcquaid *et al.*, 2013). Atualmente a maior parte dos estudos com enriquecimento ambiental envolve, protocolos no período pós-desmame, sendo que só recentemente os efeitos no período perinatal têm sido mais explorados. Estudos com ratos envolvendo enriquecimento ambiental exclusivamente no período gestacional mostraram um efeito ansiogênico do enriquecimento ambiental sobre a prole quando esta avaliada na idade adulta (Rosenfeld e Weller, 2012; Cymerblit-Sabba *et al.*, 2013). Por outro lado, estudos em camundongos envolvendo enriquecimento associado no período pré e pós-natal apresentam resultados contrários, indicando efeito ansiolítico (Chapillon *et al.*, 1999), mesmo considerando uma breve exposição da prole ao enriquecimento ambiental pós-parto (Friske e Gammie, 2005). Outros estudos tem mostrado que submeter mães prenhes (no último terço da gravidez) e as proles até próximo à vida adulta (56 ou 52 dias respectivamente) em ambientes enriquecidos promovem um perfil menos ansioso em modelos de comportamento análogo à ansiedade (Chapillon *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2001). Além disso, existe a possibilidade

de transmissibilidade dos efeitos comportamentais induzido pelo enriquecimento ambiental possam ser transferidos para a prole (Friske e Gammie, 2005).

1.5 Transferência transgeracional do comportamento análogo à ansiedade

Considerando a transferência transgeracional materna, há observações experimentais em animais e humanos que sugerem que a prole pode ter seu comportamento influenciado pelo estado de ansiedade e estresse das mães. Uma evidência disso é que ao submeter fêmeas de camundongos ao enriquecimento ambiental até dois dias após o parto observou-se que as proles tinham caráter ansiolítico na vida adulta, no mesmo sentido das mães, o que mostra transferência comportamental do fenótipo de ansiedade (Friske e Gammie, 2005). Outro resultado neste sentido é que ao se injetar LPS (lipopolissacarídeo) em ratas para se simular exposição perinatal a infecção bacteriana, as fêmeas apresentaram aumento de ansiedade. Do mesmo modo, as proles oriundas destas fêmeas que sofreram injeção de LPS na vida adulta também apresentaram comportamentos análogos à ansiedade aumentados (Walker *et al.*, 2012).

Uma possível explicação para que o estresse materno possa induzir aumento de comportamentos análogos à ansiedade na vida adulta da prole é que o feto irá se desenvolver em um ambiente gestacional com influência dos altos níveis de glicocorticoides. Sendo que isso pode interferir no SNC em desenvolvimento, contribuindo para esta alteração no comportamento (Laloux *et al.*, 2012). Vale salientar ainda, que o comportamento de cuidado materno pode ter envolvimento com a resposta comportamental da prole na vida adulta (Champagne e Meaney, 2007). Observações em humanos também sugerem que mães com transtornos de ansiedade podem induzir aumento de respostas defensivas em seus filhos (De Rosnay *et al.*, 2006). Neste sentido, é descrito em humanos que a ansiedade materna patológica é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas nos filhos (Martini *et al.*, 2010).

Esses dados indicam que tanto o estresse materno quanto o enriquecimento ambiental perinatal promovem efeitos comportamentais duradouros. Por conta disso, Friske e Gammie (2005) sugerem que efeitos epigenéticos podem estar envolvidos com a resposta ao enriquecimento ambiental perinatal em promover efeitos sobre o comportamento de ansiedade. Posteriormente, foi relatado que ratos oriundos de fêmeas submetidas ao enriquecimento ambiental durante o período perinatal apresentaram

redução da metilação global de DNA (ácido desoxirribonucleico) no córtex frontal e hipocampo aos 21 dias de idade (Mychasiuk *et al.*, 2012).

Segundo Walker e colaboradores (Walker *et al.*, 2012), alteração epigenética seria qualquer modificação na ativação dos genes que ocorra sem que a sequência de bases nitrogenadas que compõem o DNA seja modificada. Desta forma, é necessário pontuar quais são os processos envolvidos nessas alterações epigenéticas no SNC. Segundo Bale, os mecanismos epigenéticos e transgeracionais que atuam no encéfalo em desenvolvimento são: metilação de DNA, acetilação de histonas e modificações em micro RNAs não codificantes. Vale ressaltar que, se estes processos são incorporados em células germinativas (espermatozoides ou óocitos), estas alterações epigenéticas podem ser transferidas para a geração seguinte (Bale, 2015).

Outra possibilidade, mais recentemente comprovada, é que estressores ao qual o pai foi submetido podem promover efeitos no comportamento da prole (Mychasiuk *et al.*, 2012). Porém, quando se exclui o fator de influência comportamental da presença do pai sobre a prole, apenas alguns mecanismos poderiam explicar essa transferência entre gerações de características herdadas do pai, a saber, alterações epigenéticas tais como: 1) Alterações no DNA dos espermatozoides. 2) Modificações da cromatina. 3) Metilação do DNA presente nos espermatozoides. Outra possibilidade, não diretamente ligada à transmissão epigenética de alterações ocorridas pelo pai, seria que a experiência de vida do macho influencie nas estratégias de cópula e desta forma a fêmea modifique o cuidado materno após o acasalamento. 4) Isso por fim poderia ter impactos no comportamento adulto da prole, por mais que esta possibilidade não tenha sido testada pelo grupo que postulou a ideia (Mashoodh *et al.*, 2012).

A transferência transgeracional paterna do comportamento de ansiedade tem sido reportada. Um exemplo disso é que a exposição à LPS (lipopolissacarídeo) de parede bacteriana em machos durante o período perinatal (do terceiro ao quinto dia de vida pós-natal) faz com que estes tenham comportamento de ansiedade aumentado, característica esta que é transferida para sua prole (Walker *et al.*, 2012). Neste sentido, foi demonstrado que camundongos machos submetidos à derrota social e que apresentam comportamentos análogos à ansiedade e à depressão aumentados, produzem proles com aumentos destes comportamentos (Dietz *et al.*, 2011). Existe também a possibilidade de que a transmissão paterna de fenótipos comportamentais seja sexualmente dimórfica,

como o relatado no teste do campo aberto em camundongos Nalb c/J (Alter *et al.*, 2009). Observações experimentais mostram que o enriquecimento ambiental paterno, bem como, o enriquecimento ambiental materno e no período perinatal induzem redução da metilação no córtex frontal e hipocampo das proles aos 21 dias de idade. Esses animais oriundos de pais e mães submetidos ao enriquecimento ambiental do vigésimo oitavo dia de vida pós-natal até o momento do acasalamento também apresentam maior exploração no campo aberto realizado durante o período perinatal (Mychasiuk *et al.*, 2012). Já em humanos é descrito que a idade paterna avançada aumenta a chance da prole em desenvolver transtornos neuropsiquiátricos como a esquizofrenia. Assim como, a fome durante o período pré-pubere em avôs reduz a longevidade de netos, porém não de netas (para revisão ver (Alter *et al.*, 2009)).

Esta possibilidade tanto de pais quanto mães terem influência em alterações na metilação de DNA em áreas do SNC da prole, pode ajudar a explicar alterações comportamentais na vida adulta destes descendentes, visto que, processos de metilação estão envolvidos com a migração e desenvolvimento de células progenitoras neurais precursoras de neurônios GABAérgicos (para revisão ver (Lussier e Stevens, 2016)). Adicionalmente, outra característica que pode ser epigeneticamente transferida é quanto ao gene que transcreve a GAD₆₇. Há relatos de que pacientes com síndrome do pânico apresentam supermetilação deste gene (*GADI*) (Domschke *et al.*, 2013).

Sendo assim, nossa proposta de estudo envolve a hipótese de que o enriquecimento ambiental (físico e estático) durante o período perinatal influencie o comportamento análogo à ansiedade e de exploração em camundongos e que possivelmente estas características possam ser transferidas para seus descendentes. Adicionalmente, buscamos avaliar a possível relação destes efeitos com a expressão de subunidades do receptor GABA_A no córtex pré-frontal de camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do enriquecimento ambiental perinatal no comportamento análogo à ansiedade e possíveis efeitos transgeracionais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento análogo à ansiedade em animais submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal em diferentes modelos de ansiedade.
- Observar se as alterações no comportamento de ansiedade presentes nos animais submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal podem ser transmitidas pelos progenitores paternos para a geração seguinte.
- Verificar a expressão de genes que transcrevem proteínas relacionadas a subunidades α do receptor GABA_A, GAD₆₇ e VGAT no córtex frontal de animais submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e delineamento experimental

Todos os animais foram mantidos em estante ventilada (Alesco[®]) com temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e iluminação (luzes ligadas de 6:00h às 18:00h / escuro de 18:00h às 6:00h) controladas, assim como, fornecimento de água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob o número de processo 009/2015.

Foram utilizados inicialmente 24 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss Webster*, sendo 12 machos e 12 fêmeas (60 dias), fornecidos pelo Biotério de Criação de Roedores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Estes animais deram origem a 12 casais, sendo os mesmos descritos neste trabalho como geração F0. Dentre os casais da geração F0, sete permaneceram em ambiente padrão de criação e cinco no momento do acasalamento foram colocados em ambiente enriquecido (ver descrição dos ambientes no item 3.1.1). Dos sete casais do grupo padrão, apenas os filhotes de cinco foram utilizados em nosso protocolo experimental. Os filhotes dos outros dois casais foram destinados para análise

através da técnica de PCR da influência dos testes comportamentais na expressão dos genes-alvo. A prole da geração F0 está descrita como geração F1, assim como a prole da geração F1 é descrita como geração F2.

Durante o período de gestação e amamentação, as fêmeas da geração F0 permaneceram no mesmo ambiente do acasalamento e, após o nascimento da geração F1, as ninhadas foram normalizadas para 8 filhotes, sendo 4 machos e 4 fêmeas por mãe. Desta maneira, os animais da geração F1 foram submetidos a duas condições: enriquecimento ambiental perinatal (EA) ou ambiente padrão perinatal (AP). Sendo considerado período perinatal, tanto o período gestacional quanto o período pré-desmame. Aos 21 dias de idade, os animais dos dois grupos foram desmamados, separados em 4 por caixa, e mantidos em ambiente padrão, onde permaneceram durante todo o protocolo adotado. Aos 70 dias de vida, foram utilizados 2 filhotes de cada sexo por casal da geração F0 para análise comportamental, totalizando 10 animais de cada sexo por grupo, sendo que destes, 8 foram utilizados para os ensaios de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Dos animais restantes, foram formados 10 casais que deram origem aos diferentes grupos da geração F2 conforme descrito a seguir:

1) Casais formados por machos e fêmeas (F1) que sempre viveram em ambiente padrão e que não eram irmãos, deram origem ao grupo padrão (AP + AP) da geração F2.

2) Casais formados por machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal e fêmeas que sempre viveram em ambiente padrão (F1) deram origem ao grupo de linhagem paterna de enriquecimento ambiental perinatal (AE + AP) da geração F2.

Neste estudo avaliamos os efeitos transgeracionais do enriquecimento ambiental perinatal pela linhagem materna, portanto, nenhum dos animais da geração F2 foi submetido ao enriquecimento ambiental. Aos setenta dias de idade, os animais da geração F2 foram submetidos à mesma bateria de análise comportamental que os da geração F1 haviam sido expostos. Tanto na geração F1 quanto geração F2, após quatro dias do término da avaliação comportamental (aos 80 dias de vida pós-natal) os animais sofreram eutanásia e foi coletado material biológico para futura análise.

Um panorama geral do protocolo experimental nas Figuras 7 e 8 a seguir:

Protocolo experimental

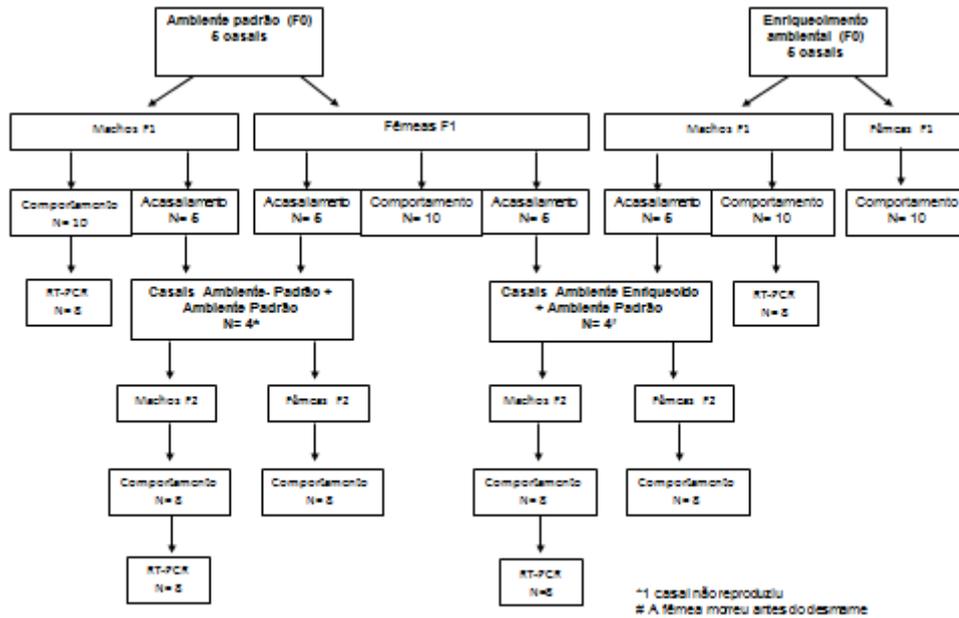


Figura 7: A- Delineamento experimental.*1 casal não reproduziu; #1 mãe morreu antes do desmame.

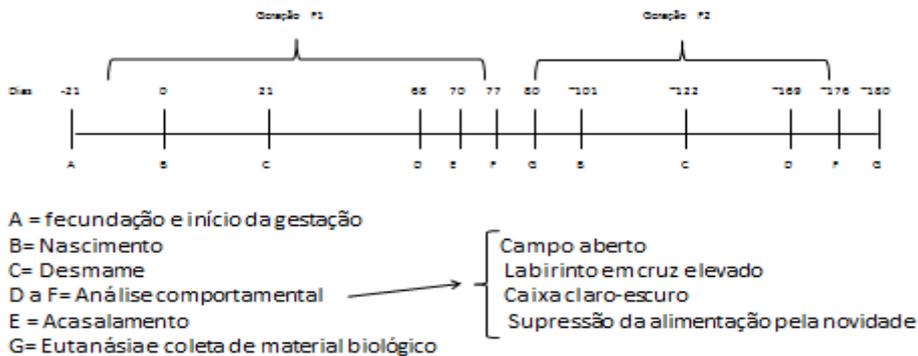


Figura 8: Linha temporal do protocolo experimental. Os dias referentes à geração F2 são aproximados em função do dia efetivo da fecundação. Análise comportamental = testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro, supressão da alimentação pela novidade (intervalo de 2 dias entre os testes)

3.1.1 Descrição de ambientes

O ambiente padrão era constituído de caixa padrão de camundongos feita em polipropileno branco opaco com as seguintes dimensões 20 x 30 x 13 cm (largura x comprimento x altura). No ambiente padrão havia apenas a presença de maravalha e tampa de metal. Sendo que o volume total do ambiente padrão sem descontar o volume ocupado pela maravalha era de 7254 cm³. Na figura 9 abaixo, estão fotos ilustrativas do ambiente padrão obtidas com caixas de policarbonato transparente para melhor visualização.

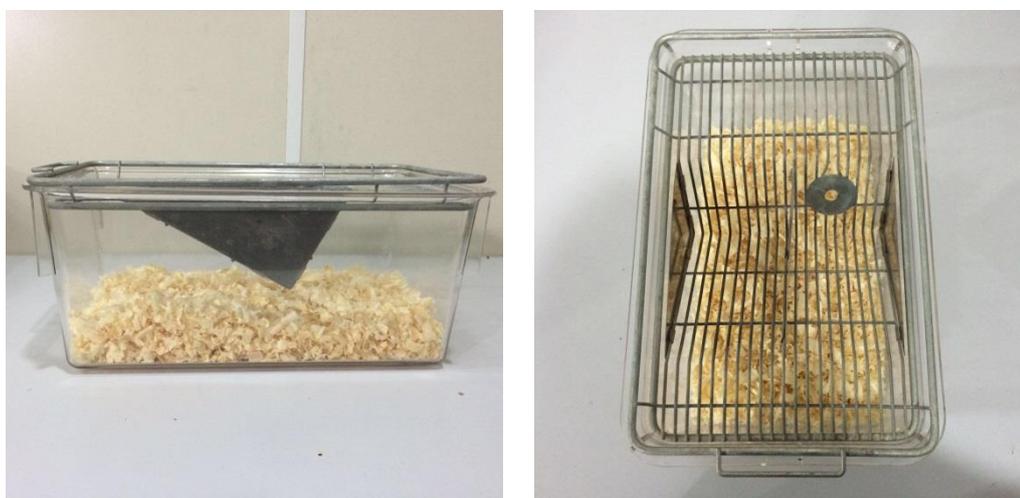


Figura 9: Ambiente padrão, vista lateral e vista de cima.

Já o ambiente enriquecido utilizado neste estudo foi uma adaptação do ambiente enriquecido proposto por Marashi e colaboradores (Marashi *et al.*, 2003). Sendo que o ambiente enriquecido foi composto de uma caixa de polipropileno branco opaco, porém medindo 34 x 40 x 20 cm (largura x comprimento x altura) e uma tampa com uma parte 4,5 cm mais alta que a altura máxima da caixa. Desta maneira, o volume total do ambiente enriquecido foi de 26244 cm³ sem descontar o volume ocupado pela maravalha ou outros componentes de enriquecimento. Além disso, o ambiente enriquecido ainda continha: túneis circulares de PVC (cloreto de polivinila) de 7 x 7 cm (comprimento x diâmetro), e tuneis semi circulares de 5,5 x 3,5 cm (comprimento x raio), e tocas de PVC 16 x 7cm (comprimento x diâmetro), as tocas diferiam dos túneis além do tamanho porque uma das extremidades era fechada. Além disso, existia papel toalha para construção de ninhos, dois pedaços de aproximadamente 10 x 45 cm (l x c)

por caixa e uma plataforma de acrílico opaco branco de 15,5 x 13,5 cm (l x c) suspensa por fios de arame e presa a parte mais alta da tampa, ficando suspensa a 3 cm do nível da maravalha. Na figura 10 abaixo, estão fotos ilustrativas do ambiente enriquecido obtidas com caixas de policarbonato transparente para melhor visualização.



Figura 10: Ambiente enriquecido, vista lateral e vista de cima do.

3.2 Avaliação comportamental

Todos os testes foram gravados através da câmera infra-vermelha TopWay Collor ccd (Topway do Brasil São Paulo-SP Brasil), e utilização do software GeoVision GV 800 System (Geovision do Brasil São Paulo-SP Brasil) para posterior análise, que foi realizada manualmente, exceto para os parâmetros de distância percorrida e tempo na área central do teste do campo aberto, no qual foi usado o programa anymaze 5.1® (Wood Dale-Illinois Estados Unidos da América). Antes dos testes, os machos permanecerem por 48 horas em sala de ambientação sem a presença de fêmeas, assim como as fêmeas permaneceram 48 horas ambientando em outra sala sem a presença de machos. Os testes foram realizados entre 6:00 e 12:00 horas. Em cada dia apenas machos ou fêmeas foram testados. A bateria de testes foi realizada na seguinte ordem: Teste do campo aberto, teste do labirinto em cruz elevado, teste da caixa claro-escuro e teste da supressão da alimentação pela novidade com intervalo de 48 horas entre eles. Após cada ensaio comportamental individual o aparato utilizado foi higienizado com

álcool a 10% para prevenir qualquer pista olfatória para o animal seguinte. Adicionalmente, no teste de teste de supressão da alimentação pela novidade a maravalha foi trocada a cada animal, além da limpeza com álcool a 10% das plataformas de plástico usadas no teste e troca do papel que as cobria.

3.2.1 Teste do campo aberto

Este teste foi realizado em uma caixa de acrílico com fundo preto (30 x 30 cm) dividido em 9 quadrantes iguais e com paredes de 15 cm de altura transparentes. Os animais foram colocados no centro do campo aberto e avaliados durante 5 minutos (Rocha *et al.*, 2011) sob 5 lux de iluminação. A seguir (figura11) é apresentada foto ilustrativa do teste do campo aberto.



Figura 11: Teste do campo aberto

Os seguintes parâmetros foram avaliados: Distância percorrida em metros, comportamentos de exploração vertical que consiste em se levantarem sobre as patas traseiras (*rearing*), episódios de autolimpezas (*Grooming*), tempo despendido em autolimpezas medido em segundos e tempo dispendido na área central (Walsh e Cummins, 1976; Brenes *et al.*, 2009). A área central foi definida como o quadrante central mais um terço dos quadrantes paralelos ao quadrante central, e as áreas dos quadrantes diagonais ao quadrante central, necessárias para formar um quadrado.

3.2.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Este ensaio foi baseado no modelo proposto por Lister para camundongos (Lister, 1987), e consistiu de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos. Os braços abertos e fechados são conectados por

uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma, as paredes laterais dos braços fechados foram confeccionados em acrílico transparente. O aparelho fica elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. O teste foi iniciado quando o animal foi colocado na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados e a duração do teste foi de 5 minutos sob 5 lux de iluminação. A seguir há uma foto ilustrativa do aparato (figura 12).



Figura 12: Labirinto em Cruz Elevado.

As medidas comportamentais registradas no teste do labirinto em cruz elevado foram: porcentagem de tempo permanecido nos braços abertos em relação ao tempo total do teste, porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas nos dois tipos de braços, número de entradas nos braços fechados e comportamentos de avaliação de risco (*Stretched attend postures – SAP*) realizados em áreas protegidas (Rodgers e Johnson, 1995).

3.2.3 Teste da caixa claro-escuro

Este teste é baseado no modelo proposto por Crawley e Godwin em 1980 (Crawley e Goodwin, 1980) usando camundongos. O aparato consiste em um campo aberto de fundo claro (200 mm de altura x 265 mm de largura e 260 mm de comprimento) com uma abertura em uma das paredes que a conecta um compartimento de fundo, paredes e tampa escura (200 mm de altura x 265 mm de largura e 175 mm de comprimento). Além disso, é colocada uma fonte de luz que faz com que a iluminação na porção clara do aparato seja de 400lux e na porção escura de 4 lux (Bourin e Hascoët, 2003). Neste teste o animal foi colocado no centro da parte clara do aparato,

voltado para a parede contrária da abertura de comunicação dos ambientes e seu comportamento avaliado por 5 minutos (Rodgers e Shepherd, 1993; Sztainberg *et al.*, 2010). Na figura 13 a seguir há foto ilustrativa do teste da caixa claro-escuro.



Figura 13: Caixa claro-escuro.

Os comportamentos que foram avaliados no teste da caixa claro-escuro foram: tempo de permanência no lado claro (medido em segundos), número de transições entre os ambientes, comportamentos de avaliação de risco (*Stretched attend postures*), número de quadrantes percorridos no lado claro, levantamentos realizados no lado claro e latência para ir para o lado escuro, mensurado em segundos (Bourin e Hascoët, 2003).

3.2.4 Teste da supressão da alimentação pela novidade

Este teste é baseado na observação da relação inversa entre emocionalidade e o ato/tempo de alimentação de roedores (Yoshioka, 1932), sendo validado farmacologicamente por Bondoff e colaboradores (Bondoff *et al.*, 1989). Os animais foram privados de alimento por 12 horas (Yang *et al.*, 2015). Após este período os animais foram colocados em um dos vértices de uma caixa (57 x 48 cm e 21 cm de altura de parede) na qual foi colocada uma plataforma com *pellet* de ração no centro. Sobre a plataforma que continha alimento foi colocada uma fonte luminosa, fazendo que a iluminação sobre o *pellet* de ração tenha sido de 300 lux durante o teste, como mostra a figura 14 a seguir.



Figura 14: Supressão da alimentação pela novidade

O comportamento analisado foi a latência para interação com o alimento (Santarelli *et al.*, 2003).

3.3 Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais foram anestesiados com Isoflurano (Instituto Biochimico indústria farmacêutica LTDA. Itatiaia-RJ Brasil) a 2,5% em O₂, em câmara de anestesia. Após a perda de consciência os animais foram submetidos à decapitação (Lange *et al.*, 2014). Logo após a decapitação o sangue foi coletado em tubos com heparina, centrifugados a 3000 G por 15 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada (NT 805 Nova Tecnica Ind. e Com. Equipamentos de laboratório Ltda. Piracicaba-SP Brasil) e o soro foi estocado para análises endócrinas posteriores. Os encéfalos foram imediatamente retirados e ainda a fresco foi retirado o córtex pré-frontal mais o córtex frontal a mão livre (1mm da parte mais rostral do córtex) como o descrito por Heiderstadt e colaboradores (2014), e com o auxílio do atlas de encéfalo de camundongo (Paxinos e Franklin, 2004). A figura 15 a seguir, mostra os limites em vista dorsal para a dissecação a mão livre do córtex frontal (pré-frontal + frontal).

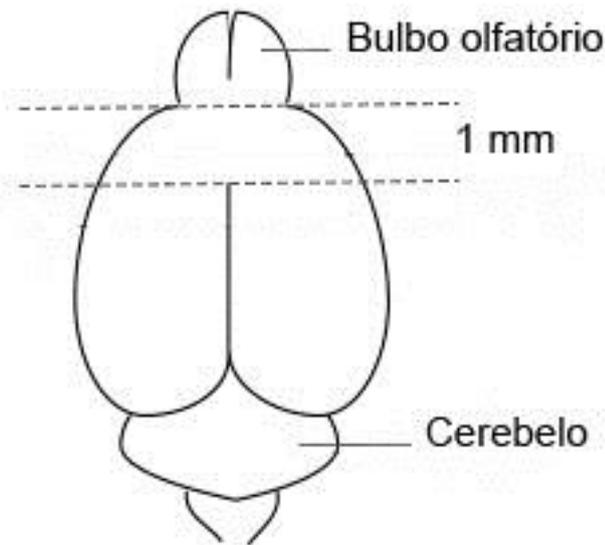


Figura 15: Representação esquemática, vista dorsal da dissecção de córtex frontal de encéfalo de camundongo. Adaptado de Zhang *et al.* (2012).

Logo após a retirada do córtex pré-frontal mais córtex frontal, o restante dos encéfalos e as adrenais foram congelados rapidamente em gelo seco e posteriormente acondicionados em ultrafreezer $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Indrel Ind. de refrigeração londrinense Ltda. Londrina-PR Brasil).

3.4 Reação de cadeia de polimerase quantitativo em tempo real (RT- qPCR)

De todas as amostras de córtex pré-frontal coletadas, foram utilizadas para o ensaio de PCR apenas 8 amostras dos machos padrão não submetidos a testes comportamentais, 8 amostras dos machos padrão submetidos a testes comportamentais e 8 amostras dos machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal. Os animais submetidos a testes comportamental, dos grupos enriquecimento ambiental perinatal e grupo padrão submetidos a testes comportamentais foram comparados entre si. Do mesmo modo, foi feita a comparação da expressão gênica, entre os animais dos grupos padrão não submetida a testes comportamentais, e do grupo padrão submetidos a testes comportamentais. Foram analisadas a expressão das subunidades α_1 , α_2 e α_3 do receptor GABA_A , bem como a enzima glutamato descarboxilase 67, para a avaliação se estas proteínas do sistema GABAérgico estão envolvidas com as respostas comportamentais promovidas pelo enriquecimento ambiental.

O RNA foi isolado do córtex frontal através do método do trizol®. Em cada microtubo que continha tecido foi adicionado 250 μl de PBS (autoclavado) e as amostras foram homogeneizadas manualmente com auxílio de homogeneizador de

tecidos em polipropileno (Sigma Aldrich Sant louis-MO, Estados Unidos da America). Em seguida foram adicionados 750µl de trizol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham-MA Estados Unidos da América) e 200 µl de clorofórmio (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias-RJ Brasil) sendo os tubos agitados manualmente durante 15 segundos e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este tempo, os tubos foram centrifugados a 12000 x g, a 4°C, por 25 minutos (centrifuga 5430 R® eppendorff, Hamburgo, Alemanha), sendo o sobrenadante retirado e adicionados 500µl de isopropanol (Sigma Aldrich Sant louis-MO, Estados Unidos da America) sobre o mesmo. Após agitação manual, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos, a 4°C. Retirou-se o isopropanol (sobrenadante) e foi adicionado 1ml de etanol a 70% (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias-RJ Brasil) seguido de nova centrifugação a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Após retirada do etanol, os precipitados foram ressuspensos em 30 µl de água ultrapura e incubados por 10 minutos a 60 °C sendo o RNA total quantificado em nanoespectrofotometro (DS-11® Denovix inc. Wilmington-DE Estados unidos da América). Uma alíquota de RNA total foi tratada com DNase para eliminar possíveis contaminações, seguindo instruções do fabricante (DNase I, Amplification Grade® Invitrogen Foster City-CA Estados Unidos da América) e 500 ng de RNA foram submetidos à transcrição reversa para produção do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Waltham-MA Estados Unidos da América) de acordo com as instruções do fabricante.

A avaliação da expressão dos genes *gabral*, *gabra2* e *gabra3*, *Gad1* (ácido glutâmico descarboxilase) e *Slc32a* (transportador vesicular de GABA) foram realizadas por RT-qPCR com detecção por meio do agente ligante de DNA SYBR Green® e gene de referência *actb* (beta-actina). Os *primers* utilizados foram fornecidos pela Síntese Biotecnologia LTDA sendo fabricados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Inc, Estados Unidos da América) e o master mix (*Power SYBR® Green PCR Master Mix*) pela Thermo Fisher Scientific.

A partir de um *pool* das amostras dos grupos experimentais, foram determinadas as concentrações ideais de *primers* (iniciadores) e a eficiência dos mesmos. Para otimização das concentrações foi realizada uma matriz para cada par de iniciadores cujas concentrações variaram em 100, 300 ou 600 nM. A partir dos resultados obtidos, foram selecionadas as menores concentrações que apresentavam maior ΔRN (repórter

normalizado pela linha de base) com menor limiar de ciclo (C_T , *cycle threshold*) e realizadas as curvas de eficiência para cada par de *primers*, sendo apenas utilizados iniciadores que apresentavam eficiência entre 90 e 110 % (tabela 2) e pico único nas curvas de dissociação.

Tabela 2: Sequência, concentrações e eficiências dos *primers* utilizados.

gene	forward primer	reverse primer	Efic. %
actb	AGGCCAACCGTGAAAAGATG	ACCAGAGGCATACAGGGACAA	93,4
Conc.	300 nM	300 nM	
gabral1	CCAAGTCTCCTTCTGGCTCAACA	GGGAGGGAATTTCTGGCACTGAT	95,6
Conc.	300 nM	300 nM	
gabral2	TTACAGTCCAAGCCGAATGTCCC	ACTTCTGAGGTTGTGTAAGCGTAGC	97,2
Conc.	300 nM	300 nM	
gabral3	CAAGAACCTGGGGACTTTGTGAA	AGCCGATCCAAGATTCTAGTGAA	95,4
Conc.	100 nM	100 nM	
Gad1	CATGGCTGCTCGTTACAAGTA	AACAGTCGTGCCTGCGGTTGC	96,0
Conc.	300nM	300nm	
Slc32a	CGTCGAGGGAGACATTCATT	ATCTTGGGTTTGTCTGTGACC	94,7
Conc.	300nM	300nM	

Todos os ensaios de RT- qPCR foram realizados no aparelho QuantStudio 3® da Applied Biosystems e os ciclos de PCR consistiram em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Ao final destes ciclos foi realizada a curva de dissociação (*Melt curve*). Os resultados foram expressos como níveis relativos de RNA mensageiro ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) e foram calculados pela comparação do limiar de ciclo de PCR (C_t) entre os grupos após serem corrigidos pelo resultado do gene de referência *actb*. Protocolo adaptado de Laureano e colaboradores (Laureano-Melo *et al.*, 2015).

3.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por teste t de Student. Com o auxílio do programa graph pad prism 6® (GraphPad Software, inc. La Jolla-CA Estados Unidos da América). Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média, seguidos pelo valor de P. Foram consideradas diferenças significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 GERAÇÃO F1

4.1.1 Teste do campo aberto

Para a avaliação da atividade locomotora espontânea dos animais foi realizado o teste do campo aberto. Neste teste, os machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal (EA) apresentaram maior distância percorrida, medida em metros ($15,5 \pm 1,1$) em relação aos machos que sempre viveram em ambiente padrão (AP) ($11,7 \pm 1,0$), $P = 0,0190$, assim como maior número de comportamentos de exploração vertical (levantar-se sobre as patas traseiras) (EA = $46,6 \pm 3,8$ vs. AP = $33,5 \pm 3,1$; $P = 0,0169$). Por outro lado, não houve diferenças entre os dois grupos no número de episódios de autolimpezas (EA = $1,5 \pm 0,2$ vs. AP = $3,4 \pm 1,0$; $P = 0,0866$) ou no tempo despendido neste comportamento (EA = $2,3 \pm 0,6$ s vs. AP = $5,7 \pm 2,1$ s; $P = 0,0778$), ou mesmo na porcentagem de tempo despendido na área central (EA = $20,9 \pm 1,6$ vs. AP = $25,0 \pm 2,1$; $P = 1,645$), conforme apresentado na figura 16, a seguir.

PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DO CAMPO ABERTO (MACHOS F1)

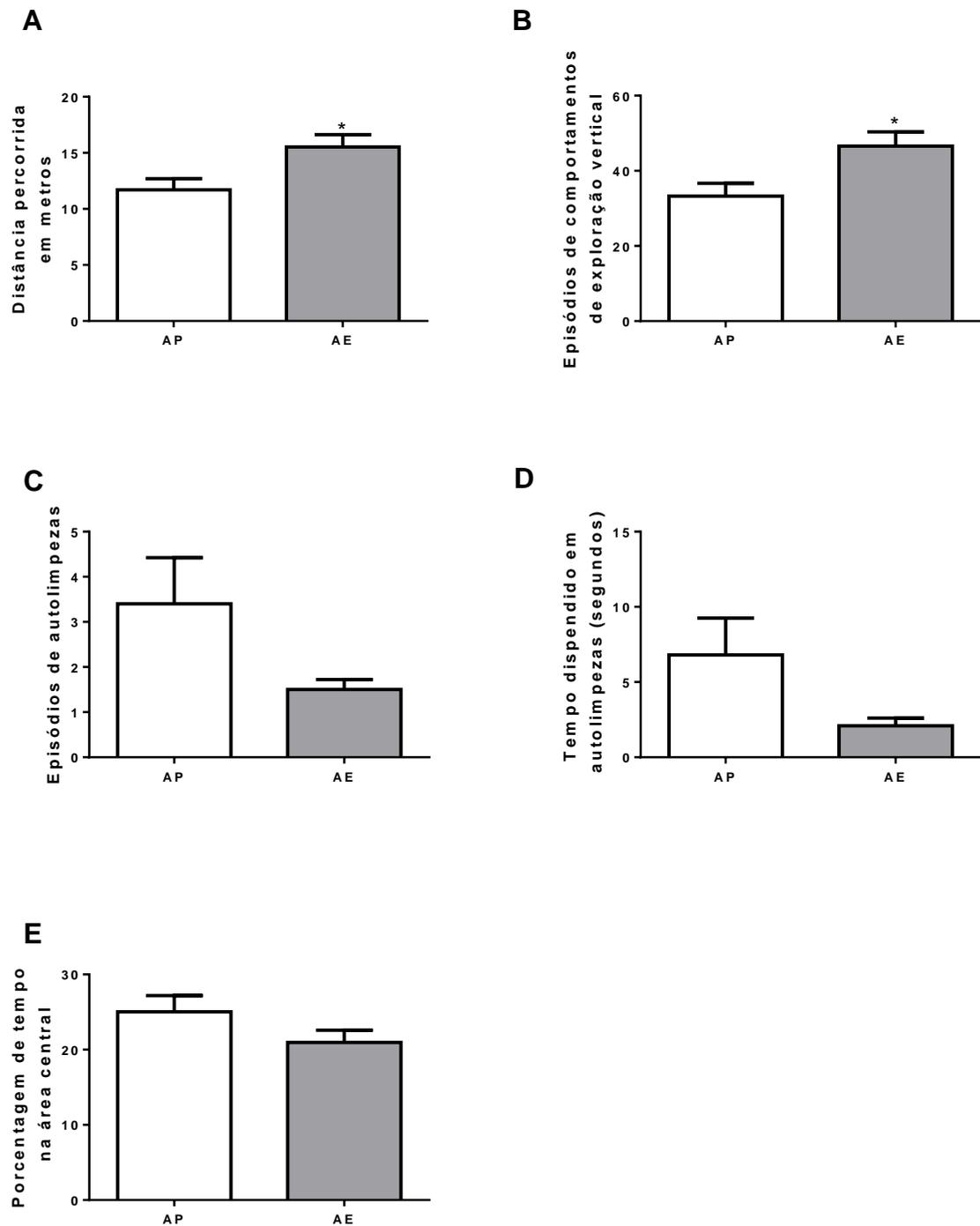


Figura 16: Parâmetros comportamentais avaliados durante os 5 minutos do campo aberto dos machos da geração F1. (A) Distância percorrida em metros, (B) Número de comportamentos de exploração vertical, (C) Número de autolimpezas, (D) Tempo em segundos dispendidos em autolimpezas e (E) porcentagem de tempo dispendido na área central do campo aberto. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de Student. * $p < 0,05$; N = 10 nos dois grupos.

No caso das fêmeas submetidas ao enriquecimento perinatal, no teste do campo aberto, apenas os comportamentos de exploração vertical se mostraram aumentados ($41,3 \pm 3,6$) em relação ao grupo padrão ($28,7 \pm 3,8$), $P = 0,0280$. Sendo que a distância em metros percorrida (EA = $6,3 \pm 0,3$ vs. AP = $5,9 \pm 0,6$; $P = 0,5379$), episódios de autolimpezas (EA = $2,80 \pm 0,65$ vs. AP = $2,7 \pm 0,8$; $P = 0,9213$), tempo despendido para a realização de autolimpezas (EA = $3,9 \pm 1,5$ s vs. AP = $4,3 \pm 1,2$ s; $P = 0,8390$) e a porcentagem de tempo despendido na área central do campo aberto (EA = $24,2 \pm 1,2$ vs. AP = $22,1 \pm 1,7$; $P = 0,3400$), não foram alterados significativamente. Estes dados são apresentados graficamente na figura 17.

PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DO CAMPO ABERTO (FÊMEAS F1)

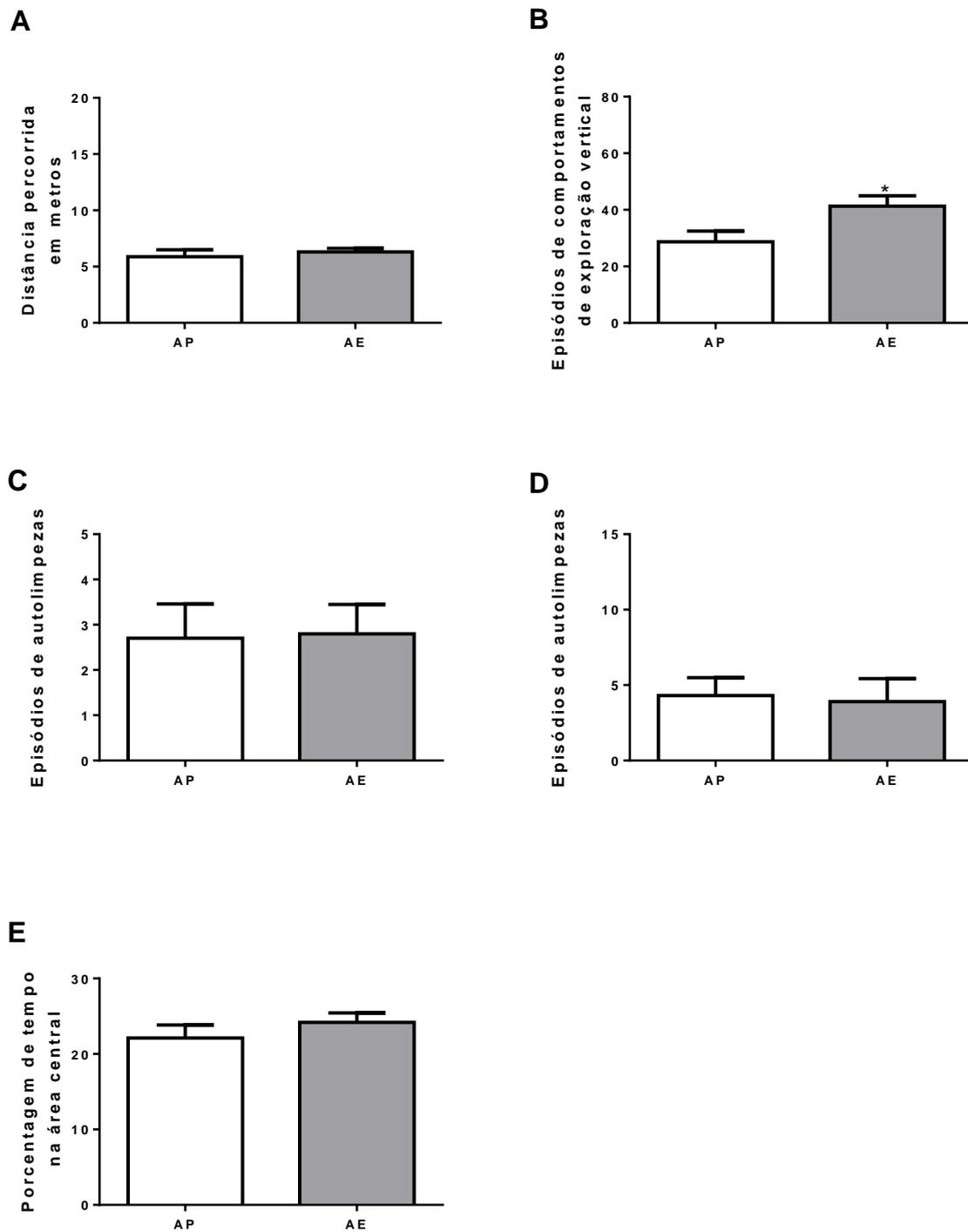


Figura 17: Parâmetros comportamentais avaliados durante os 5 minutos do campo aberto das fêmeas da geração F1. (A) Distância percorrida em metros, (B) Número de comportamentos de exploração vertical, (C) Número de autolimpezas, (D) Tempo em segundos despendidos em autolimpezas e (E) Porcentagem de tempo despendido na área central. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de Student. * $p < 0,05$; N = 10 nos dois grupos.

4.1.2 Teste do labirinto em cruz elevado

Após o teste do campo aberto, foram realizados testes mais específicos para a avaliação de comportamentos análogos a ansiedade. Dentre os testes de avaliação de comportamentos análogos à ansiedade o primeiro a ser realizado foi o teste do labirinto em cruz elevado. No teste do labirinto em cruz elevado os machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal apresentaram maior porcentagem no tempo despendido (EA = $31,2 \pm 3,7$ % vs. AP = $13,2 \pm 5,2$ %; P = 0,0115) e na porcentagem de entradas nos braços abertos em relação grupo padrão (EA = $41,8 \pm 4,5$ % vs. AP = $23,6 \pm 6,6$ %; P = 0,0355). Além disso, houve uma redução significativa do número de posições de comportamentos de avaliação de risco (EA = $15,3 \pm 2,1$ vs. AP = $27,5 \pm 2,9$; P = 0,0032). Um aumento significativo no número de entradas nos braços fechados também foi observado (EA = $14,5 \pm 1,4$ vs. AP = $8,6 \pm 1,1$; P = 0,0054). Estes resultados são expostos graficamente na figura 18.

**PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO
(MACHOS F1)**

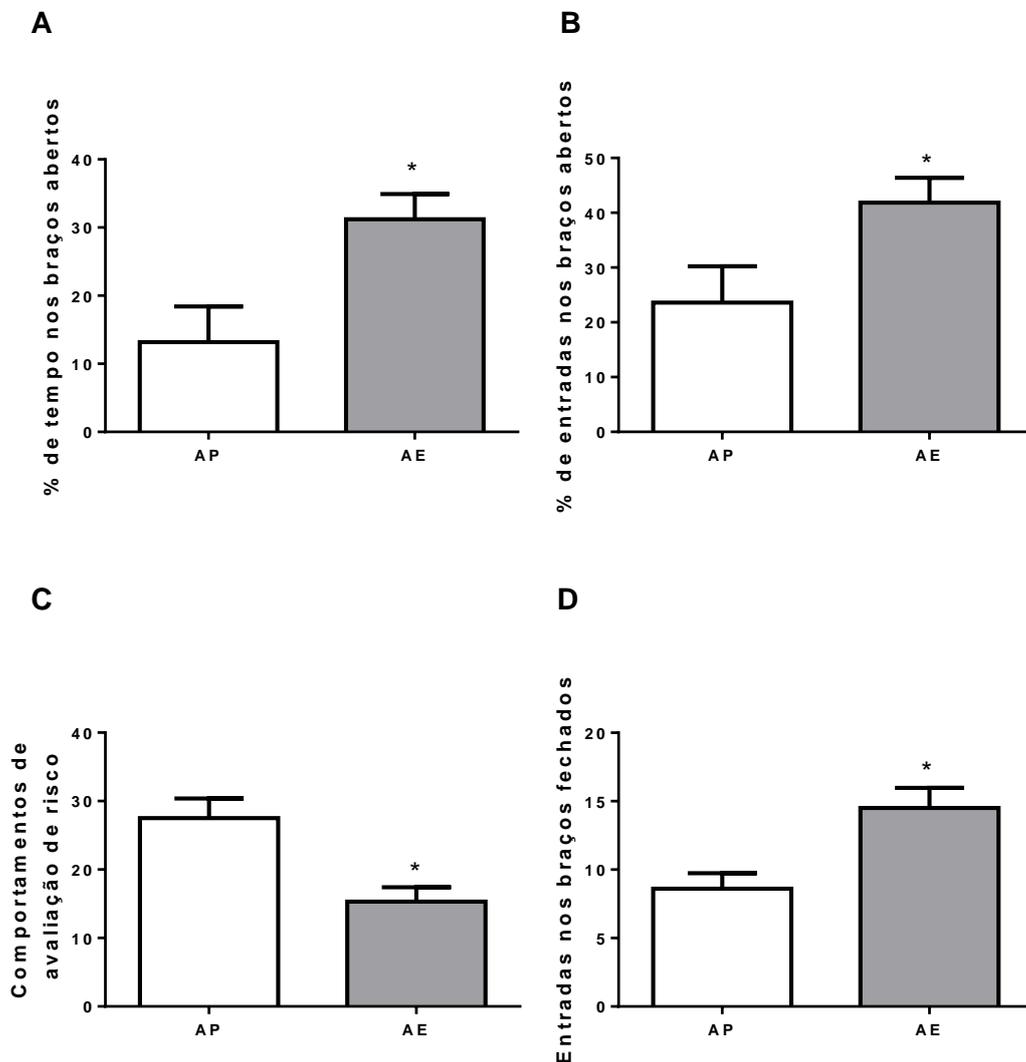


Figura 18: Parâmetros comportamentais avaliados durante os 5 minutos do teste do labirinto em cruz elevado dos machos da geração F1. A) Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos. B) Porcentagem de entradas nos braços abertos. C) Comportamentos de avaliação de risco. D) Entradas nos braços fechados. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de Student.* $p < 0,05$;. N = 10 nos dois grupos.

A análise do comportamento das fêmeas no teste do labirinto em cruz elevado demonstrou um aumento significativo no número de entradas nos braços fechados (EA = $14,0 \pm 1,0$ vs. AP = $8,9 \pm 1,5$; $P = 0,0119$) das fêmeas submetidas ao enriquecimento ambiental perinatal em relação ao grupo criado em condições padrão durante toda a vida, sem, no entanto, alterar significativamente a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (EA = $23,3 \pm 4,0$ % vs. AP = $21,5 \pm 3,7$ %; $P = 0,7374$), a

porcentagem de entradas nos braços abertos (EA = $34,1 \pm 5,9$ % vs. AP = $39,9 \pm 3,3$ %; $P = 0,4003$) ou os comportamentos de avaliação de risco (EA = $17,8 \pm 2,5$ vs. AP = $16,2 \pm 2,23$; $P = 0,6428$) conforme apresentado na figura 19.

PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (FÊMEAS F1)

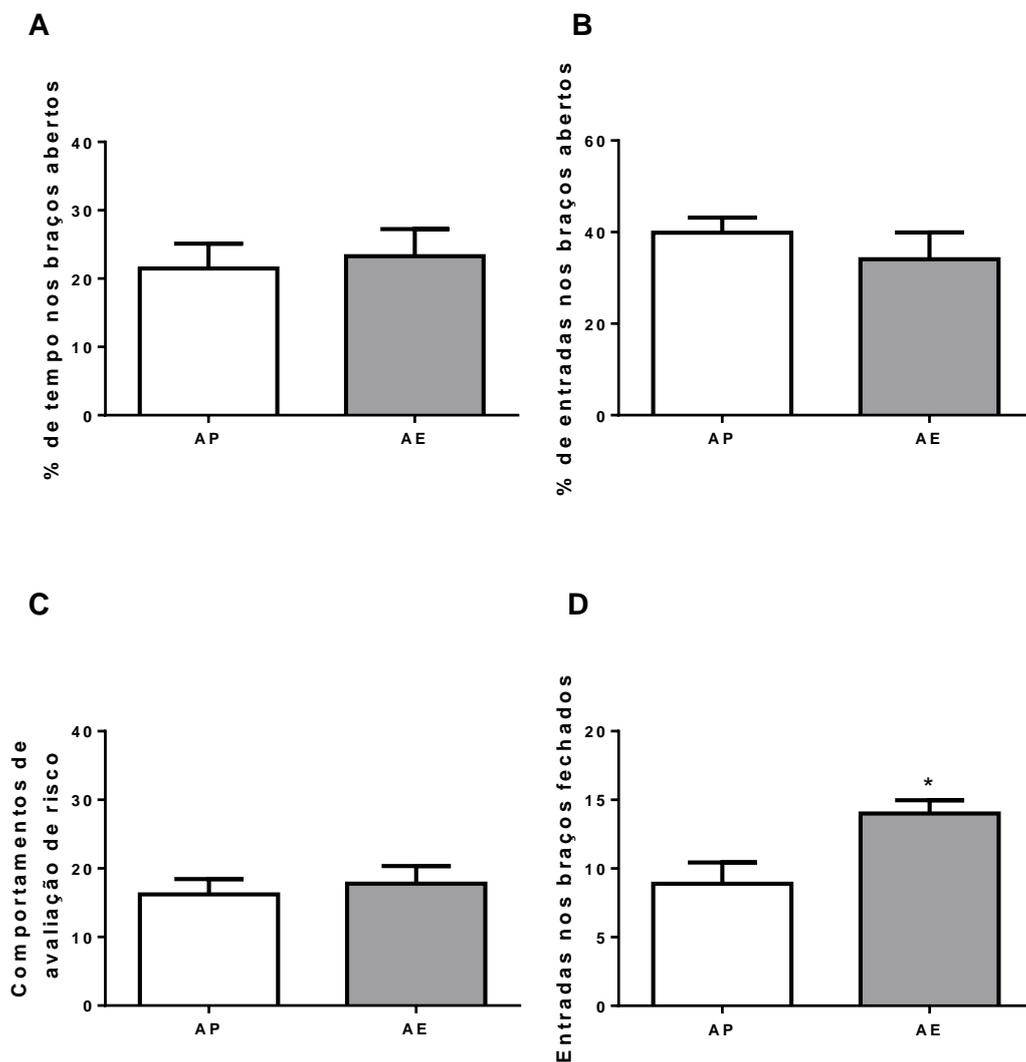


Figura 19: Parâmetros comportamentais avaliados durante os 5 minutos do teste do labirinto em cruz elevado das fêmeas da geração F1. A) Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos. B) Porcentagem de entradas nos braços abertos. C) comportamentos de avaliação de risco. D) Entradas nos braços fechados. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de Student. * $p < 0,05$; N = 10 nos dois grupos.

4.1.3 Teste da caixa claro escuro

Dois dias após o teste do labirinto em cruz elevado, os animais foram expostos ao teste da caixa claro escuro. Neste teste, os machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal apresentaram maior número de transições de ambiente ($19,7 \pm 3,1$) quando comparados aos seus pares criados em ambiente padrão por toda a vida ($11,2 \pm 1,7$), $P = 0,0264$. Do mesmo modo, o enriquecimento ambiental perinatal aumentou o número de quadrantes percorridos no lado claro (EA = $55,4 \pm 9,5$ vs. AP = $28,3 \pm 5,0$; $P = 0,0214$) e o número de comportamentos de exploração vertical (EA = $5,4 \pm 1,4$ vs. AP = $2,2 \pm 0,7$; $P = 0,0490$) realizados em relação aos animais do grupo padrão. O tempo de permanência no lado claro (EA = $96,0 \pm 13,2$ s vs. AP = $94,8 \pm 21,7$ s; $P = 0,9628$), a latência para a entrada no lado escuro da caixa claro-escuro (EA = $16,4 \pm 2,7$ s vs. AP = $38,7 \pm 12,4$ s; $P = 0,0950$) e os comportamentos de avaliação de risco (EA = $16,4 \pm 2,6$ vs. AP = $14,9 \pm 2,5$; $P = 0,6840$) não foram estatisticamente diferentes entre os grupos analisados (figura 20).

**PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DA CAIXA CLARO-ESCURO
(MACHOS F1)**

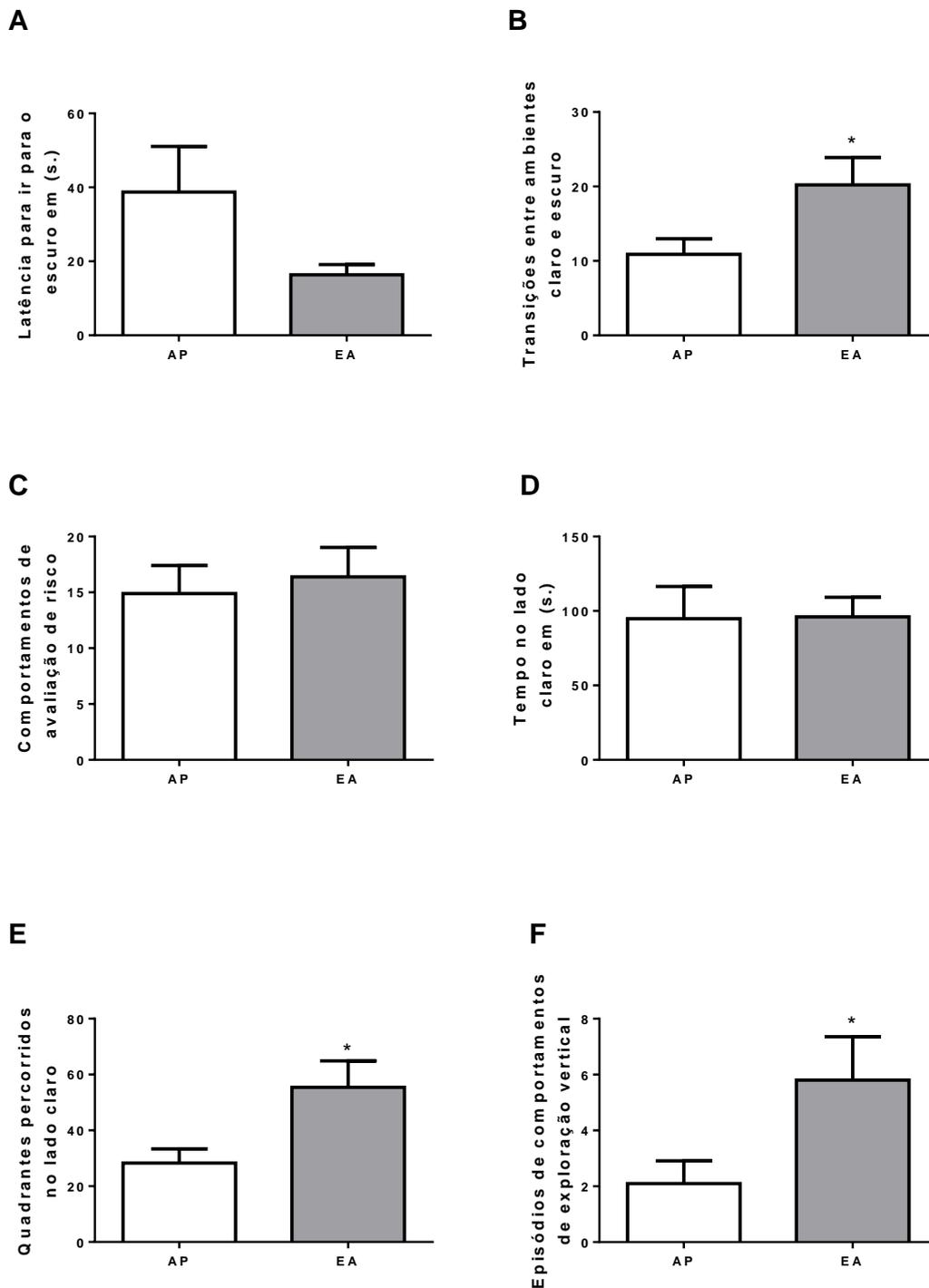


Figura 20: Parâmetros avaliados nos 5 minutos do teste da caixa claro escuro dos machos da geração F1. A) Latência para a entrada no lado escuro B) Transição entre os ambientes. C) Comportamentos de avaliação de risco. D) Tempo de permanência na parte clara. E) Quadrantes percorridos no lado claro. F) Episódios de comportamentos de exploração vertical. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de Student. * $p < 0,05$. $N = 10$ nos dois grupos.

Diferente dos machos, as fêmeas submetidas ao enriquecimento ambiental perinatal apresentaram menor latência para transição entre os compartimentos da caixa claro-escuro (EA = $16,3 \pm 1,6$ s vs. AP = $40,9 \pm 9,7$ s; P = 0,0228), menor tempo de permanência no lado claro (EA = $56,3 \pm 8,4$ s vs. AP = $88,1 \pm 8,0$ s; P = 0,0132), assim como aumento no número de comportamentos de avaliação de risco (EA = $19,6 \pm 2,2$ s vs. AP = $11,6 \pm 1,9$ s; P = 0,0121) quando comparadas as fêmeas criadas apenas em ambiente padrão. Os outros parâmetros como: número de transições entre os ambientes (EA = $14,1 \pm 3,0$ vs. AP = $11,4 \pm 2,9$; P = 0,5255), número de quadrantes percorridos no lado claro (EA = $39,5 \pm 8,7$ vs. AP = $34,4 \pm 7,1$; P = 0,6562) e número de comportamentos de exploração vertical (EA = $5,0 \pm 1,9$ vs. AP = $4,5 \pm 1,4$; P = 0,8350) não foram alterados significativamente (figura 21).

PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DA CAIXA CLARO-ESCURO (FÊMEAS F1)

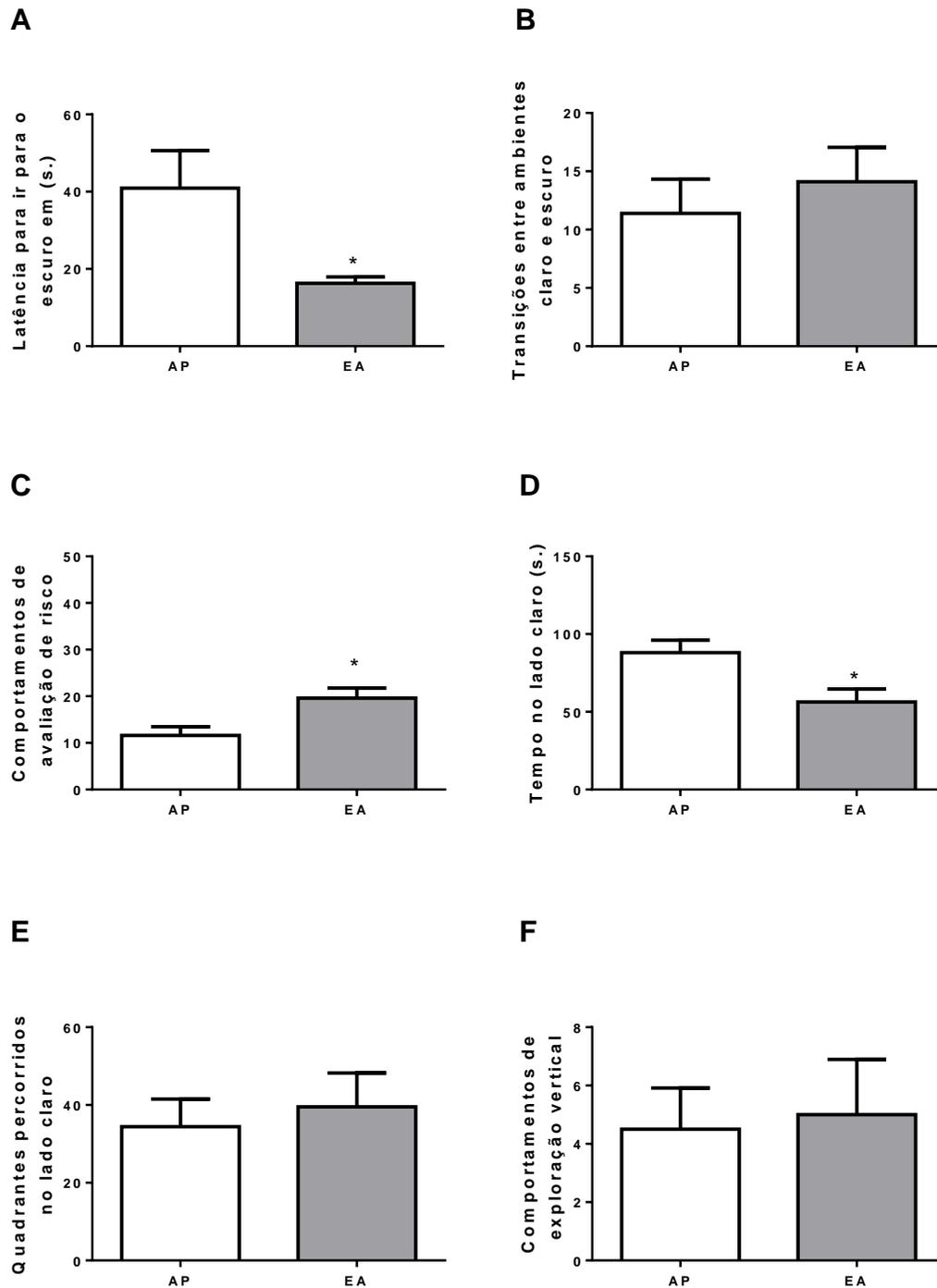


Figura 21: Parâmetros avaliados nos 5 minutos do teste da caixa claro escuro das fêmeas da geração F1. A) Latência para a entrada no lado escuro B) Transição entre os ambientes. C) Comportamentos de avaliação de risco. D) Tempo de permanência na parte clara. E) Quadrantes percorridos no lado claro. F) Episódios de comportamentos de exploração vertical. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de Student. * $p < 0,05$. $N = 10$ nos dois grupos.

4.1.4 Teste da supressão da alimentação pela novidade

O último teste de avaliação de comportamentos análogos à ansiedade que compôs a bateria foi o teste de supressão da alimentação pela novidade. Neste teste, a latência para interação com o alimento não diferiu entre os machos expostos ao enriquecimento ambiental perinatal ($53,1 \pm 17,6$ s) e os machos criados apenas em ambiente padrão ($65,4 \pm 24,2$ s), $P = 0,6862$ (figura 22A), assim como não houve diferença significativa entre as fêmeas submetidas às duas condições (EA = $37,8 \pm 6,6$ vs. AP = $73,7 \pm 29,3$; $P = 0,2271$) (figura 22 B).

TESTE DA SUPRESSÃO DA ALIMENTAÇÃO PELA NOVIDADE (GERAÇÃO F1)

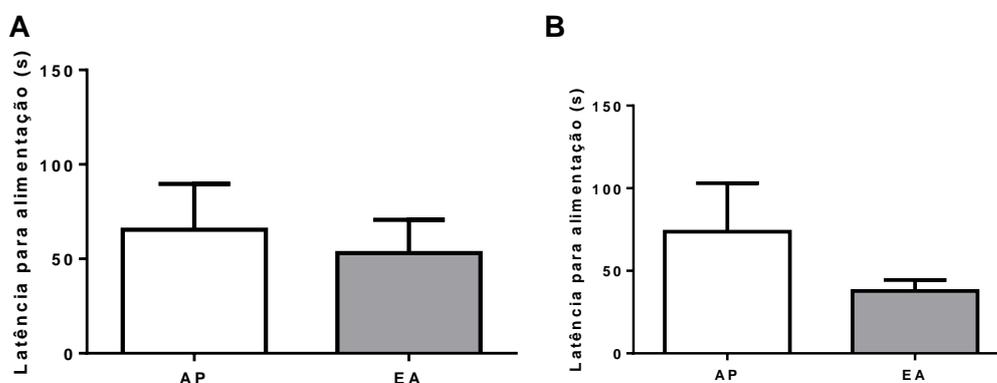


Figura 22: Latência para alimentação avaliada nos 5 minutos do teste da supressão da alimentação pela novidade na geração F1. A) machos; B) fêmeas, teste t de Student. N = 10 em todos os grupos.

4.2. GERAÇÃO F2

4.2.1 Teste do campo aberto

Da mesma forma que os animais da geração de seus genitores paternos, os machos da geração F2 foram submetidos à bateria de testes comportamentais que se iniciou pelo teste do campo aberto para avaliação da atividade exploratória espontânea. Neste teste, os machos da geração F2 oriundos de genitores que foram submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal (AE +AP) não diferem nos parâmetros analisados dos animais oriundos de pais criados apenas em ambiente padrão (AP + AP). Não houve diferença na distância percorrida em metros (AE = $13,6 \pm 1,0$ vs. AP = $11,0 \pm 0,7$; $P = 0,0587$). Assim como, nos episódios de comportamentos de exploração vertical (AE+AP = $58,1 \pm 6,7$ vs. AP+AP = $48,7 \pm 2,9$; $P = 0,2231$), episódios de autolimpeza

(AE+AP = 3,0 ± 1,0 vs. AP+AP = 3,2 ± 0,6; P = 0,8368), tempo despendido em autolimpeza (AE+AP = 5,6 ± 1,9 s vs. AP+AP = 8,9 ± 2,0 s; P = 0,0632) e na porcentagem de tempo despendida na parte central do campo aberto (AE = 20,0 ± 2,8 vs. AP = 18,0 ± 1,6; P = 0,5622) também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, como mostrado na figura 23.

PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DO CAMPO ABERTO (MACHOS F2)

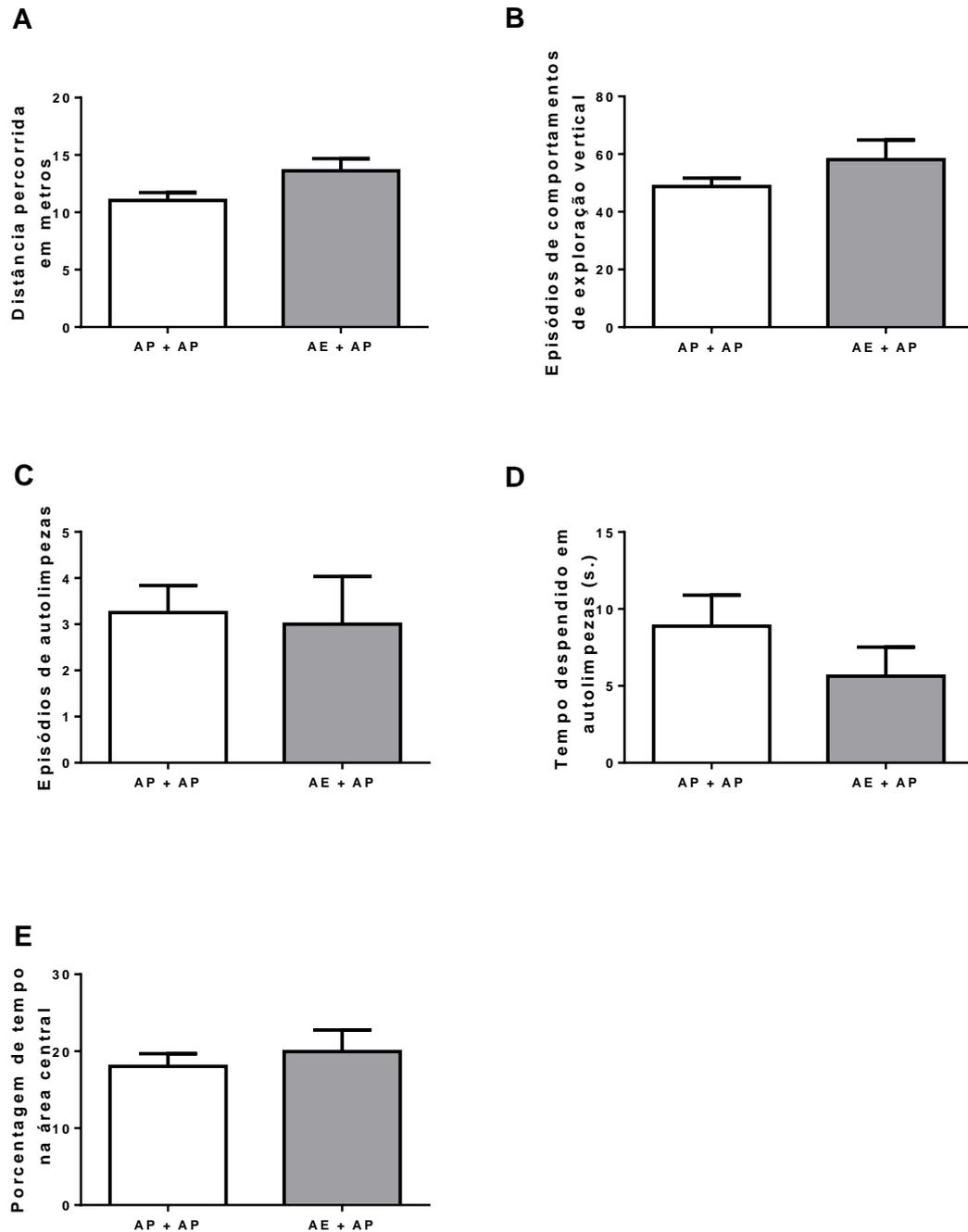


Figura 23: Parâmetros comportamentais avaliados durante os 5 minutos do campo aberto dos machos da geração F2. (A) Distância percorrida em metros, (B) Número de comportamentos de exploração vertical, (C) Número de autolimpezas, (D) Tempo em segundos despendidos em autolimpezas e (E) Porcentagem de tempo despendido na área central. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de Student, * $p < 0,05$; N = 8 nos dois grupos.

Nas fêmeas da geração F2 avaliadas não foram observadas quaisquer diferenças significativas entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados. Distância percorrida em metros, AE+AP = $11,9 \pm 1,2$ vs. AP+AP = $11,9 \pm 1,2$; P = 0,9649; comportamentos de exploração vertical, AE+AP = $49,9 \pm 4,4$ vs. AP+AP = $38,9 \pm 5,8$; P = 0,1508; número de episódios de autolimpeza, AE+AP = $2,1 \pm 0,6$ vs. AP+AP = $2,4 \pm 0,9$; P = 0,8167; tempo despendido com autolimpeza, AE+AP = $8,6 \pm 4,2$ s vs. AP+AP = $3,5 \pm 1,2$ s; P = 0,2563 e porcentagem de tempo despendido na área central, AE+AP = $20,3 \pm 2,8$ vs. AP+AP = $26,1 \pm 1,8$; P = 0,1001. Estes dados são expressos graficamente na figura 24.

PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DO CAMPO ABERTO (FÊMEAS F2)

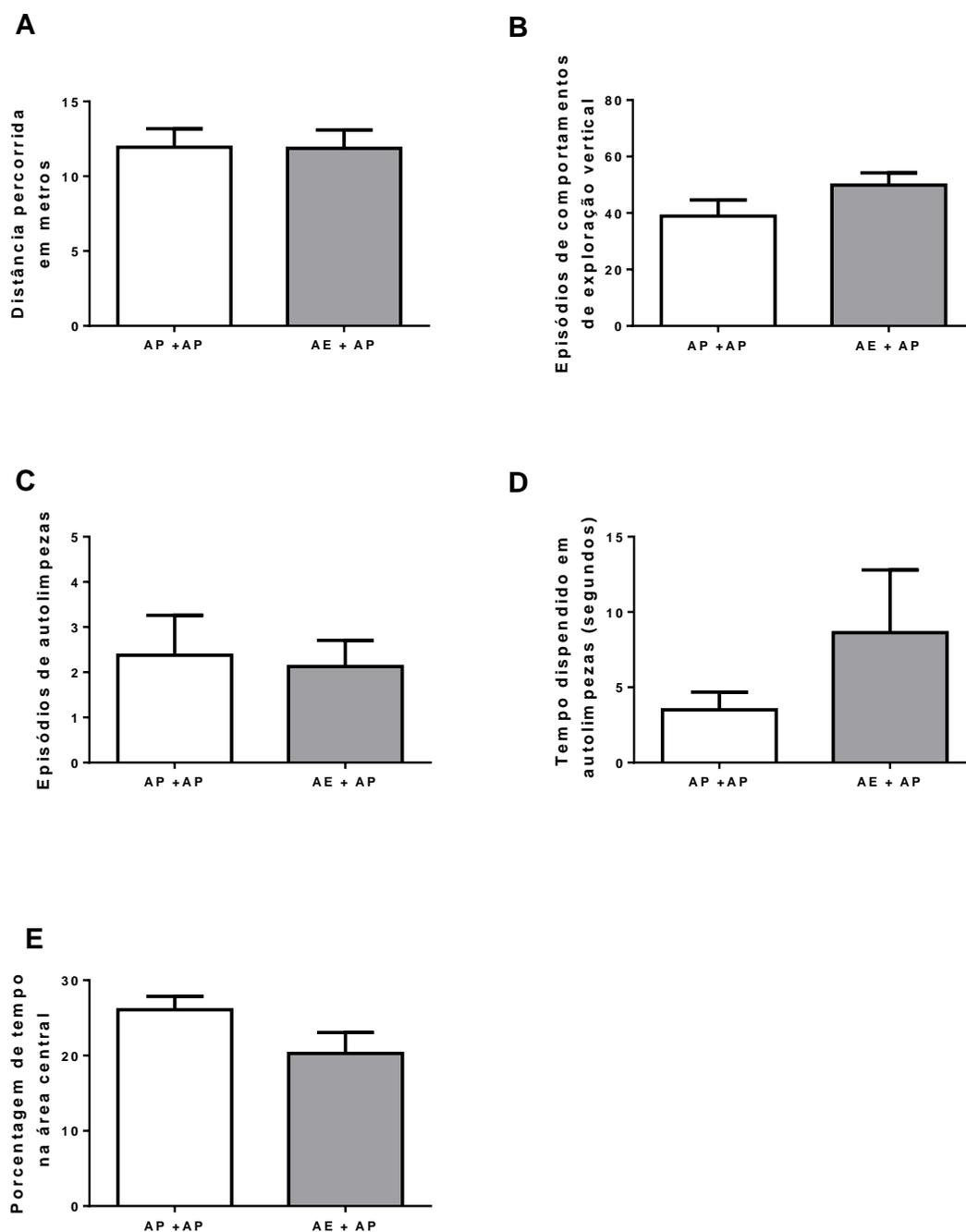


Figura 24: Parâmetros comportamentais avaliados durante os 5 minutos do campo aberto das fêmeas da geração F2. (A) Número de quadrantes percorridos, (B) Número de comportamentos de exploração vertical, (C) Número de autolimpezas, (D) Tempo em segundos despendidos em autolimpezas e (E) Porcentagem de tempo despendido na área central. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de Student, * $p < 0,05$; N = 8 nos dois grupos.

4.2.2 Teste do labirinto em cruz elevado

Neste teste, os machos oriundos de genitores machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal, apresentaram aumento na porcentagem de tempo despendido nos braços abertos ($25,7 \pm 4,3$ %) em relação às proles machos oriundas de machos submetidos apenas ao ambiente padrão de criação ($9,3 \pm 3,1$ %), $P = 0,0078$, assim como, apresentaram menos comportamentos de avaliação de risco (AE+AP = $10,7 \pm 1,4$ vs. AP+AP = $21,4 \pm 2,3$; $P = 0,0013$). Tanto a porcentagem de entradas nos braços abertos (AE+AP = $41,5 \pm 6,2$ % vs. AP+AP = $24,6 \pm 6,6$ %; $P = 0,0846$) quanto o número de entradas nos braços fechados (AE+AP = $9,1 \pm 0,6$ vs. AP+AP = $7,7 \pm 0,7$; $P = 0,1770$) não diferiram significativamente entre os grupos experimentais, como mostrado na figura 25.

**PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO
(MACHOS F2)**

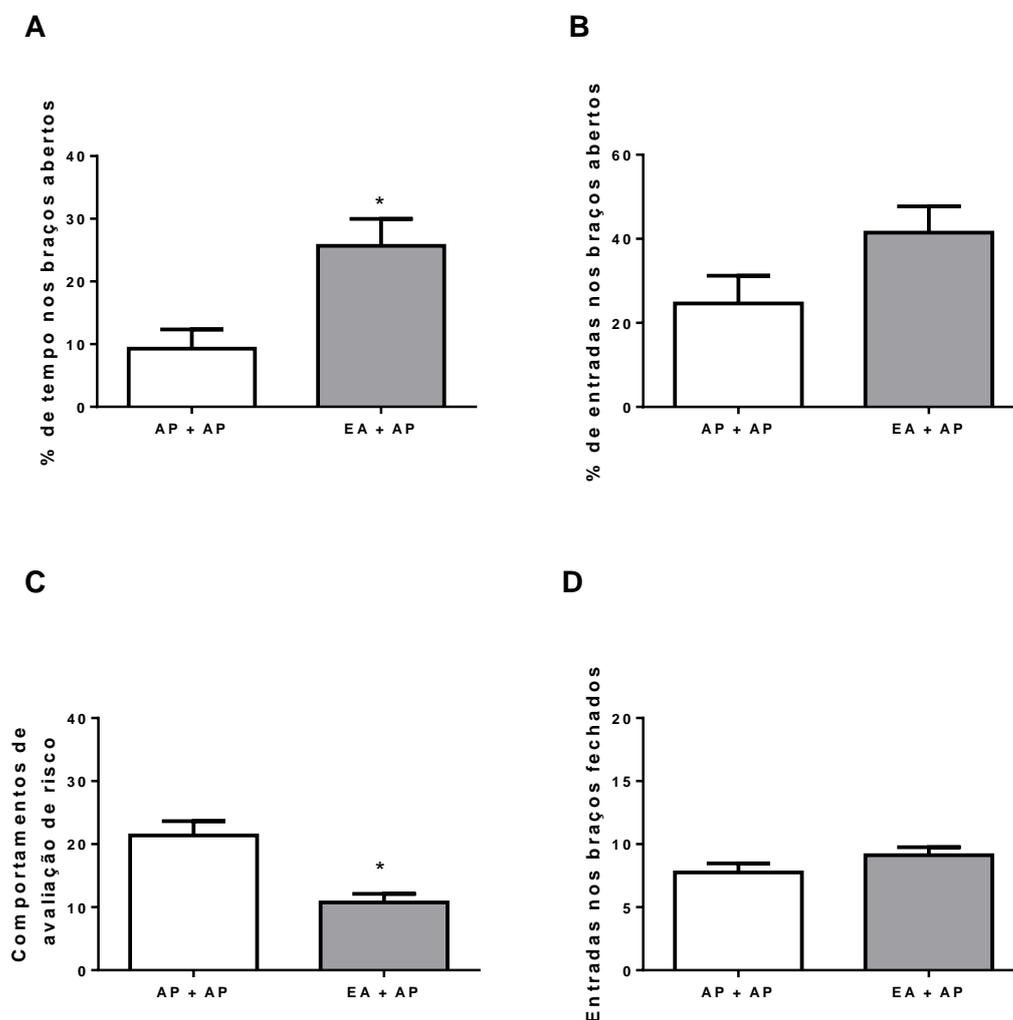


Figura 25: Parâmetros comportamentais avaliados durante os 5 minutos do teste do labirinto em cruz elevado dos machos da geração F2. A) Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos. B) Porcentagem de entradas nos braços abertos. C) comportamentos de avaliação de risco. D) Entradas nos braços fechados. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de *Student* *p < 0,05;. N = 8 nos dois grupos.

Nos grupos de fêmeas analisados, os parâmetros, porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (AE+AP = 20,1 ± 5,1 % vs. AP+AP = 17,2 ± 5,2 %; P = 0,7000), porcentagem de entradas nos braços abertos (AE+AP = 32,3 ± 7,1 % vs. AP+AP = 31,2 ± 7,4 %; P = 0,9143), comportamentos de avaliação de risco (AE+AP = 18,1 ± 2,6 vs. AP+AP = 20,1 ± 1,9; P = 0,5428) e número de entradas nos braços

fechados ($AE+AP = 8,0 \pm 1,1$ vs. $AP+AP = 8,4 \pm 0,8$; $P = 0,7890$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (figura 26).

PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (FÊMEAS F2)

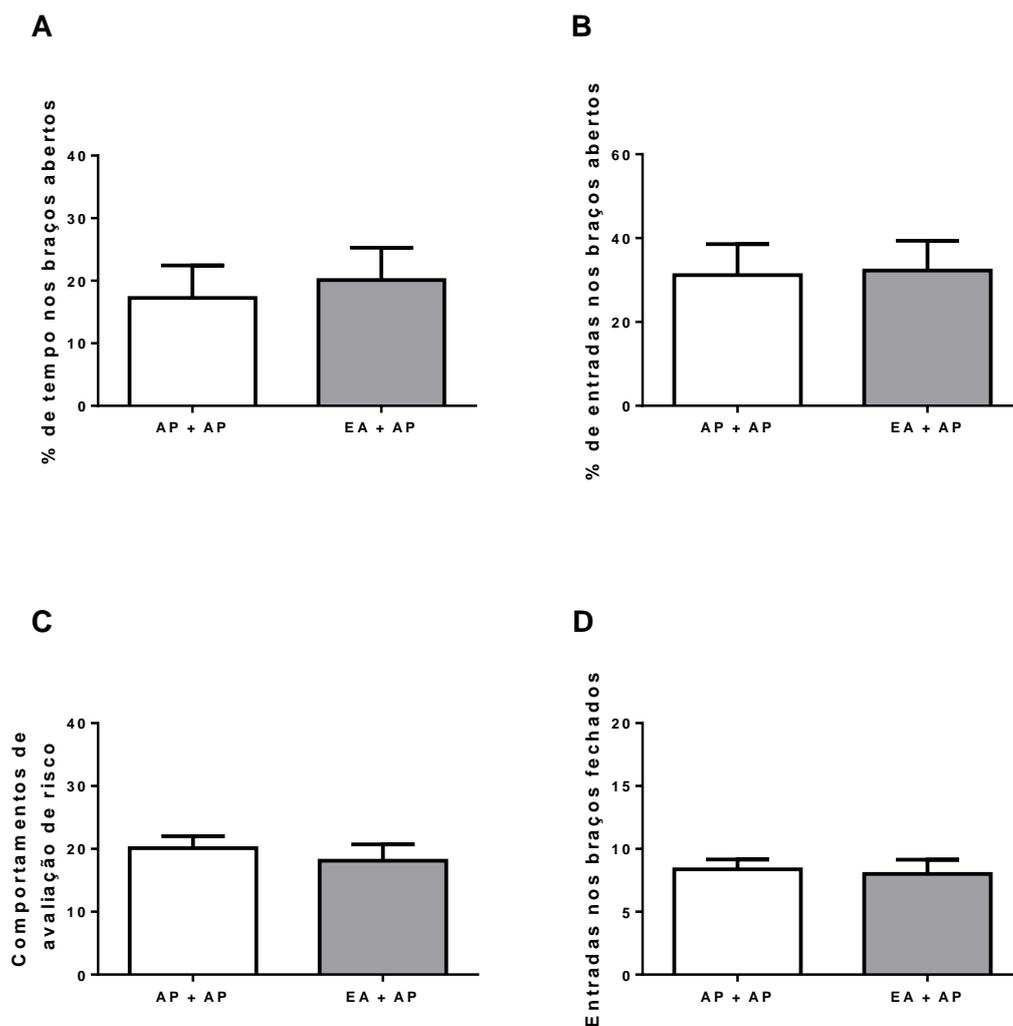


Figura 26: Parâmetros comportamentais avaliados durante os 5 minutos do teste do labirinto em cruz elevado das fêmeas da geração F2. A) Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos. B) Porcentagem de entradas nos braços abertos. C) comportamentos de avaliação de risco. D) Entradas nos braços fechados. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de *Student* $N = 8$ nos dois grupos.

4.2.3 Teste da caixa claro-escuro

No teste da caixa claro-escuro, não houve alteração significativa de nenhum dos parâmetros analisados quando comparados os machos da prole de genitores machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal e os machos da prole de genitores machos criados apenas em ambiente padrão figura 27 assim como nas fêmeas com as mesmas origens Figura 28. Os parâmetros analisados foram: latência para a entrada no lado escuro, (Machos: AE+AP = $29,1 \pm 5,1$ s vs. AP+AP = $41,5 \pm 15,1$ s; P = 0,4510), (Fêmeas: AE+AP = $29,6 \pm 10,0$ s vs. AP+AP = $30,1 \pm 4,2$ s; P = 0,9639); número de transições entre os ambientes (Machos: AE+AP = $10,6 \pm 2,5$ vs. AP+AP = $8,5 \pm 2,9$, P = 0,5905), (Fêmeas: AE+AP = $11,2 \pm 2,9$ vs. AP+AP = $8,7 \pm 1,7$; P = 0,4687), número de comportamentos de avaliação de risco (Machos: AE+AP = $26,7 \pm 11,4$ vs. AP+AP = $22,1 \pm 2,1$; P = 0,6963), (Fêmeas: AE+AP = $26,7 \pm 11,4$ vs. AP+AP = $22,1 \pm 2,1$; P = 0,2643), tempo despendido no lado claro (Machos: AE+AP = $73,9 \pm 10,5$ s vs. AP+AP = $69,6 \pm 13,9$ s; P = 0,8103), (Fêmeas= AE+AP= $76,4 \pm 10,1$ s vs. AP+AP = $60,9 \pm 6,1$ s; P = 0,2115), quadrantes percorridos no lado claro (Machos: AE+AP = $35,6 \pm 11,3$ vs. AP+AP = $22,5 \pm 7,6$; P = 0,3514), (Fêmeas: AE+AP= $32,0 \pm 6,8$ vs. AP+AP= $22,5 \pm 4,9$; P = 0,2789) e episódios de comportamentos de exploração vertical (Machos: AE+AP = $4,5 \pm 2,6$ vs. AP+AP = $2,0 \pm 1,4$; P = 0,4204), (Fêmeas: AE+AP= $1,9 \pm 0,9$ vs. AP+AP = $0,2 \pm 0,2$; P = 0,2168).

PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DA CAIXA CLARO-ESCURO MACHOS F2

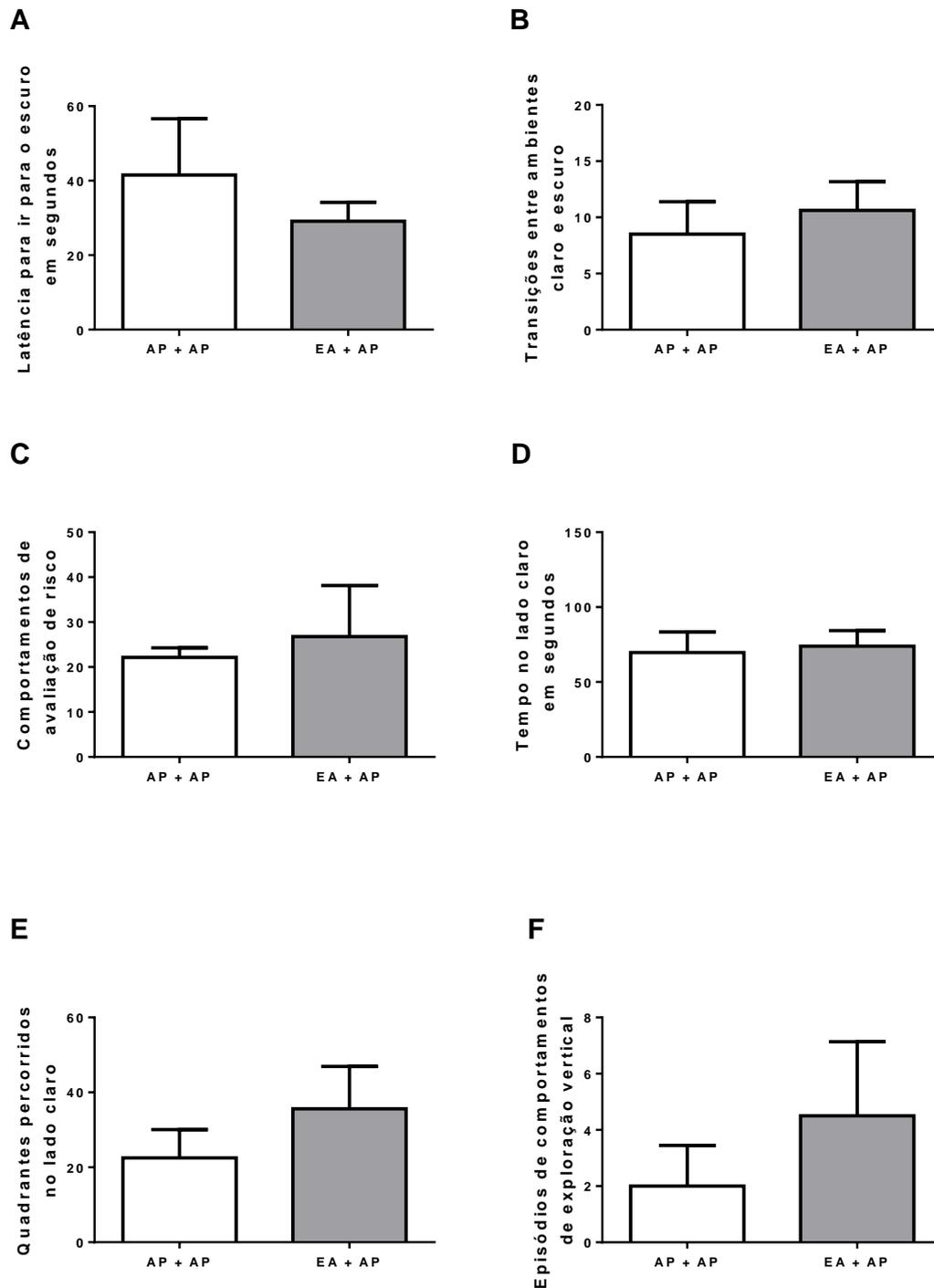


Figura 27: Parâmetros avaliados nos 5 minutos do teste da caixa claro escuro dos machos da geração F2. A) Latência para a entrada no lado escuro B) Transição entre os ambientes. C) Comportamentos de avaliação de risco. D) Tempo de permanência na parte clara. E) Quadrantes percorridos no lado claro. F) Episódios de comportamentos de exploração vertical. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de *Student*, * $p < 0,05$; N = 8 nos dois grupos.

PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DA CAIXA CLARO-ESCURO (FÊMEAS F2)

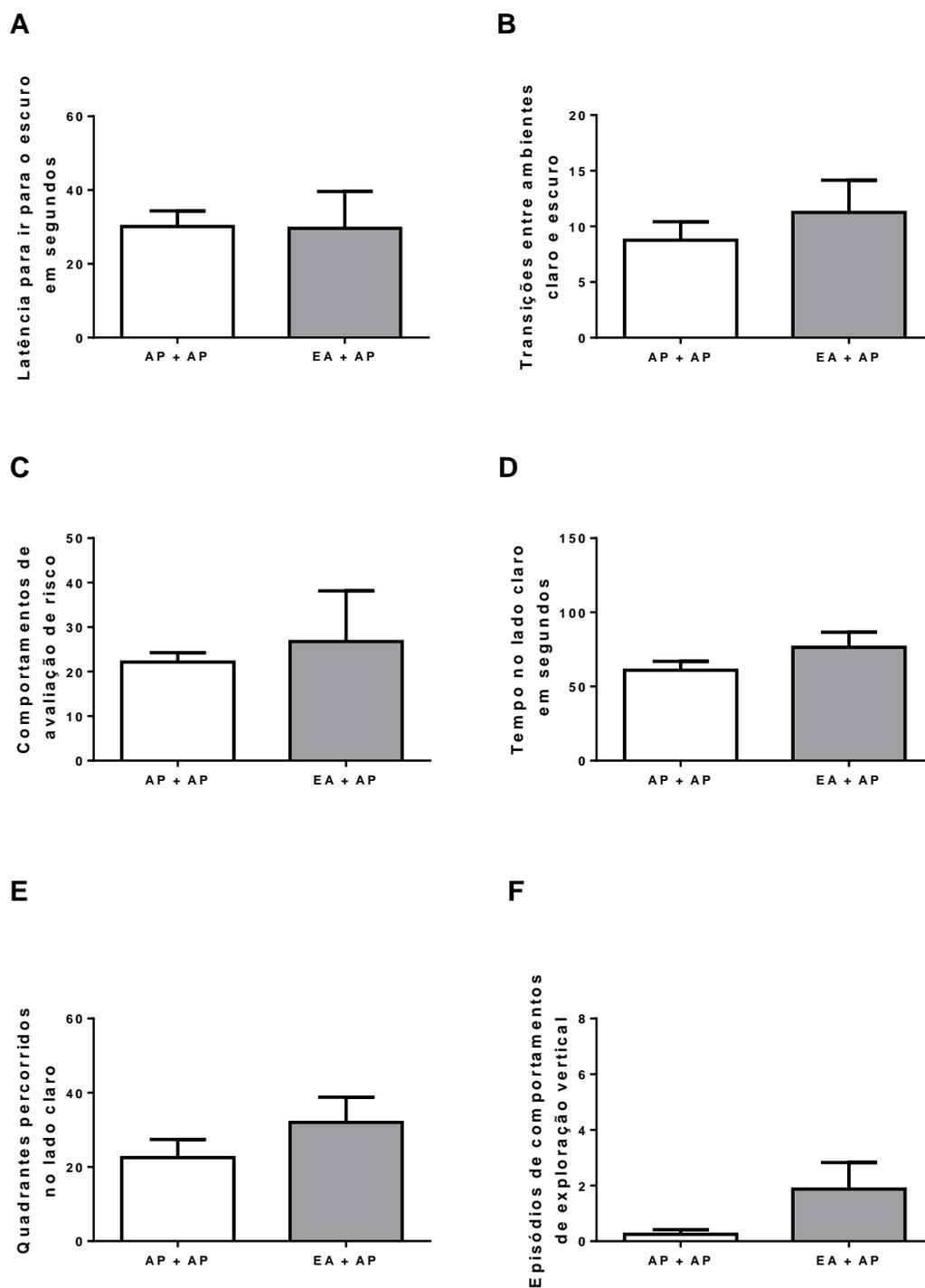


Figura 28: Parâmetros avaliados nos 5 minutos do teste da caixa claro escuro das fêmeas da geração F2.

A) Latência para a entrada no lado escuro B) Transição entre os ambientes. C) Comportamentos de avaliação de risco. D) Tempo de permanência na parte clara. E) Quadrantes percorridos no lado claro. F) Episódios de comportamentos de exploração vertical. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. Teste t de *Student*, N = 8 nos dois grupos.

4.2.4 Teste da supressão da alimentação pela novidade

Neste teste, a latência para interação com o alimento não diferiu entre os machos expostos ao enriquecimento ambiental perinatal ($45,1 \pm 14,3$ s) e os machos criados apenas em ambiente padrão ($60,9 \pm 19,4$ s), $P = 0,5243$ figura 29A, assim como não houve diferença significativa entre as fêmeas submetidas às duas condições (AE+AP = $75,5 \pm 23,4$ s vs. AP+AP = $77,2 \pm 23,7$ s; $P = 0,9598$) figura 29 B.

TESTE DA SUPRESSÃO DA ALIMENTAÇÃO PELA NOVIDADE (GERAÇÃO F2)

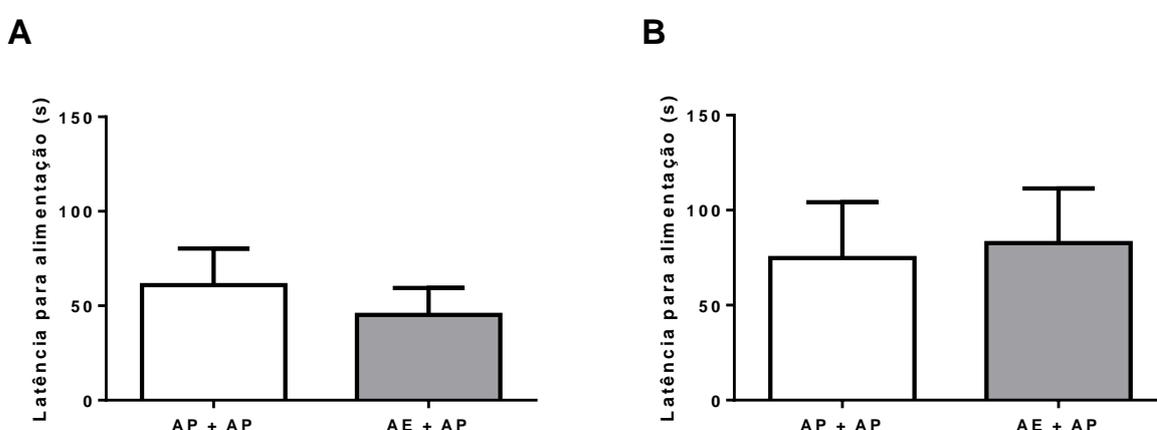


Figura 29: Latência para alimentação avaliada nos 5 minutos do teste da supressão da alimentação pela novidade na geração F2. A) machos; B) fêmeas, Teste t de *Student*, $N = 8$ em todos os grupos.

4.3. Expressão gênica no córtex frontal

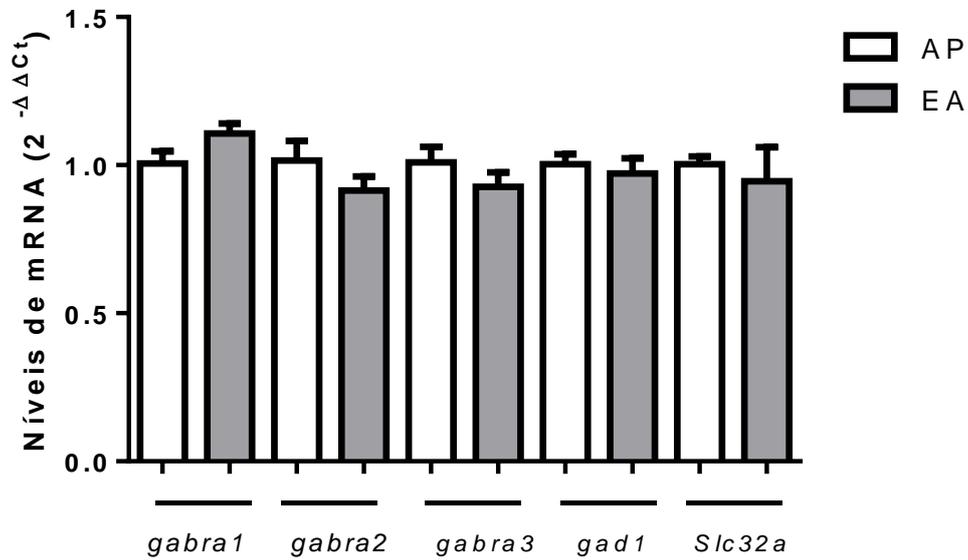
Na tentativa de explicar o mecanismo envolvido com a resposta comportamental apresentada pelos machos submetidos ao enriquecimento ambiental foi realizada a avaliação da expressão dos genes relacionados às subunidades α_1 , α_2 , α_3 do receptor $GABA_A$, ácido glutâmico descarboxilase 67 e transportador vesicular de GABA no córtex frontal, sendo os dados expressos com valores de $2^{-\Delta \Delta Ct}$. Quanto à expressão do gene *gabral* os animais submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal ($1,11 \pm 0,03$) não apresentaram diferença significativa dos animais que sempre viveram em ambiente padrão ($1,01 \pm 0,04$), $P = 0,0732$ (teste t de Student). Do mesmo modo, a expressão do gene *gabra2* não apresentou diferença entre os animais que viveram em ambiente mais complexo no período perinatal ($0,91 \pm 0,05$) em relação aos animais que foram criados

apenas em ambiente padrão ($1,01 \pm 0,07$), $P = 0,2348$ (teste t de Student). De modo semelhante, a avaliação da expressão do gene *gabra3* também não apresentou diferenças entre os machos que viveram em ambiente enriquecido no período perinatal ($0,93 \pm 0,05$) quando comparados aos animais que viveram toda a vida em ambiente padrão de criação ($1,00 \pm 0,05$), $P = 0,2668$ (teste t de Student). Também não foram encontradas diferenças na expressão do gene *GAD1* entre os animais submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal ($1,0 \pm 0,05$) e ($1,00 \pm 0,03$) e $P = 0,6073$ (teste t de Student), ou na expressão do gene *Slc32a*, respectivamente ($0,94 \pm 0,12$) e ($1,00 \pm 0,03$) e $P = 0,6162$ (teste t de Student). Estes dados são expostos na figura 30 A.

Com o objetivo de avaliar a influência da bateria de testes na expressão dos genes-alvo no córtex frontal, foram comparados animais padrão submetidos ou não à bateria de testes. A expressão do gene *gabra1* foi reduzida significativamente nos animais que passaram pela bateria de testes comportamentais ($0,86 \pm 0,03$) em relação aos animais não expostos aos testes ($1,01 \pm 0,06$), $P = 0,0446$ (teste t de Student). Por outro lado tanto à expressão do gene *gabra2* (expostos = $1,12 \pm 0,07$ vs. não expostos = $1,02 \pm 0,08$; $P = 0,4303$), quanto a expressão do gene *gabra3* (expostos = $1,13 \pm 0,06$ vs. não expostos = $1,02 \pm 0,08$; $P = 0,2952$), não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Do mesmo modo, a expressão dos genes *GAD1* (expostos = $0,98 \pm 0,03$ vs. não expostos = $1,02 \pm 0,07$; $P = 0,6704$) e *Slc32a* (expostos = $0,92 \pm 0,02$ vs. não expostos = $1,01 \pm 0,06$; $P = 0,1862$) não diferiram entre os grupos analisados. Estes dados são expostos na figura 30 B.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DAS SUBUNIDADES α_1 , α_2 , α_3 DO RECEPTOR GABA_A, GAD₆₇ e VGAT NO CÓRTEX FRONTAL

A



B

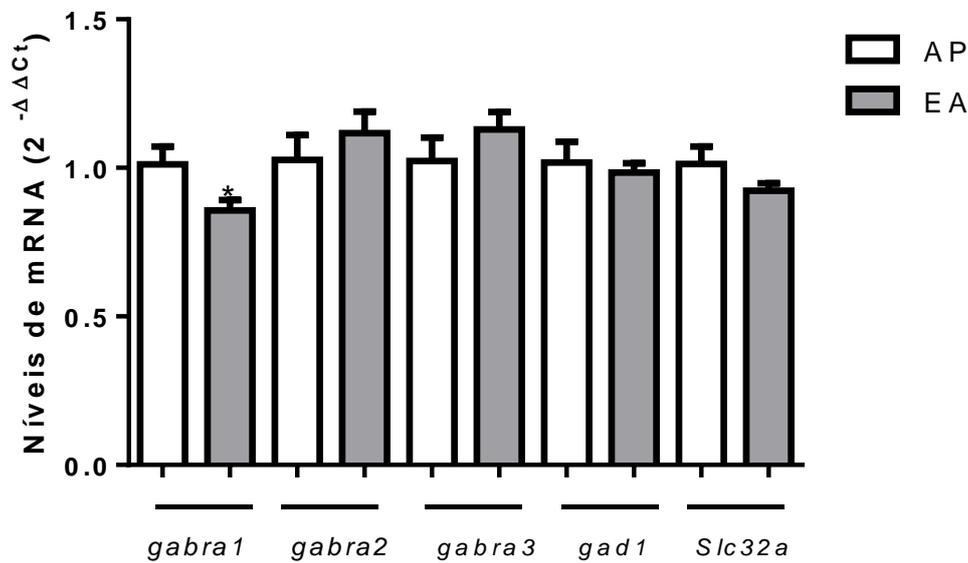


Figura 30: Expressão relativa dos genes *gabra1*, *gabra2* e *gabra3*, *GAD1* e *slc32a* através da técnica de RT-qPCR no córtex frontal de camundongos machos. A- Efeito do enriquecimento ambiental na expressão gênica. B- Efeito da bateria de testes comportamentais na expressão gênica. As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias, teste t de Student. N = 8 em todos os grupos.

5. DISCUSSÃO

5.1 Efeitos do enriquecimento ambiental perinatal em machos

A primeira série de experimentos foi instituída para avaliar quais os impactos do enriquecimento ambiental perinatal em camundongos machos e fêmeas, sendo considerados primeiro os dados obtidos com machos. No teste do campo aberto, se observou aumento da atividade locomotora e exploratória dos machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal. O aumento da atividade locomotora pode estar relacionado tanto à psicoestimulação, quanto a atividade ansiolítica. No entanto, a permanência na área central, que é o principal índice de ansiedade neste teste não foi alterada. Alguns autores sugerem que o aumento na ambulação e exploração neste teste é um indicativo de menor emocionalidade (Ivinskis, 1970) induzido pelo teste do campo aberto. Vale salientar, que o termo emocionalidade se refere a respostas que o animal tem em situações de excitação emocional ou desconforto (Hall, 1934), posteriormente extrapolado para as respostas dos animais a situações de medo e estresse (Walsh e Cummins, 1976). Neste sentido, há evidências que doses não sedativas de benzodiazepínicos aumentam a atividade locomotora de camundongos no teste do campo aberto. Este efeito dos fármacos benzodiazepínicos não é por ação direta, mas por reduzir a neofobia presente no teste, estes fármacos diminuem a neofobia responsável pela inibição comportamental, fazendo assim com que os animais tratados com este fármaco se movimentem mais (Prut e Belzung, 2003).

Ainda em relação ao teste do campo aberto, os machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal apresentaram aumento do número de comportamentos de exploração vertical (levantamentos sobre as patas traseiras - *rearings*), um parâmetro que tem sido relacionado à atividade exploratória (Archer, 1973). Considerando a relação de psicoestimulantes que aumentam a atividade locomotora, é importante salientar que anfetaminas reduzem as contagens e o tempo de duração de comportamentos de exploração vertical no campo aberto (Gould *et al.*, 2001). Isso concorda com a proposta de Prut e Belzung (2003) de que o aumento da atividade locomotora no campo aberto só é decorrente de psicoestimulação quando acompanhada de redução de comportamentos de exploração vertical.

Além disso, outros trabalhos utilizando o enriquecimento ambiental mostram que camundongos criados em ambiente mais complexo têm uma maior tendência a

explorar ambientes novos (Roy *et al.*, 2001). Apesar de também haver relatos de que alguns protocolos de enriquecimento ambiental não alteram a atividade locomotora de camundongos no teste do campo aberto (Reichmann *et al.*, 2016). Por outro lado, Reichmann e colaboradores (2016) observaram que animais *knockout* para neuropeptídeo Y (NPY) que apresentam comportamentos análogos à ansiedade aumentados no teste do labirinto em cruz elevado, também apresentavam redução da locomoção tanto no teste do campo aberto quanto no teste do labirinto em cruz elevado.

Já no teste do labirinto em cruz elevado, os resultados dos machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal indicam redução de comportamentos análogos à ansiedade. Esta afirmação é baseada no aumento da porcentagem de tempo de despendido nos braços abertos, bem como, aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos. Estes são considerados os principais índices relacionados à comportamentos análogos à ansiedade neste teste, e tem relação inversa com o estado de medo/ansiedade dos animais (Rodgers e Johnson, 1995; Albrechet-Souza *et al.*, 2009). A porcentagem de entradas é preferida ao número de entradas nos braços abertos, pois assim, a contaminação por conta do aumento da atividade locomotora é reduzida, sendo o aumento de atividade locomotora um dos principais contaminantes deste teste. Por outro lado, o número de entradas nos braços fechados, que é o parâmetro associado à atividade locomotora, também foi aumentado nos machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal (Rodgers e Johnson, 1995).

Considerando que o aumento da atividade locomotora pode ser um contaminante para os índices de ansiedade neste tipo de teste (Weiss *et al.*, 1998), se faz necessária a observação de comportamentos que sejam menos contaminados pelo aumento da atividade locomotora. Neste sentido, se destaca a observação de comportamentos de avaliação de risco (*stretched attention postures* - SAPs), que estão diretamente relacionados com respostas de medo ou comportamentos análogos à ansiedade neste teste é de fundamental importância, visto que estes são menos contaminados pela atividade locomotora (Rodgers e Johnson, 1995; Rodgers e Dalvi, 1997). Além disso, respostas no mesmo sentido (ansiolítico ou ansiogênico) neste parâmetro e nos parâmetros relacionados aos braços abertos (porcentagens de tempo e de entradas) aumentam a confiabilidade do teste em camundongos (Rodgers e Dalvi, 1997). Sendo assim, a redução destes comportamentos pelos machos submetidos a enriquecimento

perinatal é mais um indicativo do efeito ansiolítico desta manipulação experimental nestes animais.

Estes resultados concordam com os obtidos Friske e Gammie (2005) que submeteram fêmeas de camundongos gestantes ao enriquecimento ambiental até o segundo dia pós-parto, e observou que as proles na vida adulta tinham resposta ansiolítica no teste do labirinto em cruz elevado. Também concorda com outras observações, que indicam que o enriquecimento ambiental perinatal quando continuado até próximo da idade adulta reduz a quantidade de comportamentos de avaliação de risco no labirinto em cruz elevado (Chapillon *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2001), bem como, com os efeitos ansiolíticos observados em camundongos submetidos ao enriquecimento ambiental na vida adulta (Reichmann *et al.*, 2016).

Quando são considerados os resultados do teste da caixa claro escuro, os machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal aumentam o número de transições de ambiente. Há evidências de que esta resposta seja um indicativo de redução de comportamentos análogos à ansiedade. Visto que curvas dose resposta com clordiazepóxido e clonazepam mostram relação direta do aumento da dose de benzodiazepínicos e aumento do número de transições entre o ambiente claro e o ambiente escuro (Crawley e Goodwin, 1980; Young e Johnson, 1991). Do mesmo modo, há relatos de que a buspirona promove aumento de atividade no lado claro (Onaivi e Martin, 1989).

No entanto, a possibilidade de psicoestimulação deve ser considerada. Neste sentido, a administração de drogas psicoestimulantes (anfetaminas) tendem a aumentar os comportamentos na parte clara do aparato (Bourin e Hascoët, 2003). De fato, o aumento da atividade locomotora na parte clara é considerada por alguns autores um indicativo de redução de comportamentos análogos à ansiedade (Crawley e Goodwin, 1980). Vale ressaltar que os machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal apresentam aumento na atividade locomotora na área clara.

Adicionalmente, um parâmetro que não é aumentado pela administração de drogas psicoestimulantes é o comportamento de exploração vertical (Bourin e Hascoët, 2003). Este parâmetro pode ser mais um indicativo de que os machos que passaram pelo enriquecimento ambiental perinatal não apresentam uma resposta simplesmente de psicoestimulação, mas sim ansiolítica no teste da caixa claro-escuro. Isso se baseia na

observação de que drogas ansiolíticas tendem a aumentar os comportamentos de exploração vertical neste teste (Young e Johnson, 1991).

No teste da supressão da alimentação pela novidade não houve diferenças entre os animais machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal e os criados em ambiente padrão de criação. Isto sugere que o enriquecimento ambiental aqui empregado não afete todas as dimensões do comportamento análogo à ansiedade, impactando apenas nas respostas aos testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro (Ramos, 2008). Em verdade, estes três testes são largamente utilizados para a avaliação de comportamentos análogos à ansiedade tanto em experimentos com enriquecimento ambiental (Sztainberg *et al.*, 2010; Dezsi *et al.*, 2016) como em experimentos com outras manipulações (Ramos *et al.*, 2008), muito provavelmente pela maior facilidade em realização destes testes quando comparados com o teste de supressão da alimentação pela novidade.

Considerando toda bateria de testes comportamentais, os resultados indicam que machos criados em ambiente enriquecido no início da vida apresentam redução de comportamentos análogos à ansiedade e maior motivação em explorar ambientes novos.

Os resultados comportamentais motivaram a busca de um possível mecanismo para explicar esta resposta comportamental observada. Assim, se avaliou se a interação gene x ambiente no sistema nervoso, responsável por estas alterações comportamentais, poderia envolver as subunidades do tipo α do receptor GABA_A. Esta foi a tentativa de explicar o fenômeno ansiolítico aqui observado. A área escolhida para a investigação da expressão gênica foi o córtex pré-frontal, já que os resultados comportamentais foram no mesmo sentido dos obtidos em outros trabalhos com manipulações farmacológicas que aumentam a atividade GABAérgica no córtex frontal. Neste contexto, a injeção de midazolam (benzodiazepínico de uso clínico) nesta mesma região em camundongos promove o aumento da porcentagem de tempo despendido nos braços abertos e entradas nos braços abertos (Kim *et al.*, 2011). Do mesmo modo, a injeção intraperitoneal (sistêmica) de midazolam promove a redução da contagem de células imunorreativas para c-fos no córtex cingulado anterior de ratos após o teste do labirinto em cruz elevado. Enquanto outras partes do encéfalo envolvidas com o processamento de respostas defensivas tais como: amígdala basolateral, amígdala central, córtex pré-límbico e córtex infra-límbico não apresentaram alterações na contagem de células

imunorreativas para c-fos após o teste do labirinto em cruz elevado. Neste mesmo trabalho, os autores ainda mostram que tanto a injeção intra-peritoneal quanto a injeção intra-córtex cingulado anterior de midazolam promovem aumento da porcentagem de tempo e das entradas nos braços abertos, além de redução de comportamentos de avaliação de risco (Albrechet-Souza *et al.*, 2009). Além disso, de maneira semelhante, a injeção de muscimol (agonista GABA_A) no córtex pré-limbico de ratos induz aumento das porcentagens de entrada e tempo despendidos nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado (Solati *et al.*, 2013).

Além disso, esta região foi escolhida pelo fato dela ser o centro mais alto de controle de comportamentos defensivos, regulando a atividade de outros centros importantes responsáveis por tais comportamentos, tais como: amígdala (Adhikari *et al.*, 2015) e substância cinzenta periaquedutal (Albrechet-Souza *et al.*, 2009).

Por conta destas evidências foi realizado RT-PCR em tempo real para a avaliação de RNAs mensageiros relacionados a subunidades α_1 , α_2 e α_3 . Estes alvos foram escolhidos devido a necessidade da funcionalidade da subunidade α_2 do receptor GABA_A para o desenvolvimento da resposta ansiolítica promovida por benzodiazepínicos (Löw *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2012). Bem como, envolvimento em comportamentos análogos à ansiedade das subunidades α_1 no paradigma de resposta de medo ao alarme (*fear startle response*) (Smith *et al.*, 2012). E que a administração de agonistas de receptores GABA_A contendo subunidades α_3 promove efeitos ansiolíticos (Dias *et al.*, 2005). Além disso, respostas ansiogênicas no labirinto em cruz elevado podem estar relacionadas com a diminuição das células imunorreativas para a subunidade α_3 (Tzanoulinou *et al.*, 2014).

Porém, aqui nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos expostos ou não ao enriquecimento ambiental. Este resultado foi inesperado, visto que, manipulações experimentais como a separação materna, podem induzir aumento da expressão proteica de subunidades α_2 no córtex pré-frontal e núcleo central da amígdala (Gondré-Lewis *et al.*, 2016) em um possível mecanismo compensatório. De maneira semelhante, o bloqueio farmacológico de receptores 5-HT_{1A} em camundongos no início da vida, através da administração nas mães destes animais no período de lactação, promove aumento da expressão gênica de subunidades α_1 e α_3 no córtex pré-frontal e da subunidade α_2 no hipocampo. Estes autores sugerem que o não aumento da expressão

da subunidade α_2 , associado com o aumento das subunidades α_1 e α_3 , implique na redução dos receptores GABA_A contendo subunidades α_2 em relação a toda população de receptores GABA_A no córtex pré-frontal. Isso poderia reduzir a sensibilidade à benzodiazepínicos no córtex pré-frontal, contribuindo para o padrão ansiogênico apresentado pelos camundongos tratados com este bloqueador 5-HT_{1A} (Vinkers *et al.*, 2010).

Adicionalmente, foi realizado ensaio de RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão gênica destas subunidades em animais criados em ambiente padrão, porém que não foram submetidos a testes comportamentais. Estes dados foram comparados com os animais do grupo padrão submetidos à bateria de testes comportamentais. Esta comparação serve para avaliar se a exposição esta bateria de testes pode levar a alterações na expressão destes RNAs mensageiros. Desta maneira, como a alteração promovida por testes comportamentais é pequena, é possível que dependendo do gene a ser investigado os mesmos animais usados para o teste possam ser usados para os ensaios de RT-PCR contribuindo para o menor uso de animais, visto que não seriam necessários grupos experimentais adicionais. Dentre os genes analisados, apenas o *gabral* apresentou alteração tendo sua expressão reduzida. Esta subunidade tem sido relacionada com os efeitos sedativos de benzodiazepínicos (Rudolph e Möhler, 2006). Portanto, é possível, que a exposição a esta bateria de testes comportamentais promova alterações na responsividade à benzodiazepínicos referente a efeitos sedativos. Já a expressão dos outros genes *gabral2* e *gabral3* não foram alteradas. Estes dados são difíceis de comparar, pois não encontramos nenhum relato de que a exposição a estes testes comportamentais promova mudanças na expressão gênica. Por mais que seja relatado que a exposição ao labirinto em cruz elevado pode levar a mudanças na concentração de monoaminas (Carvalho *et al.*, 2005), isso sugere que a exposição a testes comportamentais possa alterar a expressão gênica de algumas proteínas.

Do mesmo modo que as subunidades do receptor GABA_A, a expressão dos genes que transcrevem a GAD 67 não foi alterada. Lussier e Stevens mostraram que considerando estressores no início da vida, há evidências de que o córtex pré-frontal é uma região encefálica muito impactada por estes. Neste sentido, há relatos de que estresse de restrição durante a prenhez em camundongos fêmeas faz com que a contagem de células imunorreativas para GAD₆₇ no córtex pré-frontal medial das proles esteja reduzida até o centésimo quinquagésimo dia de vida pós-natal (lembrando que

nossos animais sofreram eutanásia aos 80 dias de vida). Adicionalmente, a expressão de GAD₆₇ no córtex pré-frontal medial se apresenta reduzida aos 24 dias de vida pós-natal das proles de fêmeas submetidas a estresse de restrição (Lussier e Stevens, 2016). Neste contexto, é possível que esta seja uma característica epigeneticamente transferida (Mychasiuk *et al.*, 2012). Adicionalmente, há evidências de que mecanismos epigenéticos estejam envolvidos com alterações na expressão do gene que transcreve a GAD₆₇ em humanos. Há relatos de que pacientes com síndrome do pânico apresentam supermetilação deste gene (*GAD1*) (Domschke *et al.*, 2013). O que poderia estar relacionado a observação de que enriquecimento ambiental durante o período perinatal apresentaram redução da metilação no córtex frontal e hipocampo aos 21 dias de idade. (Mychasiuk *et al.*, 2012). Podendo ser uma região de importância para explicar os efeitos de longo prazo de manipulações no início da vida. Adicionalmente, isto pode ser relacionado com o sistema GABAérgico, já que processos de metilação estão envolvidos com a migração e desenvolvimento de células progenitoras neurais precursoras de neurônios GABAérgicos como é sugerido por alguns autores (Lussier e Stevens, 2016).

Desta maneira, os resultados comportamentais obtidos com machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal não estão relacionados com a expressão de RNA mensageiro para subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ do receptor GABAA, GAD67 e VGAT no córtex frontal. Sendo assim o foco permanece na avaliação comportamental.

Apesar destes resultados, o primeiro passo futuro será avaliação de outros genes no córtex frontal. Além do córtex frontal, outra região que pode estar relacionada com a neurobiologia da ansiedade, sendo por isso, é de interesse imediato o núcleo basolateral da amígdala. Em elegante estudo, Sztainberg e colaboradores (2010) mostram que o efeito ansiolítico do enriquecimento ambiental esta relacionado com a redução da expressão gênica de receptor para CRH no núcleo basolateral da amígdala. Além disso, outro alvo de interesse é investigar a expressão de neuropeptídeo Y (NPY) nestas duas regiões, já que recentes evidências sugerem que o NPY tenha sua expressão gênica hipocampal relacionada com a redução de comportamento análogo à ansiedade no labirinto em cruz elevado (Reichmann *et al.*, 2016).

Apesar de não termos encontrado alterações gênicas que expliquem os resultados comportamentais, é possível que alterações epigenéticas que modifiquem a

expressão destes RNA mensageiros em outras regiões ou de outros RNA mensageiros nesta e/ou outras regiões do encéfalo relacionadas à neurobiologia da ansiedade sejam responsáveis por estes efeitos de longo prazo. Assim, existe a possibilidade que estes efeitos da interação entre gene e ambiente ainda não elucidados, possam ser transferidos para gerações seguintes (Dezsi *et al.*, 2016). Por conta disso, a prole de machos submetidos ao enriquecimento ambiental também foi realizado.

5.2 Efeitos do enriquecimento ambiental perinatal em fêmeas

Já as fêmeas submetidas ao enriquecimento ambiental perinatal apresentaram apenas aumento nos comportamentos de exploração vertical, que são relacionados à atividade exploratória (Archer, 1973; Gould *et al.*, 2001). Quando aos comportamentos de exploração vertical, a comparação com os dados de Sztainberg não pode ser feita, pois estes autores não relatam os resultados neste parâmetro (Sztainberg *et al.*, 2010). Já quando o enriquecimento ambiental é instituído apenas durante o período gestacional em ratas, os animais da prole realizam menos comportamentos de exploração vertical (tanto nas fêmeas quanto nos machos da prole). Segundo os autores isso se deve a um aumento de medo ou comportamentos análogos à ansiedade apresentados por estes animais. Estes autores ainda consideram que isso possa ter ocorrido por conta do estresse materno devido à transferência do ambiente enriquecido para o ambiente padrão (Rosenfeld e Weller, 2012). É importante ressaltar que a atividade locomotora e o tempo na área central não diferiram entre os grupos. Isto também foi observado neste teste em fêmeas submetidas ao enriquecimento ambiental a partir do desmame (Sztainberg *et al.*, 2010).

Considerando o teste do labirinto em cruz elevado, percebemos que o enriquecimento ambiental perinatal não foi capaz de promover o efeito de redução de comportamentos análogos à ansiedade, tanto no padrão de ocupação de braços abertos do aparato quanto nos comportamentos de avaliação de risco, como o observado nos machos. Estes resultados também discordam de outras observações em fêmeas de camundongo submetidos ao enriquecimento ambiental instituído a partir do desmame até a vida adulta, neste experimento foram observados efeitos ansiolíticos no teste do labirinto em cruz elevado induzidos pelo enriquecimento ambiental (Sztainberg *et al.*, 2010). Do mesmo modo, estes resultados também diferem de outras observações em machos, quando esta manipulação experimental é iniciada no período perinatal e é

continuada até próximo da vida adulta. Este outro tipo de protocolo de enriquecimento ambiental promove efeitos ansiolíticos no teste do labirinto em cruz elevado (Chapillon *et al.*, 1999).

Sendo que o único resultado em que as fêmeas submetidas ao enriquecimento ambiental diferiram das fêmeas criadas em ambiente padrão foi o número de entradas nos braços fechados, no teste do labirinto em cruz elevado, que é associado aumento geral da movimentação também está presente nas fêmeas. O aumento de entradas nos braços fechados que isoladamente não tem relação com comportamentos análogos à ansiedade. Podendo indicar neste caso um efeito psicoestimulante bem definido (Rodgers e Johnson, 1995). Resultado no mesmo sentido foi observado nas fêmeas da prole de ratas submetidas ao enriquecimento ambiental durante o período gestacional, o que para os autores do trabalho é um fator contribuinte para considerar estas ratas com um perfil mais ansioso do que as fêmeas não expostas ao enriquecimento ambiental no período de vida intrauterina (Rosenfeld e Weller, 2012). Em outro experimento, o enriquecimento ambiental perinatal em camundongos fêmeas com a exposição ao ambiente enriquecido logo em seguida ao desmame até a vida adulta, mostrou resposta inversa da encontrada aqui. Nesta situação é relatado que o enriquecimento ambiental promoveu aumento nas porcentagens de permanência de entradas nos braços abertos sem alterar o número de entradas em braços fechados (Sztainberg *et al.*, 2010).

Em relação ao teste da caixa claro escuro, as fêmeas submetidas ao enriquecimento ambiental perinatal apresentaram um aumento de comportamentos análogos à ansiedade, evidenciada pelo menor tempo despendido no lado claro (Young e Johnson, 1991; Löw *et al.*, 2000). Dado semelhante foi observado em camundongos jovens machos expostos a protocolo de separação materna (Chocyk *et al.*, 2013). Os dados apresentados aqui novamente discordam dos obtidos em outros estudos com a exposição de fêmeas após o desmame a um ambiente mais complexo, que promove o aumento do tempo de permanência no lado claro, o que sugere efeito ansiolítico (Sztainberg *et al.*, 2010). Além disso, as fêmeas submetidas ao enriquecimento ambiental perinatal apresentaram menor latência para ir para o lado escuro, o que reforça a ideia de aumento de comportamentos análogos à ansiedade neste teste. Isto porque a administração de drogas ansiolíticas aumenta a latência para o escape da área clara para a escura quando camundongos começam este teste na área clara (Young e Johnson, 1991).

No teste da supressão da alimentação pela novidade, assim como ocorreu nos machos, não houve diferença entre os grupos analisados em nenhum parâmetro analisado. Desta maneira, acreditamos que o enriquecimento ambiental perinatal aqui empregado não interfere no conflito criado neste teste (Bodnoff *et al.*, 1989) devido à ausência de diferenças significativas tanto em machos quanto em fêmeas.

Os dados comportamentais em fêmeas foram surpreendentes, pois era esperada uma resposta no mesmo sentido dos machos. No entanto, outros tipos de manipulação no início da vida podem promover resultados sexualmente dimórficos. Por exemplo, a restrição materna de proteína durante a gestação e lactação em ratas, pode promover aumento da preferência aos braços abertos do labirinto em cruz nas fêmeas da prole (Reyes-Castro, Rodriguez, Charco, *et al.*, 2012). Já quando o estudo avaliou os machos da prole destas ratas eles apresentaram aumento da preferência pelos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Reyes-Castro, Rodriguez, Rodriguez-Gonzalez, *et al.*, 2012). De modo interessante quando se avalia a prole destes machos que as mães foram submetidas à privação proteica na dieta, novamente só as fêmeas apresentam aumento de preferência pelos braços abertos (Reyes-Castro *et al.*, 2015). Além disso, neste protocolo de privação materna proteica os resultados na ambulação no teste do campo aberto são no mesmo sentido entre fêmeas (Reyes-Castro, Rodriguez, Charco, *et al.*, 2012) e machos (Reyes-Castro, Rodriguez, Rodriguez-Gonzalez, *et al.*, 2012). Por mais que se comparada à distância total percorrida as fêmeas esta possa ser um pouco maior (Reyes-Castro, Rodriguez, Charco, *et al.*, 2012).

Assim, na visão geral da bateria de testes deve ser considerado que o enriquecimento ambiental perinatal em fêmeas aumentou os comportamentos análogos à ansiedade. Resultado inesperado também observado em ratas que ficaram sobre regime de enriquecimento ambiental apenas no período gestacional. Os autores deste trabalho sugerem que para estas ratas o empobrecimento ambiental devido de transferência de ambiente enriquecido para o ambiente padrão, possa ser uma situação aversiva para fêmeas (Rosenfeld e Weller, 2012). Deste modo, é possível que esta mudança de ambiente tenha sido um evento aversivo para as fêmeas do presente experimento quando desmamadas, e isso ter promovido o efeito ansiogênico apresentado pelas fêmeas na bateria de testes comportamentais. Neste sentido, há evidências de que estresse no período equivalente a pré-adolescência (imediatamente

após o desmame) em camundongos pode induzir aumento de ansiedade na vida adulta (Kumari *et al.*, 2016).

Uma possível explicação para esta resposta ansiogênica seria que o estresse em um período crítico do desenvolvimento do SNC poderia causar um *imprint* que aumentasse a expressão de receptores para CRH do tipo 1 na amígdala, mecanismo inverso ao descrito por Sztainberg e colaboradores (2010). Adicionalmente isso pode estar relacionado com diversas observações em estudos e observações com humanos que imputam eventos estressores como predisponentes para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade (Stout e Nemeroff, 1994; Meyer-Lindenberg e Tost, 2012), inclusive quando eles ocorrerem em períodos críticos de desenvolvimento (Castillo *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2010).

Uma possibilidade a se considerar que esta transferência de ambientes que ocorreu logo após o desmame, possa ter sido um evento adverso para as fêmeas. Este que é um momento de grande plasticidade no SNC de roedores. É possível que estes efeitos comportamentais na vida adulta no sentido de aumento de ansiedade, talvez possam estar relacionados com eventos plásticos do sistema GABAérgico, como em outros protocolos de estresse antes do completo desenvolvimento do SNC (Lussier e Stevens, 2016). Neste contexto, protocolos de estresse pré-pubere em ratos mostraram aumento de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado e de interação social, quando avaliados na vida adulta. Estas respostas comportamentais são acompanhadas de redução nas quantidades de células imunorreativas para a subunidade $\alpha 3$ do receptor GABA_A e das duas isoformas de GAD na amígdala (Tzanoulinou *et al.*, 2014). Sendo este um possível caminho a ser seguido em futuras investigações. De modo interessante, esta resposta diferencial a estressores instituídos no início da vida e com respostas diferenciais entre os sexos também está presente em humanos para revisão ver (Green *et al.*, 2010). No entanto, no caso do nosso experimento este é um ponto ainda a ser testado.

5.3 Efeitos transgeracionais do enriquecimento ambiental perinatal em machos

Na continuidade dos experimentos foi avaliado se o fenótipo comportamental ansiolítico apresentado por machos submetidos ao enriquecimento ambiental poderia ser transferido para machos e fêmeas da sua prole. Recentes evidências mostram que a interação gene x ambiente que promova efeitos comportamentais em machos possa ser

transferida para gerações subsequentes (Dietz *et al.*, 2011; Mychasiuk *et al.*, 2012; Dezsi *et al.*, 2016). Esta transferência muito provavelmente ocorre através de mecanismos epigenéticos (Bale, 2015). Por conta disso, aqui foi investigado se ocorrida transferência transgeracional do fenótipo ansiolítico presente em camundongos machos submetidos ao enriquecimento ambiental perinatal as suas proles.

Quanto à avaliação comportamental de machos oriundos de genitores submetidos ao enriquecimento ambiental, os machos da prole não apresentaram aumento de ambulação no teste do campo aberto, apesar de podermos considerar uma tendência ao aumento, já que o valor de P é muito próximo do limite de significância. No entanto, a atividade exploratória vertical avaliada pelos episódios de levantamentos não apresentou diferença em comparação com os animais cujos pais provem de ambiente padrão (ver primeira seção da discussão). Isso indica que o fenótipo comportamental não é transmitido no teste do campo aberto. Estes resultados não concordam com a observação de que ratos machos oriundos de genitores submetidos ao enriquecimento ambiental na presença de fêmeas a partir dos 28 dias de vida, estes animais apresentam maior locomoção no teste do campo aberto realizado aos 10, 13 e 15 dias de vida (Mychasiuk *et al.*, 2012).

Considerando a transferência comportamental paterna, há evidências de que ratos submetidos ao enriquecimento ambiental da 3^a a 14^a semana de vida transferem os efeitos comportamentais que eles apresentam no teste do campo aberto para os machos da sua prole. Por mais que no experimento de Dezsi e colaboradores, terem observado aumento no número de entradas na área interna, porém sem nenhuma alteração quanto à ambulação (Dezsi *et al.*, 2016). Apesar destes resultados em ratos, é importante ressaltar que um estudo específico sobre transferência transgeracional do comportamento no campo aberto de camundongos sugere que as respostas comportamentais apresentadas pelos pais não são transferidas para os machos de sua prole, mas pode ser transferido para as fêmeas da prole (Alter *et al.*, 2009).

No teste do labirinto em cruz elevado, o aumento na porcentagem de tempo de permanência nos braços aberto e a redução de comportamentos de avaliação de risco dos machos que os pais passaram por enriquecimento ambiental perinatal indica redução dos comportamentos análogos à ansiedade (Rodgers e Johnson, 1995). Os resultados destes animais são no mesmo sentido dos resultados de animais submetidos

ao enriquecimento ambiental perinatal. Novamente, há ausência de concordância com os resultados na porcentagem de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados, o que indica uma transferência parcial da resposta no teste. Surpreendentemente, neste caso o resultado ansiolítico está mais bem definido, visto que estes animais não apresentam aumento do número de entradas nos braços fechados que é um contaminante dos índices principais de ansiedade neste teste (Rodgers e Johnson, 1995).

Nossos resultados no teste do labirinto em cruz elevado são no mesmo sentido dos obtidos nos ratos machos da prole de genitores com a exposição prolongada ao enriquecimento ambiental (Dezsi *et al.*, 2016). Adicionalmente, nossos resultados no teste do labirinto em cruz elevado são opostos dos obtidos quando avaliaram a transmissão transgeracional do comportamento de machos submetidos à derrota social, que apresentam perfil ansiogênico, assim como os machos de sua prole (Dietz *et al.*, 2011). Sugerimos assim, que este comportamento ansiolítico possa ser uma herança adaptativa herdada no caso do presente experimento.

Já nos testes da caixa claro-escuro os machos que os pais foram submetidos ao enriquecimento ambiental não apresentaram nenhuma diferença em comparação com os animais cujos pais viveram em ambiente padrão. Desta forma, a transmissão transgeracional do comportamento paterno não ocorreu para prole neste caso. Aqui se percebe uma discordância com as observações em machos da prole de ratos expostos a períodos prolongados de enriquecimento ambiental. Nestes ratos, é observado aumento do número de transições (Dezsi *et al.*, 2016). É possível que os substratos neurais envolvidos com a resposta nos testes do campo aberto, teste do labirinto em cruz elevado e no teste da caixa claro escuro não sejam totalmente iguais (Ramos, 2008) e isso possa estar relacionado com esta aparente transferência comportamental seletiva que ocorreu no presente experimento.

Quanto aos mecanismos envolvidos com a transmissão deste fenótipo comportamental os dados atualmente obtidos não podem determinar quais mecanismos envolvidos, permitindo apenas especulações sobre o tema. Uma possibilidade de explicação é que o enriquecimento ambiental possa alterar mecanismo epigenéticos, tais como o padrão dos metilação do DNA, ou acetila de histonas de genes paternos (Branchi *et al.*, 2011) presentes nos espermatozoides, ou outro aumento da expressão de

micro RNAs nos espermatozoides (Rodgers *et al.*, 2013) e induzir via mecanismos epigenéticos, alterações na expressão gênica em áreas do SNC das proles, em áreas envolvidas com os comportamentos de ansiedade. Neste sentido há observações de que o enriquecimento social pode promover aumento de acetilação de histonas em regiões promotoras que aumentam a expressão gênica de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Branchi *et al.*, 2011), sendo que o aumento desta molécula é promovido por diversos protocolos de enriquecimento ambiental e ela parece ter relação com os feitos comportamentais da exposição a ambientes mais complexos (Nithianantharajah e Hannan, 2006; Simpson e Kelly, 2011).

Outro mecanismo que também pode estar envolvido com a resposta é a reprogramação do eixo hipotálamo hipófise adrenal (HHA). Há evidências de que ao expor genitores a um protocolo de estresse crônico variado este pode transmitir através do esperma micro RNAs que são capazes de induzir alterações na expressão de enzimas que participam da regulação epigenética do eixo HHA, inclusive receptores para CRH do tipo 1 (Rodgers *et al.*, 2013). Considerando que a redução da expressão gênica destes receptores na amígdala basolateral e no núcleo leito da estria terminal estão relacionados com a resposta ansiolítica do enriquecimento ambiental (Sztainberg *et al.*, 2010), este pode ser o mecanismo responsável pela transmissibilidade do fenótipo menos ansioso.

Outra possibilidade é que os machos submetidos ao enriquecimento ambiental sejam machos de melhor qualidade reprodutiva, o que induziria melhor cuidado materno das fêmeas e levando a os efeitos na expressão genica da prole, como o observado na comparação entre genitores submetidos ao isolamento social e ao enriquecimento social. Isso poderia ter impactos benéficos quanto aos comportamentos análogos à ansiedade dos machos da prole na vida adulta (Mashoodh *et al.*, 2012). No entanto, roedores submetidos ao isolamento social apresentam distúrbios de cópula quando comparados com animais criados em condições de não isolamento social (Gerall *et al.*, 1967). Sendo assim, esta é a possibilidade menos provável, visto que o controle utilizado no trabalho de Mashood e colaboradores pode não ser o mais indicado para a comparação com os controles utilizados no presente experimento. Vale salientar que, tanto os controles quanto os animais enriquecidos foram mantidos em 4 animais por caixa, com seus irmãos, tendo portanto, uma estrutura social similar. Por conta disto, acreditamos que o

mecanismo proposto por estes autores seja menos provável de ocorrer no caso de nosso experimento.

Pensando de maneira translacional os resultados obtidos a partir destas observações podem ajudar a explicar dados epidemiológicos relacionados com estressores no início da vida e a resposta sexualmente diferente no desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos de humanos expostos a eventos estressores no início da vida (Green *et al.*, 2010). Bem como, podem ajudar a fundamentar estratégias não farmacológicas para o tratamento e prevenção de transtornos de ansiedade como a proposta de alguns autores (Dezsi *et al.*, 2016).

5.4. Ausência de efeitos transgeracionais nas fêmeas da prole.

No caso das fêmeas o enriquecimento ambiental perinatal parece não transmitir as características comportamentais dos genitores em nenhum dos testes, visto que não houve qualquer alteração nos parâmetros comportamentais analisados em toda a bateria de testes comportamentais. Novamente aqui há um indicativo de resposta sexualmente dimórfica.

Neste contexto, nossos resultados são frontalmente contrários aos obtidos por Alter e colaboradores (2009). Estes autores observaram que transmissão paterna do comportamento no campo aberto de camundongo apenas para fêmeas e não para machos. No entanto, o uso de linhagens diferentes (e conseqüentemente cargas genéticas diferentes) de camundongos pode ser um dos motivos desta discrepância. Neste sentido, há evidências de que linhagens diferentes de camundongos podem responder de maneira não igualitária aos mesmos testes comportamentais (Chapillon *et al.*, 1999).

Considerando o dimorfismo na resposta comportamental ao teste do labirinto em cruz elevado de proles oriundas de genitores machos submetidos à restrição proteica no período intra-uterino, é relatado um caráter no sentido inverso do apresentado aqui. No experimento de Reyes-Castro e colaboradores, foi mostrado que esta manipulação da dieta da avó paterna durante a gestação dos pais, induz em ratas aumento de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Dado este que não está presente nos machos (Reyes-Castro *et al.*, 2015).

Em outro protocolo experimental, se observou que a transferência comportamental paterna decorrente de derrota social era transmitida tanto para os machos quanto para as fêmeas da prole. Porém, os machos apresentavam mais claramente esta transferência (Dietz *et al.*, 2011). É possível que isso esteja relacionado com a maior susceptibilidade do encéfalo masculino a modificações epigenéticas e conseqüentemente seus impactos sobre o comportamento devido a uma menor variabilidade dos níveis de hormônios sexuais (Bale, 2015). Talvez isso explique essa resposta diferente de machos e fêmeas obtida aqui.

6. CONCLUSÕES

- O enriquecimento ambiental perinatal promove efeitos ansiolíticos e de maior atividade exploratória em camundongos machos.
- O efeito ansiolítico e exploratório não parece estar associado a alterações da expressão dos genes *gabral*, *gabra2* e *gabra3*, *GAD1* ou *VGAT* no córtex frontal.
- O enriquecimento ambiental induziu efeito ansiogênico em fêmeas.
- O efeito ansiolítico observado em machos é transferido para os seus descendentes machos.
- O efeito comportamental observado em machos não é transferido para as fêmeas de sua prole.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, A. et al. Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. **Nature**, 2015. ISSN 0028-0836.

ALBRECHET-SOUZA, L. et al. The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 387-397, 2009. ISSN 0306-4522.

ALTER, M. D. et al. Paternal transmission of complex phenotypes in inbred mice. **Biological psychiatry**, v. 66, n. 11, p. 1061-1066, 2009. ISSN 0006-3223.

ANDRADE, L. H. et al. Mental disorders in megacities: findings from the Sao Paulo megacity mental health survey, Brazil. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31879, 2012. ISSN 1932-6203.

ARABO, A. et al. Temporal analysis of free exploration of an elevated plus-maze in mice. **Journal of Experimental Psychology: Animal Learning and Cognition**, v. 40, n. 4, p. 457, 2014. ISSN 2329-8464.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973. ISSN 0003-3472.

ARIKIAN, S. R.; GORMAN, J. M. A review of the diagnosis, pharmacologic treatment, and economic aspects of anxiety disorders. **Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry**, v. 3, n. 3, p. 110, 2001.

BALE, T. L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 332-344, 2015. ISSN 1471-003X.

BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. **ILAR journal**, v. 46, n. 2, p. 162-170, 2005. ISSN 1084-2020.

BERRIOS, G. Anxiety disorders: a conceptual history. **Journal of affective disorders**, v. 56, n. 2, p. 83-94, 1999. ISSN 0165-0327.

BODNOFF, S. R. et al. A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. **Psychopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 277-279, 1989. ISSN 0033-3158.

BOLIVAR, V. J. et al. Habituation of activity in an open field: a survey of inbred strains and F1 hybrids. **Behavior genetics**, v. 30, n. 4, p. 285-293, 2000. ISSN 0001-8244.

BORMANN, J. The 'ABC' of GABA receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 16-19, 2000. ISSN 0165-6147.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1, p. 55-65, 2003. ISSN 0014-2999.

BRANCHI, I. et al. Epigenetic modifications induced by early enrichment are associated with changes in timing of induction of BDNF expression. **Neuroscience letters**, v. 495, n. 3, p. 168-172, 2011. ISSN 0304-3940.

BRENES, J. C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. **Behavioural brain research**, v. 197, n. 1, p. 125-137, 2009. ISSN 0166-4328.

BUDDHALA, C.; HSU, C.-C.; WU, J.-Y. A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. **Neurochemistry international**, v. 55, n. 1, p. 9-12, 2009. ISSN 0197-0186.

CALDJI, C.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J. Variations in maternal care alter GABAA receptor subunit expression in brain regions associated with fear. **Neuropsychopharmacology**, 2003. ISSN 1740-634X.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 35, p. S101-S111, 2013. ISSN 1516-4446.

CAROBREZ, A.; BERTOGLIO, L. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005. ISSN 0149-7634.

CARVALHO, M. et al. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 12, p. 1857-1866, 2005. ISSN 0100-879X.

CASTILLO, A. R. G. et al. Transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, p. 20-23, 2000. ISSN 1516-4446.

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, n. 6, p. 1353, 2007. ISSN 1939-0084.

CHAPILLON, P. et al. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. **Behavior genetics**, v. 29, n. 1, p. 41-46, 1999. ISSN 0001-8244.

CHOCYK, A. et al. Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 1, p. 2089-2107, 2013. ISSN 1460-9568.

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, n. 2, p. 167-170, 1980. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305780900672>>.

CRESTANI, F. et al. Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 9, p. 833-839, 1999.

CYMERBLIT-SABBA, A. et al. Prenatal Enriched Environment improves emotional and attentional reactivity to adulthood stress. **Behav Brain Res**, v. 241, p. 185-90, Mar 15 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking).

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annual review of neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 353-375, 1992. ISSN 0147-006X.

DE ROSNAY, M. et al. Transmission of social anxiety from mother to infant: An experimental study using a social referencing paradigm. **Behaviour research and therapy**, v. 44, n. 8, p. 1165-1175, 2006. ISSN 0005-7967.

DEZSI, G. et al. Environmental enrichment imparts disease-modifying and transgenerational effects on genetically-determined epilepsy and anxiety. **Neurobiology of disease**, v. 93, p. 129-136, 2016. ISSN 0969-9961.

DIAS, R. et al. Evidence for a significant role of $\alpha 3$ -containing GABAA receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. **The Journal of neuroscience**, v. 25, n. 46, p. 10682-10688, 2005. ISSN 0270-6474.

DIETZ, D. M. et al. Paternal transmission of stress-induced pathologies. **Biological psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 408-414, 2011. ISSN 0006-3223.

DOMSCHKE, K. et al. Epigenetic signature of panic disorder: a role of glutamate decarboxylase 1 (GAD1) DNA hypomethylation? **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 189-196, 2013. ISSN 0278-5846.

FILE, S. E.; MABBUTT, P. S.; HITCHCOTT, P. K. Characterisation of the phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 98-101, 1990. ISSN 0033-3158.

FOSTER, T.; DUMAS, T. Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience. **Journal of Neurophysiology**, v. 85, n. 4, p. 1377-1383, 2001. ISSN 0022-3077.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behav Brain Res**, v. 175, n. 1, p. 1-8, Nov 25 2006. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking).

FRISKE, J. E.; GAMMIE, S. C. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. **Physiology & behavior**, v. 85, n. 2, p. 187-194, 2005. ISSN 0031-9384.

GERALL, H. D.; WARD, I. L.; GERALL, A. A. Disruption of the male rat's sexual behaviour induced by social isolation. **Animal Behaviour**, v. 15, n. 1, p. 54-58, 1967. ISSN 0003-3472.

GONDRÉ-LEWIS, M. C. et al. Early life stress is a risk factor for excessive alcohol drinking and impulsivity in adults and is mediated via a CRF/GABAA mechanism. **Stress**, p. 1-13, 2016. ISSN 1025-3890.

GOULD, T. J.; KEITH, R. A.; BHAT, R. V. Differential sensitivity to lithium's reversal of amphetamine-induced open-field activity in two inbred strains of mice. **Behavioural brain research**, v. 118, n. 1, p. 95-105, 2001. ISSN 0166-4328.

GRAEFF, F. G. Anxiety. In: BRANDAO, M. L. e GRAEFF, F. G. (Ed.). **Neurobiology of mental disorders**. New York.: Nova Science Publish inc., 2006. cap. 3, p.25

56. ISBN 1-59454-914-1.

GRAEFF, F. G. [Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 29 Suppl 1, p. S3-6, May 2007. ISSN 1516-4446 (Print)

1516-4446 (Linking).

GRAEFF, F. G. et al. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1, p. 123-131, 1993. ISSN 0166-4328.

GREEN, J. G. et al. Childhood adversities and adult psychiatric disorders in the national comorbidity survey replication I: associations with first onset of DSM-IV disorders. **Archives of general psychiatry**, v. 67, n. 2, p. 113-123, 2010. ISSN 0003-990X.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006. ISSN 1471-003X.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385, 1934. ISSN 0093-4127.

HEIDERSTADT, K. M. et al. Communal nesting increases pup growth but has limited effects on adult behavior and neurophysiology in inbred mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 152-160, 2014. ISSN 1559-6109.

HELDT, S. A.; RESSLER, K. J. Amygdala-specific reduction of $\alpha 1$ -GABAA receptors disrupts the anticonvulsant, locomotor, and sedative, but not anxiolytic, effects of benzodiazepines in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 21, p. 7139-7151, 2010. ISSN 0270-6474.

HETTEMA, J. M.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. **American Journal of Psychiatry**, 2001.

ICKES, B. R. et al. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Experimental neurology**, v. 164, n. 1, p. 45-52, 2000. ISSN 0014-4886.

IVINSKIS, A. A Study of validity of open-field measures. **Australian Journal of Psychology**, v. 22, n. 2, p. 175-183, 1970. ISSN 1742-9536.

JANIK, R. et al. Magnetic resonance spectroscopy reveals oral Lactobacillus promotion of increases in brain GABA, N-acetyl aspartate and glutamate. **NeuroImage**, v. 125, p. 988-995, 2016. ISSN 1053-8119.

JANITZKY, K. et al. Behavioral effects and pattern of brain c-fos mRNA induced by 2, 5-dihydro-2, 4, 5-trimethylthiazoline, a component of fox feces odor in GAD67-GFP knock-in C57BL/6 mice. **Behavioural brain research**, v. 202, n. 2, p. 218-224, 2009. ISSN 0166-4328.

KASH, S. F. et al. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 4, p. 1698-1703, 1999. ISSN 0027-8424.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 493-495, 1997. ISSN 0028-0836.

KESSLER, R. C. et al. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of general psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 617-627, 2005. ISSN 0003-990X.

KIM, S. S. et al. Neurabin in the anterior cingulate cortex regulates anxiety-like behavior in adult mice. **Molecular brain**, v. 4, n. 1, p. 1, 2011. ISSN 1756-6606.

KINCHESKI, G. C.; CAROBREZ, A. P. The dorsal periaqueductal gray modulates the increased fear-like behavior exhibited by experienced rats in the elevated plus-maze. **Behavioural brain research**, v. 206, n. 1, p. 120-126, 2010. ISSN 0166-4328.

KUMARI, A. et al. Social isolation mediated anxiety like behavior is associated with enhanced expression and regulation of BDNF in the female mouse brain. **Physiology & Behavior**, v. 158, p. 34-42, 2016. ISSN 0031-9384.

LAI, H. M. X. et al. Prevalence of comorbid substance use, anxiety and mood disorders in epidemiological surveys, 1990–2014: a systematic review and meta-analysis. **Drug and alcohol dependence**, v. 154, p. 1-13, 2015. ISSN 0376-8716.

LALOUX, C. et al. Anxiety-like behaviour and associated neurochemical and endocrinological alterations in male pups exposed to prenatal stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 10, p. 1646-1658, 2012. ISSN 0306-4530.

LANGE, M. D. et al. Glutamic acid decarboxylase 65: a link between GABAergic synaptic plasticity in the lateral amygdala and conditioned fear generalization. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 9, p. 2211-2220, 2014. ISSN 0893-133X.

LAUREANO-MELO, R. et al. Sodium selenite supplementation during pregnancy and lactation promotes anxiolysis and improves mnemonic performance in wistar rats'

offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 138, p. 123-132, 2015. ISSN 0091-3057.

LINDEN, A. et al. Anxiolytic activity of the MGLU2/3 receptor agonist LY354740 on the elevated plus maze is associated with the suppression of stress-induced c-Fos in the hippocampus and increases in c-Fos induction in several other stress-sensitive brain regions. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 3, p. 502-513, 2004. ISSN 0893-133X.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987. ISSN 0033-3158.

LÖW, K. et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 131-134, 2000. ISSN 0036-8075.

LUSSIER, S. J.; STEVENS, H. E. Delays in GABAergic interneuron development and behavioral inhibition after prenatal stress. **Developmental neurobiology**, 2016. ISSN 1932-846X.

MARASHI, V. et al. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 2, p. 281-292, 2003. ISSN 0018-506X.

MARTINI, J. et al. Anxiety disorders before birth and self-perceived distress during pregnancy: associations with maternal depression and obstetric, neonatal and early childhood outcomes. **Early Human Development**, v. 86, n. 5, p. 305-310, 2010. ISSN 0378-3782.

MASHOODH, R. et al. Paternal social enrichment effects on maternal behavior and offspring growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. Supplement 2, p. 17232-17238, 2012. ISSN 0027-8424.

MCILWAIN, K. L. et al. The use of behavioral test batteries: effects of training history. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 5, p. 705-717, 2001. ISSN 0031-9384.

MCQUAID, R. J. et al. The differential impact of social defeat on mice living in isolation or groups in an enriched environment: plasma corticosterone and monoamine variations. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 02, p. 351-363, 2013. ISSN 1469-5111.

MESSANVI, F. et al. A discrete dopaminergic projection from the incertohypothalamic A13 cell group to the dorsolateral periaqueductal gray in rat. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 7, p. 41, 2013. ISSN 1662-5129.

MEYER-LINDENBERG, A.; TOST, H. Neural mechanisms of social risk for psychiatric disorders. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 663-668, 2012. ISSN 1097-6256.

MOBBS, D. et al. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. **Science**, v. 317, n. 5841, p. 1079-1083, 2007. ISSN 0036-8075.

MORAWSKA, M. M.; FENDT, M. The effects of muscimol and AMN082 injections into the medial prefrontal cortex on the expression and extinction of conditioned fear in mice. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 8, p. 1394-1398, 2012. ISSN 0022-0949.

MÜLLER, I.; ÇALIŞKAN, G.; STORK, O. The GAD65 knock out mouse—a model for GABAergic processes in fear-and stress-induced psychopathology. **Genes, Brain and Behavior**, v. 14, n. 1, p. 37-45, 2015. ISSN 1601-183X.

MYCHASIUK, R. et al. Parental enrichment and offspring development: modifications to brain, behavior and the epigenome. **Behavioural brain research**, v. 228, n. 2, p. 294-298, 2012. ISSN 0166-4328.

NELOVKOV, A. et al. Rats displaying distinct exploratory activity also have different expression patterns of γ -aminobutyric acid-and cholecystokinin-related genes in brain regions. **Brain research**, v. 1100, n. 1, p. 21-31, 2006. ISSN 0006-8993.

NIKOLAEV, E. et al. Environmental manipulation differentially alters c-Fos expression in amygdaloid nuclei following aversive conditioning. **Brain Research**, v. 957, n. 1, p. 91-98, 2002. ISSN 0006-8993.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697-709, 2006. ISSN 1471-003X.

OLESEN, J. et al. The economic cost of brain disorders in Europe. **European Journal of Neurology**, v. 19, n. 1, p. 155-162, 2012. ISSN 1468-1331.

OLIVARES, E. L. et al. Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 446-456, 2012. ISSN 0028-3908.

OLSEN, R. W. Analysis of γ -aminobutyric acid (GABA) type A receptor subtypes using isosteric and allosteric ligands. **Neurochemical research**, v. 39, n. 10, p. 1924-1941, 2014. ISSN 0364-3190.

ONAIWI, E. S.; MARTIN, B. R. Neuropharmacological and physiological validation of a computer-controlled two-compartment black and white box for the assessment of anxiety. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 13, n. 6, p. 963-976, 1989. ISSN 0278-5846.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Gulf Professional Publishing, 2004. ISBN 012547640X.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985. ISSN 0165-0270.

PERNA, G. et al. Long-Term Pharmacological Treatments of Anxiety Disorders: An Updated Systematic Review. **Current psychiatry reports**, v. 18, n. 3, p. 1-16, 2016. ISSN 1523-3812.

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, n. 1, p. 3-33, 2003. ISSN 0014-2999.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in pharmacological sciences**, v. 29, n. 10, p. 493-498, 2008. ISSN 0165-6147.

RAMOS, A. et al. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behavioural brain research**, v. 193, n. 2, p. 277-288, 2008. ISSN 0166-4328.

REICHMANN, F. et al. Environmental enrichment induces behavioural disturbances in neuropeptide Y knockout mice. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

REYES-CASTRO, L. et al. Paternal line multigenerational passage of altered risk assessment behavior in female but not male rat offspring of mothers fed a low protein diet. **Physiology & behavior**, v. 140, p. 89-95, 2015. ISSN 0031-9384.

REYES-CASTRO, L. et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 39-45, 2012. ISSN 0736-5748.

REYES-CASTRO, L. et al. Pre-and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. **Behavioural brain research**, v. 227, n. 2, p. 324-329, 2012. ISSN 0166-4328.

ROCHA, F. F. et al. Anxiolytic-like and sedative effects of *Hydrocotyle umbellata* L., Araliaceae, extract in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 115-120, 2011. ISSN 0102-695X.

RODGERS, A. B. et al. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 21, p. 9003-9012, 2013. ISSN 0270-6474.

RODGERS, R.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997. ISSN 0149-7634.

RODGERS, R.; JOHNSON, N. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 52, n. 2, p. 297-303, 1995. ISSN 0091-3057.

RODGERS, R.; SHEPHERD, J. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 237-242, 1993. ISSN 0033-3158.

ROSENFELD, A.; WELLER, A. Behavioral effects of environmental enrichment during gestation in WKY and Wistar rats. **Behavioural brain research**, v. 233, n. 2, p. 245-255, 2012. ISSN 0166-4328.

ROY, V. et al. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 3, p. 313-320, 2001. ISSN 0031-9384.

RUDOLPH, U.; MÖHLER, H. GABA-based therapeutic approaches: GABA A receptor subtype functions. **Current opinion in pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 18-23, 2006. ISSN 1471-4892.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 803-834, 2003. ISSN 0031-9333.

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **science**, v. 301, n. 5634, p. 805-809, 2003. ISSN 0036-8075.

SHYNE, A. Meta-analytic review of the effects of enrichment on stereotypic behavior in zoo mammals. **Zoo Biology**, v. 25, n. 4, p. 317-337, 2006. ISSN 1098-2361.

SILVANI, A.; DAMPNEY, R. A. Central control of cardiovascular function during sleep. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 305, n. 12, p. H1683-H1692, 2013. ISSN 0363-6135.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural brain research**, v. 222, n. 1, p. 246-264, 2011. ISSN 0166-4328.

SINGEWALD, N. Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 31, n. 1, p. 18-40, 2007. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking).

SINGEWALD, N. Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 1, p. 18-40, 2007. ISSN 0149-7634.

SINGEWALD, N.; SHARP, T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. **Neuroscience**, v. 98, n. 4, p. 759-770, 2000. ISSN 0306-4522.

SMITH, K. S. et al. Benzodiazepine-induced anxiolysis and reduction of conditioned fear are mediated by distinct GABA A receptor subtypes in mice. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 2, p. 250-258, 2012. ISSN 0028-3908.

SOGHOMONIAN, J.-J.; MARTIN, D. L. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? **Trends in pharmacological sciences**, v. 19, n. 12, p. 500-505, 1998. ISSN 0165-6147.

SOLATI, J.; HAJIKHANI, R.; GOLUB, Y. Activation of GABA A receptors in the medial prefrontal cortex produces an anxiolytic-like response. **Acta neuropsychiatrica**, v. 25, n. 04, p. 221-226, 2013. ISSN 1601-5215.

STORK, O. et al. Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. **Brain research**, v. 865, n. 1, p. 45-58, 2000. ISSN 0006-8993.

STOUT, S. C.; NEMEROFF, C. B. Stress and psychiatric disorders. *Seminars in Neuroscience*, 1994, Elsevier. p.271-280.

STRINE, T. W. et al. Depression and anxiety in the United States: findings from the 2006 behavioral risk factor surveillance system. **Psychiatric Services**, 2015.

SZTAINBERG, Y. et al. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. **Molecular psychiatry**, v. 15, n. 9, p. 905-917, 2010. ISSN 1359-4184.

TASCA, C. et al. Women and hysteria in the history of mental health. **Clinical Practice & Epidemiology in Mental Health**, v. 8, n. 1, 2012.

TOVOTE, P. et al. Midbrain circuits for defensive behaviour. **Nature**, 2016. ISSN 0028-0836.

TZANOULINO, S. et al. Long-term behavioral programming induced by peripuberty stress in rats is accompanied by GABAergic-related alterations in the Amygdala. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94666, 2014. ISSN 1932-6203.

VIBERG, H. et al. Neonatal ketamine exposure results in changes in biochemical substrates of neuronal growth and synaptogenesis, and alters adult behavior irreversibly. **Toxicology**, v. 249, n. 2, p. 153-159, 2008. ISSN 0300-483X.

VINKERS, C. H. et al. Early-Life Blockade of 5-HT 1A Receptors Alters Adult Anxiety Behavior and Benzodiazepine Sensitivity. **Biological psychiatry**, v. 67, n. 4, p. 309-316, 2010. ISSN 0006-3223.

WALKER, A. K. et al. Transgenerational transmission of anxiety induced by neonatal exposure to lipopolysaccharide: implications for male and female germ lines. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 8, p. 1320-1335, 2012. ISSN 0306-4530.

WALKER, E. R.; MCGEE, R. E.; DRUSS, B. G. Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis. **JAMA psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 334-341, 2015. ISSN 2168-622X.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976. ISSN 1939-1455.

WEISS, S. et al. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 265-271, 1998. ISSN 0149-7634.

WHO. **The World Health Report 2001: Mental health: new understanding, new hope**. World Health Organization, 2001. ISBN 9241562013.

_____. Health in 2015: from MDGs, Millennium Development Goals to SDGs. **Sustainable Development Goals. Switzerland: World Health Organization.** Available: <http://www.who.int/gho/publications/mdgs-sdgs/en/>[Accessed January 10 2016], 2015.

YANG, L.-P. et al. Acute Treatment with a Novel TRPC4/C5 Channel Inhibitor Produces Antidepressant and Anxiolytic-Like Effects in Mice. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0136255, 2015. ISSN 1932-6203.

YOSHIOKA, J. G. Learning versus skill in rats. **The Pedagogical Seminary and Journal of Genetic Psychology**, v. 41, n. 2, p. 406-416, 1932. ISSN 0885-6559.

YOUNG, R.; JOHNSON, D. N. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 40, n. 4, p. 739-743, 1991. ISSN 0091-3057.

ZHANG, L. et al. Galanin transgenic mice with elevated circulating galanin levels alleviate demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33901, 2012. ISSN 1932-6203.

ZHU, S. W. et al. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. **Behav Brain Res**, v. 169, n. 1, p. 10-20, Apr 25 2006. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking).