

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

**TESE**

**Efeitos do enriquecimento ambiental perinatal no comportamento análogo  
à ansiedade e na sociabilidade e o possível envolvimento dos neurônios  
vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do núcleo paraventricular do  
hipotálamo**

**Samantha Costa Amorim Muniz**

**2025**



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

**Efeitos do enriquecimento ambiental perinatal no comportamento análogo  
à ansiedade e na sociabilidade e o possível envolvimento dos neurônios  
vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do núcleo paraventricular do  
hipotálamo**

**SAMANTHA COSTA AMORIM MUNIZ**

*Sob a Orientação do Professor  
Fabio Fagundes da Rocha*

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

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2025

CM966e Costa Amorim Muniz, Samantha, 1987-  
e Efeitos do enriquecimento ambiental perinatal n  
o comportamento análogo à ansiedade e na sociabili  
o possivel envolvimento dos neurônios  
vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do núcleo  
paraventricular do hipotálamo / Samantha Costa Amo  
Muniz. - Seropédica, 2025.  
112 f.: il.

Orientador: Fábio Fagundes da Rocha.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
de Janeiro, Programa Multicêntrico de Pós Graduaçã  
Ciências Fisiológicas, 2025.

1. Comportamento. I. Fagundes da Rocha, Fábio,  
1975-, orient. II Universidade Federal Rural do Ri  
de Janeiro. Programa Multicêntrico de Pós Graduaçã  
Ciências Fisiológicas III. Título.



TERMO N° 129/2025 - PPGMCF (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.009413/2025-49

Seropédica-RJ, 26 de fevereiro de 2025.

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLOGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS**

**SAMANTHA COSTA AMORIM MUNIZ**

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 Ciências Fisiológicas

**TESE APROVADA EM 25/02/2025**

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

Prof Dr Bruno Lobão Soares - Membro Externo – UFRN

Prof Dr Cláudio da Silva Almeida - Membro Externo – IFRO

Prof Dr André de Souza Mecawi - Membro Externo, – UNIFESP)

Profa Dra Norma Aparecida Almeida Figueiredo de Oliveira - Membro Interno – UFRRJ

*(Assinado digitalmente em 28/02/2025 13:15)*

FABIO FAGUNDES DA ROCHA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Matricula: ####195#7

*(Assinado digitalmente em 27/02/2025 09:40)*

NORMA APARECIDA ALMEIDA FIGUEIREDO DE  
OLIVEIRA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Matricula: ####791#4

*(Assinado digitalmente em 28/02/2025 10:19)*

CLÁUDIO DA SILVA ALMEIDA  
ASSINANTE EXTERNO

CPF: ####.###.197-##

*(Assinado digitalmente em 26/02/2025 14:39)*

ANDRE DE SOUZA MECAWI  
ASSINANTE EXTERNO

CPF: ####.###.127-##

*(Assinado digitalmente em 28/02/2025 11:37)*

BRUNO LOBÃO SOARES  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ####.###.067-##

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico esta tese ao meu filho, Mikkel Sousa Amorim, cuja alegria e amor foram minha força nos momentos mais difíceis. Sua presença iluminou os dias de dúvida e cansaço, lembrando-me do motivo pelo qual nunca desisti.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu marido, Rodrigo Sousa Muniz, e ao meu filho, Mikkel Sousa Amorim, pelo amor incondicional e por iluminarem minha vida com momentos de alegria em meio às dificuldades e tristezas.*

*À minha família pelo carinho e apoio.*

*Ao meu orientador, Fabio Fagundes da Rocha, por ter acreditado em mim e me acompanhado ao longo dessa longa jornada, que se estendeu por oito anos. Sua orientação foi fundamental, especialmente nos momentos de dificuldade, ao me apresentar novos caminhos e possibilidades.*

*Aos professores André de Souza Mecawi, Wellington Côrtes, Norma Aparecida A. F. de Oliveira e Roberto Laureano Melo pelos ensinamentos e incentivos.*

*À técnica Raquel Souza pelo companheirismo e tempo dedicado para me auxiliar a encontrar soluções para diversas desafios.*

*À aluna de doutorado Liliani Aparecida S. F. de Medeiros que sempre trazia palavras acolhedoras e de incentivo nos momentos mais desafiadores.*

*Ao Laboratório de Neuroendocrinologia Molecular da Escola Paulista de Medicina, coordenado pelo professor André Souza Mecawi, pela colaboração material e suporte procedural para a realização deste projeto. Em especial aos alunos Naima J. dos S. Marciano, João Victor S. Nani, Roger R. Gúzman e Ana Beatriz H. Santos pela recepção e auxílio.*

*Ao técnico Gabriel Ferraz da Silva da unidade de microscopia do Instituto de Ciências Biomédicas pelos ensinamentos e pela sua confiança ao meu comprometimento.*

*À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.*

*Às agências de fomento: CAPES e FAPERJ pelo suporte financeiro.*

*O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 “This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001”.*

*“O cérebro é como um bloco de pedra bruta que contém em si todas as esculturas possíveis [...]. No que ele se tornará depende do cinzel empunhado pela vida, pelo ambiente, pelas escolhas que o próprio cérebro faz no caminho.”*

*Suzana Herculano-Houzel*

## RESUMO

**MUNIZ, S. C. A. Efeitos do enriquecimento ambiental perinatal no comportamento análogo à ansiedade e na sociabilidade e o possível envolvimento dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo.** 2025. 112p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2025.

Os transtornos de ansiedade estão entre as condições psiquiátricas de maior prevalência na população ocidental, levando à perda da qualidade de vida das pessoas acometidas. Isso reflete em prejuízos no convívio social, no desempenho escolar e no trabalho, além de promover grandes custos financeiros tanto para o paciente quanto para os sistemas de saúde. Diferentes mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento de transtornos de ansiedade, dentre eles, alterações neuroendócrinas, como por exemplo, disfunções dos sistemas vasopressinérgico e ocitocinérgico. Além disso, disfunções nesses sistemas também podem causar déficits sociais, prejudicando a capacidade de integrar habilidades comportamentais, cognitivas e afetivas para se adaptar a diferentes contextos sociais. Ansiedade e déficits sociais são características comuns em transtornos neuropsiquiátricos, como depressão, transtornos bipolares e autismo. Eventos ocorridos no período perinatal têm grande impacto no comportamento do indivíduo desde a infância até a idade adulta. Fatores desfavoráveis nesta fase, têm sido correlacionados com a manifestação de doenças neuropsiquiátricas devido à sensibilidade neuroplástica desse período no desenvolvimento do sistema nervoso central. Por outro lado, ambientes favoráveis podem melhorar as capacidades cognitivas e emocionais. Neste trabalho, avaliamos os efeitos do enriquecimento ambiental (EA) perinatal no comportamento social e comportamento análogo à ansiedade em camundongos adolescentes e adultos, tanto machos quanto fêmeas. Também foi realizada uma análise por imunofluorescência dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo. Na adolescência, os grupos submetidos ao ambiente enriquecido perinatal (AEP) apresentaram um aumento de 144,9% no tempo de brincadeira social em comparação aos animais de ambiente padrão perinatal (APP) (fator ambiente:  $F_{1,28} = 12,23, p = 0,0016$ ). O EA perinatal não foi capaz de promover redução dos comportamentos ansiosos no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e da caixa claro-escuro (CCE). Contudo, no LCE, o aumento da atividade locomotora em 23,6% foi observado nos animais AEP em comparação aos animais APP (fator ambiente:  $F_{1,60} = 4,28, p = 0,04$ ). Na análise dos neurônios vasopressinérgicos, não foram encontradas diferenças significativas nos animais adolescentes. Porém, na análise dos neurônios ocitocinérgicos, os animais EAP apresentavam área do soma 10,7% maior que os APP (fator ambiente:  $F_{1,17} = 4,95, p = 0,03$ ), assim como um aumento de 7,5% no diâmetro (fator ambiente:  $F_{1,17} = 13,2, p = 0,002$ ). Nos adultos, independente do sexo, não houve diferenças significativas nos comportamentos sociais no teste de sociabilidade e preferência pela novidade social. Contudo, os animais EAP apresentaram aumento da atividade exploratória neste teste, com aumento no número de *rearing* 88,1% maior que dos animais APP (fator ambiente:  $F_{1,57} = 5,10, p = 0,02$ ). No teste do LCE, os animais enriquecidos demonstraram evidente redução dos comportamentos ansiosos, com aumento de 67,12% do tempo relativo de permanência nos braços abertos em relação aos animais APP (fator ambiente:  $F_{1,58} = 5,17, p = 0,02$ ). Neste teste, o EA perinatal também foi

capaz de aumentar o número relativo de entradas nos braços abertos em 56,0% ( $F_{1,58} = 5,64, p = 0,02$ ) e de reduzir o número de avaliações de risco em 27,4% ( $F_{1,58} = 18,94, p < 0,0001$ ), contudo, houve interação entre os fatores nesses dois parâmetros, e esse efeito foi observado apenas nos machos. No teste da CCE, os animais EAP adultos apresentaram aumento da atividade exploratória, representado por um aumento de 61,36% no número de transições entre os ambientes claro/escuro em comparação aos APP (fator ambiente:  $F_{1,58} = 9,19, p = 0,003$ ), assim como a redução de 33,2% na latência para entrada no compartimento claro da caixa pela primeira vez ( $F_{1,58} = 7,56, p = 0,007$ ). Na análise dos neurônios vasopressinérgicos dos animais adultos, o EA perinatal foi capaz de reduzir em 13,0% a área do soma (fator ambiente:  $F_{1,16} = 5,95, p = 0,02$ ), e em 9,6% o diâmetro (fator ambiente:  $F_{1,16} = 6,41, p = 0,02$ ) em comparação aos grupos APP. Contudo, houve interação entre os fatores e o EA perinatal foi capaz de afetar apenas os machos. De forma semelhante, os animais EAP apresentaram redução de 7,3% na área do núcleo desses neurônios (fator ambiente:  $F_{1,16} = 5,95, p = 0,02$ ) e de 4,6% no diâmetro ( $F_{1,16} = 6,41, p = 0,02$ ), com interação entre os fatores, sendo esse efeito apenas sob os machos (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,16} = 19,81, p = 0,0004$ ). Na análise dos neurônios ocitocinérgicos, os animais EAP apresentaram 9,1% de aumento na intensidade de marcação de ocitocina do soma em comparação aos animais APP (fator ambiente:  $F_{1,16} = 5,42, p = 0,03$ ). Além disso, o EA também promoveu um aumento de 16,2% na área do núcleo desses neurônios (fator ambiente:  $F_{1,16} = 12,09, p = 0,003$ ), assim como um aumento de 7,1% no diâmetro (fator ambiente:  $F_{1,16} = 6,80, p = 0,01$ ). Portanto, o EA perinatal é capaz de aumentar a sociabilidade de machos e fêmeas adolescentes, possivelmente por alterações no sistema ocitocinérgico. Nos animais adultos, o EA é capaz de reduzir comportamentos ansiosos dependentes do contexto em adultos, com possível envolvimento dos sistemas vasopressinérgico e ocitocinérgico, com diferenças sexo-dependentes.

**Palavras-chave:** camundongo, comportamento, neurodesenvolvimento.

## ABSTRACT

MUNIZ, S. C. A. **Perinatal environmental enrichment effects on anxiety-like behavior and sociability and the potential involvement of vasopressinergic and oxytocinergic neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.** 2025. 112p. Thesis (Doctorate in Physiology). Institute of Biological and Health Sciences, Multicentric Graduate Program in Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2025.

Anxiety disorders are among the most prevalent psychiatric conditions in Western populations, leading to a loss of quality of life for those affected. This results in impairments in social interactions, academic performance, and work productivity, as well as significant financial costs for both patients and healthcare systems. Various mechanisms are involved in the development of anxiety disorders, including neuroendocrine alterations, such as dysfunctions in the vasopressinergic and oxytocinergic systems. Furthermore, dysfunctions in these systems can also lead to social deficits, impairing the ability to integrate behavioral, cognitive, and emotional skills to adapt to different social contexts. Anxiety and social deficits are common features of neuropsychiatric disorders such as depression, bipolar disorders, and autism. Events occurring during the perinatal period have a significant impact on an individual's behavior from childhood through adulthood. Adverse factors during this phase have been correlated with the manifestation of neuropsychiatric disorders due to the neuroplastic sensitivity of this period in the development of the central nervous system. On the other hand, favorable environments can enhance cognitive and emotional capacities. In this study, we evaluated the effects of perinatal environmental enrichment (EE) on social behavior and anxiety-like behavior in adolescent and adult mice, both males and females. Additionally, we performed an immunofluorescence analysis of vasopressinergic and oxytocinergic neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. During adolescence, groups subjected to perinatal EE (PEE) exhibited a 144.9% increase in social play time compared to animals raised in standard perinatal environment (SPE) (environment factor:  $F_{1,28} = 12.23, p = 0.0016$ ). Perinatal EE did not reduce anxiety-like behaviors in the elevated plus maze (EPM) or light/dark box (LDB) tests. However, in the EPM, a 23.6% increase in locomotor activity was observed in PEE animals compared to SPE animals (environment factor:  $F_{1,60} = 4.28, p = 0.04$ ). In the analysis of vasopressinergic neurons, no significant differences were found in adolescent animals. However, in the analysis of oxytocinergic neurons, PEE animals exhibited a 10.7% larger soma area compared to SPE animals (environment factor:  $F_{1,17} = 4.95, p = 0.03$ ), as well as a 7.5% increase in diameter (environment factor:  $F_{1,17} = 13.2, p = 0.002$ ). In adulthood, regardless of sex, no significant differences were observed in social behaviors in the sociability and social novelty preference tests. However, PEE animals showed increased exploratory activity during the test, with an 88.1% higher rearing count compared to SPE animals (environment factor:  $F_{1,57} = 5.10, p = 0.02$ ). In the EPM test, enriched animals demonstrated a clear reduction in anxiety-like behaviors, with a 67.12% increase in the relative time spent in open arms compared to SPE animals (environment factor:  $F_{1,58} = 5.17, p = 0.02$ ). In this test, perinatal EE was also able to increase the relative number of open arm entries by 56.0% ( $F_{1,58} = 5.64, p = 0.02$ ) and reduce the number of risk assessments by 27.4% ( $F_{1,58} = 18.94, p < 0.0001$ ). However, there was an interaction between the factors for these two parameters, and these effects were observed only in males. In the LDB test, PEE adults animals displayed increased exploratory activity, evidenced by a 61.36% increase in the number of transitions between the light/dark compartments compared to SPE animals (environment factor:  $F_{1,58} = 9.19, p = 0.003$ ), as well as a 33.2% reduction in latency to enter the light compartment for the first time ( $F_{1,58} = 7.56, p$

= 0.007). In the analysis of vasopressinergic neurons of adults animals, perinatal EE reduced soma area by 13.0% (environment factor:  $F_{1,16} = 5.95, p = 0.02$ ) and diameter by 9.6% (environment factor:  $F_{1,16} = 6.41, p = 0.02$ ) compared to SPE groups. However, there was an interaction between factors, and perinatal EE affected only males. Similarly, PEE animals exhibited a 7.3% reduction in the nuclear area of these neurons (environment factor:  $F_{1,16} = 5.95, p = 0.02$ ) and a 4.6% reduction in diameter ( $F_{1,16} = 6.41, p = 0.02$ ), with an interaction between factors, affecting only males (environment  $\times$  sex interaction:  $F_{1,16} = 19.81, p = 0.0004$ ). In the analysis of oxytocinergic neurons, PEE animals showed a 9.1% increase in oxytocin labeling intensity in the soma compared to SPE animals (environment factor:  $F_{1,16} = 5.42, p = 0.03$ ). Additionally, perinatal EE promoted a 16.2% increase in the nuclear area of these neurons (environment factor:  $F_{1,16} = 12.09, p = 0.003$ ) and a 7.1% increase in diameter (environment factor:  $F_{1,16} = 6.80, p = 0.01$ ). Therefore, perinatal EE increases sociability in both male and female adolescents, possibly through alterations in the oxytocinergic system. It also reduces context-dependent anxiety-like behaviors in adults, with the potential involvement of vasopressinergic and oxytocinergic systems, exhibiting sex-dependent differences.

**Keywords:** mouse, behavior, neurodevelopment.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal mediante ao estresse.....	04
<b>Figura 2:</b> Esquema comparativo entre humanos e roedores demonstrando os principais processos no neurodesenvolvimento da gestação até a idade adulta. ....	06
<b>Figura 3:</b> Estruturas primárias dos neuropeptídeos ocitocina e vasopressina.....	11
<b>Figura 4:</b> Liberação de vasopressina e ocitocina por neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN e do SON.....	13
<b>Figura 5:</b> Esquema simplificado dos efeitos da vasopressina e da ocitocina na modulação do comportamento.....	14
<b>Figura 6:</b> Delineamento experimental.....	21
<b>Figura 7:</b> Ambiente padrão, vista lateral (imagem superior, à esquerda) e superior (imagem inferior, à direita).....	22
<b>Figura 8:</b> Ambiente enriquecido, vista lateral (à esquerda) e superior (à direita).....	23
<b>Figura 9:</b> Teste de interação social durante a adolescência.....	25
<b>Figura 10:</b> Aparato utilizado no teste de sociabilidade e preferência pela novidade social.....	26
<b>Figura 11:</b> Teste do labirinto em cruz elevado.....	27
<b>Figura 12:</b> Teste da caixa claro-escuro.....	29
<b>Figura 13:</b> Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste de interação social realizado em camundongos machos e fêmeas adolescentes.....	33
<b>Figura 14:</b> Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste do labirinto em cruz elevado realizado em camundongos machos e fêmeas adolescentes.....	34
<b>Figura 15:</b> Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste da caixa claro-escuro realizado em camundongos machos e fêmeas adolescentes.....	36
<b>Figura 16:</b> Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste de sociabilidade e preferência pela novidade social, sessão 1, realizado em camundongos machos e fêmeas adultos.....	38
<b>Figura 17:</b> Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste de sociabilidade e preferência pela novidade social, sessão 2, realizado em camundongos machos e fêmeas adultos.....	40
<b>Figura 18:</b> Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste do labirinto em cruz elevado realizado em camundongos machos e fêmeas adultos.....	42

<b>Figura 19:</b> Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste da caixa claro-escuro realizado em camundongos machos e fêmeas adultos.....	44
<b>Figura 20:</b> Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no soma de neurônios imunorreativos à vasopressina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adolescentes.....	45
<b>Figura 21:</b> Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no núcleo de neurônios imunorreativos à vasopressina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adolescentes.....	46
<b>Figura 22:</b> Fotomicrografias representativas de secções coronais (30µm) mostrando neurônios AVP (verde) e núcleos (azul) do PVN de camundongos adolescentes machos APP (A), fêmeas APP (B), machos AEP (C) e fêmeas AEP (D).....	47
<b>Figura 23:</b> Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no soma de neurônios imunorreativos à ocitocina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adolescentes.....	49
<b>Figura 24:</b> Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no núcleo de neurônios imunorreativos à ocitocina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adolescentes.....	50
<b>Figura 25:</b> Fotomicrografias representativas de secções coronais (30µm) mostrando neurônios OT (verde) e núcleos (azul) do PVN de camundongos adolescentes machos APP (A), fêmeas APP (B), machos AEP (C) e fêmeas AEP (D).....	51
<b>Figura 26:</b> Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no soma de neurônios imunorreativos à vasopressina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adultos .....	53
<b>Figura 27:</b> Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no núcleo de neurônios imunorreativos à vasopressina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adultos. ....	54
<b>Figura 28:</b> Fotomicrografias representativas de secções coronais (30µm) mostrando neurônios AVP (verde) e núcleos (azul) do PVN de camundongos adultos machos APP (A), fêmeas APP (B), machos AEP (C) e fêmeas AEP (D).....	55
<b>Figura 29:</b> Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no soma de neurônios imunorreativos à ocitocina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adultos.....	57

<b>Figura 30:</b> Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no núcleo de neurônios imunorreativos à ocitocina presentes no PVN em camundongos machos e fêmeas adultos.....	58
<b>Figura 31.</b> Fotomicrografias representativas de secções coronais (30µm) mostrando neurônios OT (verde) e núcleos (azul) do PVN de camundongos adultos machos APP (A), fêmeas APP (B), machos AEP (C) e fêmeas AEP (D).....	59
<b>Figura 32.</b> Matriz de correlação entre parâmetros analisados nos testes comportamentais dos animais adolescentes.....	61
<b>Figura 33.</b> Correlações entre parâmetros comportamentais nos testes da caixa claro-escuro (CCE) e o teste de interação e brincadeira social (TIBS) dos animais adolescentes.....	63
<b>Figura 34.</b> Correlações entre parâmetros comportamentais do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) dos animais adolescentes.....	64
<b>Figura 35.</b> Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos dos animais adolescentes.....	65
<b>Figura 36.</b> Correlações entre parâmetros morfológicos dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos dos animais adolescentes.....	66
<b>Figura 37.</b> Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios vasopressinérgicos e os resultados dos testes comportamentais dos animais adolescentes.....	66
<b>Figura 38.</b> Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios ocitocinérgicos e os resultados dos testes comportamentais dos animais adolescentes.....	68
<b>Figura 39.</b> Correlações entre parâmetros comportamentais no teste da caixa claro-escuro (CCE) e o número de cruzamentos na área clara no teste da CCE dos animais adultos.....	69
<b>Figura 40.</b> Correlações entre parâmetros comportamentais no teste da caixa claro-escuro (CCE) dos animais adolescentes.....	71
<b>Figura 41.</b> Correlações dos dados comportamentais do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e da caixa claro-escuro (CCE) dos animais adultos.....	72
<b>Figura 42.</b> Correlações dos dados comportamentais do teste de interação social (IS), sessão 1, e da caixa claro-escuro (CCE) dos animais adultos.....	74
<b>Figura 43.</b> Correlações entre o número de <i>rearing</i> na sessão 2 do teste de Interação Social (IS) e os parâmetros comportamentais avaliados na Caixa Claro-Escuro (CCE) dos animais adultos.....	76

<b>Figura 44.</b> Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos dos animais adultos.....	77
<b>Figura 45.</b> Correlação positiva entre a área do soma e a área do núcleo dos neurônios vasopressinérgicos dos animais adultos.....	78
<b>Figura 46.</b> Correlação entre a intensidade de marcação dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos em animais adultos.....	78
<b>Figura 47.</b> Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios vasopressinérgicos e os resultados dos parâmetros analisados dos testes comportamentais dos animais adultos.....	79
<b>Figura 48.</b> Correlação entre parâmetros analisados dos neurônios vasopressinérgicos e comportamentos no teste CCE e de interação social (IS) dos animais adultos.....	80
<b>Figura 49.</b> Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios ocitocinérgicos e os resultados dos testes comportamentais dos animais adultos.....	81
<b>Figura 50.</b> Correlações entre os parâmetros dos neurônios ocitocinérgicos e os comportamentos nos testes da caixa claro-escuro (CCE) e do labirinto em cruz elevado (LCE) dos animais adultos.....	82
<b>Figura 51.</b> Correlações entre os parâmetros dos neurônios ocitocinérgicos e os comportamentos no teste de interação social (IS) dos animais adultos.....	83

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Critérios para Diagnóstico de Transtorno de Ansiedade Generalizada (DSM-V).....	02
<b>Tabela 2.</b> Anticorpos utilizados para a marcação de imunofluorescência.....	30
<b>Tabela 3:</b> Resultados obtidos sobre os efeitos do EA perinatal em camundongos machos e fêmeas, adolescentes e adultos.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> (hormônio adrenocorticotrófico)
AEP	Ambiente enriquecido perinatal
APP	Ambiente padrão perinatal
AVP	<i>Arginine Vasopressin</i> (arginine vasopressina)
ATV	Área tegumentar ventral
CCE	Caixa claro-escuro
CeA	Amígdala central
CRH	<i>Corticotropin releasing hormone</i> (hormônio liberador de corticotrofina)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais)
EA	Enriquecimento ambiental
HHA	Hipotálamo – hipófise - adrenal
IQR	Intervalo interquartil
IS	Interação e preferência pela novidade social (Interação social)
LCE	Labirinto em cruz elevando
MeA	Amígdala medial
NLET	Núcleo leito da estria terminal
NAc	Núcleo <i>accumbens</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i> (soro normal de cabra)
OT	Ocitocina
OTR	Receptor de ocitocina
PAG	<i>Periaqueductal gray</i> (substância cinzenta periaquedatal)
PBS	<i>Phosphate saline buffer</i> (tampão fosfato salino)
PVN	<i>Paraventricular nucleus</i>
PFA	Paraformaldeído
PND	<i>Post natal day</i> (dia pós-natal)
PVC	Policloreto de vinila
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
SBN	<i>Social behavior network</i> (rede do comportamento social)

SL	Septo lateral
SNC	Sistema nervoso central
SON	<i>Supraoptic nucleus</i> (Núcleo supraóptico)
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TIBS	Teste de interação e brincadeira social
UA	Unidade arbitrária
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
V1aR	Receptor de vasopressina tipo 1a
V1bR	Receptor de vasopressina tipo 1b
V2	Receptor de vasopressina tipo 2

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	01
1.1 Ansiedade e déficit social.....	01
1.2 Período perinatal e enriquecimento ambiental.....	05
1.3 Sistemas vasopressinérgico e ocitocinérgico.....	11
1.2.1 Vasopressina e comportamento .....	14
1.2.2 Ocitocina e comportamento.....	16
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	19
2.1 Objetivos gerais.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	20
3.1 Animais e delineamento experimental.....	20
3.2 Descrição dos ambientes.....	21
3.2.1 Ambiente padrão.....	21
3.2.2 Ambiente enriquecido.....	22
3.3 Testes comportamentais.....	23
3.3.1 Teste de interação e brincadeira social .....	23
3.3.2 Teste de sociabilidade e preferência pela novidade social.....	25
3.3.3 Teste do labirinto em cruz elevado.....	26
3.3.4 Teste da caixa claro-escuro.....	28
3.4 Eutanásia, coleta e processamento dos encéfalos.....	29
3.5 Imunofluorescência.....	30
3.6 Análise estatística.....	31
<b>4 RESULTADOS.....</b>	32
4.1 Testes comportamentais.....	32
4.1.1 Adolescentes.....	32
4.1.1.1 Teste de interação e brincadeira social.....	32
4.1.1.2 Labirinto em cruz elevado.....	33
4.1.1.3 Caixa claro-escuro.....	35
4.1.2 Adultos.....	37
4.1.2.1 Teste de sociabilidade e preferência pela novidade social.....	37
4.1.2.2 Labirinto em cruz elevado.....	40
4.1.2.3 Caixa claro-escuro.....	42

4.2 Análise dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do PVN por imunofluorescência.....	45
4.2.1 Adolescentes.....	45
4.2.2 Adultos .....	52
4.3 Sumário geral dos resultados.....	59
4.4 Análise de correlação de Spearman e regressão linear.....	60
4.4.1 Adolescentes.....	60
4.4.2 Adultos.....	67
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	84
5.1 Avaliação comportamental.....	84
5.1.1 Adolescentes.....	84
5.1.2 Adultos.....	86
5.2 Análise dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do PVN.....	89
5.2.1 Neurônios vasopressinérgicos.....	90
5.2.2 Neurônios ocitocinérgicos.....	91
5.3 Análise de correlação.....	93
5.3.1 Comportamento.....	93
5.3.2 Imunofluorescência <i>vs.</i> comportamento.....	94
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	96
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	97

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Ansiedade e déficit social

A proporção de transtornos mentais tem crescido em todo o mundo nos últimos anos, gerando impactos sobre a saúde e a qualidade de vida da população, além de significante importância econômica nos países de sua maior prevalência. Segundo a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2019, 970 milhões de pessoas em todo o mundo sofriam de algum distúrbio mental. Os transtornos de ansiedade estão entre os de maior prevalência, afetando cerca de 300 milhões de pessoas, sendo mais comum em pessoas do sexo feminino, além de afetar 14% dos adolescentes (WHO, 2022). É importante destacar que o Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking nos países das Américas, onde 7,5% da população sofre de transtornos de ansiedade (OPAS – ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2018).

Sob uma perspectiva comparativa, a ansiedade está relacionada à antecipação de possíveis ameaças futuras enquanto o medo é uma emoção que surge em resposta a uma ameaça iminente, seja ela real ou percebida (WHO, 2022). Essas respostas emocionais englobam diversas funções fisiológicas, como ativação de reflexos autonômicos e liberação de glicocorticoides que levam ao aumento do estado de alerta, emoções negativas e comportamentos de defesa. Nesse sentido, a ansiedade é considerada uma emoção natural que ocorre de forma antecipatória, mas se torna patológica quando exacerbada a ponto de interferir no bem-estar emocional, na qualidade de vida e na execução de atividades cotidianas (ALLEN; LEONARD; SWEDO, 1995; STRÖHLE; GENSICHEN; DOMSCHKE, 2018). Indivíduos que apresentam transtornos de ansiedade, possuem sintomas como medo e ansiedade excessivos, com perturbações comportamentais. Os transtornos de ansiedade se diferem entre si e são classificados de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) da Associação de Psiquiatria Norte-americana (PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é o mais comum entre eles e para o diagnóstico dessa doença, o DSM-V estabelece critérios conforme descritos na tabela 1 (PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

**Tabela 1.** Critérios para Diagnóstico de Transtorno de Ansiedade Generalizada – (DSM-V)

- 
- Ansiedade excessiva e preocupação com diversos eventos ocorrem na maioria dos dias por pelo menos 6 meses;
  - A pessoa tem dificuldade em controlar a preocupação;
  - A ansiedade e a preocupação estão associadas a pelo menos três dos seguintes seis sintomas (apenas um sintoma é necessário em crianças):
    - Inquietação ou sensação de estar "à flor da pele";
    - Fadiga fácil;
    - Dificuldade de concentração;
    - Irritabilidade;
    - Tensão muscular;
    - Distúrbios do sono.
  - A ansiedade, a preocupação ou os sintomas físicos causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo;
  - A perturbação não é causada pelos efeitos fisiológicos de uma substância ou condição médica;
  - A perturbação não é melhor explicada por outro transtorno mental.
- 

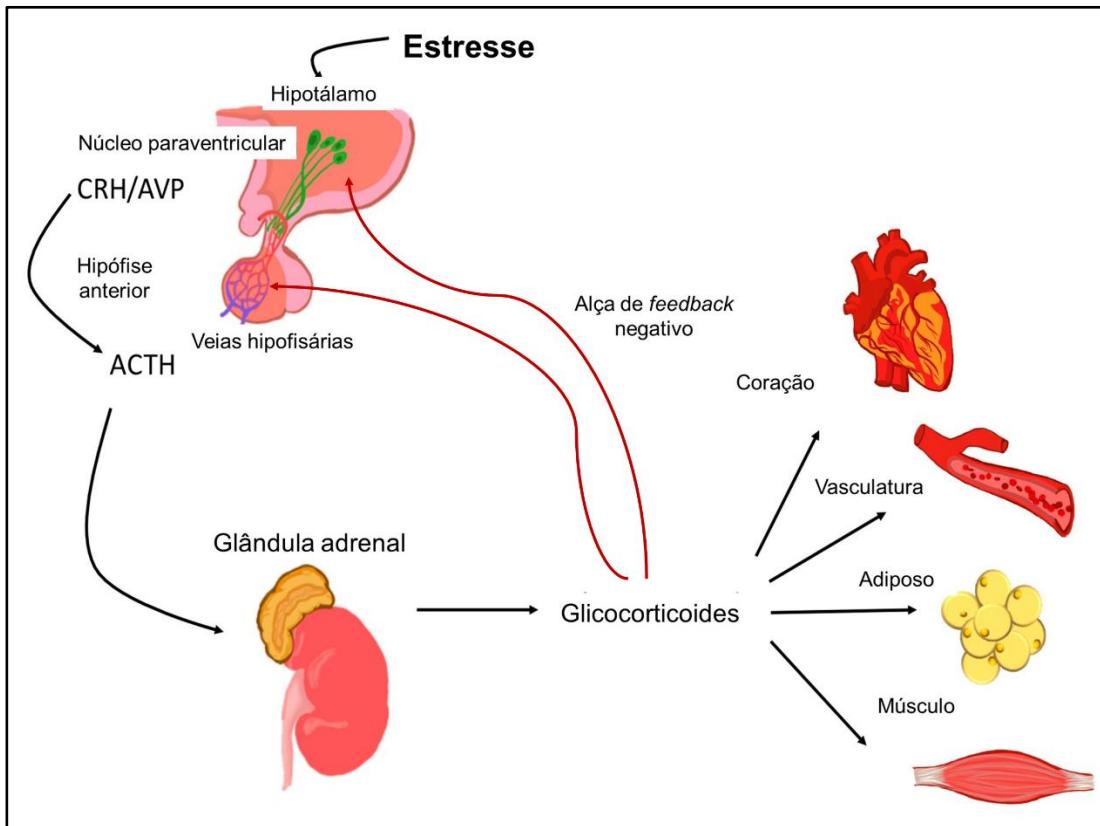
Do ponto de vista anátomo-funcional, nos transtornos de ansiedade estão envolvidas estruturas que compõe o circuito corticolímbico, como por exemplo a amígdala, hipotálamo, hipocampo, núcleo leito da estria terminal (NLET) e córtex pré-frontal (ADHIKARI, 2014; JANAK; TYE, 2015; MARTIN et al., 2010), onde podem ser identificadas alterações na neurotransmissão GABAérgica, serotoninérgica, noradrenérgica, glutamatérgica e dopaminérgica (BAHI; DREYER, 2019; CHEN et al., 2019; FERRAGUTI, 2018; JAKUBOVSKI et al., 2019). Os sistemas monoaminérgicos e GABAérgicos são os mais estudados sendo a base dos tratamentos farmacológicos dos transtornos de ansiedade. Contudo, estudos recentes têm se voltado para a descoberta de outros mecanismos envolvidos e possíveis alvos terapêuticos, como os sistemas vasopressinérgico e o ocitocinérgico (RAE et al., 2022; RANA et al., 2022).

Dentre os fatores de riscos para o desenvolvimento da TAG, podemos destacar a interação de fatores genéticos e ambientais. A exposição a eventos estressores em diferentes fases da vida, sendo eles físicos ou psicológicos, caracteriza-se como um importante fator desencadeante desse transtorno (STEIN; SAREEN, 2015).

O estresse é algo comum e faz parte da vida de seres humanos assim como de outros animais. Ele é desencadeado por mudanças no ambiente ou pela interpretação de situações como desafiadoras, podendo ser positivo (eustresse) ou negativo (distresse). A exposição a

elevados níveis de estresse perturba a homeostase do organismo e desencadeia um conjunto de respostas integradas adaptativas envolvendo funções fisiológicas, endócrinas e comportamentais. Um dos principais sistemas envolvidos nessa resposta é o eixo hipotálamo-hipofise-adrenal (HHA) e a ativação inadequada e/ou excessiva desse eixo está relacionada ao desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas, tais como os transtornos de ansiedade (BURFORD; WEBSTER; CRUZ-TOPETE, 2017).

No eixo HHA, o hipotálamo e a hipófise, componentes do sistema nervoso central (SNC) regulam a secreção de glicocorticoides, como o cortisol e corticosterona, pela zona fasciculada da medula adrenal. Células adrenocorticotróficas presentes na hipófise anterior secretam hormônio adrenocorticotrófico (ACTH – do inglês *adrenocorticotropic hormone*), responsável pelo estímulo à síntese dos glicocorticoides adrenais. A síntese e secreção do ACTH é estimulada pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH – do inglês *corticotropin releasing hormone*), e é potencializada pela ação da vasopressina arginina (AVP – do inglês *arginine vasopressin*). Mediante a estímulos estressantes, neurônios parvocelulares presentes no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN – do inglês *paraventricular nucleus*) secretam CRH, enquanto neurônios magnocelulares do PVN e do núcleo supraóptico hipotalâmico (SON – do inglês *supraoptic nucleus*) secretam a AVP, que atingem a hipófise anterior através do sistema porta-hipofisário na eminência média. Os efeitos fisiológicos dos glicocorticoides são mediados por receptores intracelulares e estão distribuídos por todo organismo, ativando respostas adaptativas ao estresse. Além disso, os glicocorticoides têm um importante papel nos mecanismos de *feedback* negativo desse eixo, inibindo a secreção do CRH e da AVP pelo hipotálamo, assim como a secreção de ACTH pela hipófise anterior (Figura 1) (BURFORD; WEBSTER; CRUZ-TOPETE, 2017; SMITH; VALE, 2006).



**Figura 1:** Ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal mediante ao estresse. Adaptado de Burford et al., (2017).

A AVP, além de estimular a liberação do ACTH na hipófise anterior mediante a um estímulo estressor, também é capaz de alcançar outras regiões do SNC como o córtex, sistema límbico e tronco, atuando como neurotransmissor, com efeitos principalmente ansiogênicos. Um outro neuropeptídio secretado por neurônios do PVN e SON que tem aumento da sua secreção mediante ao estresse é a ocitocina (OT), contudo, centralmente, tem efeitos ansiolíticos, contrabalanceando os efeitos da AVP e regulando mecanismos adaptativos ao estresse (DOUGLAS, 2005).

Esses neuropeptídeos, mas principalmente a OT, desempenham um papel crucial nos comportamentos sociais (RIGNEY et al., 2022; SMITH; DIBENEDICTIS; VEENEMA, 2019). Os comportamentos sociais referem-se às interações entre indivíduos de uma mesma espécie, mediadas por fatores biológicos, psicológicos e sociais. Essas interações são essenciais para a sobrevivência, pois promovem cooperação, aprendizado e suporte mútuo contribuindo para a manutenção e sucesso adaptativo e reprodutivo dos indivíduos que vivem em sociedade (CHEN; HONG, 2018; KAIDANOVICH-BEILIN et al., 2011).

Nas espécies sociais, o comportamento social é particularmente complexo, envolvendo principalmente a detecção e processamento de estímulos sociais, a formação e manutenção de

vínculos/relacionamentos, aprendizagem social, e em humanos, inclui comunicação verbal, além de ser influenciado por fatores culturais (rae et al., 2014; PORCELLI et al., 2019).

A rede neural do comportamento social (SBN – do inglês *social behavior network*) foi inicialmente proposta por Sara Newman (NEWMAN, 1999) e envolve a interconexão recíproca entre diversas áreas do cérebro que regulam comportamentos sociais, como agressividade, comportamento sexual e cuidado parental. Essa rede abrange regiões corticais e subcorticais, incluindo a amígdala, NLET, septo lateral (SL), hipotálamo, hipocampo, substância cinzenta periaquedatal (PAG – do inglês *periaqueductal gray*), córtex orbitofrontal, córtex pré-frontal medial e córtex cingulado anterior (NEWMAN, 1999; PORCELLI et al., 2019; SMITH; DIBENEDICTIS; VEENEMA, 2019).

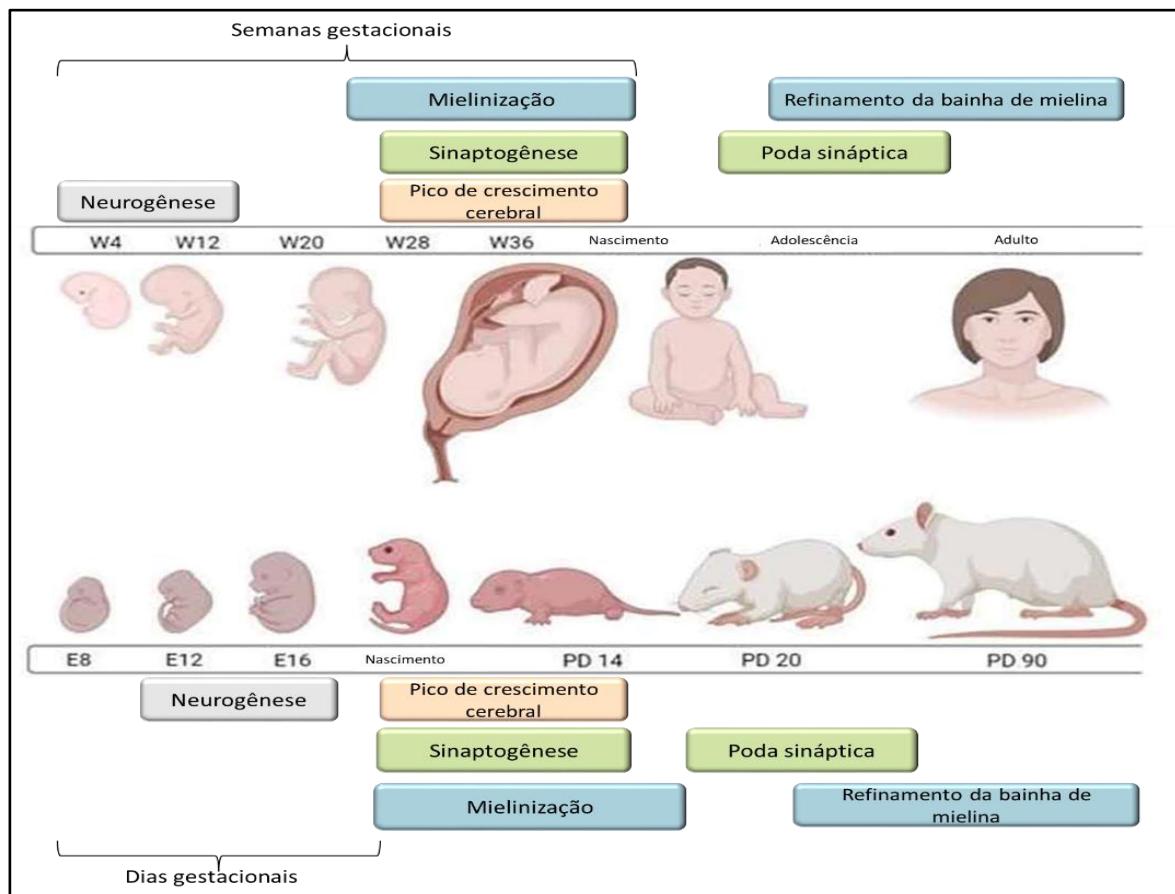
Disfunções nos sistemas neurotransmissores glutamatérgico, GABAérgico, serotoninérgico, dopaminérgico, bem como nos sistemas vasopressinérgico e ocitocinérgico dentro da SBN, podem levar a déficits sociais. Esses déficits referem-se a dificuldades em integrar habilidades comportamentais, cognitivas e afetivas para se adaptar a diferentes contextos sociais, resultando em comportamentos avaliados como negativos conforme os padrões de cada contexto. Déficits sociais são identificados em diversos transtornos neuropsiquiátricos, como ansiedade, depressão, transtornos bipolares e autismo (BEERY; KAUFER, 2015; PORCELLI et al., 2019).

Déficits sociais, assim como os transtornos de ansiedade, podem se manifestar em diferentes períodos da vida. Sob diferentes perspectivas (neurobiológica, comportamental, social), diversos estudos têm destacado a influência do ambiente durante o período perinatal, demonstrando seu impacto no comportamento ao longo da vida (MARTINEZ; BRUNELLI; ZIMMERBERG, 2015; PROUNIS; THOMAS; OPHIR, 2018; SHACKMAN; GEE, 2023; SILVA-ALMEIDA et al., 2024; THORSELL; NÄTT, 2016).

## **1.2 Período perinatal e enriquecimento ambiental**

O período perinatal é uma fase crítica para o neurodesenvolvimento, onde o SNC passa por intensos processos de maturação, incluindo a proliferação neuronal, migração celular, formação de sinapses, mielinização e estabelecimento dos circuitos neurais e de neurotransmissão. Durante este período, o cérebro é extremamente plástico, sendo capaz de se modificar de acordo com a experiência através de alterações estruturais e funcionais promovendo a base para o desenvolvimento das habilidades cognitivas, emocionais e comportamentais ao longo da vida (LUBY; ROGERS; MCLAUGHLIN, 2022; MILBOCKER

et al., 2021). Enquanto em roedores, esse período se inicia logo ao nascimento, abrangendo as 3 primeiras semanas de vida, com um pico por volta do 10º dia pós-natal (PND – do inglês *post natal day*), em humanos, esse pico acontece a partir do terceiro trimestre de gestação e continua até os dois anos de vida (Figura 2) (MILBOCKER et al., 2021).



**Figura 2:** Esquema comparativo entre humanos e roedores demonstrando os principais processos no neurodesenvolvimento da gestação até a idade adulta. Adaptado de Milbocker et al., 2021.

A formação do SNC é um processo altamente coordenado e dinâmico, influenciado por fatores genéticos e epigenéticos que regulam com precisão a ativação e repressão de genes específicos em momentos determinados. A sincronização entre esses fatores é crucial para o desenvolvimento correto do SNC, assegurando que aconteça de forma funcional e adaptativa. Genes relacionados a fatores de transcrição, vias de sinalização e proteínas estruturais desempenham papéis cruciais na formação e organização dos sistemas neurais (HAN et al., 2022; YANG; QI; SUN, 2021), enquanto a epigenética atua como um modulador que integra informações ambientais ao programa genético, ajustando a expressão gênica sem alterar a sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*), como a metilação do DNA, modificações de histonas e regulação por ácido ribonucleico (RNA – do

inglês *ribonucleic acid*) não codificante. Esses mecanismos permitem que o desenvolvimento do SNC seja flexível, ajustando-se às condições ambientais (KUNDAKOVIC; JARIC, 2017).

Enquanto experiências adversas, como exposição a estresse físico e/ou psicológico ou desnutrição durante períodos críticos de desenvolvimento podem causar alterações na programação epigenética e prejudicar a estruturação e funcionamento de circuitos neurais, resultando em maior vulnerabilidade a transtornos neuropsiquiátricos e de comportamento (THORSELL; NÄTT, 2016). Por outro lado, experiências enriquecedoras no período perinatal, melhoram as capacidades cognitivas como o aprendizado e a memória (DURÁN-CARABALI et al., 2018), aumentam comportamentos afetivos e sociais (MARTINEZ; BRUNELLI; ZIMMERBERG, 2015) além de reduzirem comportamentos ansiosos (SILVA-ALMEIDA et al., 2024).

Em humanos, sabe-se que durante diferentes fases do período perinatal, fatores como o estresse materno, a pobreza, a má nutrição e a privação psicossocial, estão correlacionados com déficit na cognição, na fala, nas funções executivas e no desempenho escolar, além de problemas emocionais ao longo da vida (BLACK et al., 2017; SHACKMAN; GEE, 2023).

Portanto, compreender como alterações ambientais durante esse período interferem no neurodesenvolvimento é essencial para a formulação de intervenções preventivas e terapêuticas que possam favorecer um desenvolvimento saudável de forma a trazer efeitos benéficos a saúde mental durante toda a vida. Neste contexto, uma das ferramentas úteis para o estudo de influências ocorridas no ambiente perinatal na cognição e na expressão do comportamento em indivíduos é o enriquecimento ambiental (EA).

O termo “enriquecimento ambiental” foi proposto pela primeira vez por Donald Hebb, que observou que os ratos que corriam soltos em um ambiente tinham maior capacidade de aprendizado e memória do que os animais mantidos em condições de laboratório, que indicava que um ambiente com maior complexidade contribuía para melhora cognitiva (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

O paradigma experimental do EA é caracterizado por alterações no ambiente de criação de animais de laboratório que favorecem estímulos sensoriais, motores, cognitivos e sociais e de forma geral, podem ser de dois tipos: físico e/ou social (SIMPSON; KELLY, 2011).

O EA geralmente é realizado de forma multimodal, fornecendo diferentes tipos de estímulos ao animal. Ambientes que proporcionam maior exploração, com brinquedos variados, rodas de atividades, plataformas, túneis e tocas, estimulam a atividade física. Além disso, a diversidade de brinquedos, com diferentes formatos, cores e texturas, contribui para o

enriquecimento sensorial. A introdução constante de novidades, por meio da troca de objetos e mudanças em suas localizações, introduz um elemento de novidade que estimula habilidades cognitivas. Por fim, gaiolas maiores, que acomodam um maior número de animais, promovem interações sociais mais intensas, enriquecendo ainda mais a experiência dos indivíduos (HAN et al., 2022).

Um ambiente estimulador não aversivo promove um efeito positivo chamado de eustresse, que diferente das condições de alojamento padrão de laboratório, proporciona ao animal oportunidades de manifestar seus comportamentos naturais como exploração, forrageio e nidificação (SPARLING et al., 2020)

Os protocolos utilizados variam amplamente entre os estudos, desde o tipo e complexidade do enriquecimento até o período e duração, e não há um consenso em definir qual protocolo experimental tem efeitos benéficos no cérebro e no comportamento (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

O EA durante o período perinatal tem sido amplamente estudado devido aos seus efeitos significativos sobre o comportamento de roedores em curto e longo prazo. De modo geral, o EA promove benefícios comportamentais e cognitivos, embora algumas pesquisas relatem efeitos divergentes.

Em um trabalho realizado anteriormente pelo nosso grupo, o EA foi aplicado desde a concepção até o dia de desmame (PND 21), utilizando gaiolas maiores equipadas com túneis e tocas de policloreto de vinila (PVC), uma plataforma suspensa de acrílico e material para nidificação. Esse ambiente foi eficaz em reduzir comportamentos ansiosos em camundongos adultos (SILVA-ALMEIDA et al., 2024). De forma similar, Sparling et al. (2018) implementaram o EA do período pré-natal até o PND 35 em um sistema de colônia social, com gaiolas padrão interligadas a uma gaiola central de quatro níveis. O ambiente continha objetos variados, como materiais para ninho, rodas de corrida, e brinquedos que eram regularmente trocados para manter a novidade. Esse protocolo aumentou os comportamentos de brincadeira em ratos adolescentes, mas não influenciou os comportamentos sociais na idade adulta (SPARLING; BAKER; BIELAJEW, 2018). Em Cymerblit-Sabba et al. (2013) foi realizado EA restrito ao período pré-natal que incluía maior espaço, escadas, caixas de areia e objetos variados, além de enriquecimento social (cinco ratas prenhas por gaiola). Esse protocolo reduziu comportamentos ansiosos e depressivos em animais submetidos a estresse na idade adulta, promovendo resiliência ao estresse com redução dos níveis plasmáticos de corticosterona (CYMERBLIT-SABBA et al., 2013).

Além disso, estudos sobre o impacto do EA logo após o nascimento também indicam benefícios. Chapillon et al. (1999) relataram que animais criados em caixas plásticas maiores, interligadas por túneis e contendo objetos variados como rodas e peças de plástico que eram alterados de posição três vezes por semana, apresentaram uma redução significativa em comportamentos do tipo ansioso na idade adulta (CHAPILLON et al., 1999). Em Zheng et al. (2020) foi realizado EA espacial logo após o nascimento, com tocas, túneis, materiais para nidificação (algodão, pedaços de tecidos e rolos de papel) e brinquedos variados com diferentes formas e cores que eram reposicionados diariamente, além de um cubo contendo diferentes especiarias, como anis e canela. E após o desmame foi realizado também enriquecimento social sendo mantidos mais animais por gaiola enriquecida (7-9) do que do ambiente padrão (3-5), e adicionaram uma roda de corrida além de três tipos de brinquedos e de especiarias que eram trocados duas vezes por semana. Esse complexo ambiente promoveu melhora da coordenação motora, da aprendizagem, da memória e da sociabilidade, assim como reduziu a ansiedade em ratos adultos (ZHENG et al., 2020).

Por outro lado, alguns estudos relatam aumento de comportamentos ansiosos promovidos pelo EA nos períodos iniciais do desenvolvimento. Whitaker et al. (2016) investigaram dois tipos de EA aplicados do nascimento ao desmame: um com materiais para nidificação e forrageio como algodão e fibras de papel, além de uma toca, e o outro ambiente, que continha esses mesmos materiais, porém foi inserida uma roda de exercício voluntário. Nesse estudo, os efeitos do EA sobre a ansiedade em camundongos machos e fêmeas adolescentes variaram de acordo com a linhagens de roedores estudadas e as condições específicas do ambiente, podendo tanto aumentar quanto diminuir comportamentos relacionados à ansiedade, dependendo do contexto do teste comportamental e da configuração do enriquecimento o qual o animal havia sido submetido (WHITAKER et al., 2016).

Em outro estudo, Li et al. (2016) aplicaram o EA do nascimento até o desmame. Apesar de ambos os ambientes (padrão e enriquecido) conterem materiais para nidificação e serem do mesmo tamanho, as caixas enriquecidas continham uma gangorra de plástico mais três objetos, sendo um deles trocados a cada três dias. Foram usados quatro tipos de objetos: túnel de plástico, parede de escalada, plataforma e um bloco de madeira. Os testes comportamentais foram realizados um dia após o desmame e os animais enriquecidos apresentaram aumento do comportamento do tipo ansioso (LI; LUND; VOIGT, 2016). De forma similar, Connors et al. (2015) realizaram EA durante o período pré e pós-natal e identificaram aumento de comportamentos ansiosos em ratos adolescentes sem alterações sobre os comportamentos

sociais. Neste trabalho, o ambiente enriquecido era composto por uma gaiola com grandes dimensões com vários níveis e rampas, contendo brinquedos e tubos (trocados duas vezes por semana), ossos para mastigação e material para nidificação, (CONNORS et al., 2015). Resultados semelhantes também foram encontrados por Rosenfeld e Weller (2012), onde o EA foi realizado exclusivamente durante o período pré-natal e induziu comportamento ansioso em ratos na adolescência e idade adulta. Neste trabalho o EA era composto por gaiolas maiores do que as utilizadas em ambiente padrão e continham pequenas caixas, tubos, bolas e brinquedos barulhentos, escadas e correntes de ferro e objetos para mastigação, como papelão, corda e materiais plásticos que eram trocados semanalmente (ROSENFELD; WELLER, 2012).

Esses trabalhos citados destacam a complexidade dos efeitos do EA, evidenciando que os resultados dependem de diversos fatores, como o período de aplicação, o tipo de enriquecimento e o contexto experimental. Portanto, enquanto o EA pode oferecer benefícios significativos para o neurodesenvolvimento e o comportamento, ele também pode gerar efeitos negativos como o aumento dos níveis de ansiedade, dependendo das condições específicas do protocolo.

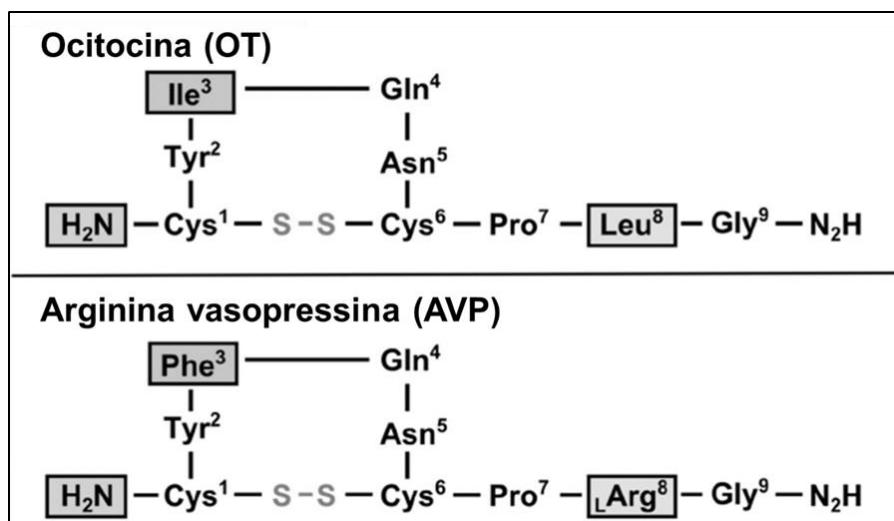
Outro fato interessante, é a capacidade do EA modular os sistemas vasopressinérgico e ocitocinérgico. Em Curley et al. (2009) foi realizado EA social na forma de ninho comunal de forma que logo após o parto, eram mantidas três fêmeas com 3 ninhadas por gaiola, enquanto as fêmeas do grupo controle eram mantidas em gaiolas isoladas com uma ninhada. Após o desmame (PND28) todos os filhotes foram alocados em ambiente padrão. Quando adultos, os animais provenientes de ninho comunal apresentaram redução dos comportamentos ansiosos assim como aumento na densidade de ligação de OT e redução de AVP aos seus respectivos receptores no SL, assim como em outras regiões envolvidas no comportamento (CURLEY et al., 2009). Em Neal et al. (2018), o EA social e físico foi realizado logo após o desmame através de gaiolas maiores, contendo materiais de origem natural, como casca de coco triturada utilizada como substrato para cama, além objetos como pedras, gravetos e pedaços de casca de coco que serviam como abrigo, suporte para escalada, escavação de túneis ou manipulação. Durante a adolescência, os animais enriquecidos tiveram um aumento significativo na sociabilidade e apresentaram aumento da porcentagem de imunorreatividade para OT no PVN (NEAL et al., 2018).

O desenvolvimento dos sistemas vasopressinérgico e ocitocinérgico acontece principalmente no período perinatal, sendo especialmente sensível às experiências vividas nos estágios iniciais de vida. Portanto, nessa fase, o ambiente tem o potencial de modular a

maturação desses sistemas, afetando respostas comportamentais, autonômicas e neuroendócrinas, sendo um determinante na formação de mecanismos adaptativos a estressores e interações sociais ao longo da vida (BARACZ; EVERETT; CORNISH, 2020; DUMAIS; VEENEMA, 2016; MADRIGAL; JURADO, 2021; ONAKA; TAKAYANAGI, 2021).

### 1.3 Sistemas vasopressinérgico e ocitocinérgico

A OT e a AVP são neuropeptídeos envolvidos em funções fisiológicas, na manutenção da homeostase e na regulação do comportamento. São nonapeptídeos evolutivamente conservados, com estrutura similar, se diferenciando apenas os aminoácidos (aa) de duas posições, 3 e 8. Enquanto a ocitocina possui isoleucina e leucina, a AVP contém fenilalanina e arginina nas posições respectivas (QURESHI et al., 2014). Esses aa estão organizados em um anel de 6 aa ligados por pontes de cisteínas com uma cauda de 3 aa finalizada por um grupo amina (Figura 3). Estes neuropeptídeos têm como precursor moléculas de 12 aa que são clivadas na forma madura desses neuropeptídeos. Esses precursores são sintetizados e liberados junto com proteínas carreadoras específicas, a neurofisina I (para OT) e a neurofisina II (para AVP), e ficam armazenados em vesículas até sua liberação (CARTER, 2017).



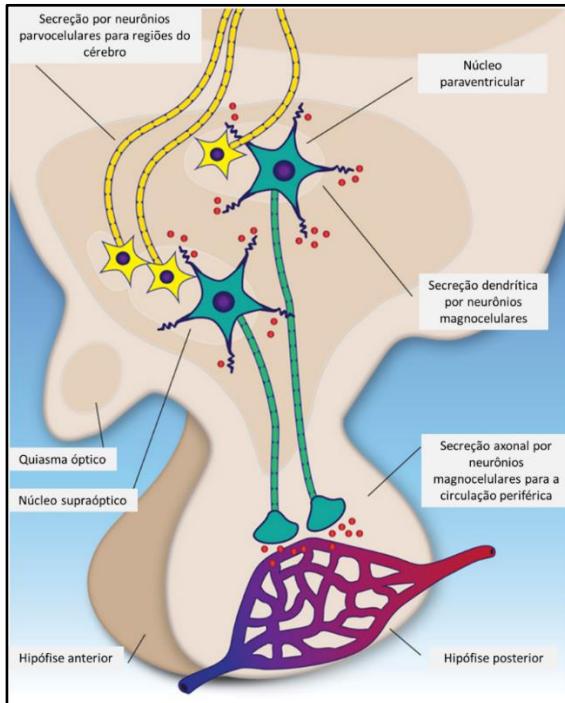
**Figura 3:** Estruturas primárias dos neuropeptídeos ocitocina e vasopressina. Os aminoácidos destacados nas posições 3 e 8 representam as diferenças na sequência de aminoácidos entre essas duas moléculas. Adaptado de Qureshi et al. (2014).

Devido às similaridades nas suas estruturas, AVP e OT têm a capacidade de se ligarem aos mesmos receptores, porém com diferentes níveis de afinidade. O receptor o qual a OT tem maior afinidade é o receptor de ocitocina (OTR), e os receptores para vasopressina são o receptor para vasopressina V1a (V1aR), V1b (V1bR) e V2 (V2R). OTR e V1aR são os

principais receptores presentes no cérebro e possuem alto grau de homologia, enquanto o V1bR é restrito à hipófise anterior e o V2R aos rins (HAMMOCK, 2015).

Receptores para OT e AVP são ambos acoplados a proteína G. No encéfalo, os OTR e V1aR estão geralmente acoplados a proteínas da família  $G\alpha_{q/11}$  e sua ativação leva a despolarização, liberação de neurotransmissor e/ou transcrição e síntese de proteína. Também são encontrados OTR acoplados a proteínas inibitórias da família  $G\alpha_{i/o}$  reduzindo a excitabilidade neuronal (DUMAIS; VEENEMA, 2016; HAMMOCK, 2015; JUREK; NEUMANN, 2018; SONG; ALBERS, 2018).

AVP e OT são sintetizados principalmente por neurônios magnocelulares presentes no PVN e SON. Esses neurônios possuem longas projeções axonais para a hipófise posterior onde acontece a liberação desses peptídeos para a circulação sanguínea onde atingem tecidos alvos exercendo suas funções endócrinas. Além disso, neurônios magnocelulares possuem processos semelhantes a axônios que partem do soma e de dendritos proximais que se projetam para áreas encefálicas, como córtex, núcleo *accumbens* (NAc), NLET, habênula lateral, amígdala e hipocampo. Neurônios parvocelulares presentes no PVN também sintetizam AVP e OT e fazem sinapse com neurônios magnocelulares do PVN e SON modulando a sua atividade, além de se projetarem para outras áreas do SNC, como núcleos do tronco encefálico, medula espinal, amígdala, hipocampo, estriado, NAc e NLET (Figura 4). Dentro do cérebro, além da liberação pela via sináptica, neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos também liberam esses neuropeptídeos através de varicosidades axonais e de regiões somato-dendríticas, onde a AVP e a OT se difundem no espaço extracelular modulando a atividade neuronal de células adjacentes (BARIBEAU; ANAGNOSTOU, 2015; CARTER, 2017; GRINEVICH; LUDWIG, 2021; HERNÁNDEZ et al., 2015; MEYER-LINDENBERG et al., 2011).

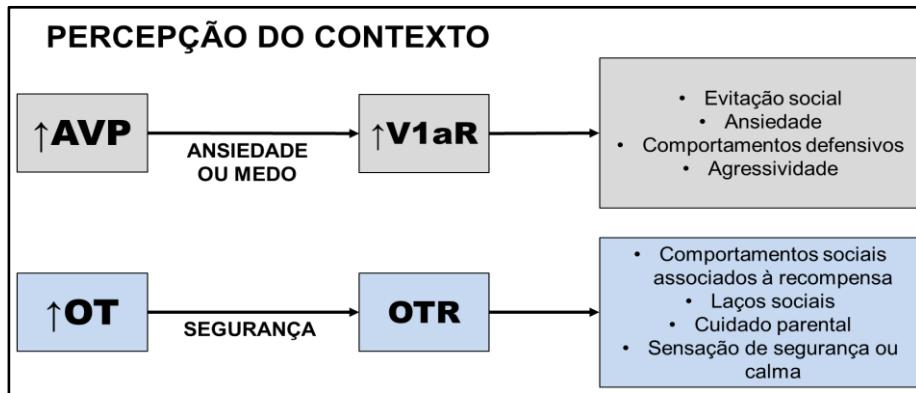


**Figura 4:** Liberação de vasopressina e ocitocina por neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN e do SON. Adaptado de Baribeau; Anagnostou, 2015.

Outras regiões extrahipotalâmicas também possuem neurônios que sintetizam AVP e OT, como a amígdala e o NLET, formando pequenas unidades funcionais que modulam respostas rápidas sob o comportamento, como sociabilidade, agressividade e ansiedade (JIN et al., 2023; MADRIGAL; JURADO, 2021; RIGNEY; DE VRIES; PETRULIS, 2023).

Os efeitos hormonais da AVP e da OT são bastante distintos. De forma resumida, AVP realiza o balanço hidro-eletrolítico com efeito antidiurético e vasoconstritor promovendo aumento da pressão arterial, enquanto a OT estimula as contrações uterina no início do parto e a ejeção do leite durante a amamentação (BARACZ; EVERETT; CORNISH, 2020; RIGNEY; DE VRIES; PETRULIS, 2023).

Dentro do SNC, as projeções sinápticas desses neurônios e a liberação extrasináptica desses neuropeptídeos, assim como a ampla distribuição dos seus receptores em diversas regiões do cérebro, indicam grande importância da AVP e OT sobre a modulação do comportamento. De forma geral, o sistema ocitocinérgico estimula o cuidado parental, formação de vínculo social, além de ter efeito ansiolítico, enquanto o sistema vasopressinérgico atua de forma antagônica, aumentando a agressividade, territorialidade e a ansiedade. Mas essa forma simplista não explica toda complexidade desses sistemas, pois ambos trabalham de forma integrada modulando comportamentos sociais e a reatividade ao estresse (Figura 5) (BARACZ; EVERETT; CORNISH, 2020; CARTER, 2017; MADRIGAL; JURADO, 2021).



**Figura 5:** Esquema simplificado dos efeitos da vasopressina e da ocitocina na modulação do comportamento. Adaptado de Carter, 2017.

O início do desenvolvimento do sistema vasopressinérgico em humanos acontece por volta da 11<sup>a</sup> semana de gestação onde a AVP já é detectada, enquanto a OT é encontrada por volta da 14<sup>a</sup> semana. Na 26<sup>a</sup> semana de gestação, os níveis de reatividade e o número de neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos no PVN são semelhantes ao da idade adulta (HAMMOCK, 2015).

Já em camundongos, o início do desenvolvimento do sistema ocitocinérgico e vasopressinérgico acontece por volta do 16.5 dia pós concepção, onde a forma imatura de AVP e OT, e a forma madura (amidada) de AVP podem ser detectadas no PVN e no SON. O sistema vasopressinérgico amadurece mais cedo que o ocitocinérgico, de forma que neurônios ocitocitêgicos ainda são escassos no PND7. Ambos os sistemas continuam a se desenvolver pós-natalmente, células vasopressinérgicas extrahipotalâmicas no NLET e da amígdala medial (MeA) se estabelecem havendo dimorfismo sexual com aumentada síntese de AVP e maior densidade de fibras que se projetam para a habênula e para o SL em machos. O RNA mensageiro do OTR e V1aR e sua capacidade de ligação também já foram detectados durante o período pré-natal, mas o padrão nos níveis de expressão é transiente após o nascimento e somente após o desmame fica semelhante ao da idade adulta (HAMMOCK, 2015; MADRIGAL; JURADO, 2021).

### 1.3.1 Vasopressina e comportamento

Neurônios vasopressinérgicos presentes no PVN se projetam para diversas regiões envolvidas na modulação da ansiedade e dos comportamentos sociais, como para NAc, NLET, SL, área pré óptica, globo pálido ventral, núcleo caudado e putâmen, habênula lateral, núcleos amigdalares, tálamo, hipocampo, córtex pré-frontal (infralímbico, pré-límbico, córtex cingulado e orbital) e o próprio hipotálamo. Também se projetam para regiões do mesencéfalo

e tronco, como para o núcleo dorsal da rafe, área tegumentar ventral (ATV), PAG, substância *nigra* e núcleo mesencefálico reticular (FREDA et al., 2022; RIGNEY; DE VRIES; PETRULIS, 2023).

Centralmente, a AVP está relacionada principalmente a adaptação a situações estressantes, regulando comportamentos de autodefesa e de proteção da colônia social, estimulando a agressividade e territorialidade, além de modular a expressão do comportamento de medo (CARTER, 2017).

Apesar da AVP ter importante papel no comportamento agressivo, ela também atua de forma pró-social dependendo do contexto e da região encefálica de interação com seu receptor. Por exemplo, Duque-Wilckens et al., (2016), demonstraram que no NLET, a ligação da AVP ao V1aR aumenta os comportamentos sociais em camundongos machos e fêmeas (DUQUE-WILCKENS et al., 2016). Em ratas juvenis, o AVP no SL aumenta comportamentos de brincadeira através da ligação ao V1aR em terminais pós-sinápticos de neurônios dopaminérgicos provenientes da ATV, estimulando a recompensa social através do aumento da liberação de dopamina (BREDEWOLD et al., 2018). Outro papel do AVP sobre a sociabilidade está relacionado ao reconhecimento social, a ativação de neurônios AVP do PVN que se projetam hipocampo durante a aquisição, melhora a memória social através da ativação de V1aR nessa região (SMITH et al., 2016). Além disso, a ativação de V1aR no SL também facilita o aprendizado social (BIELSKY et al., 2005).

A AVP também desempenha um papel no comportamento ansioso e resposta ao estresse em contextos não sociais. Linhagens de ratos com fenótipo ansioso possuem maiores níveis de expressão de AVP no PVN (MURGATROYD et al., 2004), e foi demonstrado que a ativação de V1aR no PVN aumenta comportamentos ansiosos (BAYERL; HÖNIG; BOSCH, 2016).

Além disso, Wotjak et al. (2001) demonstraram que ratos submetidos ao estresse agudo, apresentam níveis elevados de RNA de AVP no PVN (WOTJAK et al., 2001). Por outro lado, camundongos fêmeas, mas não machos, demonstram uma redução nos níveis de RNA mensageiro de AVP após estresse agudo e crônico, acompanhada por um aumento nos comportamentos sociais (BORROW et al., 2018, 2019). Outro fato importante, é que eventos estressantes durante o período de desenvolvimento são capazes de aumentar os níveis de expressão de RNA mensageiro de AVP no PVN assim como os níveis de ansiedade em animais na idade adulta (ZHANG et al., 2012).

Neurônios vasopressinérgicos do PVN se projetam densamente para a amígdala central (CeA), núcleo amigdalar responsável pelo processamento emocional de informações

ambientais, modulando a resposta ao estresse. Neurônios GABAérgicos da CeA expressam V1aR e ativação desses neurônios pela AVP tem efeitos ansiogênicos (HERNÁNDEZ et al., 2016). Por outro lado, no NLET, a ligação da AVP ao V1aR tem efeitos ansiolíticos em camundongos (apenas em machos) (DUQUE-WILCKENS et al., 2016).

O dimorfismo sexual nas respostas ao estresse em contexto social e não social envolvendo o AVP é em parte justificada por diferenças nos níveis de receptores de estrogênio nas subpopulações de neurônios vasopressinérgicos, que variam drasticamente entre os sexos, sendo que estes receptores têm efeito inibitório sobre a síntese e secreção de AVP (OYOLA et al., 2017). Além disso, como dito anteriormente, em machos, neurônios vasopressinérgicos originados de outras estruturas envolvidas com o comportamento, como o NLET e a MeA, possuem maiores densidades de projeções para outras estruturas do sistema límbico, especialmente para o SL (VEENEMA; BREDEWOLD; DE VRIES, 2013).

### **1.3.2 Ocitocina e comportamento**

Similarmente à AVP, neurônios ocitocinérgicos originados do PVN se projetam para diversas regiões envolvidas no comportamento, como núcleos da rafe, núcleo reticular mesencefálico, ATV, substância *nigra*, PAG, núcleos amigdalares, NLET, NAc, SL, tálamo, área pré-optica medial, núcleo olfatório anterior, hipocampo e regiões corticais como córtex pré-frontal (cingulado anterior, orbital medial e ventral, pré-límbico e de associação frontal) e temporal, além do próprio hipotálamo (FREDA et al., 2022; JIN et al., 2023; KNOBLOCH et al., 2012; TANG et al., 2020).

De forma resumida, a sinalização da ocitocina pode ser classificada em três níveis de neuromodulação (FROEMKE; YOUNG, 2021). Na neuromodulação de primeira ordem, células excitatórias são ativadas através da ligação de OT ao seu receptor, como por exemplo, as células piramidais da região CA2 do hipocampo, que estão diretamente relacionadas à memória de reconhecimento social (TIRKO et al., 2018). Na neuromodulação de segunda ordem, ocorre a modulação de microcircuitos, envolvendo neurônios inibitórios que possuem receptores OTR. Um exemplo disso, são os interneurônios GABAérgicos da CeA, que irão inibir neurônios excitatórios, regulando o medo e a ansiedade (HAN et al., 2018). Já na terceira ordem, há uma interação entre circuitos de neuromodulação. Nesse contexto, podemos citar a integração entre o sistema ocitocinérgico e serotoninérgico, onde terminais de neurônios serotoninérgicos provenientes dos núcleos da rafe, presentes no NAc, possuem receptores OTR. A ativação desses receptores aumenta a depressão de longo prazo nos neurônios excitatórios

que fazem sinapse com neurônios espinhosos médios modulando a plasticidade sináptica em circuitos envolvidos com a recompensa social, estimulando comportamentos sociais (DÖLEN et al., 2013).

A mediação da ocitocina nos comportamentos sociais é altamente complexa, sendo modulada pela ativação de OTRs em diversas regiões límbicas e relacionadas à recompensa, como o córtex pré-frontal, amígdala, ATV, NAc, septo lateral, hipotálamo e hipocampo (JIN et al., 2023). Durante interações sociais, a atividade dos neurônios ocitocinérgicos do PVN é intensificada, aumentando sua síntese e liberação (HUNG et al., 2017). Além disso, neurônios parvocelulares ocitocinérgicos que fazem sinapse direta com uma grande população de neurônios magnocelulares no PVN tem papel crucial na ativação destes, mediante a um estímulo somatosensorial, aumentando significativamente a taxa de atividade dos neurônios magnocelulares durante interações sociais (TANG et al., 2020). A ATV recebe projeções ocitocinérgicas do PVN, e a ativação de OTRs em neurônios dopaminérgicos que se projetam para o NAc promove o aumento da sociabilidade e intensifica os mecanismos de recompensa social (BORLAND et al., 2018). Além disso, a inervação direta do NAc por essas projeções modula os terminais sinápticos de neurônios serotoninérgicos através da ligação com OTRs, tendo efeitos semelhantes sob comportamentos sociais (DÖLEN et al., 2013). Adicionalmente, a memória e o reconhecimento social envolvem a ativação de OTRs em regiões específicas, como a MeA (LUKAS et al., 2013) e as células excitatórias piramidais da região CA2 do hipocampo (TIRKO et al., 2018).

Além dos comportamentos sociais, a OT tem importante papel na redução da ansiedade e resposta ao estresse administrada periférica ou centralmente (AYERS et al., 2011). Projeções ocitocinérgicas provenientes do hipotálamo ativam interneurônios GABAérgicos presentes na amígdala centro-lateral, atenuando a atividade da amígdala centro-medial (ambas componentes da CeA), inibindo comportamentos de medo e ansiedade em ratas fêmeas (machos não foram estudados) (KNOBLOCH et al., 2012). No núcleo medial da rafe, a ativação de OTRs presentes em neurônios serotoninérgicos aumenta a liberação desse neurotransmissor reduzindo comportamentos ansiosos (YOSHIDA et al., 2009). No córtex pré-frontal medial, a OT tem efeitos ansiolíticos (apenas em camundongos machos). A ativação de OTRs presentes em interneurônios desta região estimulam a síntese da proteína ligante do CRH. Essa proteína bloqueia os efeitos do CRH, impedindo a sua ligação a receptores presentes nos neurônios piramidais do córtex pré-frontal medial, que são susceptíveis a plasticidade mediante a estresse. (LI et al., 2016). Além disso, a OT na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial tem

efeitos ansiolíticos em ratos de ambos os sexos. A ativação de OTRs presentes em interneurônios GABAérgicos desta região inibem a estimulação de neurônios glutamatérgicos que se projetam para a amígdala basolateral e para a CeA, reduzindo os comportamentos ansiosos (SABIHI et al., 2017). Além disso, a liberação de OT mediante a um estímulo estressor pode atuar como um mecanismo de “feedback” negativo sobre o eixo HHA inibindo a síntese e liberação de CRH de duas formas: 1 - Indiretamente, através da ligação a OTRs presentes em neurônios GABAérgicos que tem ação inibitória sobre neurônios CRH. 2 - Diretamente, através da ligação a OTR presentes em neurônios CRH tendo efeitos genômicos, inibindo a transcrição gênica do CRH. (WINTER; JUREK, 2019).

Diferente do sistema vasopressinérgico, a citoarquitetura do sistema ocitocinérgico apresenta pouco dimorfismo sexual (FREDA et al., 2022) e tem sido proposto que as diferenças de comportamentos entre os sexos são devido às diferenças de sensibilidade à OT nas diferentes regiões do cérebro assim como padrões de excitabilidade neural. Além disso, a evolução diferencial dos sistemas de ocitocina em machos e fêmeas pode resultar em variações na forma como cada sexo processa informações sociais e ambientais e responde a esses estímulos (CALDWELL, 2018). Além disso, os OTRs são sensíveis aos hormônios gonadais e a ligação do estrogênio com seu receptor alfa, que é um fator de transcrição, interage com elementos responsivos na região promotora do gene do OTR, aumentando sua transcrição. Durante a fase do estro, quando há um aumento significativo de estrógenos, há um aumento dramático da ligação da OT ao OTR em diversas regiões do cérebro (DUMAIS; VEENEMA, 2016).

Sabendo-se que a AVP e a OT desempenham um papel fundamental na modulação dos comportamentos sociais e ansiosos e que fatores ambientais são capazes de modular o comportamento assim como o neurodesenvolvimento, pouco está esclarecido sobre a possíveis alterações nos sistemas vasopressinérgico e ocitocinérgico mediante ao enriquecimento ambiental durante todo período perinatal. Diante disto, supomos que alterações comportamentais associadas ao enriquecimento ambiental perinatal podem estar envolvidas com alterações nos neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos.

Portanto, este trabalho tem como objetivo investigar os efeitos do enriquecimento ambiental durante o período perinatal sobre o comportamento e a morfologia de neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos, com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a influência de fatores ambientais no neurodesenvolvimento assim como na modulação do comportamento em diferentes fases da vida.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do enriquecimento ambiental perinatal no comportamento análogo à ansiedade e nos comportamentos sociais e possíveis substratos neurobiológicos envolvidos em camundongos machos e fêmeas, adolescentes e adultos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental perinatal em modelos de ansiedade.
- Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental perinatal nos comportamentos sociais.
- Identificar possíveis alterações morfométricas e na intensidade de marcação de vasopressina e ocitocina dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo provocadas pelo enriquecimento ambiental perinatal através da análise imunofluorescência.
- Investigar as correlações entre parâmetros comportamentais em diferentes testes e sua relação com a morfometria e intensidade de marcação dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais e delineamento experimental**

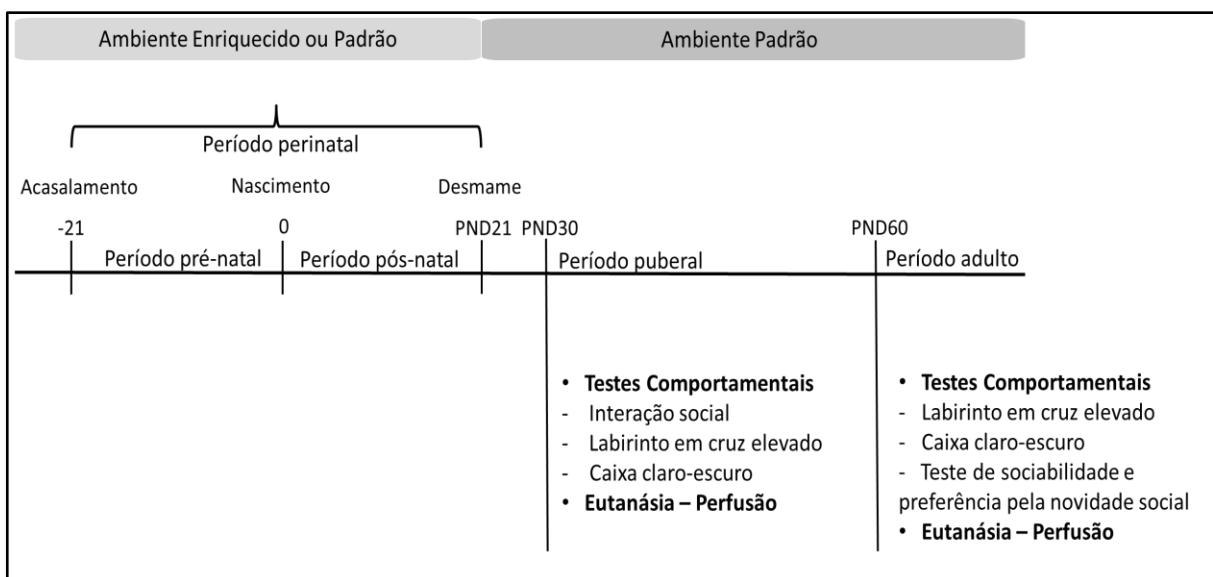
Para a realização deste trabalho, foram utilizados, inicialmente, como matrizes, camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, sendo 16 machos e 16 fêmeas, com aproximadamente 60 dias de idade, fornecidos pelo Biotério de Criação de Roedores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os animais foram mantidos em estantes ventiladas Alesco®, sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à água e ração. Na chegada dos animais ao biotério experimental o ciclo de iluminação foi invertido, sendo a fase clara iniciada às 18:00 h e a fase escura às 06:00 h. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - UFRRJ, sob o número de processo 08/2022 (ANEXO 1).

Estes animais deram origem a 16 casais que foram alocados em caixa padrão ( $n = 9$ ) ou enriquecida ( $n = 7$ ) para a cópula (ver descrição dos ambientes no item 3.2). Sete dias após a formação dos casais, os machos foram retirados e submetidos à eutanásia (SILVA-ALMEIDA et al., 2024).

Durante o período de gestação e amamentação, as mães permaneceram no mesmo ambiente do acasalamento e, após o nascimento, as ninhadas foram normalizadas para 08 filhotes, sendo 4 machos e 4 fêmeas por mãe (em uma das ninhadas de ambiente padrão, o número de filhotes machos que nasceram foram apenas 3, enquanto em outra ninhada enriquecida, a quantidade de fêmeas obtidas também foi reduzida, sendo somente 3 filhotes). Desta maneira, estes animais foram submetidos a duas condições durante o período perinatal: ambiente enriquecido ou ambiente padrão. Sendo considerado período perinatal, tanto o período gestacional quanto o período pré-desmame. Ao PND21, os animais foram desmamados, separados por sexo, e alojados em grupos de 4 indivíduos por caixa, sendo os dois grupos, ambiente enriquecido perinatal (AEP) e ambiente padrão perinatal (APP), mantidos em ambiente padrão a partir do desmame, onde permaneceram até o final do protocolo adotado (SILVA-ALMEIDA et al., 2024).

Quando os filhotes atingiram entre 30-35 dias de vida (fase da adolescência), dois machos e duas fêmeas de cada casal foram submetidos aos testes comportamentais na seguinte ordem: teste de interação e brincadeira social (TIBS), labirinto em cruz elevado (LCE) e caixa claro-escuro (CCE), com intervalo de 48 horas entre eles. A ordem foi determinada pelo grau

de invasividade (do menos ao mais invasivo) (PAYLOR et al., 2006). No dia de cada teste, apenas machos ou fêmeas eram testados. No dia seguinte após a CCE, estes animais foram submetidos à eutanásia e os cérebros coletados para posterior análise por imunofluorescência. Todos os animais remanescentes de cada casal permaneceram em caixa padrão até serem submetidos à análise comportamental na fase adulta (60-65 dias de idade). Similarmente à sequência de testes adotada na fase da adolescência, os testes foram realizados do menos para o mais invasivo: LCE, CCE, teste de sociabilidade e preferência pela novidade social (interação social - IS), mantendo-se o intervalo de 48 horas entre eles. No dia seguinte após o último teste, estes animais foram submetidos à eutanásia e os cérebros coletados para posterior análise por imunofluorescência. O esquema do delineamento experimental está demonstrado na figura 6.



**Figura 6:** Delineamento experimental.

### 3.2 Descrição dos ambientes

#### 3.2.1 Ambiente padrão

O ambiente padrão era constituído de caixa padrão de camundongos feita em polipropileno branco opaco com as seguintes dimensões 20,0 x 30,0 x 13,0 cm (largura x comprimento x altura). No ambiente padrão havia apenas a presença de maravalha no piso da caixa. Sendo que o volume total do ambiente padrão sem descontar o volume ocupado pela maravalha era de 7254 cm<sup>3</sup> (Figura 7).

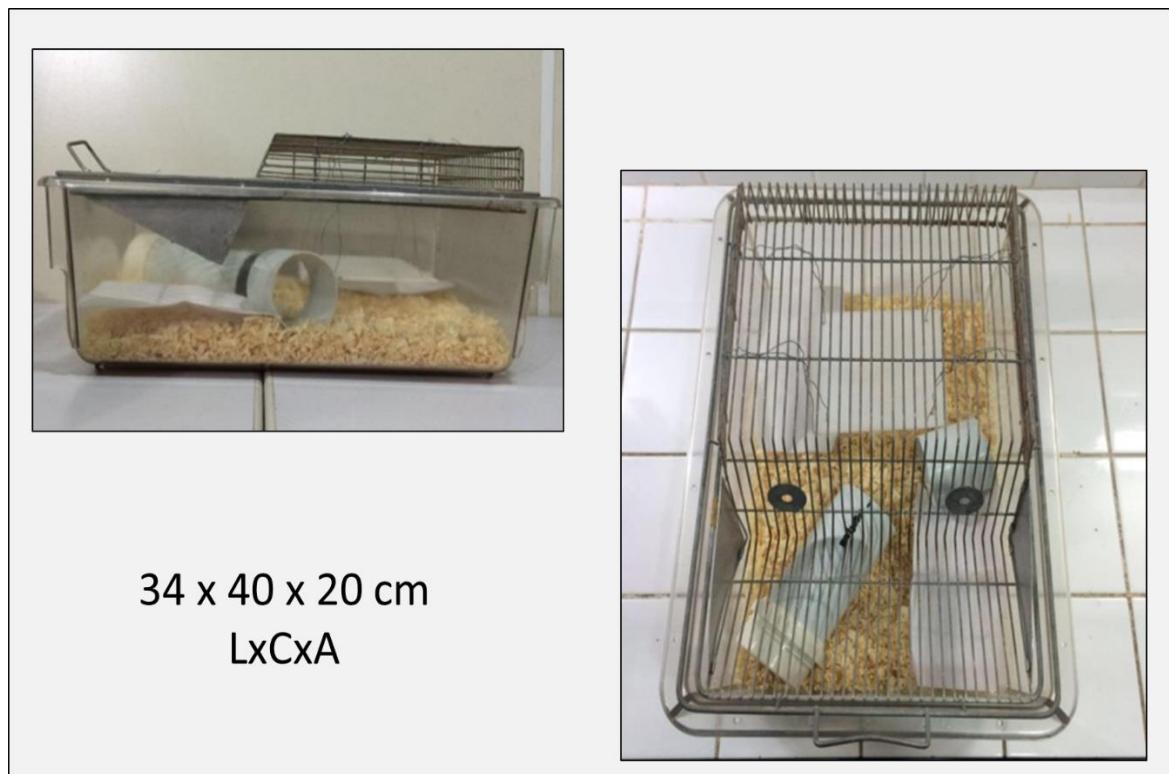


**Figura 7:** Ambiente padrão, vista lateral (imagem superior, à esquerda) e superior (imagem inferior, à direita). A caixa das imagens é de material em policarbonato transparente para possibilitar visualização da área interna.

### 3.2.2 Ambiente enriquecido

O ambiente enriquecido utilizado neste estudo foi o mesmo realizado por Silva-Almeida et al, (2024), que tem como objetivo proporcionar um ambiente enriquecido controlado, com baixo grau de instabilidade, evitando a hiperestimulação que poderia causar estresse durante o período perinatal (SILVA-ALMEIDA et al., 2024). O ambiente era composto por uma caixa de polipropileno branco opaco, medindo 34,0 x 40,0 x 20,0 cm (largura x comprimento x altura) e uma tampa metálica com uma parte 4,5 cm mais elevada que a altura máxima da caixa. Desta maneira, o volume total do ambiente enriquecido foi de 26244 cm<sup>3</sup> sem descontar o volume ocupado pela maravalha ou outros componentes de enriquecimento. Além do enriquecimento espacial, o ambiente continha os seguintes objetos: túneis circulares de PVC de 7,0 x 7,0 cm (comprimento x diâmetro), túneis semi-circulares de 5,5 x 3,5 cm (comprimento x raio), e tocas de PVC 16,0 x 7,0 cm (comprimento x diâmetro). O ambiente também possuía uma plataforma de acrílico opaco branco de 15,5 x 13,5 cm (largura x comprimento), suspensa por fios de arame e presa a parte mais alta da tampa, ficando suspensa a 3 cm do nível da maravalha. Também

eram fornecidos aos animais, a cada troca e higienização das caixas, dois pedaços de papel toalha com aproximadamente 10 x 45 cm (largura x comprimento) (Figura 8).



**Figura 8:** Ambiente enriquecido, vista lateral (à esquerda) e superior (à direita). A caixa das imagens é de material em policarbonato transparente para visualização para possibilitar visualização da área interna.

### 3.3 Testes comportamentais

Todos os testes comportamentais foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento – UFRRJ, durante a primeira metade da fase escura, período de maior atividade dessa espécie. Após cada ensaio comportamental, o aparato utilizado foi higienizado com álcool a 10% para evitar pistas olfatórias para o animal seguinte. No teste de interação social realizado na fase da adolescência, para cada dupla de animais, a caixa e a maravalha eram substituídas por uma caixa limpa e higienizada com álcool 10% com maravalha limpa.

Os testes foram filmados e gravados para posterior análise, que foi realizada manualmente por um avaliador cego para o grupo experimental.

#### 3.3.1 Teste de interação e brincadeira social

O teste para a avaliação da interação social e dos comportamentos de brincadeira para camundongos antes de atingirem a idade adulta foi descrito primeiramente por Terranova e Laviola, (1995). Neste teste, os comportamentos sociais e não sociais são classificados de

acordo com o perfil etológico comportamental de camundongos durante o início e o final da adolescência (~21 a ~45 dias pós natal) (LIVIA TERRANOVA; LAVIOLA, 1995). No presente trabalho, o protocolo e a análise dos comportamentos sociais foram adaptados de acordo com o protocolo proposto por Terranova e Laviola, 2005 (TERRANOVA; LAVIOLA, 2005). Avaliamos o tempo de duração dos comportamentos sociais (ver descrição abaixo) e agrupamos os elementos por categoria para análise estatística.

Categorias de comportamentos:

A. Elementos investigativos

1. Cheirar social: um dos animais ou ambos cheiram o parceiro;
2. Perseguir: um dos animais persegue o parceiro;
3. Círculo mútuo: os parceiros cheiram mutuamente a região anogenital um do outro reciprocamente, seguindo um ao outro em círculos.

B. Comportamentos afiliativos

1. *Grooming* social: um dos animais realiza *grooming* no parceiro;
2. Inatividade social: os animais permanecem parados, deitados ou de pé, mantendo contato físico próximo entre eles;
3. Empurrar por baixo: um dos animais empurra o próprio focinho ou toda a parte anterior do corpo sob o corpo do parceiro.

C. Itens de solicitação de brincadeira

1. Passar empurrando: um dos animais passa entre a parede da gaiola e o corpo do parceiro empurrando seu próprio corpo através do espaço estreito;
- 2-3. Rastejar por baixo/por cima: O animal focal rasteja por baixo ou por cima do corpo do parceiro, cruzando-o transversalmente de um lado para o outro.

Devido a alguns dos comportamentos serem recíprocos, as duplas foram avaliadas como uma única unidade experimental. Estas eram constituídas por animais não familiares, de mesmo sexo, idade (entre 30 e 35 dias de vida) e tratamento, não ultrapassando a diferença de 10 gramas entre os indivíduos.

A ambientação e o teste aconteceram na primeira metade do ciclo escuro por ser um período de maior atividade dessa espécie. Para ambientação à caixa e à sala experimental, um dia antes do teste, os animais foram colocados individualmente em caixas de policarbonato transparente (33,0 x 18,0 x 14,0 cm – largura x comprimento x altura) com cerca de 2 cm de maravalha, durante 30 minutos. No momento do teste, as duplas foram colocadas em caixas

idênticas às utilizadas durante a ambientação e o comportamento das duplas foi filmado e gravado durante o período de 10 minutos para posterior análise (Figura 9).



**Figura 9:** Teste de interação social durante a adolescência

### **3.3.2 Teste de sociabilidade e preferência pela novidade social**

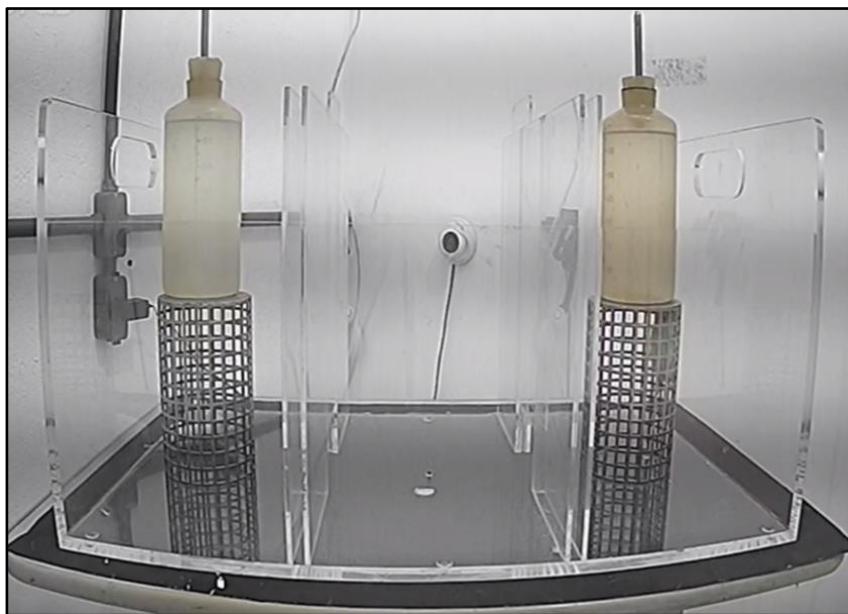
Para avaliarmos a sociabilidade e a preferência pela novidade social de animais adultos utilizamos o aparato de três câmaras descrito inicialmente por Crawley, 2004 e Moy et al., 2004 (CRAWLEY, 2004; MOY et al., 2004). Apesar desse teste ter sido proposto inicialmente para estudo de modelos animais de autismo, pesquisas mais recentes o tem utilizado para investigação de alterações no comportamento social mediante a outras manipulações experimentais, como por exemplo na avaliação de modelos de dor e de substâncias neurotóxicas (KHOSRAVI; KHALILZADEH; VAFAEI SAIAH, 2021; LIU et al., 2022).

O teste é realizado em um aparato retangular (20,0 x 44,0 x 35,0 cm - comprimento x largura x altura), confeccionado em acrílico transparente composto por três câmaras divididas em igual tamanho. As paredes que dividem essas câmaras possuem uma abertura retangular (10,0 cm largura x 6,5 cm altura) permitindo o livre trânsito do animal entre elas. Uma gaiola redonda de arame (11,0 x 10,5 cm – altura x diâmetro, e barras espaçadas de 1 cm) é colocada em cada câmara lateral do aparato (Figura 10).

O teste é composto por três etapas: habituação, sessão 1 e sessão 2. Para habituação, o animal teste foi colocado primeiramente na câmara central sendo permitido explorar todo aparato durante 05 minutos. Na sessão 1, um animal co-específico, não familiar, mesmo sexo e idade (estranho 1), foi colocado em um dos compartimentos laterais sendo contido pela gaiola

de arame. Essa gaiola dificulta a luta mas permite contato visual, auditivo, olfatório e tátil. Na outra câmara lateral, é mantida uma gaiola vazia, servindo como controle para exploração do objeto e do ambiente. A localização do estranho 1 era alternada em esquerda/direita entre as sessões. Durante 10 minutos, foram avaliados o tempo de interação com o estranho 1, assim como o tempo de permanência na área central, o número de *rearing* e o tempo de autolimpeza. Na sessão 2 foi inserido um novo animal co-específico, não familiar, mesmo sexo e idade (estranho 2), também contido por uma gaiola circular na câmara oposta, anteriormente vazia. O animal experimental então foi avaliado durante o período de 10 minutos, observando-se tempo de interação com o estranho 2 (novidade social), tempo de permanência na área central, o número de *rearing* e o tempo de autolimpeza. O experimento foi realizado sob 450 lux (KAIDANOVICH-BEILIN et al., 2011).

Para a análise estatística do tempo de interação com o estranho 1 (sessão 1) e com o estranho 2 (sessão 2), o tempo de interação foi transformado em índice de preferência social definido por  $\frac{\text{Tempo IE1}}{\text{Tempo IE1} + \text{Tempo IGV}} \times 100$  (sessão 1), e  $\frac{\text{Tempo IE2}}{\text{Tempo IE2} + \text{Tempo IE1}} \times 100$  (sessão 2), sendo IE1: interação com estranho 1, IE2: interação com estranho 2, IGV: interação com a gaiola vazia (NYGAARD; MALONEY; DOUGHERTY, 2019).



**Figura 10:** Aparato utilizado no teste de sociabilidade e preferência pela novidade social

### 3.3.3 Teste do labirinto em cruz elevado

O uso do LCE como modelo para avaliação da ansiedade foi inicialmente proposto por Pellow et al. (1985) em ratos e posteriormente validado para camundongos por Lister (1987) (LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985). Este teste é baseado na aversão dos roedores a

ambientes abertos *versus* a tendência de explorar novos ambientes. Como principais parâmetros indicadores de ansiedade, utiliza-se a avaliação do tempo de permanência nos braços abertos (relativo ao tempo total de permanência nos dois braços), o número de entradas nos braços abertos (relativo ao total de entradas nos dois braços) e o número de avaliações de risco (RODGERS' AND et al., 1995). O aparato é composto por dois braços abertos opostos medindo 5,0 x 30,0 cm cada (largura x comprimento) e dois braços fechados (5,0 x 30,0 x 25,0 cm cada – largura x comprimento x altura) também opostos, e uma plataforma central interligando estes braços (5,0 cm<sup>2</sup>), confeccionado em acrílico opaco e fica suspenso a uma altura de 45 cm do chão (Figura 11). Nesse teste, os braços abertos e fechados ficaram sob lux de 200±10 e 20±2, respectivamente. O teste se iniciava quando o animal era colocado na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados e a avaliação era realizada durante 5 minutos.

Os parâmetros comportamentais avaliados no teste do labirinto em cruz elevado foram: a porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas nos dois tipos de braços, a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total despendido nos dois tipos de braços e o número de comportamentos de avaliação de risco. Também foi analisado o número total de entradas nos braços fechados para se avaliar a atividade locomotora dos animais (RODGERS' AND et al., 1995).



**Figura 11:** Teste do labirinto em cruz elevado

### 3.3.4 Teste da caixa claro-escuro

Este teste é baseado no modelo proposto por Crawley e Godwin em 1980 com camundongos, utilizado para avaliar comportamentos exploratórios e ansiosos (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). O paradigma envolve a exposição do animal a um ambiente composto por dois compartimentos, um com alta luminosidade e outro escuro. Neste teste, podemos avaliar o comportamento exploratório e/ou ansioso. O comportamento exploratório é caracterizado pela capacidade do animal de transitar livremente no novo ambiente e explorar os diferentes compartimentos. Neste teste, aumento de transições entre os dois ambientes e aumento da movimentação compartimento claro indicam maior atividade exploratória. Enquanto o comportamento ansioso é evidenciado principalmente por uma relutância em explorar a área clara, e menor tempo de permanência neste compartimento (BOURIN; HASCOËT, 2003; CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997).

O lado claro do aparato consiste em um campo aberto de piso e paredes brancas (26,5 cm x 26,0 cm x 20,0 cm – largura x comprimento x altura) com uma abertura em uma das paredes que se conecta ao compartimento escuro. O compartimento claro fica submetido a uma fonte de luz mantendo  $400 \pm 10$  lux. O compartimento escuro possui paredes e tampa pretas nas medidas 26,5 x 17,5 x 20,0 cm (largura x comprimento x altura) com iluminação em no máximo 4 lux (Figura 12) (BOURIN; 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, R. e Shepherd, J., 1993; Sztainberg, Y *et al.*, 2010). Os parâmetros avaliados foram: tempo de permanência e número de cruzamentos na área clara, tempo de latência para entrar na área clara, tempo de latência para o retorno à área escura, número de cruzamentos entre os dois ambientes e número de avaliações de risco (BOURIN; HASCOËT, 2003; CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997).



**Figura 12:** Teste da caixa claro-escuro

### 3.4 Eutanásia, coleta e processamentos dos encéfalos

No dia seguinte ao último experimento comportamental, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta dos encéfalos. Após anestesia profunda com sobredose de tiopental sódico (200mg/kg, i.p.), os animais foram submetidos a perfusão transcardíaca com salina heparinizada seguida de solução de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato salino (PBS – do inglês *phosphate saline buffer*) 0,01M pH 7,2. Os encéfalos foram coletados e permaneceram em *overnight* sob solução de PFA 4% para fixação. Após este período, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose 30% em PBS 0,01M para desidratação do tecido, permanecendo armazenados sob refrigeração (4 °C) para posterior análise por imunofluorescência. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento - UFRRJ.

Os encéfalos foram cortados em criostato (Leica Biosystems CM1520) (-20°C) em secções coronais de 30 µm de espessura. Os cortes contendo a região do PVN (bregma -0,70 mm ao -1,22 mm), identificada com o auxílio do atlas Franklin & Paxinos (2019) (PAXINOS; FRANKLIN, 2019), foram divididos em triplicatas e acondicionados em *eppendorfs*, contendo solução anticongelante composta de etilenoglicol, glicerol e PBS 0,1M pH 7,2, e estocados a -20°C até a sua utilização. A realização dos cortes foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia Molecular da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

### 3.5 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para avaliar parâmetros morfométricos do soma e dos respectivos núcleos de neurônios ocitocinérgicos e vasopresinérgicos presentes no PVN. Para a marcação dupla, os cortes foram primeiramente lavados em PBS 0,01M (três lavagens de 5 minutos cada) sendo mantidos sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, ficaram sob agitação durante uma hora em solução de bloqueio (5% de soro normal de burro (NGS), 0,3% de Triton-X em PBS 0,1M). Depois, os cortes foram incubados com os anticorpos primários em solução de incubação (2% de NGS, 0,3% de Triton-X em PBS 0,1M), mantidos sob agitação a 4 °C em *overnight*. Após esse período, foram novamente lavados em PBS 0,01M e então incubados com os anticorpos secundários em solução de incubação durante uma hora, sob agitação em temperatura ambiente. Após a realização de mais três lavagens em PBS 0,01M, os cortes foram incubados com DAPI durante 20 minutos em temperatura ambiente. As lâminas montadas com os cortes, foram deixadas para secar durante 30 minutos e em seguida cobertas com o meio de montagem *Fluoromount*™ e seladas com lamínulas. Os anticorpos utilizados estão listados na tabela 2. A técnica de imunofluorescência foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia Molecular - Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

**Tabela 2.** Anticorpos utilizados para a marcação de imunofluorescência

Anticorpo	Marca	Código	Diluição
Guinea Pig anti (Arg8) -Vasopressin	Península Laboratories	T-5048	1:25000
Rabbit anti Oxytocin	Península Laboratories	T-4084	1:25000
Alexa Fluor® 488 AffiniPure™	Jackson ImmunoResearch	711-545-152	1:300
Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Laboratories		
Alexa Fluor® 594 AffiniPure™	Jackson ImmunoResearch	706-585-148	1:300
Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L)	Laboratories		

As imagens dos núcleos PVN contendo dupla marcação por imunofluorescência dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos foram fotografados no aumento de 10x e 40x usando um microscópio de fluorescência confocal (Zeiss Celldiscoverer 7) para posterior análise. A obtenção das imagens foi realizada na unidade de microscopia do Instituto de Ciências Biomédicas da - Universidade Federal do Rio de Janeiro. A análise das imagens foi realizada com o auxílio do *software* ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA). Foram analisados o tamanho do soma e os respectivos núcleos de 5-20 neurônios

imunorreativos a AVP e OT de cada animal ( $n = 4 - 6$  por grupo), avaliando-se os seguintes parâmetros: área ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) e intensidade óptica (unidade arbitrária – UA).

### 3.6 Análise estatística

Para a comparação de quatro grupos experimentais, os dados foram analisados através do ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey. Quando os dados não apresentavam distribuição normal conforme avaliado pelo teste de Shapiro-Wilk, era aplicada uma transformação em *rank* antes da análise do ANOVA. Essa transformação é uma abordagem estatística que substitui os valores brutos de cada observação por suas posições relativas (*ranks*) dentro do conjunto de dados, organizando-os em ordem crescente. Os resultados foram expressos graficamente em *box plots*, demonstrando a mediana, o intervalo interquartil (IQR), e os limites do *whisker* (menor e o maior valor dentro de 1,5 vezes o IQR). Para análise de correlação dos resultados obtidos foram realizadas regressão linear e correlação de Spearman. Os resultados foram considerados significativos quando os valores de  $p < 0,05$ . A análise dos dados foi realizada com o auxílio do *software* GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 4 RESULTADOS

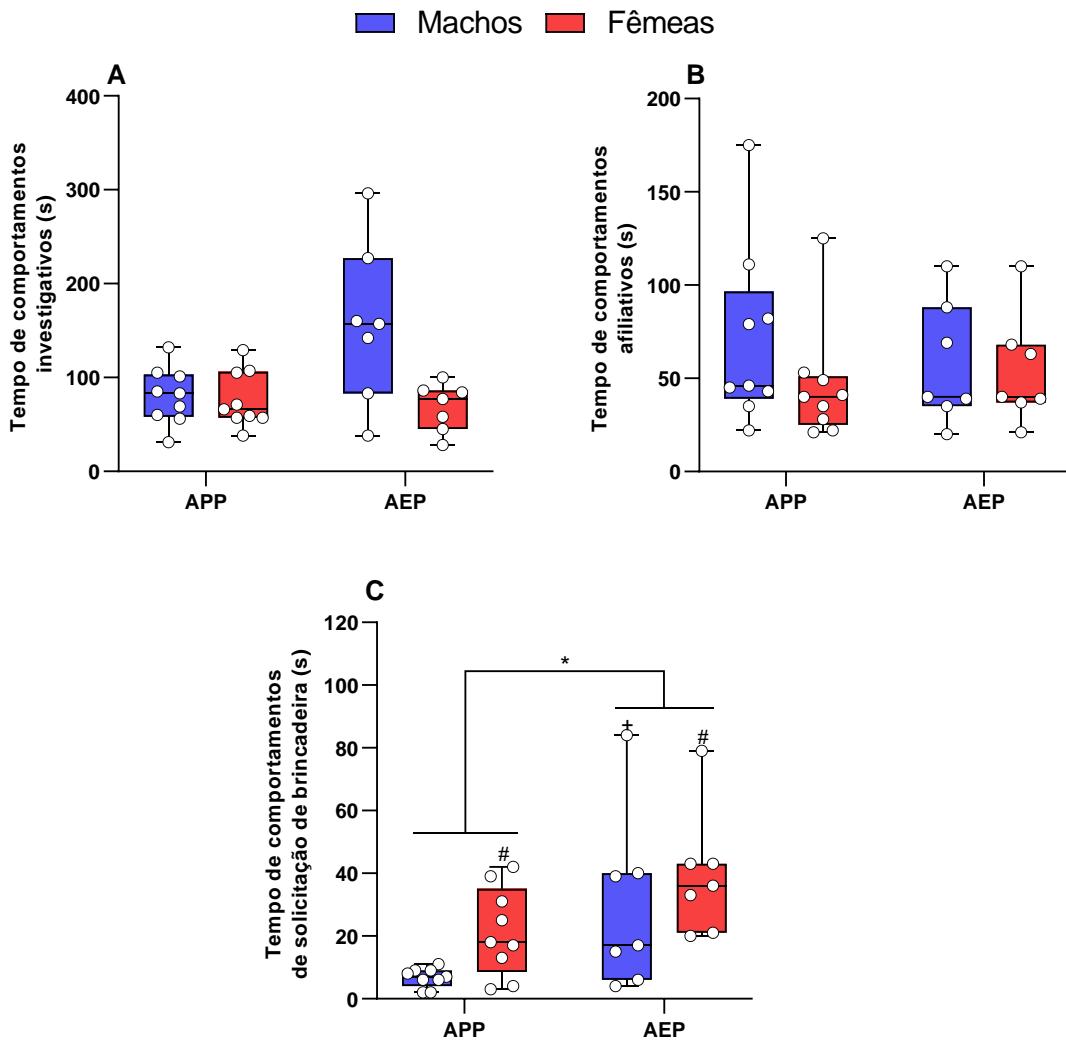
### 4.1 Testes comportamentais

#### 4.1.1 Adolescentes

##### 4.1.1.1 Teste de interação e brincadeira social

No TIBS realizado no período da adolescência, a ANOVA de duas vias não identificou diferença estatística entre os grupos no tempo de comportamento investigativo (Interação ambiente  $\times$  sexo:  $F_{1,28} = 2,74, p = 0,10$ , fator ambiente  $F_{1,28} = 1,29, p = 0,26$ ; fator sexo:  $F_{1,28} = 4,19, p = 0,05$ ) (Figura 13A). Assim como também não houve diferença estatística no comportamento afiliativo (Interação ambiente  $\times$  sexo:  $F_{1,28} = 0,76, p = 0,39$ , fator ambiente  $F_{1,28} = 0,04, p = 0,83$ ; fator sexo:  $F_{1,28} = 0,95, p = 0,33$ ) (Figura 13B). No tempo de comportamento de solicitação de brincadeira, o fator ambiente demonstrou haver significância ( $F_{1,28} = 12,23, p = 0,0016$ ), onde os animais enriquecidos demonstraram aumento desse comportamento. O fator sexo também apresentou diferença significativa sobre este parâmetro ( $F_{1,28} = 9,09, p = 0,005$ ), onde as fêmeas apresentaram aumento deste comportamento em relação aos machos. Não houve interação entre os fatores ( $F_{1,28} = 0,14, p = 0,70$ ). O pós-teste demonstrou que os machos APP ficavam menos tempo realizando comportamentos de solicitação de brincadeira que os machos AEP ( $p = 0,04$ ) e que as fêmeas AEP ( $p = 0,0004$ ) e não se diferenciavam das fêmeas APP ( $p = 0,07$ ) (Fig. 13C).

## TESTE DE INTERAÇÃO E BRINCADEIRA SOCIAL



**Figura 13:** Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste de interação social realizado em camundongos machos e fêmeas adolescentes. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey ( $n = 9 - 7$ ). Os valores de todos os gráficos foram transformados em *rank* antes do ANOVA. Box plot indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 7 - 9$ ). \* $p < 0,05$ : comparando os grupos AEP vs. grupos APP, # $p < 0,05$ : comparando aos grupos de machos, + $p < 0,05$ : comparando ao respectivo grupo controle.

### 4.1.1.2 Labirinto em cruz elevado

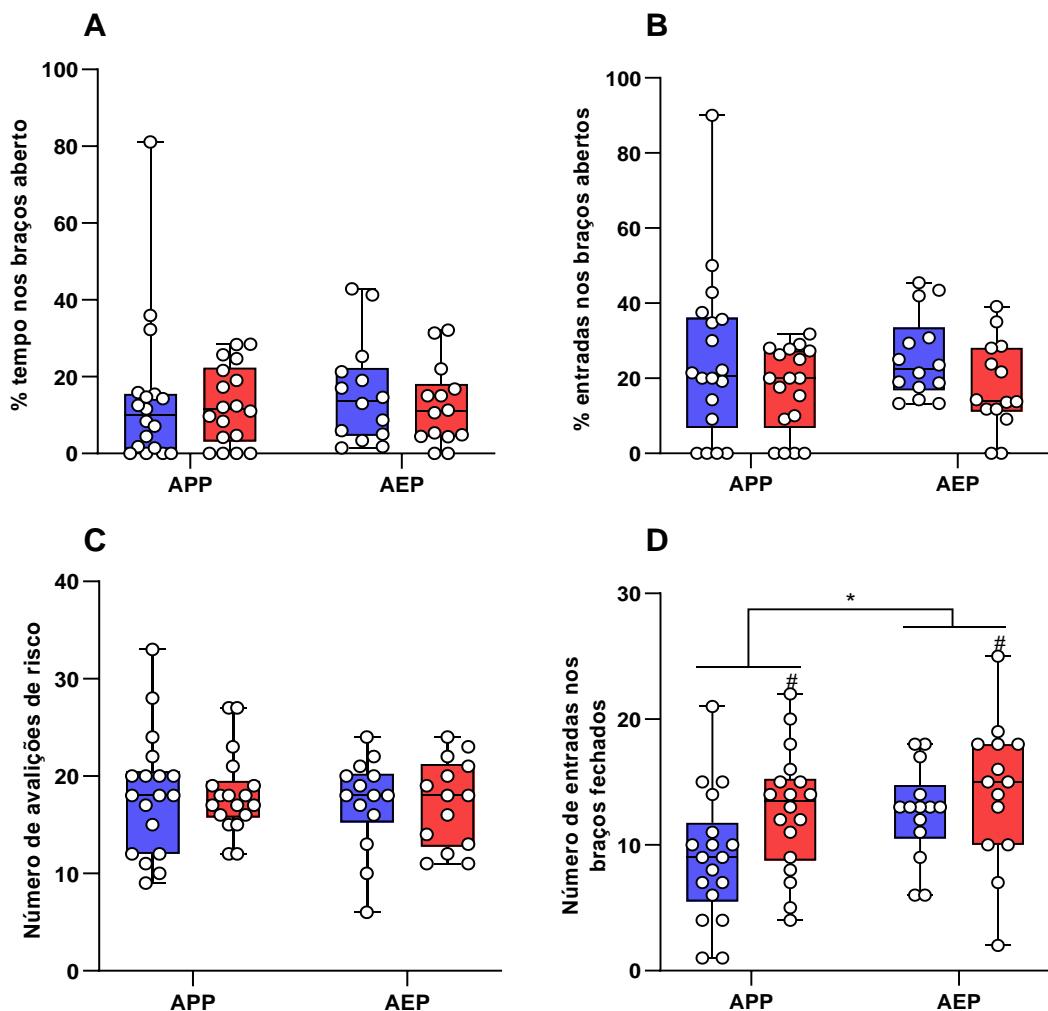
No teste do LCE realizado no período da adolescência, ANOVA de duas vias demonstrou não haver diferença significativa entre os grupos no tempo relativo de permanência nos braços abertos (Interação ambiente  $\times$  sexo:  $F_{1,60} = 0,55, p = 0,45$ , fator ambiente:  $F_{1,60} = 0,51, p = 0,47$  fator sexo:  $F_{1,60} = 0,05, p = 0,81$ ) (Figura 14A), assim como também não foi observada diferença significativa na frequência relativa de entradas nos braços abertos (Interação ambiente  $\times$  sexo:  $F_{1,60} = 0,15, p = 0,69$ , fator ambiente:  $F_{1,60} = 0,13, p = 0,71$ , fator

sexo:  $F_{1,60} = 2,95, p = 0,09$ ) (Figura 14B). Os grupos também não se diferenciaram no número de comportamentos de avaliação de risco (Interação ambiente  $\times$  sexo:  $F_{1,60} = 0,00, p > 0,99$ , fator ambiente  $F_{1,60} = 0,47, p = 0,49$ ; fator sexo:  $F_{1,60} = 0,00, p > 0,99$ ) (Figura 14C).

Por outro lado, o número de entradas nos braços fechados foi afetado significantemente pelo fator ambiente ( $F_{1,60} = 4,28, p = 0,04$ ), onde os camundongos enriquecidos apresentaram uma maior atividade locomotora do que os animais dos grupos APP. O fator sexo também influenciou neste comportamento ( $F_{1,60} = 4,80, p = 0,03$ ), sendo que as fêmeas entraram mais vezes nos braços fechados do que os machos. Neste parâmetro, não houve interação entre estes fatores ( $F_{1,60} = 0,65, p = 0,42$ ) (Figura 14D).

## LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

■ Machos ■ Fêmeas



**Figura 14:** Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste do labirinto em cruz elevado realizado em camundongos machos e fêmeas adolescentes. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. Os valores dos gráficos A e B foram transformados em *rank* antes do ANOVA. *Box plot* indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 14 - 18$ )

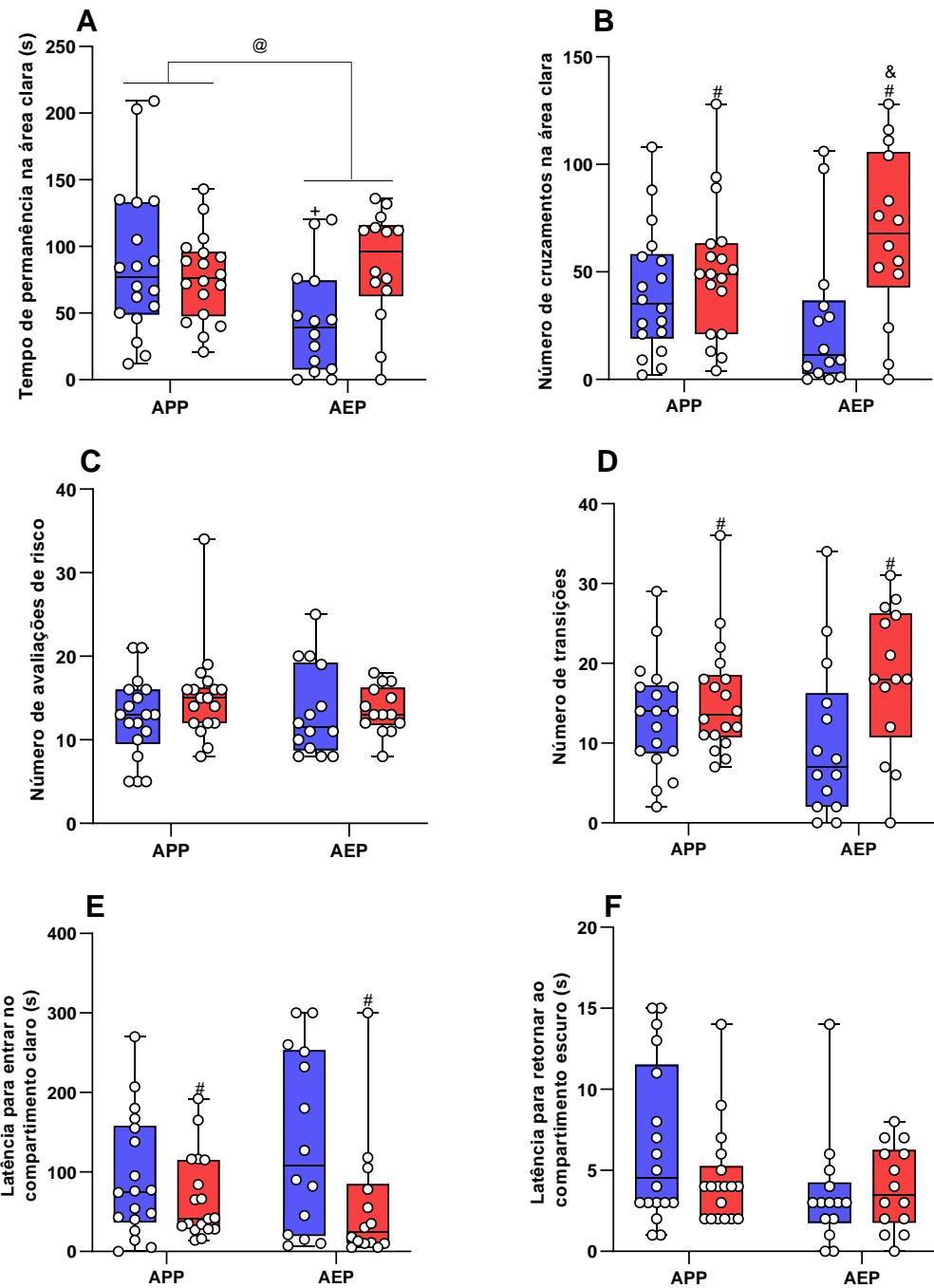
\* $p < 0,05$ : comparando os grupos AEP vs. grupos APP, # $p < 0,05$ : comparando aos grupos de machos.

#### 4.1.1.3 Caixa claro-escuro

No teste da CCE realizado no período da adolescência, o tempo de permanência no lado claro apresentou significativo efeito de interação entre os fatores ambiente e sexo ( $F_{1,60} = 5,79, p = 0,01$ ) e não houve diferença no fator ambiente: ( $F_{1,60} = 2,55, p = 0,11$ ) assim como não houve no fator sexo ( $F_{1,60} = 1,96, p = 0,16$ ). O pós-teste de Tukey indicou que os machos AEP permaneceram menos tempo no compartimento claro da caixa do que os machos APP ( $p = 0,03$ ), enquanto entre os outros grupos, não houve diferença significativa (Figura 15A). O número de cruzamentos na área clara foi afetado pelo fator sexo ( $F_{1,60} = 9,77, p = 0,002$ ), onde as fêmeas de ambos os grupos percorreram mais quadrantes quando comparadas aos grupos de machos. Contudo, o pós-teste demonstrou diferença significativa apenas entre as fêmeas AEP e os machos AEP ( $p = 0,007$ ). Esse parâmetro não foi alterado pelo fator ambiente ( $F_{1,60} = 0,08, p = 0,76$ ), assim como não houve interação entre os fatores ( $F_{1,60} = 3,62, p = 0,06$ ) (Figura 15B). Em relação ao número de avaliações de risco, não foram observadas diferenças significativas neste parâmetro (ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,60} = 0,18, p = 0,66$ , fator ambiente  $F_{1,60} = 0,26, p = 0,60$ , fator sexo:  $F_{1,60} = 1,76, p = 0,18$ ) (Figura 15C). Na análise do número de transições entre os dois ambientes, foi observada diferença significativa em relação ao fator sexo ( $F_{1,60} = 5,83, p = 0,01$ ), onde as fêmeas de ambos os grupos fizeram mais transições do que os machos. O fator ambiental não alterou esse parâmetro ( $F_{1,60} = 0,01, p = 0,89$ ) e não houve interação entre os dois fatores ( $F_{1,60} = 1,96, p = 0,16$ ) (Figura 15D). Na análise do tempo de latência para entrada no compartimento claro da caixa, foi observada diferença significativa no fator sexo ( $F_{1,60} = 4,99, p = 0,02$ ), onde as fêmeas de ambos os grupos demoravam menos tempo para entrar neste compartimento. Não houve significância no fator ambiental ( $F_{1,60} = 0,11, p = 0,73$ ), assim como não houve interação entre os dois fatores ( $F_{1,60} = 1,98, p = 0,16$ ) (Figura 15E). No tempo de latência para escapada (retorno) para o compartimento escuro da caixa, não foi identificada nenhuma diferença significativa estatisticamente (ambiente *x* sexo:  $F_{1,60} = 1,42, p = 0,23$ , fator ambiente  $F_{1,60} = 2,80, p = 0,09$ , fator sexo:  $F_{1,60} = 0,002, p = 0,95$ ) (Figura 15F).

## CAIXA CLARO-ESCURO

■ Machos ■ Fêmeas



**Figura 15:** Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste da caixa claro-escuro realizado em camundongos machos e fêmeas adolescentes. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. Os valores dos gráficos B, C, E e F foram transformados em *rank* antes do ANOVA. *Box plot* indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 14 - 18$ ). @ $p < 0,05$ : interação entre os fatores ambiente e sexo, # $p < 0,05$ : comparando aos grupos de machos, + $p < 0,05$ : comparando ao respectivo grupo controle, & $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo de machos.

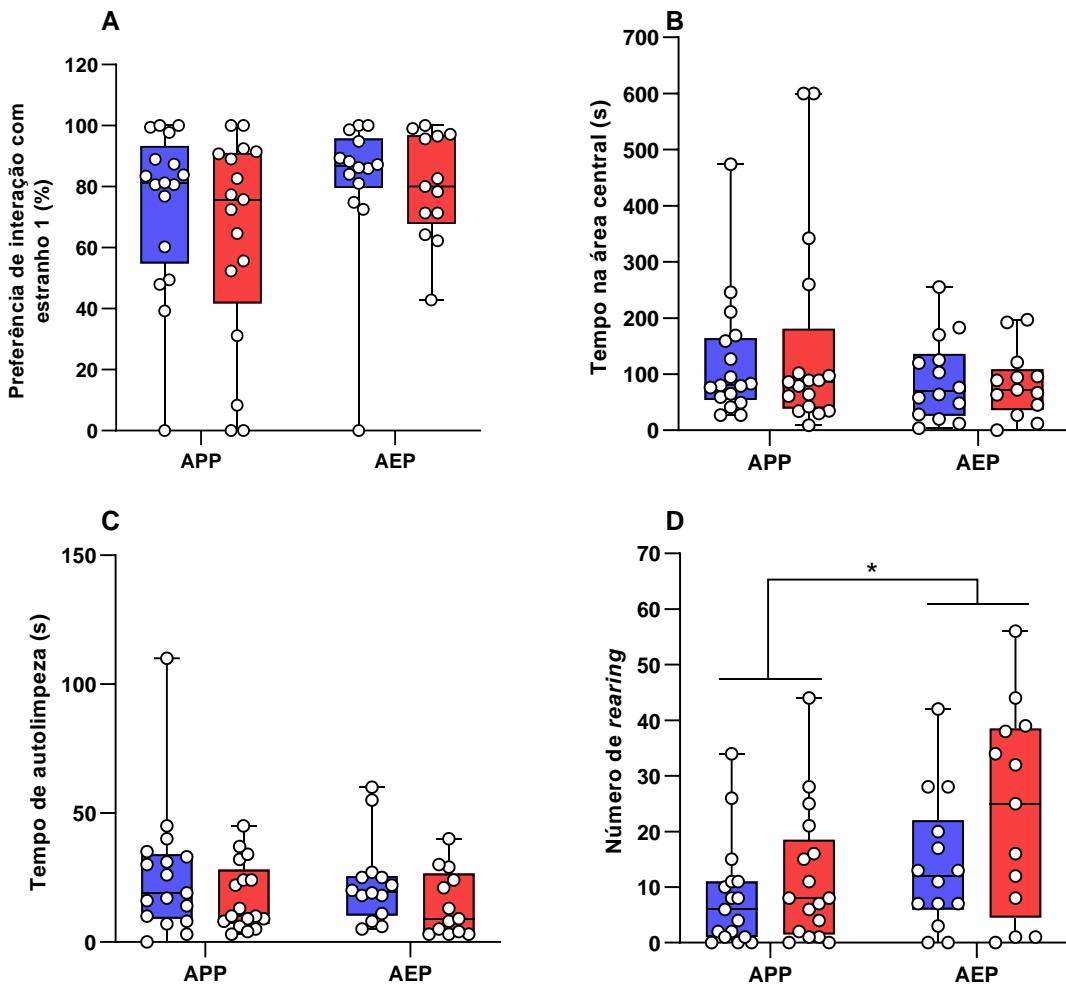
## 4.1.2 Adultos

### 4.1.2.1 Teste de Sociabilidade e preferência pela novidade social

Na sessão 1 do teste de IS, não houve diferenças significativas entre os grupos no índice do tempo de interação com o estranho 1 (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,57} = 0,007, p = 0,93$ , fator ambiente:  $F_{1,57} = 1,74, p = 0,19$ , fator sexo:  $F_{1,57} = 1,06, p = 0,30$ ) (Figura 16A). No tempo de permanência na área central, também não foram encontradas diferenças significativas (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,57} = 0,003, p = 0,95$ , fator ambiente:  $F_{1,57} = 0,94, p = 0,33$ , fator sexo:  $F_{1,57} = 0,01, p = 0,90$ ) (Figura 16B), assim como não houve no tempo de autolimpeza (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,57} = 0,18, p = 0,66$ , fator ambiente:  $F_{1,57} = 0,34, p = 0,55$ , fator sexo:  $F_{1,57} = 3,11, p = 0,08$ ) (Figura 16C). Contudo, a análise mostrou diferença significativa no número de *rearing* referente ao fator ambiente ( $F_{1,57} = 5,10, p = 0,02$ ), onde os animais AEP realizaram maior número desse comportamento em comparação aos animais APP. O fator sexo não foi capaz de alterar este parâmetro ( $F_{1,57} = 1,88, p = 0,17$ ), assim como também não houve interação entre os fatores ( $F_{1,57} = 0,09, p = 0,76$ ) (Figura 16D).

## SOCIABILIDADE E PREFERÊNCIA PELA NOVIDADE SOCIAL - SESSÃO 1

■ Machos ■ Fêmeas

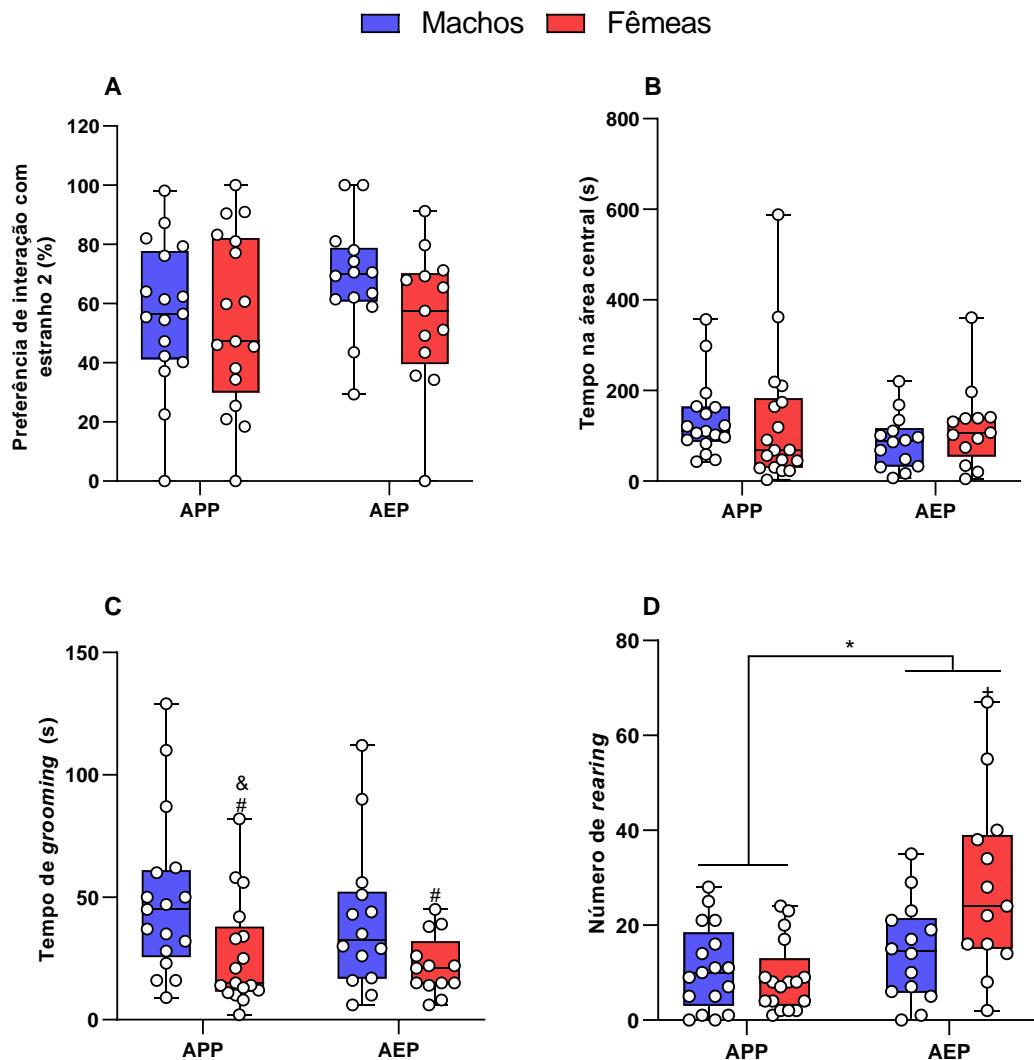


**Figura 16.** Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste de sociabilidade e preferência pela novidade social, sessão 1, realizado em camundongos machos e fêmeas adultos. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. Os valores dos gráficos B, C e D foram transformados em rank antes do ANOVA. *Box plot* indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 14 - 17$ ). \* $p < 0,05$ : comparando os grupos AEP vs. grupos APP.

Na sessão 2 do teste de IS, ANOVA de duas vias demonstrou não haver diferenças significativas entre os grupos no índice do tempo de interação com o estranho 2 (Interação ambiente vs. sexo:  $F_{1,57} = 0,73, p = 0,39$ , fator ambiente:  $F_{1,57} = 1,02, p = 0,31$ , fator sexo:  $F_{1,57} = 1,66, p = 0,20$ ) (Figura 17A). Também não houve diferenças significativas entre os grupos no tempo de permanência na área central do aparato (Interação ambiente vs. sexo:  $F_{1,57} = 2,12, p = 0,15$ , fator ambiente:  $F_{1,57} = 0,82, p = 0,36$ , fator sexo:  $F_{1,57} = 0,002, p = 0,95$ ) (Figura 17B). No tempo de autolimpeza, a análise demonstrou haver diferença significativa no fator sexo ( $F_{1,57} =$

11,16,  $p = 0,001$ ), sendo que os machos realizaram maior tempo de autolimpeza que as fêmeas. O fator ambiente não apresentou diferença estatística significante ( $F_{1,57} = 0,60, p = 0,43$ ), e não houve interação entre os fatores ( $F_{1,57} = 0,27, p = 0,60$ ). O pós-teste de Tukey detectou maior tempo de autolimpeza dos machos APP em relação às fêmeas APP ( $p = 0,02$ ) e às fêmeas AEP ( $p = 0,02$ ), sem se diferenciarem dos machos AEP ( $p = 0,78$ ) (Figura 17C). No número de *rearing*, foi observada diferença significativa estatisticamente no fator ambiente ( $F_{1,57} = 10,49, p = 0,001$ ), onde os animais AEP realizaram um maior número desse comportamento. O fator sexo não apresentou diferença ( $F_{1,57} = 1,42, p = 0,23$ ), e não houve interação entre os fatores ( $F_{1,57} = 3,82, p = 0,05$ ). O pós-teste demonstrou que as fêmeas AEP realizaram mais *rearing* que os machos APP ( $p = 0,01$ ) e que as fêmeas APP ( $p = 0,003$ ), porém não se diferiram dos machos AEP ( $p = 0,21$ ) (Figura 17D).

## SOCIABILIDADE E PREFERÊNCIA PELA NOVIDADE SOCIAL - SESSÃO 2



**Figura 17.** Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste de sociabilidade e preferência pela novidade social, sessão 2, realizado em camundongos machos e fêmeas adultos. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. Os valores dos gráficos B, C e D foram transformados em *rank* antes do ANOVA. *Box plot* indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 14 - 17$ ). \* $p < 0,05$ : comparando os grupos AEP vs. grupos APP; # $p < 0,05$ : comparando aos grupos de machos; + $p < 0,05$ : comparando ao respectivo grupo controle; & $p < 0,05$  comparando ao respectivo grupo de machos.

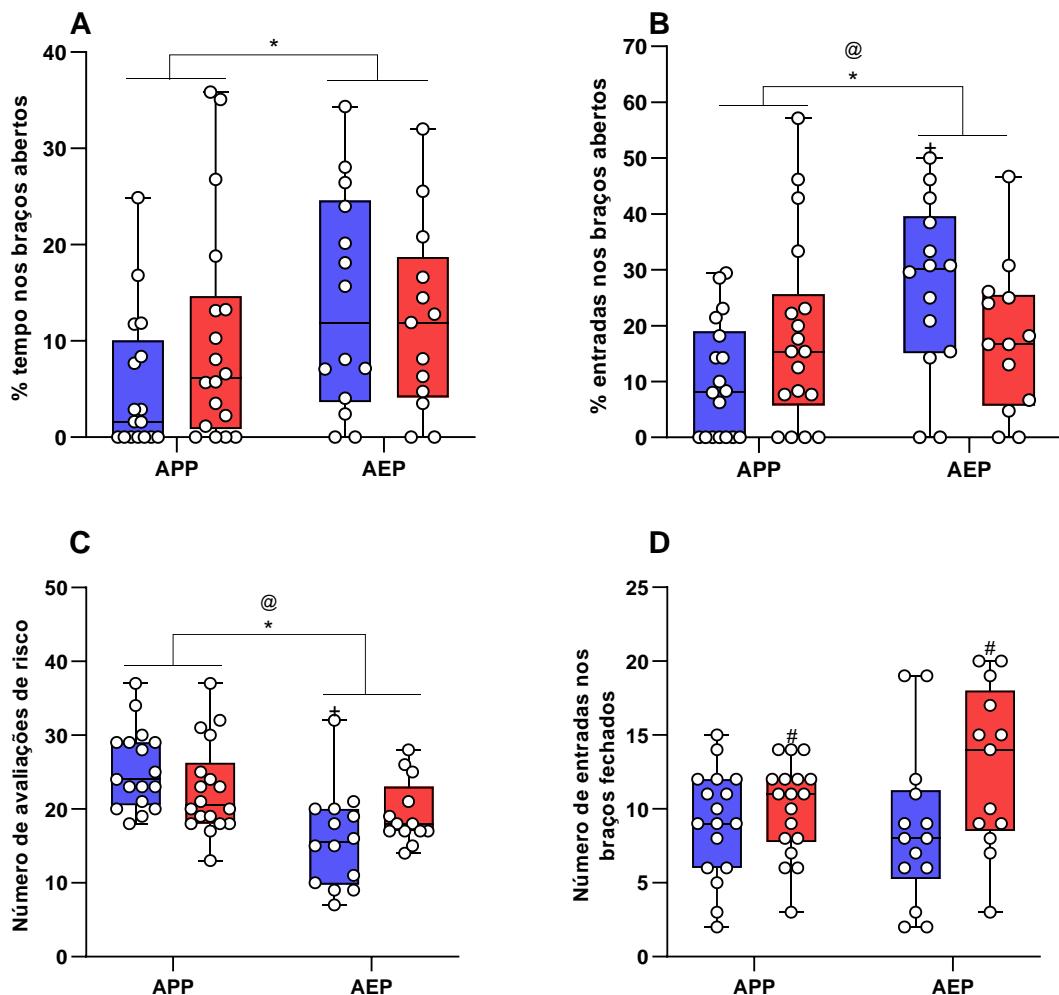
### 4.1.2.2 Labirinto em cruz elevado

No teste do LCE realizado durante a fase adulta, considerando-se o tempo relativo de permanência nos braços abertos, o ANOVA de duas vias demonstrou significante efeito do ambiente sobre esse parâmetro ( $F_{1,58} = 5,17, p = 0,02$ ), onde os animais AEP permaneceram mais tempo nessa região do que os animais APP. Esse parâmetro não foi afetado pelo fator sexo

( $F_{1,58} = 0,64, p = 0,42$ ) e não houve interação entre os dois fatores ( $F_{1,58} = 1,40, p = 0,24$ ) (Figura 18A). Na análise da frequência relativa de entradas nos braços abertos foi identificada uma interação significativa entre os fatores ambiente e sexo ( $F_{1,58} = 5,78, p = 0,01$ ). Também foi observada diferença significativa no fator ambiente ( $F_{1,58} = 5,64, p = 0,02$ ) e o fator sexo não foi capaz de alterar esse parâmetro ( $F_{1,58} = 0,01, p = 0,91$ ). A análise do pós- teste demonstrou que os machos AEP tiveram uma maior porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparados aos machos APP ( $p = 0,005$ ) (Figura 18B). No número de avaliações de risco, também houve interação entre os fatores ambiente e sexo ( $F_{1,58} = 4,52, p = 0,03$ ). O fator ambiente também apresentou diferença significativa ( $F_{1,58} = 18,94, p < 0,0001$ ), onde os animais AEP realizaram menos esse tipo de comportamento em relação aos animais do grupo APP. O fator sexo não apresentou significância estatística ( $F_{1,58} = 0,07, p = 0,79$ ). No pós-teste observou-se que os machos AEP realizaram menos comportamentos de avaliação de risco que os machos APP ( $p < 0,0001$ ) e que as fêmeas APP ( $p < 0,01$ ) (figura 18C). No número de entradas nos braços fechados, não houve interação entre os fatores ( $F_{1,58} = 2,01, p = 0,16$ ) e não houve diferença significativa no fator ambiente ( $F_{1,58} = 1,09, p = 0,29$ ). Contudo, o fator sexo foi capaz de alterar este parâmetro ( $F_{1,58} = 5,09, p = 0,02$ ), sendo que as fêmeas realizaram mais entradas nos braços fechados do que os machos (Figura 18D).

## LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

■ Machos ■ Fêmeas



**Figura 18.** Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste do labirinto em cruz elevado realizado em camundongos machos e fêmeas adultos. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. Os valores dos gráficos A e B foram transformados em *rank* antes do ANOVA. Box plot indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 13 - 18$ ) @ $p < 0,05$ : interação entre os fatores ambiente e sexo, \* $p < 0,05$ : comparando os grupos AEP vs. grupos APP, # $p < 0,05$ : comparando aos grupos de machos, + $p < 0,05$ : comparando ao respectivo grupo controle.

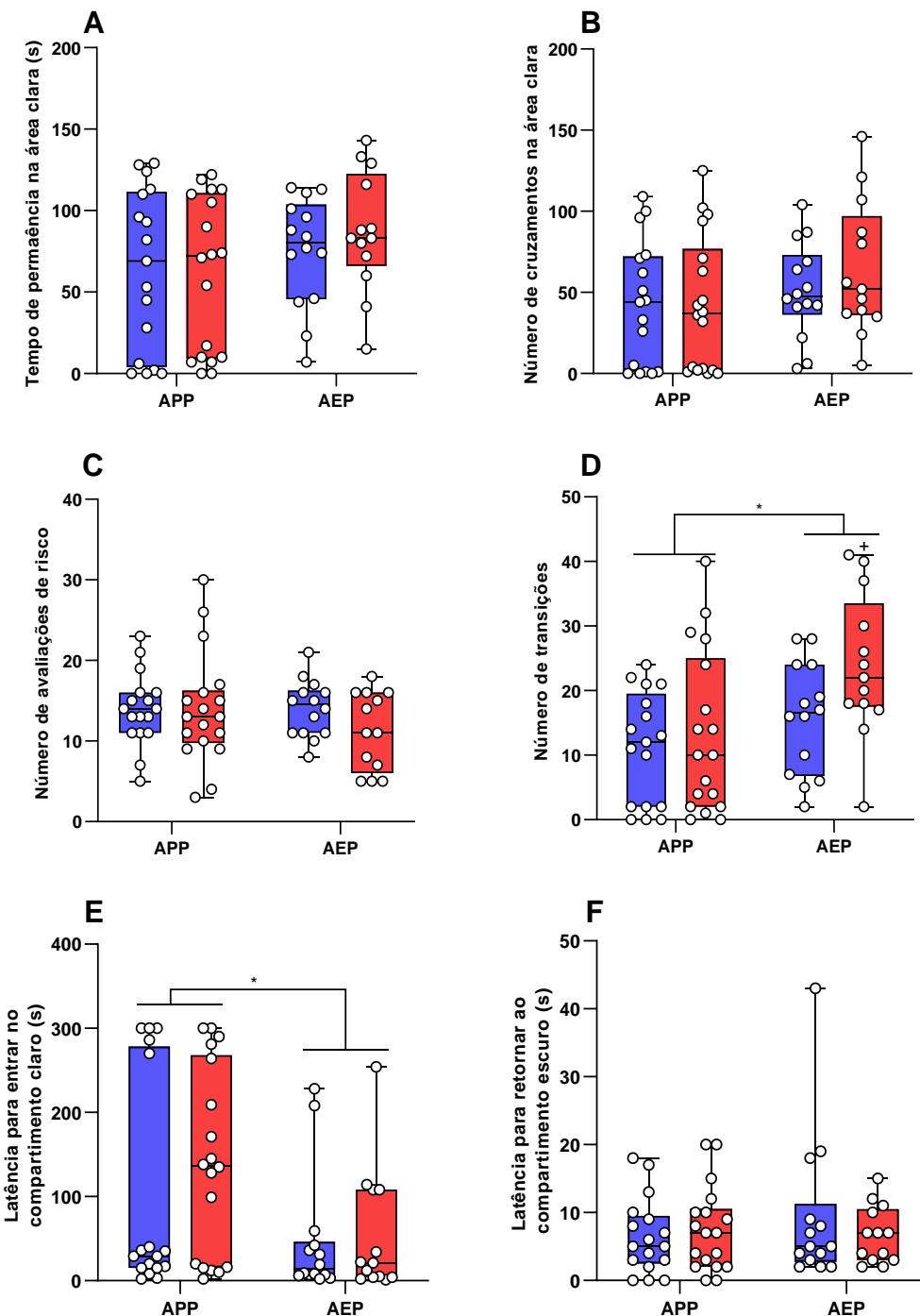
### 4.1.2.3 Caixa claro-escuro

No teste da CCE realizado durante a fase adulta, na análise do tempo de permanência no compartimento claro, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Interação ambiente vs. sexo:  $F_{1,58} = 0,35, p = 0,55$ , fator ambiente:  $F_{1,58} = 2,22, p = 0,14$ , fator sexo:  $F_{1,58} = 0,22, p = 0,63$ ) (Figura 19A). Assim como não houve diferenças significativas entre os grupos no número de cruzamentos na área clara (Interação ambiente vs. sexo:  $F_{1,58} =$

0,20,  $p = 0,64$ , fator ambiente:  $F_{1,58} = 3,38, p = 0,07$ , fator sexo:  $F_{1,58} = 0,10, p = 0,74$ ) (Figura 19B). No número de avaliações de risco, também não foram observadas diferenças significativas (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,58} = 1,01, p = 0,31$ , fator ambiente:  $F_{1,58} = 0,93, p = 0,33$ , fator sexo:  $F_{1,58} = 1,01, p = 0,31$ ) (Figura 19C). Analisando o número de transições entre os dois ambientes, foi observada diferença significativa no fator ambiente ( $F_{1,58} = 9,19, p = 0,003$ ), onde animais AEP realizaram mais transições que os animais APP. Este parâmetro não foi alterado pelo fator sexo ( $F_{1,58} = 2,55, p = 0,11$ ) e não houve interação entre os fatores (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,58} = 0,89, p = 0,34$ ). O pós-teste de Tukey demonstrou que as fêmeas AEP realizaram mais transições do que os machos APP ( $p = 0,01$ ) e do que as fêmeas APP ( $p = 0,03$ ) mas não se diferenciaram dos machos AEP ( $p = 0,33$ ) (Figura 19D). Na latência para entrada no compartimento claro da caixa, houve diferença significativa no fator ambiente ( $F_{1,58} = 7,56, p = 0,007$ ), onde os animais AEP demoraram menos tempo para entrar nesta área do que os animais do grupo APP. Não houve significância no fator sexo ( $F_{1,58} = 0,40, p = 0,52$ ), assim como não houve interação entre os dois fatores ( $F_{1,58} = 0,48, p = 0,48$ ) (Fig. 19E). No tempo de latência para escapada (retorno) para a área escura da caixa não foram identificadas diferenças significativas (Interação ambiente *x* sexo:  $F_{1,58} = 0,11, p = 0,73$ , fator ambiental:  $F_{1,58} = 0,06, p = 0,79$ , fator sexo:  $F_{1,58} = 0,04, p = 0,82$ ) (Figura 19F).

## CAIXA CLARO-ESCURO

■ Machos ■ Fêmeas



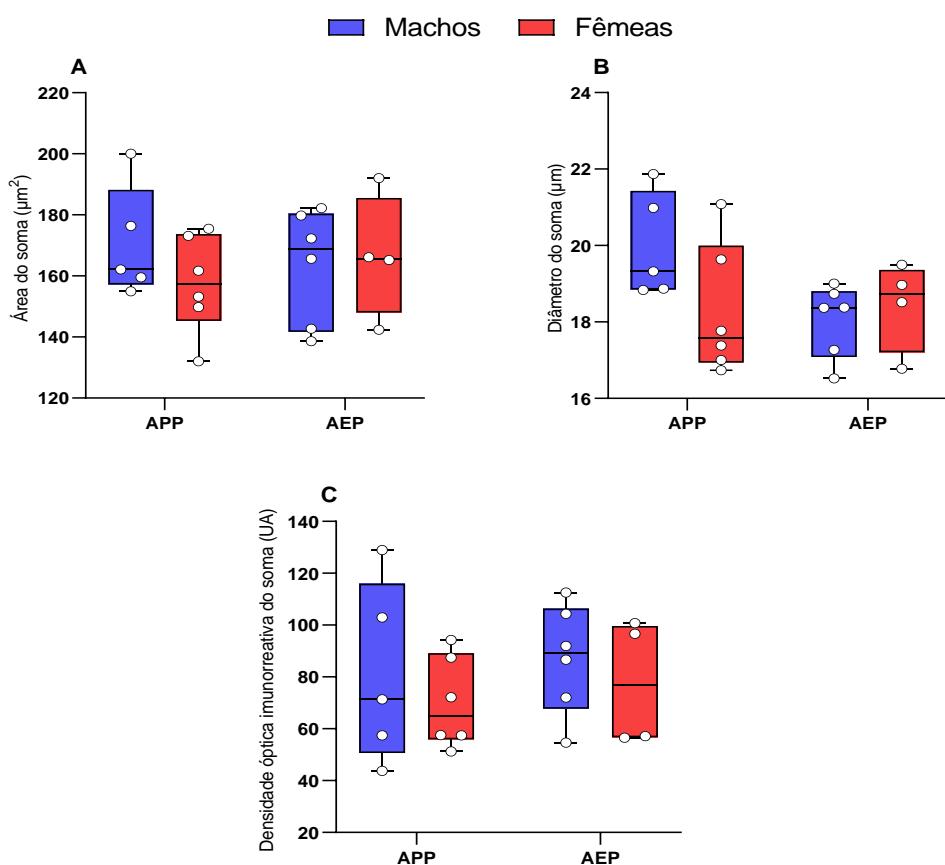
**Figura 19:** Efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal no teste da caixa claro-escuro realizado em camundongos machos e fêmeas adultos. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. Os valores dos os gráficos A, B, D, E e F foram transformados em *rank* antes do ANOVA. *Box plot* indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 14 - 18$ ). \* $p < 0,05$ : comparando os grupos AE vs. grupos AP, + $p < 0,05$ : comparando ao respectivo grupo controle.

## 4.2 Análise dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do PVN por imunofluorescência

### 4.2.1 Adolescentes

Na análise dos neurônios vasopressinérgicos presentes no PVN de animais adolescentes, ANOVA de duas vias demonstrou não haver diferença significativa na média da área do soma entre os grupos analisados (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,17} = 0,97, p = 0,33$ , fator ambiente:  $F_{1,17} = 0,01, p = 0,91$ , fator sexo:  $F_{1,17} = 0,39, p = 0,53$ ) (Figura 20A). Assim como não houve diferença no diâmetro desses neurônios (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,17} = 3,09, p = 0,09$ , fator ambiente:  $F_{1,17} = 2,15, p = 0,16$ , fator sexo:  $F_{1,17} = 1,20, p = 0,28$ ) (Figura 20B). Também não houve diferença na densidade óptica imunorreativa ao AVP do soma (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,17} = 0,005, p = 0,94$ , fator ambiente:  $F_{1,17} = 0,40, p = 0,53$ , fator sexo:  $F_{1,17} = 0,84, p = 0,36$ ) (Figura 20C).

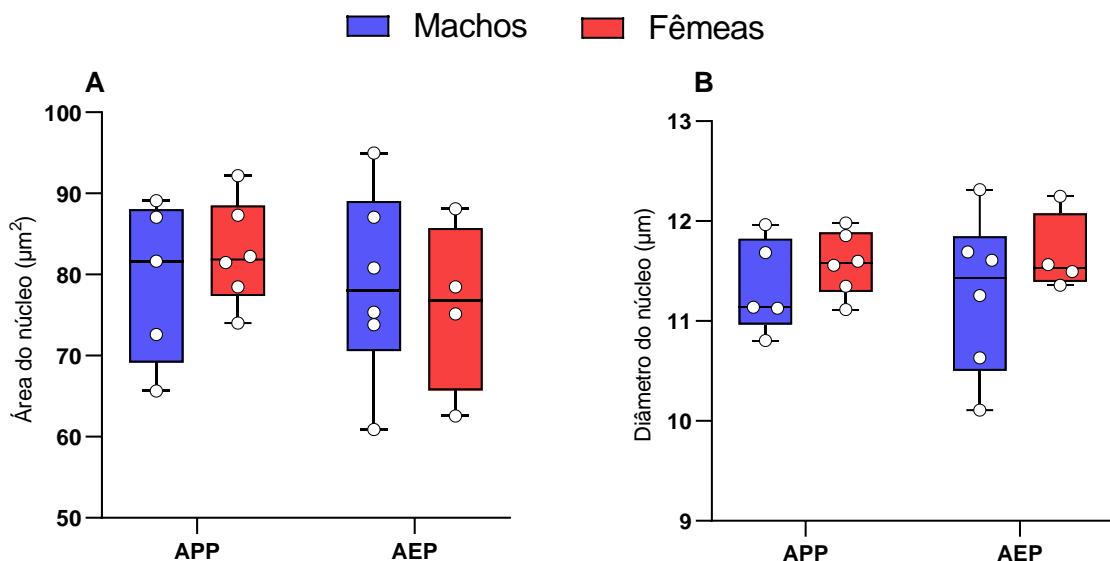
### SOMA DOS NEURÔNIOS VASOPRESSINÉRGICOS



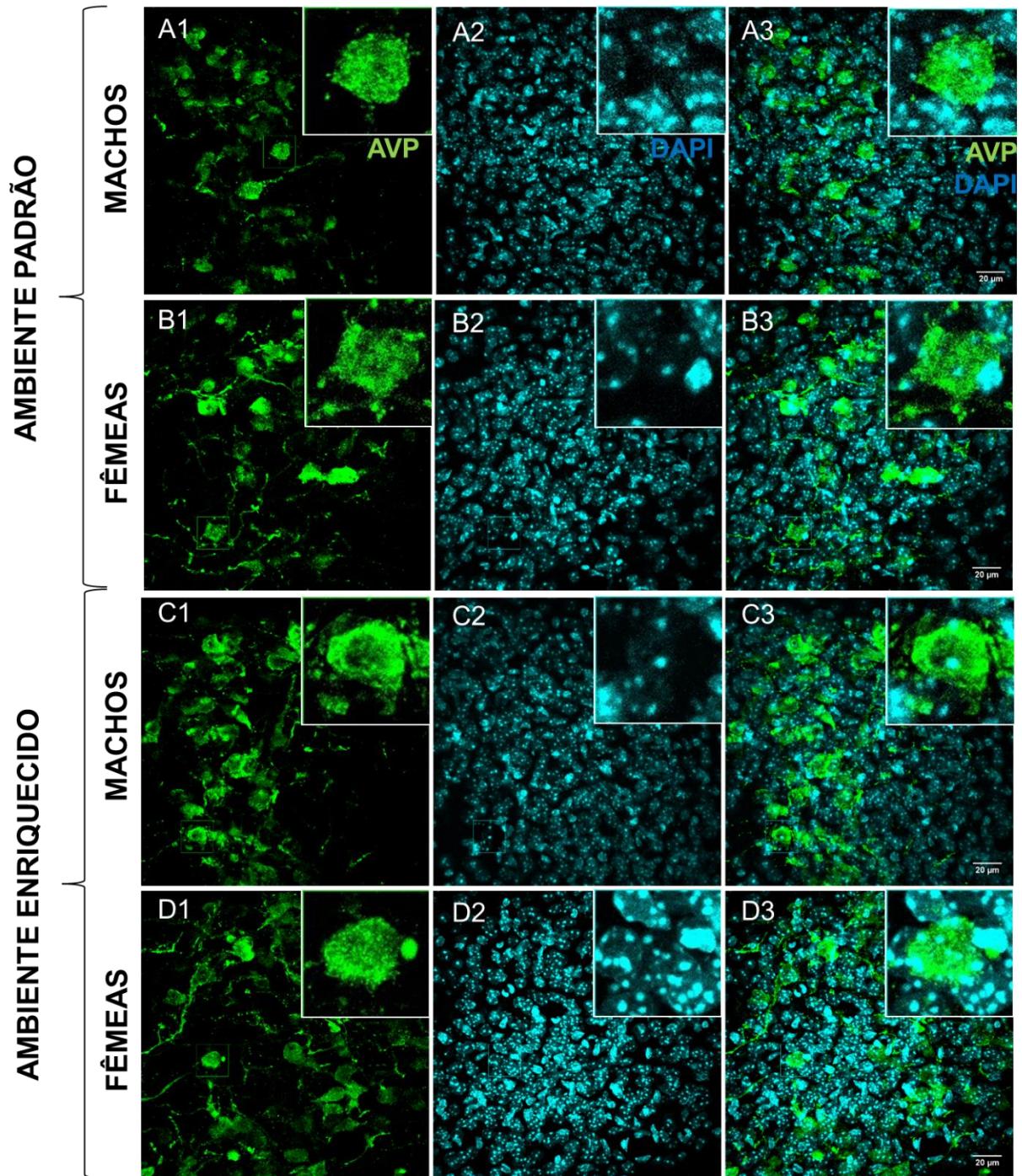
**Figura 20:** Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no soma de neurônios imunorreativos à vasopressina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adolescentes. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *Box plot* indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 04 - 06$ ).

Avaliando-se o núcleo desses mesmos neurônios, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na média da área (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,17} = 0,50, p = 0,48$ , fator ambiente:  $F_{1,17} = 0,64, p = 0,43$ , fator sexo:  $F_{1,17} = 0,005, p = 0,93$ ) (Figura 21A). Assim como não houve diferença no diâmetro (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,17} = 0,11, p = 0,73$ , fator ambiente:  $F_{1,17} = 0,001, p = 0,97$ , fator sexo:  $F_{1,17} = 1,72, p = 0,26$ ) (Figura 21B). A média da intensidade óptica do núcleo também não apresentou diferença significativa (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,17} = 0,19, p = 0,66$ , fator ambiente:  $F_{1,17} = 0,08, p = 0,77$ , fator sexo:  $F_{1,17} = 0,27, p = 0,60$ ) (Figura 21C). Imagens representativas dos neurônios vasopressinérgicos do PVN de cada grupo estão apresentadas na figura 22.

## NÚCLEO DOS NEURÔNIOS VASOPRESSINÉRGICOS



**Figura 21:** Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no núcleo de neurônios imunorreativos à vasopressina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adolescentes. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *Box plot* indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 04 - 06$ ).

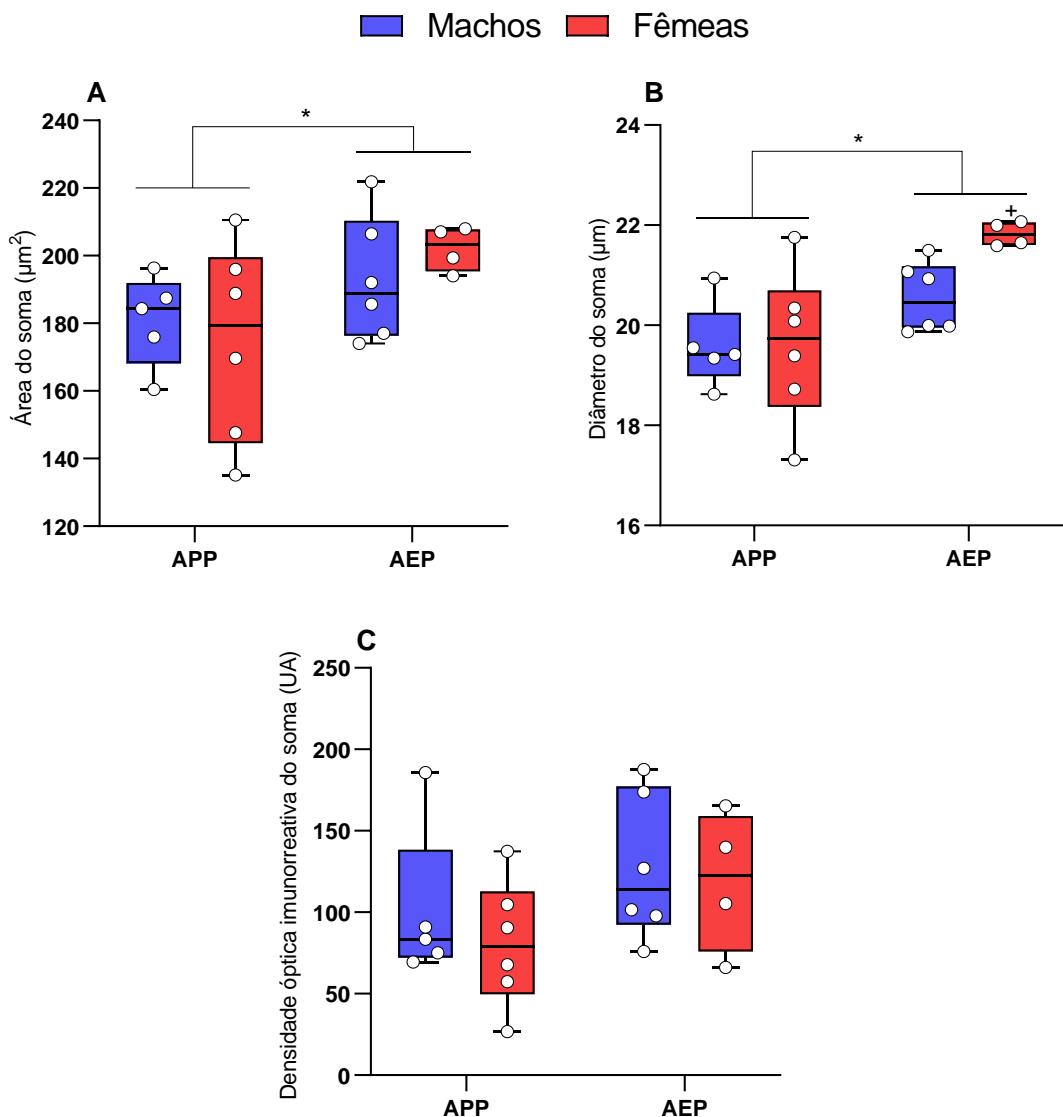


**Figura 22:** Fotomicrografias representativas de secções coronais (30 $\mu$ m) mostrando neurônios AVP (verde) e núcleos (azul) do PVN de camundongos adolescentes machos APP (A), fêmeas APP (B), machos AEP (C) e fêmeas AEP (D). Barra de escala: 20  $\mu$ m

Na análise dos neurônios ocitocinérgicos presentes no PVN de animais adolescentes, ANOVA de duas vias demonstrou haver diferença significativa na média da área do soma por efeito do fator ambiente ( $F_{1,17} = 4,95, p = 0,03$ ), sendo os animais do ambiente AEP apresentando maior área do soma em relação aos animais APP. O fator sexo não apresentou diferença significativa ( $F_{1,17} = 0,02, p = 0,86$ ), assim como não houve interação entre os fatores

( $F_{1,17} = 0,77, p = 0,39$ ) (Figura 23A). O diâmetro do soma também demonstrou diferença significativa no fator ambiente ( $F_{1,17} = 13,2, p = 0,002$ ), onde os animais AEP apresentaram maior média de diâmetro do soma dos neurônios ocitocinérgicos em comparação aos animais APP. Esse parâmetro não foi afetado pelo fator sexo ( $F_{1,17} = 2,15, p = 0,16$ ) e não houve interação entre os fatores ( $F_{1,17} = 1,98, p = 0,17$ ). O pós-teste demonstrou que as fêmeas AEP apresentavam maior diâmetro que as fêmeas APP ( $p = 0,01$ ) e que os machos APP ( $p = 0,01$ ), sem se diferirem dos machos AEP ( $p = 0,23$ ) (Figura 23B). A intensidade óptica imunorreativa à OT do soma não apresentou diferença significativa (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,17} = 0,09, p = 0,75$ , fator ambiente:  $F_{1,17} = 2,82, p = 0,11$ , fator sexo:  $F_{1,17} = 0,53, p = 0,47$ ) (Figura 23C).

## SOMA DOS NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS

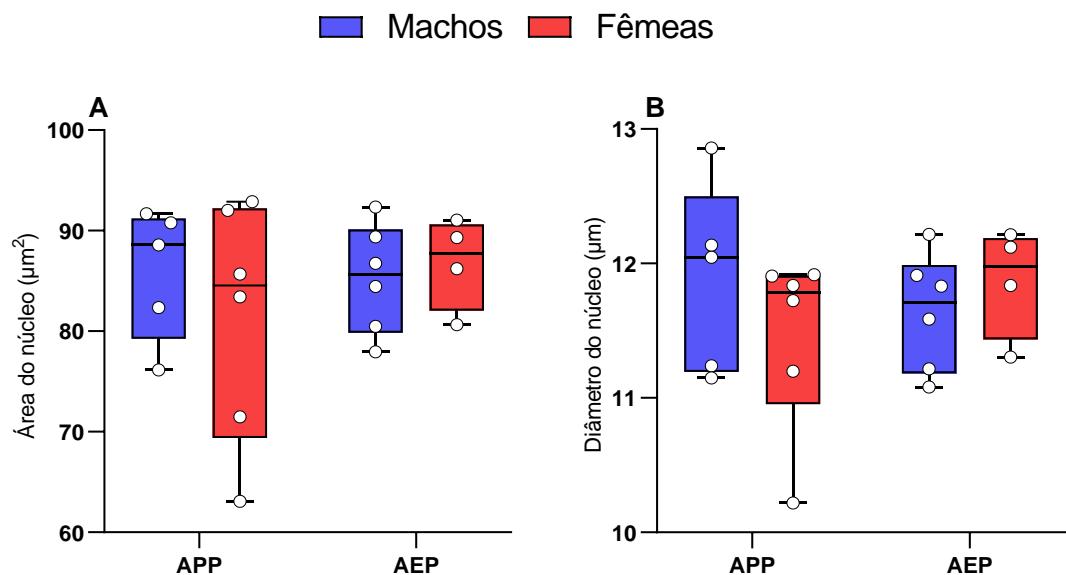


**Figura 23:** Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no soma de neurônios imunorreativos à ocitocina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adolescentes. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *Box plot* indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 04 - 06$ ). \* $p < 0,05$ : comparando os grupos AEP vs. grupos APP; + $p < 0,05$ : comparando ao respectivo grupo controle.

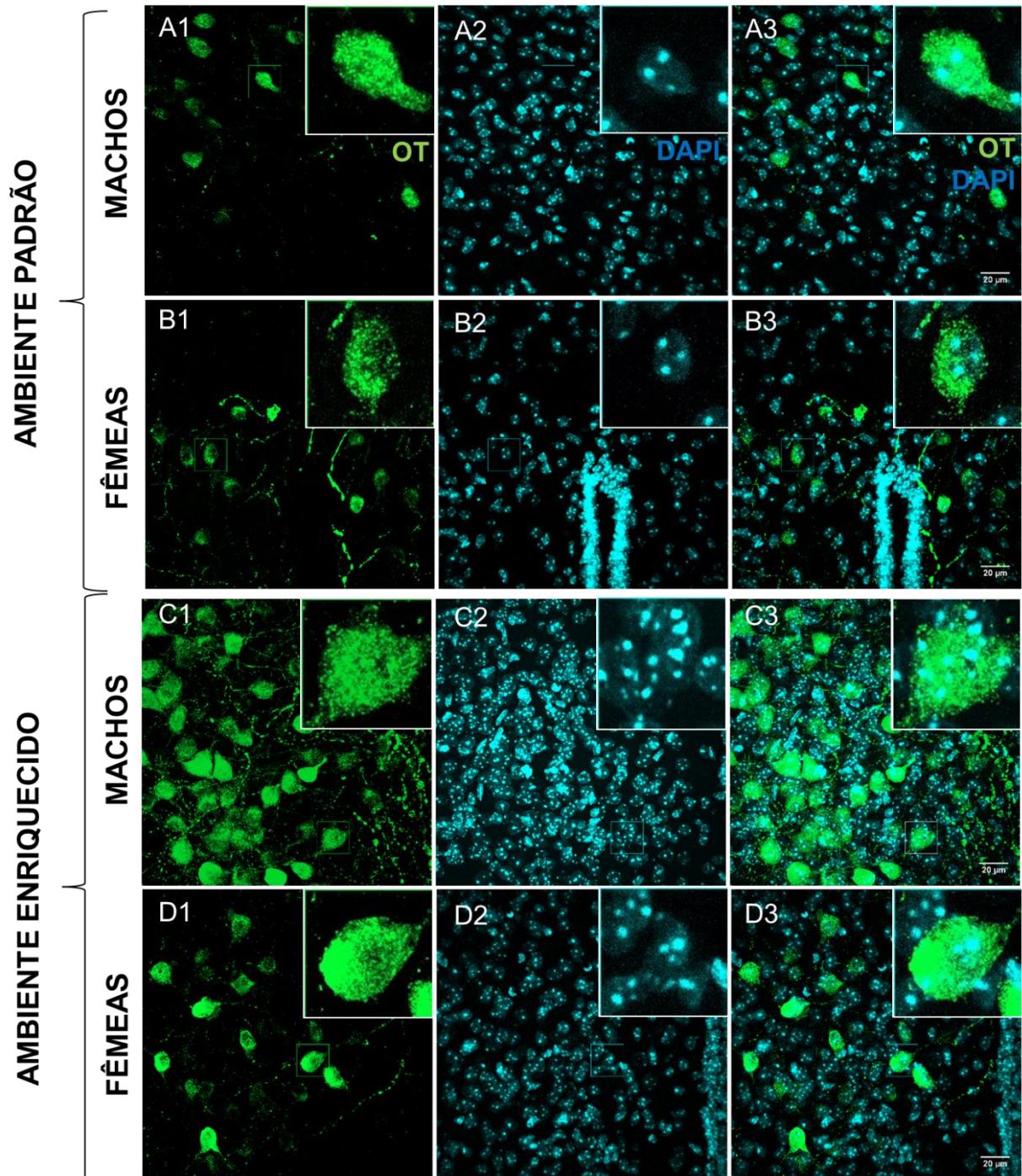
Avaliando-se o núcleo desses mesmos neurônios ocitocinérgicos, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na média da área (Interação ambiente vs. sexo:  $F_{1,17} = 0,16, p = 0,69$ , fator ambiente:  $F_{1,17} = 0,04, p = 0,83$ , fator sexo:  $F_{1,17} = 0,0001, p = 0,99$ ) (Figura 24A). Assim como não houve diferença no diâmetro (Interação ambiente vs. sexo:  $F_{1,17} = 1,59, p = 0,22$ , fator ambiente:  $F_{1,17} = 0,09, p = 0,76$ , fator sexo:  $F_{1,17} = 0,14, p = 0,71$ )

(Figura 24B). Imagens representativas dos neurônios ocitocinérgicos do PVN de cada grupo estão apresentadas na figura 25.

## NÚCLEO DOS NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS



**Figura 24:** Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no núcleo de neurônios imunorreativos à ocitocina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adolescentes. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. Os valores do gráfico A foram transformados em *rank* antes do ANOVA. *Box plot* indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 04 - 06$ ).

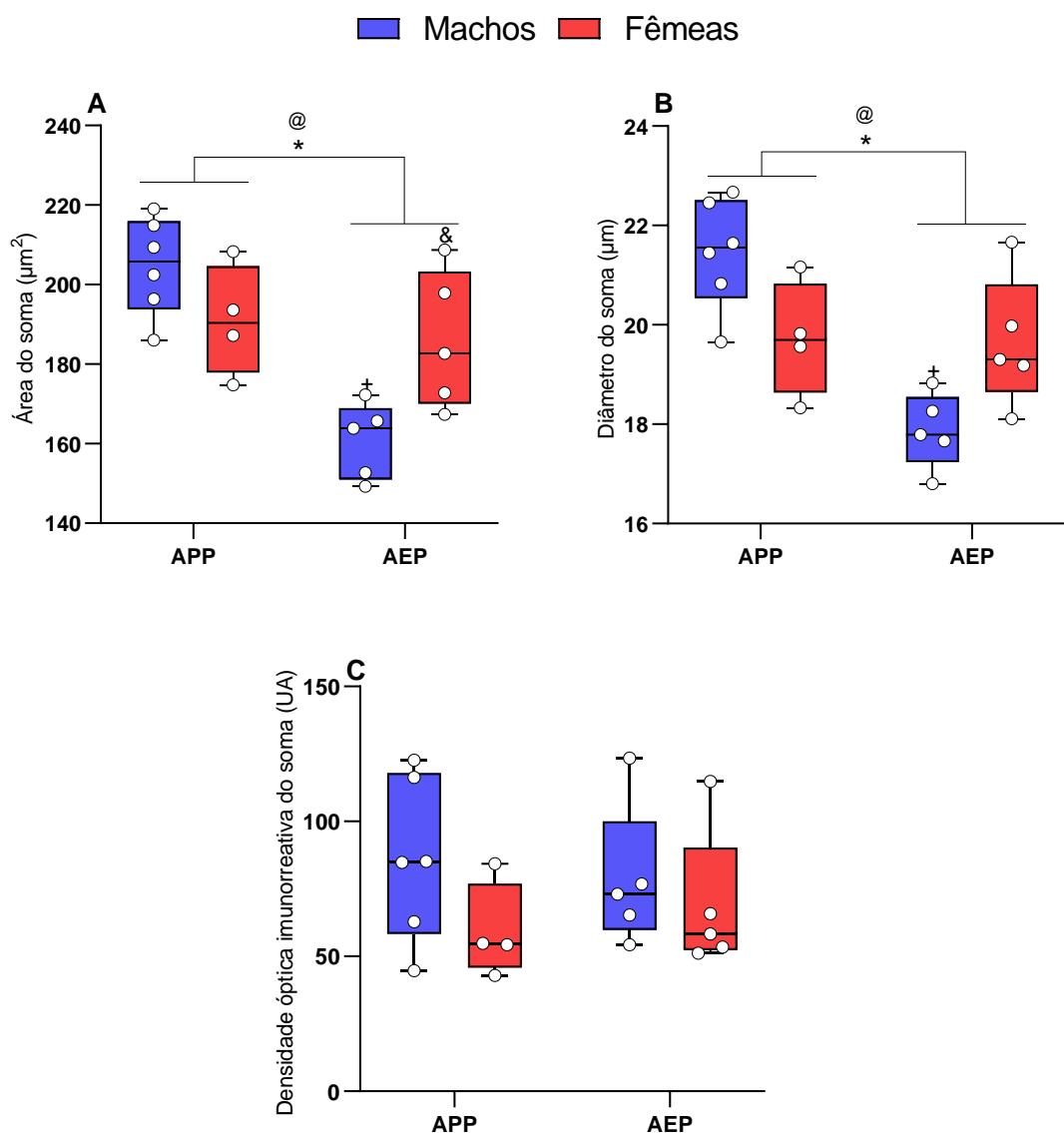


**Figura 25:** Fotomicrografias representativas de secções coronais (30 $\mu$ m) mostrando neurônios OT (verde) e núcleos (azul) do PVN de camundongos adolescentes machos APP (A), fêmeas APP (B), machos AEP (C) e fêmeas AEP (D). Barra de escala: 20  $\mu$ m

#### 4.2.2 Adultos

Na análise dos neurônios vasopressinérgicos presentes no PVN dos animais adultos, ANOVA duas vias demonstrou haver interação entre os fatores sexo e ambiente ( $F_{1,16} = 10,24, p = 0,005$ ) em relação à média da área do soma. Foi detectada diferença significativa por efeito do fator ambiente ( $F_{1,16} = 16,27, p = 0,001$ ), sendo os animais AEP apresentando menor área em relação aos animais APP e o fator sexo não afetou este parâmetro ( $F_{1,16} = 0,87, p = 0,36$ ). O pós-teste demonstrou que os machos AEP apresentaram menor área que os machos APP ( $p = 0,0003$ ) e fêmeas APP ( $p = 0,01$ ), assim como em relação às fêmeas AEP ( $p = 0,04$ ) (Figura 26A). Na análise do diâmetro do soma também foi identificada interação entre os fatores ( $F_{1,16} = 12,49, p = 0,002$ ). O fator ambiente demonstrou afetar esse parâmetro ( $F_{1,16} = 13,55, p = 0,002$ ), onde os animais AEP apresentaram menor diâmetro que os animais APP. Não foram observadas diferenças no fator sexo ( $F_{1,16} = 0,001, p = 0,96$ ). O pós-teste demonstrou que os machos AEP apresentavam menor diâmetro do soma do que os machos APP ( $p = 0,0003$ ) e não se diferiram estatisticamente das fêmeas AEP ( $p = 0,08$ ) (Figura 26B). A densidade óptica imunorreativa ao AVP do soma não demonstrou diferença significativa entre os grupos (Interação ambiente *vs.* sexo:  $F_{1,16} = 0,27, p = 0,60$ , fator ambiente:  $F_{1,16} = 0,006, p = 0,93$ , fator sexo:  $F_{1,16} = 3,29, p = 0,08$ ) (Figura 26C).

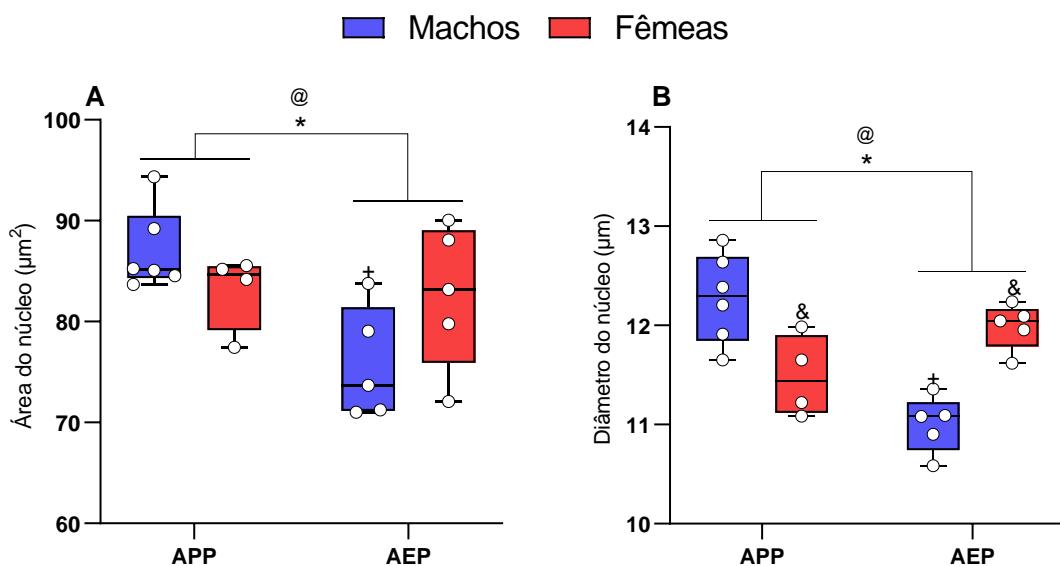
## SOMA DOS NEURÔNIOS VASOPRESSINÉRGICOS



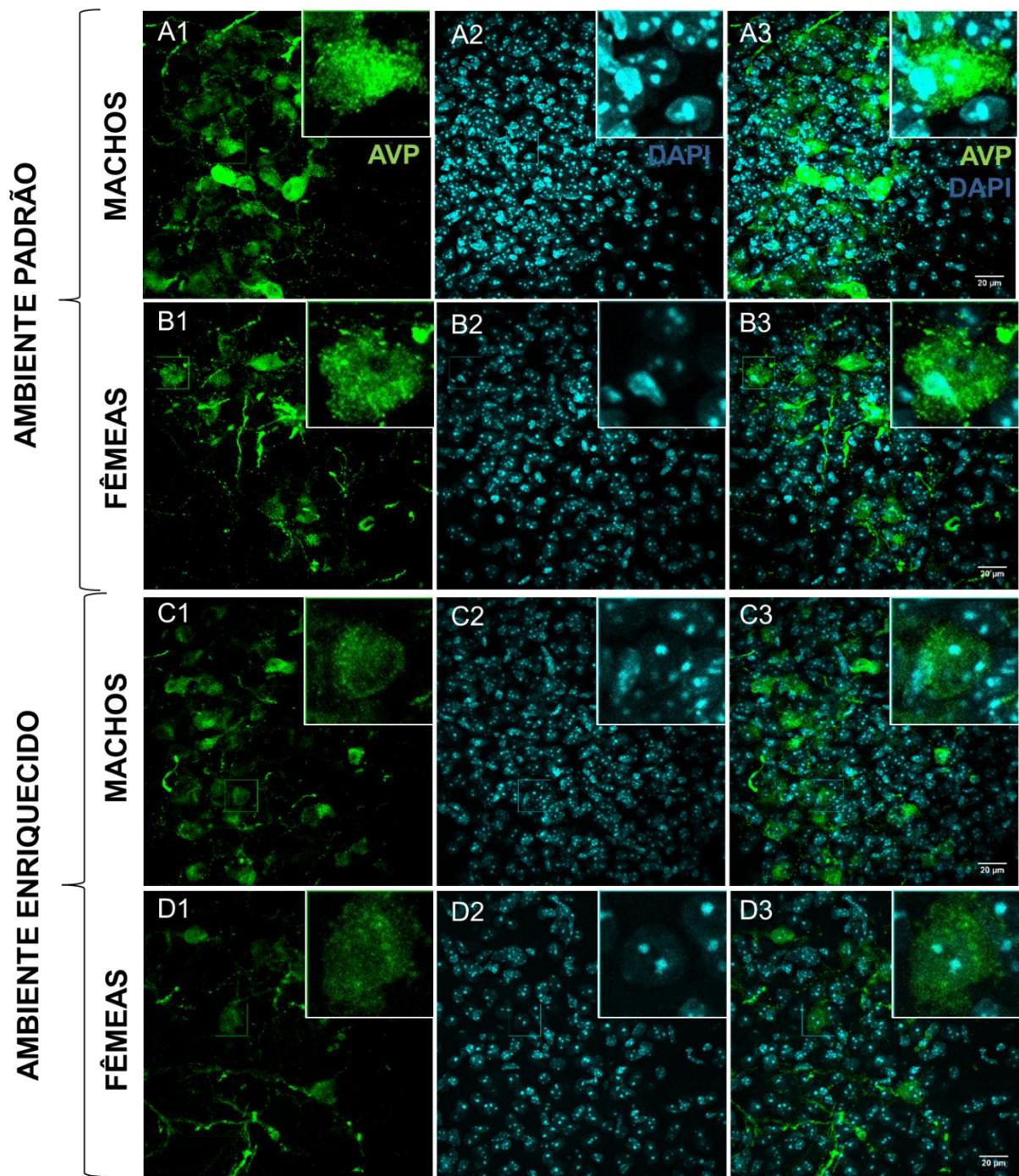
**Figura 26:** Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no soma de neurônios imunorreativos à vasopressina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adultos. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. Os valores do gráfico C foram transformados em *rank* antes do ANOVA. Box plot indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 04 - 06$ ). @ $p < 0,05$ : interação entre os fatores ambiente e sexo; \* $p < 0,05$ : comparando os grupos AEP vs. grupos APP; + $p < 0,05$ : comparando ao respectivo grupo controle; & $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo de machos.

Avaliando-se o núcleo desses neurônios vasopressinérgicos, ANOVA duas vias demonstrou haver interação entre os fatores sexo e ambiente em relação à média da área ( $F_{1,16} = 5,04, p = 0,03$ ). O fator ambiente foi capaz de afetar esse parâmetro ( $F_{1,16} = 5,95, p = 0,02$ ), onde os animais AEP apresentaram menor área do núcleo que os animais dos grupos APP. O fator sexo não apresentou diferença significativa ( $F_{1,16} = 0,37, p = 0,54$ ). O pós-teste identificou que os machos AEP apresentavam menor média da área do núcleo em relação aos machos APP ( $p = 0,01$ ) e não se diferenciavam estatisticamente das fêmeas AEP ( $p = 0,21$ ) (Figura 27A). A ANOVA também demonstrou haver interação entre os fatores em relação ao diâmetro do núcleo ( $F_{1,16} = 19,81, p = 0,0004$ ). Identificou-se diferença significativa no fator ambiente ( $F_{1,16} = 6,41, p = 0,02$ ), onde o diâmetro do núcleo dos neurônios AVP dos animais AEP eram menores que dos animais APP e o fator sexo não foi capaz de afetar este parâmetro ( $F_{1,16} = 0,01, p = 0,90$ ). O pós-teste demonstrou que os machos AEP apresentavam menor diâmetro em relação aos machos APP ( $p = 0,004$ ), assim como em relação as fêmeas AEP ( $p = 0,02$ ) (Figura 27B). Imagens representativas dos neurônios vasopressinérgicos do PVN de cada grupo estão apresentadas na figura 28.

## NÚCLEO DOS NEURÔNIOS VASOPRESSINÉRGICOS



**Figura 27:** Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no núcleo de neurônios imunorreativos à vasopressina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adultos. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *Box plot* indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 04 - 06$ ). @ $p<0,05$ : interação entre os fatores ambiente e sexo; \* $p<0,05$ : comparando os grupos AEP vs. grupos APP; + $p<0,05$ : comparando ao respectivo grupo controle; & $p<0,05$  comparado ao respectivo grupo de machos.



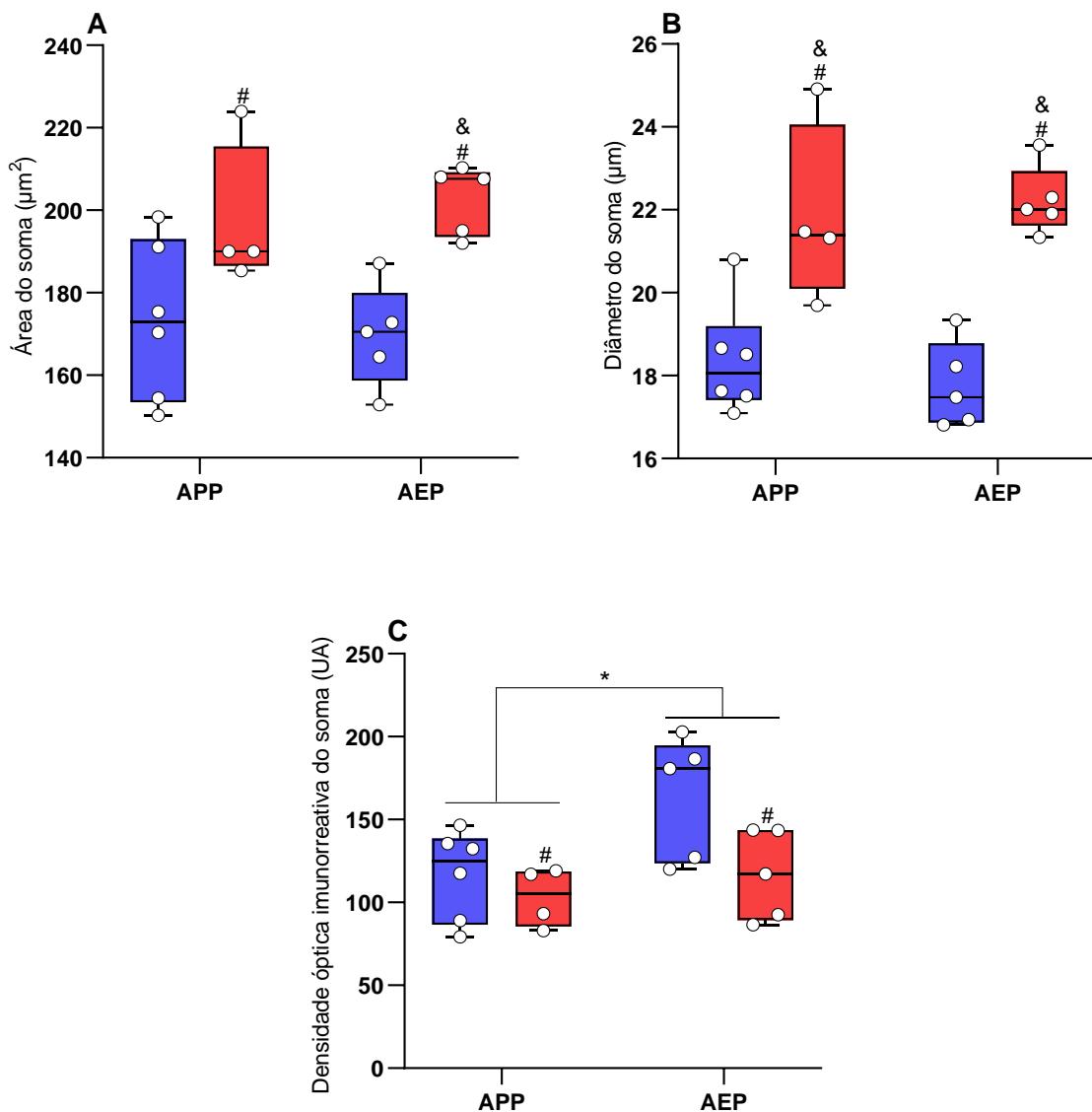
**Figura 28:** Fotomicrografias representativas de secções coronais (30 $\mu$ m) mostrando neurônios AVP (verde) e núcleos (azul) do PVN de camundongos adultos machos APP (A), fêmeas APP (B), machos AEP (C) e fêmeas AEP (D). Barra de escala: 20  $\mu$ m

Na análise dos neurônios ocitocinérgicos presentes no PVN dos animais adultos, ANOVA de duas vias demonstrou haver diferença significativa na média da área do soma por efeito do fator sexo ( $F_{1,16} = 17,22, p = 0,0008$ ), sendo que as fêmeas apresentavam maior área do que os machos. O fator ambiente não demonstrou afetar este parâmetro ( $F_{1,16} = 0,01, p =$

0,91) e não houve interação entre os fatores ( $F_{1,16} = 0,43, p = 0,52$ ). O pós-teste demonstrou que as fêmeas AEP apresentavam maior tamanho do soma em relação aos machos APP ( $p = 0,02$ ) e aos machos AEP ( $p = 0,01$ ), mas não se diferenciavam estatisticamente das fêmeas APP ( $p = 0,95$ ) (Figura 29A). A média do diâmetro do soma também apresentou significância no fator sexo ( $F_{1,16} = 40,57, p < 0,0001$ ), onde as fêmeas apresentavam maior diâmetro do soma do que os machos. Não houve significância estatística em relação ao fator ambiente ( $F_{1,16} = 0,03, p = 0,85$ ), e não houve interação entre os fatores ( $F_{1,16} = 0,62, p = 0,44$ ). O pós-teste demonstrou que as fêmeas AEP apresentavam maior diâmetro do núcleo de neurônios ocitocinérgicos que os machos AP ( $p = 0,001$ ) e machos AEP ( $p = 0,0005$ ), mas não se diferenciavam das fêmeas APP ( $p = 0,97$ ). E que as fêmeas APP possuíam maior diâmetro relação aos machos APP ( $p = 0,006$ ) e machos AEP ( $p = 0,002$ ) (Figura 29B). Na análise da densidade óptica imunorreativa à OT do soma, foi demonstrado haver efeito do ambiente ( $F_{1,16} = 5,42, p = 0,03$ ) e do sexo ( $F_{1,16} = 5,45, p = 0,03$ ), onde as fêmeas apresentavam maior densidade óptica que os machos e os animais AEP maior densidade óptica que os animais de APP, sem haver interação entre os fatores ( $F_{1,16} = 1,63, p = 0,21$ ) (Figura 29C).

## SOMA DOS NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS

■ Machos ■ Fêmeas

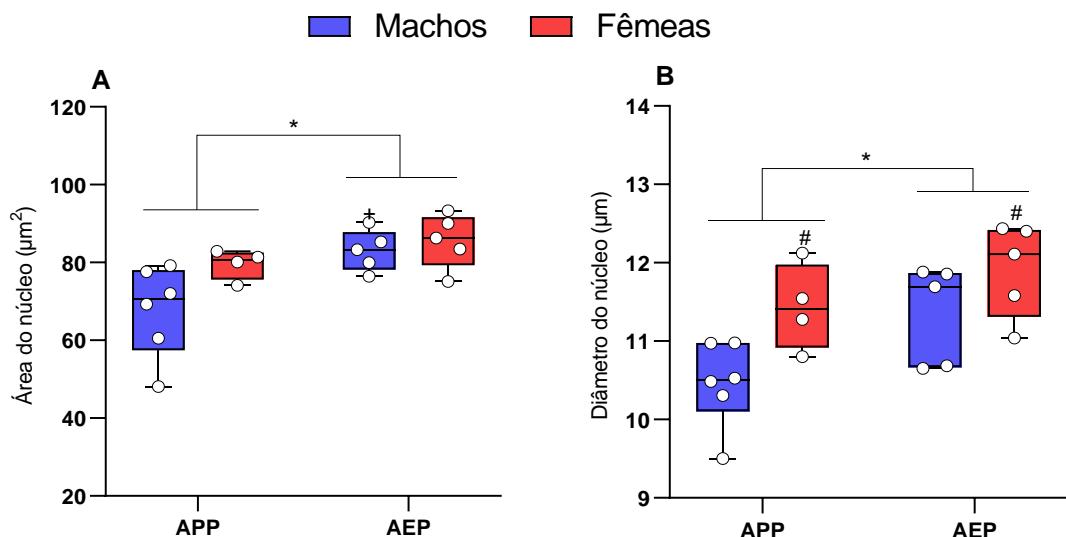


**Figura 29:** Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no soma de neurônios imunorreativos à ocitocina presentes no PVN de camundongos machos e fêmeas adultos. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. Box plot indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 04 - 06$ ). \* $p < 0,05$ : comparando os grupos AEP vs. grupos APP; # $p < 0,05$ : comparando os grupos de machos; & $p < 0,05$  comparando a diferença entre os grupos APP e AEP para fêmeas.

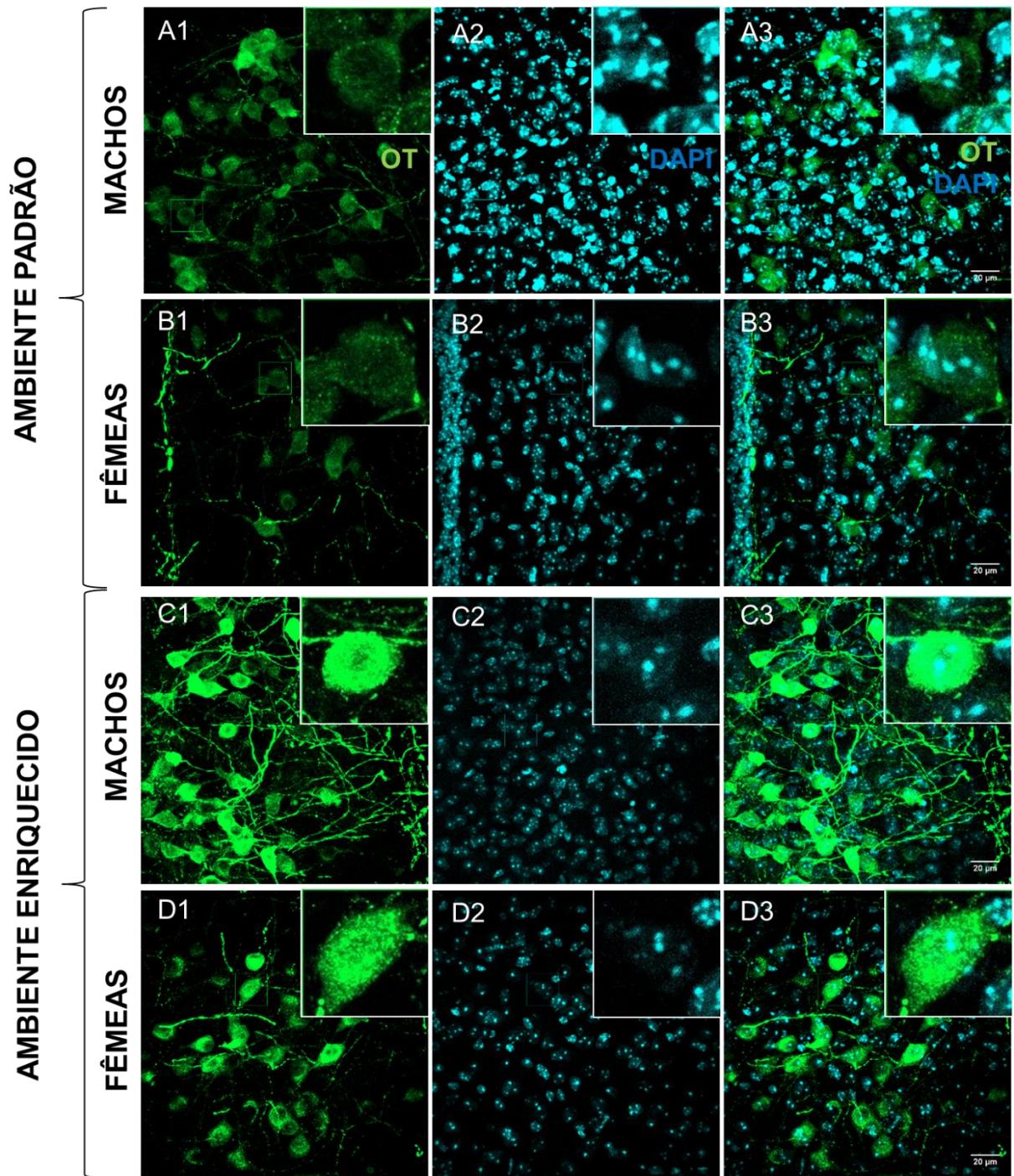
Avaliando-se o núcleo desses neurônios ocitocinérgicos, ANOVA de duas vias demonstrou haver significância em relação ao fator ambiente ( $F_{1,16} = 12,09, p = 0,003$ ), onde os animais AEP apresentaram maior média da área do núcleo do que os animais APP. Não houve significância no fator sexo ( $F_{1,16} = 3,89, p = 0,06$ ), e não houve interação entre os fatores

$(F_{1,16} = 0,91, p = 0,35)$ . O pós-teste demonstrou que os machos AEP apresentavam maior área do núcleo que os machos APP ( $p = 0,02$ ), mas que não se diferenciavam das fêmeas APP ( $p = 0,74$ ) e das fêmeas AEP ( $p = 0,88$ ) (Figura 30A). Referente ao diâmetro do núcleo, a análise apresentou diferença estatística em relação ao fator ambiente ( $F_{1,16} = 6,80, p = 0,01$ ), onde os animais AEP apresentavam maior diâmetro que os animais APP. O fator sexo também demonstrou significância sobre este parâmetro ( $F_{1,16} = 8,55, p = 0,009$ ), onde as fêmeas de ambos os grupos apresentavam maior média no diâmetro do núcleo dos neurônios analisados. Não houve interação entre os fatores ( $F_{1,16} = 0,62, p = 0,44$ ) (Figura 30B). Imagens representativas dos neurônios ocitocinérgicos do PVN de cada grupo estão apresentadas na figura 31.

## NÚCLEO DOS NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS



**Figura 30:** Efeitos promovidos pelo enriquecimento ambiental no período perinatal no núcleo de neurônios imunorreativos à ocitocina presentes no PVN em camundongos machos e fêmeas adultos. Dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. Os valores dos gráficos A foram transformados em *rank* antes do ANOVA. Box plot indicam dados individuais, mediana, primeiro e terceiro quartis de cada grupo ( $n = 04 - 06$ ). \* $p < 0,05$ : comparando os grupos AEP vs. grupos APP; # $p < 0,05$ : comparando aos grupos de machos; + $p < 0,05$ : comparando ao respectivo grupo controle.



**Figura 31:** Fotomicrografias representativas de secções coronais (30 $\mu$ m) mostrando neurônios OT (verde) e núcleos (azul) do PVN de camundongos adultos machos APP (A), fêmeas APP (B), machos AEP (C) e fêmeas AEP (D). Barra de escala: 20  $\mu$ m.

#### 4.3 Sumário geral dos resultados

Para uma análise geral e simplificada dos resultados obtidos neste trabalho, na tabela 3 estão resumidos os efeitos do EAP nos testes comportamentais e nas análises de imunofluorescência realizados.

**Tabela 3:** Resultados obtidos sobre os efeitos do EA perinatal em camundongos machos e fêmeas, adolescentes e adultos.

	Teste Comportamental			Neurônios do PVN	
	Interação social	LCE	CCE	Vasopressinérgicos	Ocitocinérgicos
<b>Adolescentes</b>	Aumento da interação social	Aumento da atividade locomotora	Não houve alteração	Não houve alteração	Aumento da área e do diâmetro do soma
<b>Adultos</b>	Aumento da atividade exploratória	Redução do comportamento ansiosos, mais evidente em machos	Aumento da atividade exploratória	Redução do diâmetro e da área do soma e do núcleo*	Aumento da intensidade de marcação do soma Aumento da área e diâmetro do núcleo

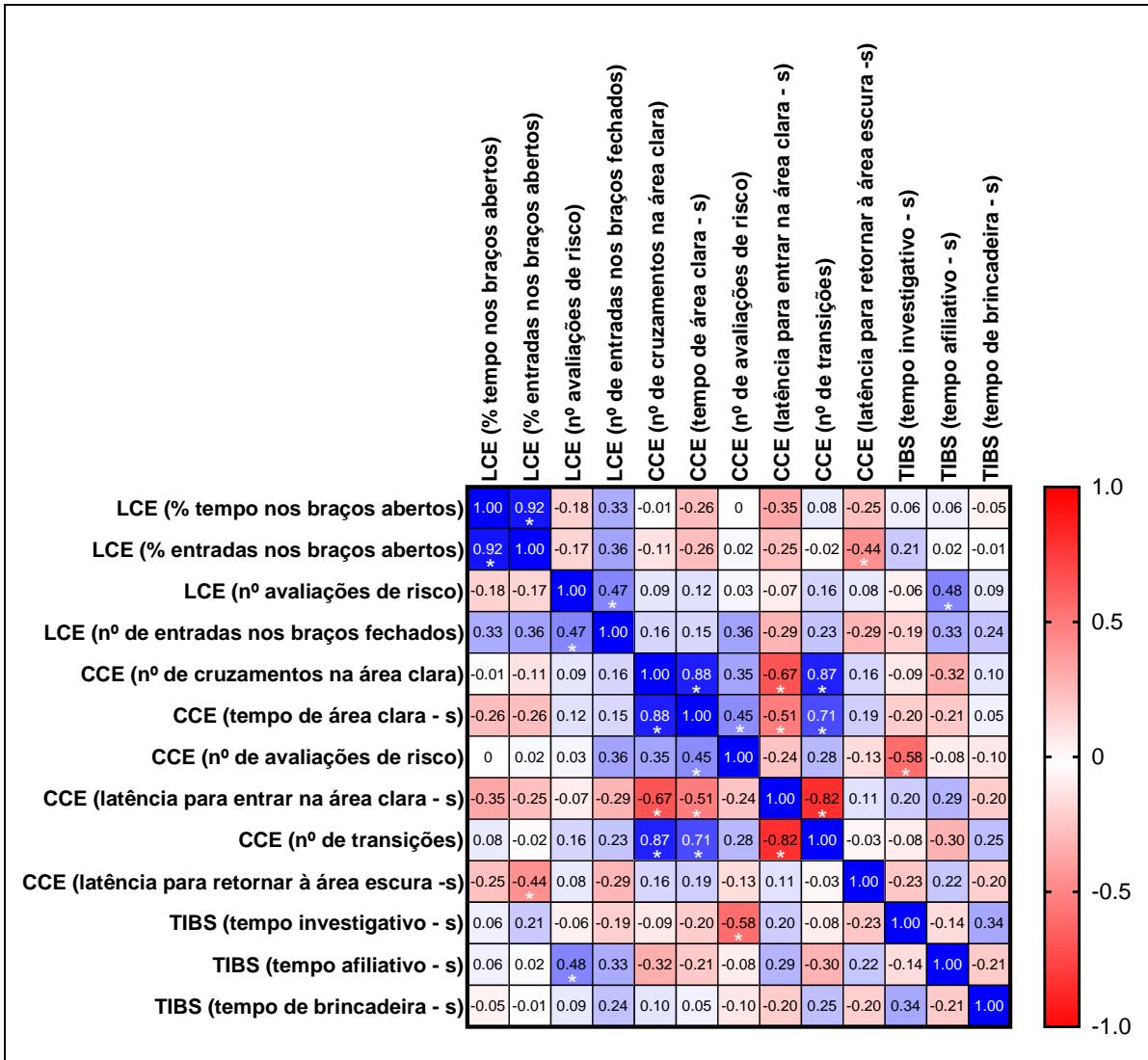
\*Diferença significativa apenas nos machos

#### 4.4 Análise de correlação de Spearman e regressão linear

Para investigar a relação entre os resultados obtidos nos parâmetros dos testes comportamentais assim como os resultados da marcação por imunofluorescência, foram realizadas análises de correlação de Spearman e regressão linear, separando inicialmente os grupos de adolescentes e adultos. Quando identificadas correlações significativas, os dados foram estratificados e analisados por regressão linear entre os grupos APP vs. AEP e entre Machos vs. Fêmeas. Neste trabalho, apresentamos os resultados mais relevantes obtidos.

##### 4.4.1 Adolescentes

Inicialmente, foi realizada uma análise de correlação entre os parâmetros avaliados nos testes comportamentais, o gráfico matriz de correlação e os valores do coeficiente de correlação (r) estão mostrados na figura 32.



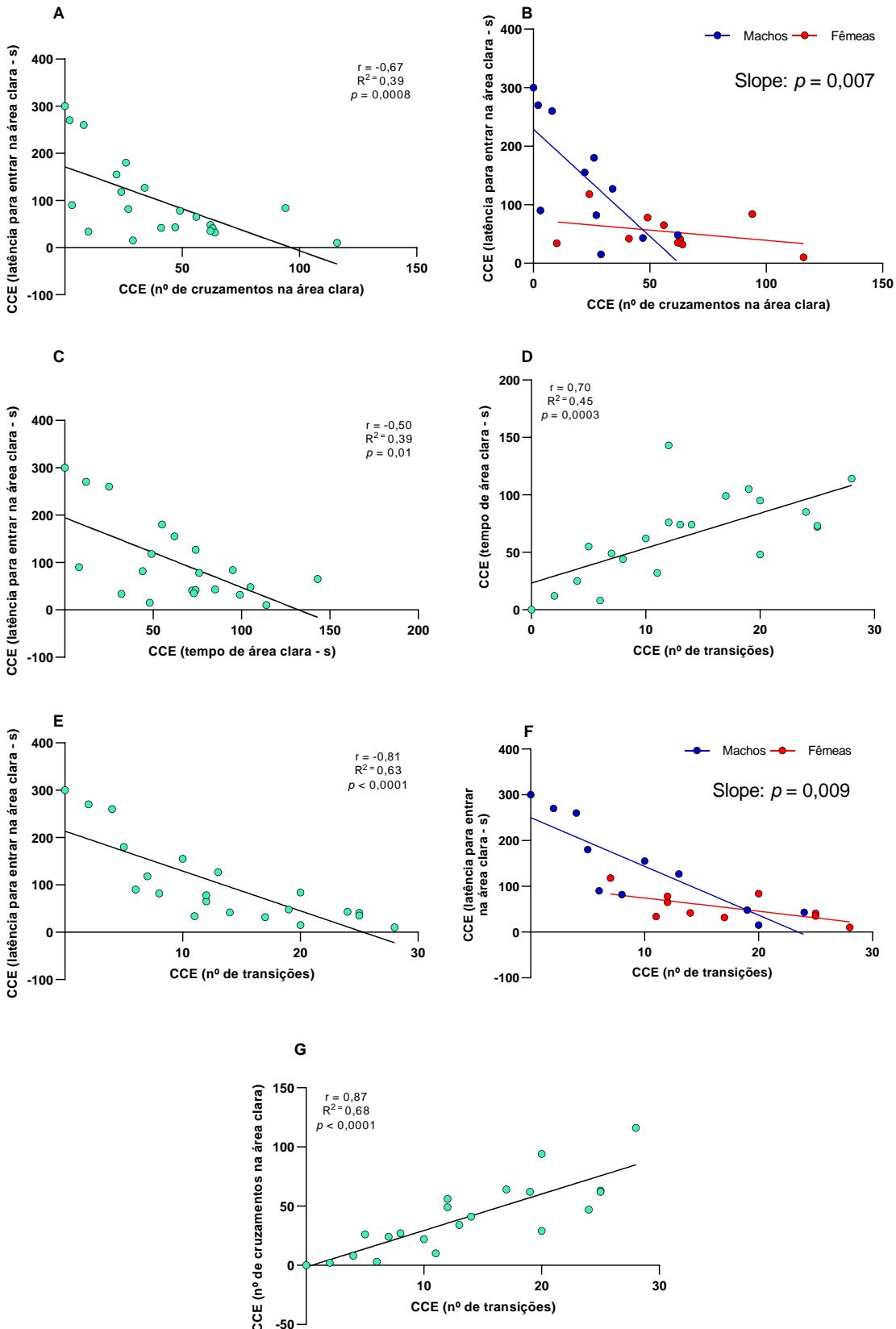
**Figura 32:** Matriz de correlação entre parâmetros analisados nos testes comportamentais dos animais adolescentes. Dados analisados por correlação de Spearman, \* $p<0,05$ .

Na análise de correlação de Spearman dentre os parâmetros comportamentais do teste da CCE, foi identificada uma correlação negativa entre o número de cruzamentos na área clara e a latência para a entrada no compartimento claro ( $r = -0,67$ ;  $R^2 = 0,39$ ;  $p = 0,0008$ ), indicando que os animais que mais realizavam cruzamentos na área clara menos tempo demoravam para entrar neste compartimento (Figura 33A). Ao se comparar os grupos Machos *vs.* Fêmeas por regressão linear, foi identificada uma diferença significativa entre os *slopes* ( $p = 0,007$ ) indicando que, para os machos, um aumento no número de cruzamentos está associado a uma redução mais expressiva na latência para entrar no compartimento claro (Figura 33B). Devido a essa diferença entre os *slopes*, não foi possível identificar se há diferenças entre os interceptos. Não foram observadas diferenças significativas nos *slopes* ou nos interceptos ao comparar os grupos APP *vs.* AEP.

Na análise entre o tempo de permanência na área clara e o tempo de latência para entrar pela primeira vez nesta área, foi identificada uma correlação negativa entre esses parâmetros ( $r = -0,50$ ;  $R^2 = 0,39$ ;  $p = 0,01$ ), indicando que os animais que menos demoravam para entrar no compartimento claro, permaneciam mais tempo nesta área (Figura 33C). Não foram observadas diferenças significativas entre os *slopes* e os interceptos ao se comparar os grupos APP *vs.* AEP e Machos *vs.* Fêmeas.

Também observamos correlação negativa entre o número de transições entre os ambientes e o tempo de latência para entrar no compartimento claro pela primeira vez ( $r = -0,81$ ;  $R^2 = 0,63$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando que os animais que mais realizavam transições entre os ambientes, menos tempo demoravam para entrar na área clara (Figura 33E). Ao se comparar os grupos Machos *vs.* Fêmeas pela análise de regressão linear, foi identificada uma diferença significativa entre os *slopes* ( $p = 0,009$ ), indicando que a associação entre o número de transições e a demora para entrar na área clara era maior no grupo de machos (Figura 33F). Não foram observadas diferenças significativas entre os *slopes* e entre os interceptos ao se comparar os grupos APP *vs.* AEP.

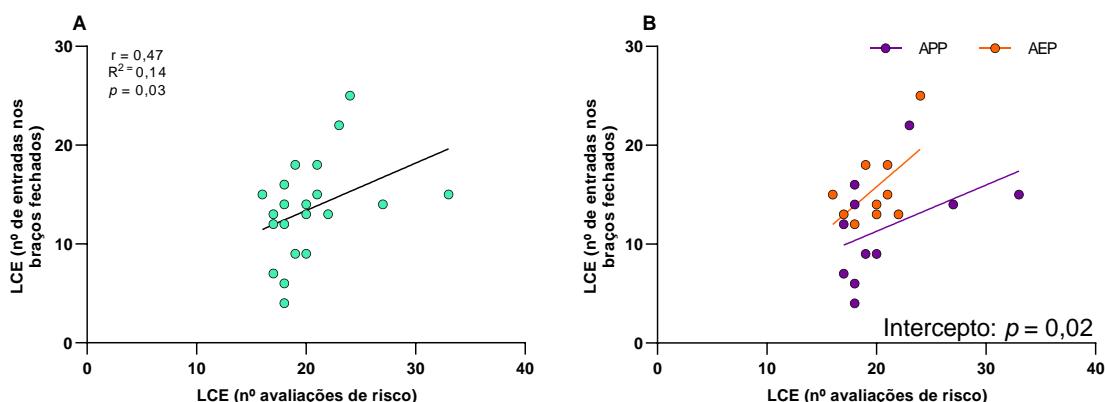
Conforme podemos observar nos gráficos D e G da figura 33, foi identificada uma correlação positiva entre o número de transições e tempo de permanência na área clara ( $r = 0,70$ ;  $R^2 = 0,45$ ;  $p = 0,0003$ ), assim como em relação ao número de cruzamentos nessa área ( $r = 0,87$ ;  $R^2 = 0,68$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando que os animais que mais realizavam transições, mais tempo permaneciam na área clara e mais cruzamentos realizavam neste compartimento (Figura 33D e G respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas entre os *slopes* e entre os interceptos ao se comparar os grupos APP *vs.* AEP e Machos *vs.* Fêmeas.



**Figura 33.** Correlações entre parâmetros comportamentais nos testes da caixa claro-escuro (CCE) e o teste de interação e brincadeira social (TIBS) dos animais adolescentes. (A) Correlação negativa entre o número de cruzamentos na área clara e a latência para a entrada no compartimento claro. (B) Diferença significativa entre os *slopes* na comparação entre Machos e Fêmeas para a relação entre o número de cruzamentos na área clara e a latência para a entrada no compartimento claro. (C) Correlação negativa entre o tempo de permanência na área

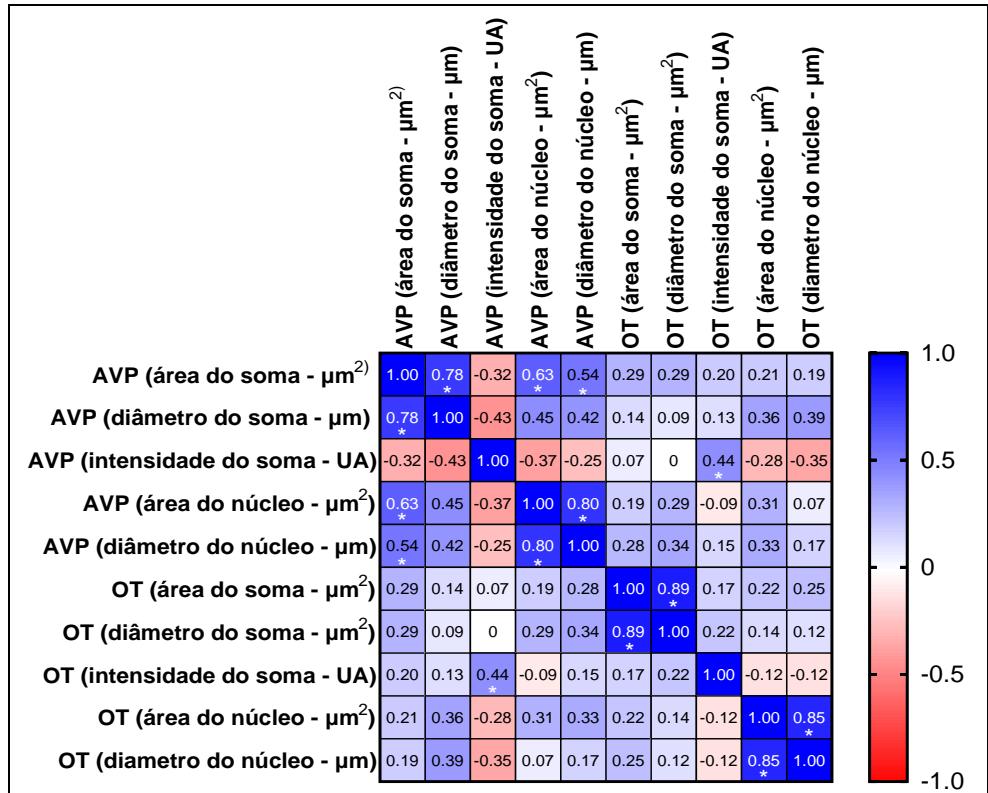
clara e a latência para entrar nessa área. (D) Correlação positiva entre o número de transições e o tempo de permanência na área clara. (E) Correlação negativa entre o número de transições e a latência para entrar no compartimento claro pela primeira vez. (F) Diferença significativa entre os *slopes* na comparação entre Machos e Fêmeas para a relação entre o número de transições e a latência para entrar na área clara. (G) Correlação positiva entre o número de transições e o número de cruzamentos na área clara. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

Na análise de correlação entre os parâmetros avaliados no teste do LCE, foi observada uma correlação positiva entre o número de avaliações de risco e o número de entradas nos braços fechados ( $r = 0,47$ ,  $R^2 = 0,14$ ;  $p = 0,03$ ), sugerindo que quanto mais um animal realizava avaliações de risco, mais ele entrava nesses braços. Ao se comparar os grupos APP vs. AEP pela análise de regressão linear, foi identificada uma diferença significativa entre os interceptos ( $p = 0,02$ ), indicando que o número basal de entradas nos braços fechados realizados pelos animais AEP era menor que dos animais APP (Figura 34B). Não foram observadas diferenças significativas entre os *slopes* e entre os interceptos ao se comparar os grupos Machos vs. Fêmeas.



**Figura 34.** Correlações entre parâmetros comportamentais do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) dos animais adolescentes. (A) Correlação positiva entre o número de avaliações de risco e o número de entradas nos braços fechados. (B) Diferença significativa entre os interceptos do número de avaliações de risco e o número de entradas nos braços fechados dos animais APP vs. AEP. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

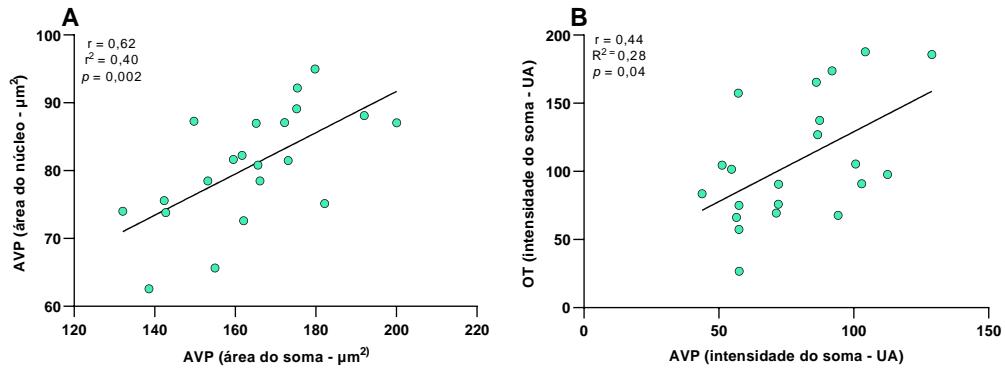
A matriz de correlação de Spearman e os valores do coeficiente de correlação ( $r$ ) entre os parâmetros avaliados por imunofluorescência dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos dos animais adolescentes está apresentada na figura 35.



**Figura 35.** Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos dos animais adolescentes. Dados analisados por correlação de Spearman, \* $p<0,05$ .

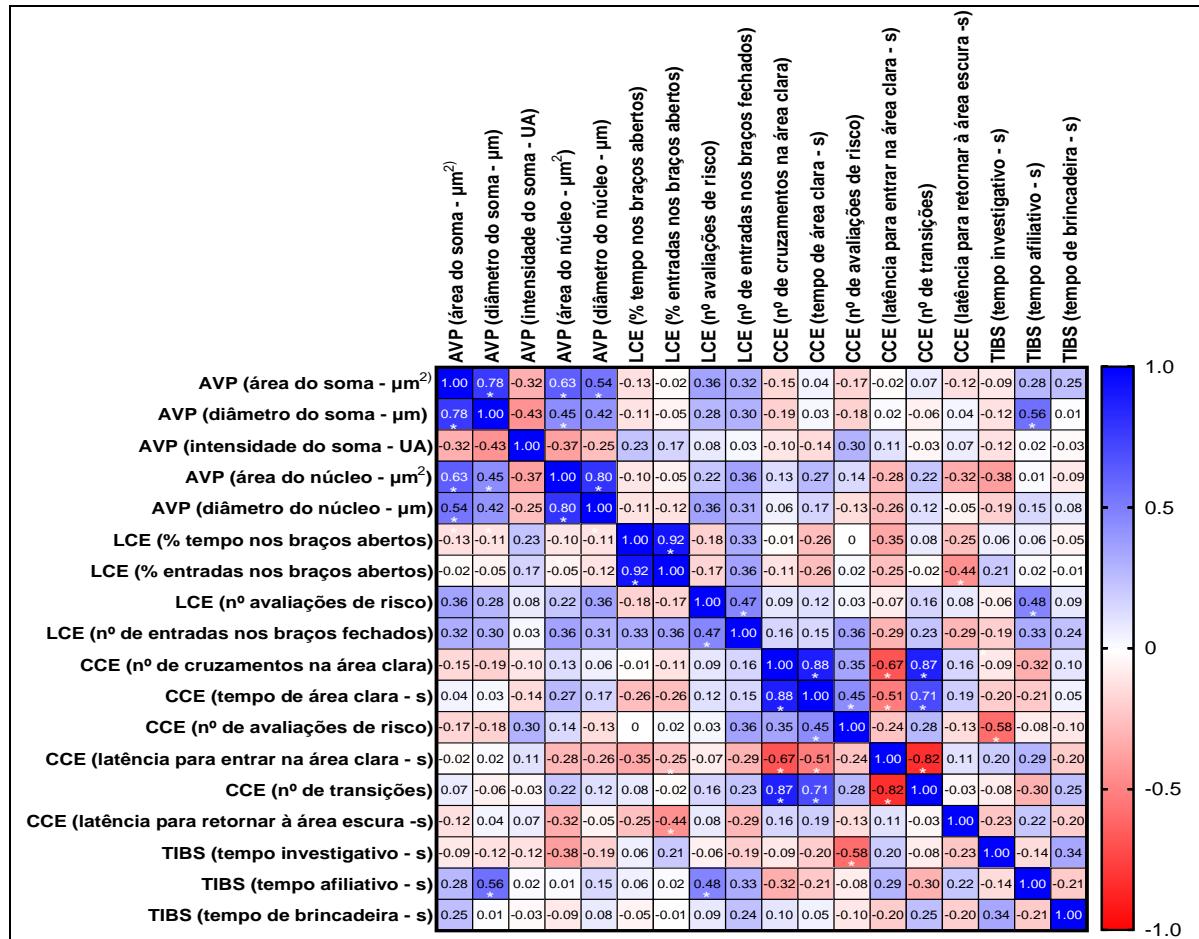
Na análise de correlação de Spearman, foi identificada uma correlação positiva entre a área do soma dos neurônios vasopressinérgicos e a área dos núcleos desses neurônios ( $r = 0,62$ ;  $R^2 = 0,40$ ;  $p = 0,002$ ), indicando que quanto maior a área do soma, maior a área do núcleo (Figura 36A). Não foram observadas diferenças significativas entre os *slopes* e os interceptos ao se comparar os grupos APP *vs.* AEP e Machos *vs.* Fêmeas.

Também foi identificada uma correlação positiva entre a intensidade de marcação do soma dos neurônios vasopressinérgicos e do soma dos neurônios ocitocinérgicos, sugerindo que quanto maior a intensidade de marcação dos neurônios vasopressinérgicos, maior a intensidade de marcação dos neurônios ocitocinérgicos ( $r = 0,44$ ;  $R^2 = 0,28$ ;  $p = 0,04$ ) (Figura 36B). Não foram observadas diferenças significativas nos *slopes* ou nos interceptos ao comparar os grupos APP *vs.* AEP e Machos *vs.* Fêmeas.



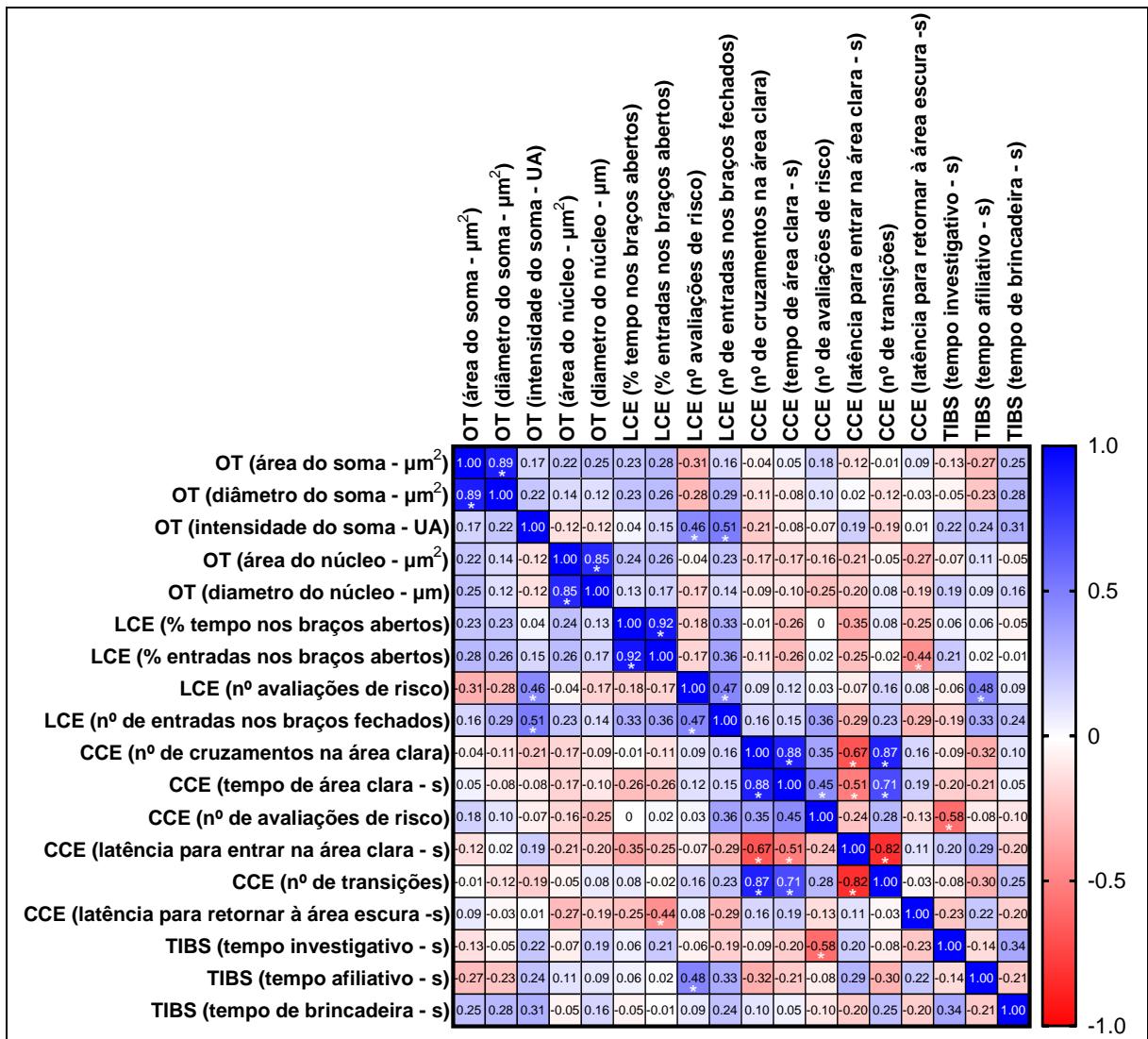
**Figura 36.** Correlações entre parâmetros morfológicos dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos dos animais adolescentes. (A) Correlação positiva entre a área do soma e a área do núcleo dos neurônios vasopressinérgicos (B) Correlação positiva entre a intensidade de marcação do soma dos neurônios vasopressinérgicos e a intensidade de marcação do soma dos neurônios ocitocinérgicos. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

A análise de correlação entre os parâmetros avaliados por imunofluorescência dos neurônios vasopressinérgicos e os resultados dos testes comportamentais estão no gráfico matriz de correlação e os valores do coeficiente de correlação ( $r$ ) estão mostrados na figura 37.



**Figura 37.** Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios vasopressinérgicos e os resultados dos testes comportamentais dos animais adolescentes. Dados analisados por correlação de Spearman,  $*p < 0,05$ .

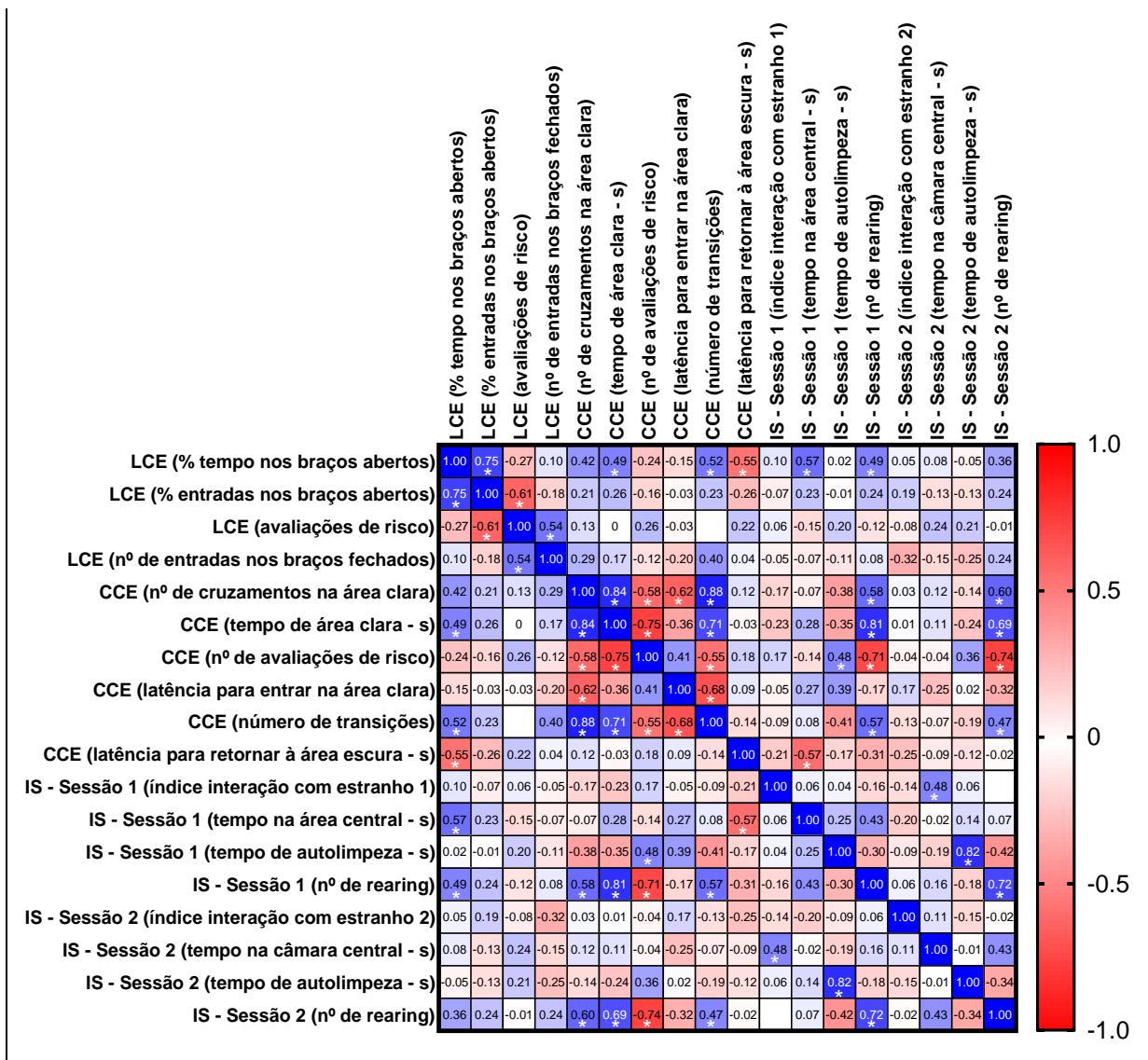
A análise de correlação entre os parâmetros avaliados por imunofluorescência dos neurônios ocitocinérgicos e os resultados dos testes comportamentais estão o gráfico matriz de correlação e os valores do coeficiente de correlação (r) estão mostrados na figura 38.



**Figura 37.** Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios ocitocinérgicos e os resultados dos testes comportamentais dos animais adolescentes. Dados analisados por correlação de Spearman, \* $p < 0.05$ .

#### 4.4.2 Adultos

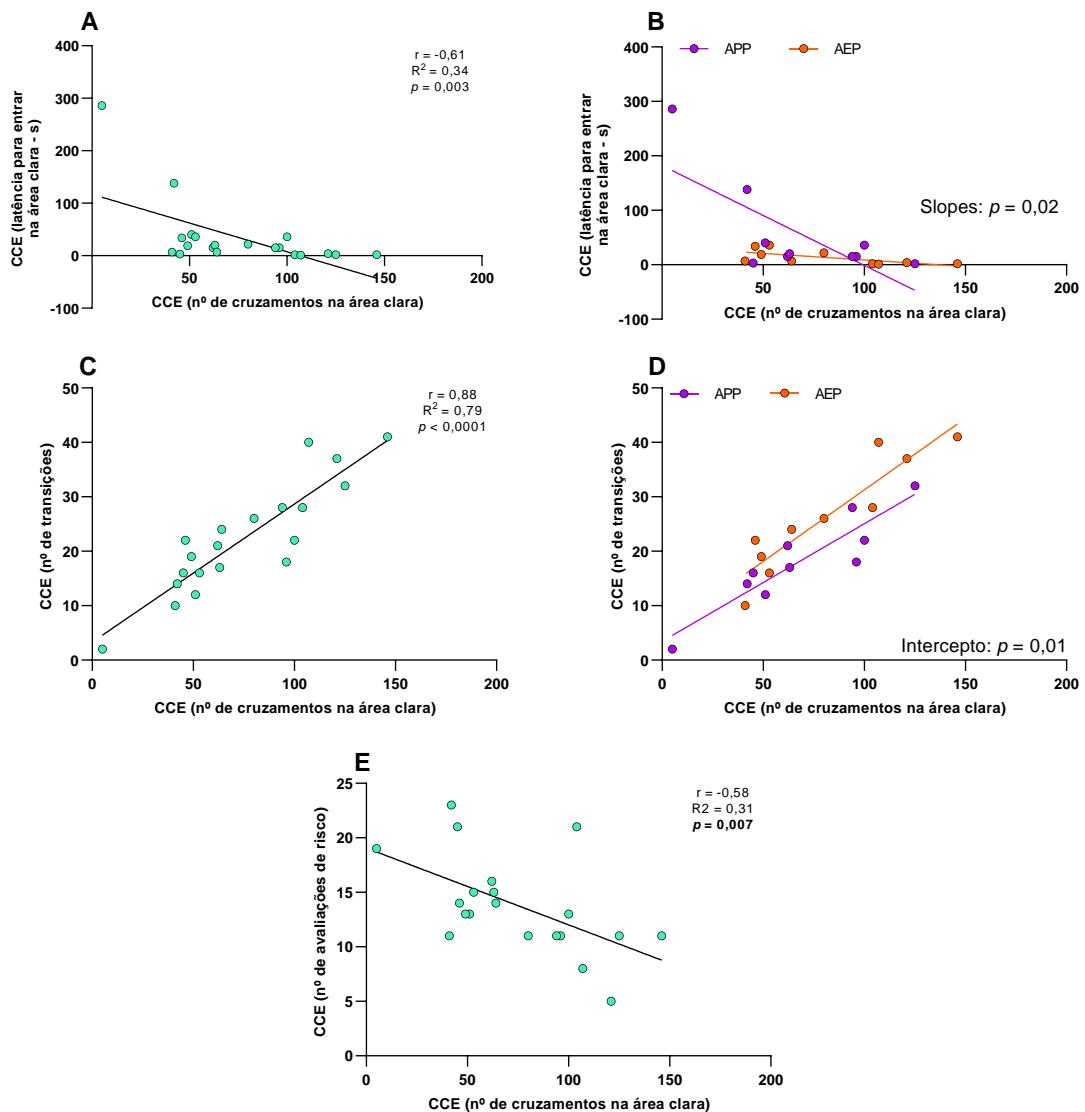
Inicialmente, foi realizada uma análise de correlação entre os parâmetros avaliados nos testes comportamentais, o gráfico matriz de correlação e os valores do coeficiente de correlação (r) estão mostrados na figura 38.



**Figura 38.** Matriz de correlação entre parâmetros analisados nos testes comportamentais dos animais adultos. Dados analisados por correlação de Spearman,  $*p < 0,05$ .

Na análise correlação entre os parâmetros avaliados na CCE, foi observada uma correlação negativa entre o número de cruzamentos na área clara e a latência para entrada nessa área pela primeira vez ( $r = 0,61$ ;  $R^2 = 0,34$ ;  $p = 0,003$ ) assim como o número de avaliações de risco ( $r = -0,58$ ;  $R^2 = 0,31$ ;  $p = 0,007$ ), sugerindo que mais um animal realizava cruzamentos, menor era sua latência para entrar nesse compartimento e menor o número de avaliações de risco (Figura 39A e 39E respectivamente). Adicionado a isso, na análise de regressão linear entre o número de cruzamentos e a latência para entrar na área clara, foi identificada diferença dos *slopes* entre os animais APP e AEP, indicando menor associação entre esses parâmetros nos animais AEP (Figura 39B). Devido a essa diferença, não foi possível verificar se há diferença significativa entre os interceptos.

Na análise entre o número de cruzamentos na área clara e o número de transições entre os compartimentos, foi observada uma correlação positiva ( $r = 0,88$ ;  $R^2 = 0,79$ ;  $p < 0,0001$ ), sugerindo que quanto mais um animal realizava cruzamentos neste compartimento, maior era o número de transições (Figura 39C). Quando realizada a regressão linear entre APP e AEP, foi verificada uma diferença significativa entre os interceptos ( $p = 0,01$ ), indicando que os animais de ambiente enriquecido apresentavam maior nível basal de transições (Figura 39D). Não foram observadas diferenças significativas entre os *slopes* e entre os interceptos ao se comparar os grupos Machos vs. Fêmeas.



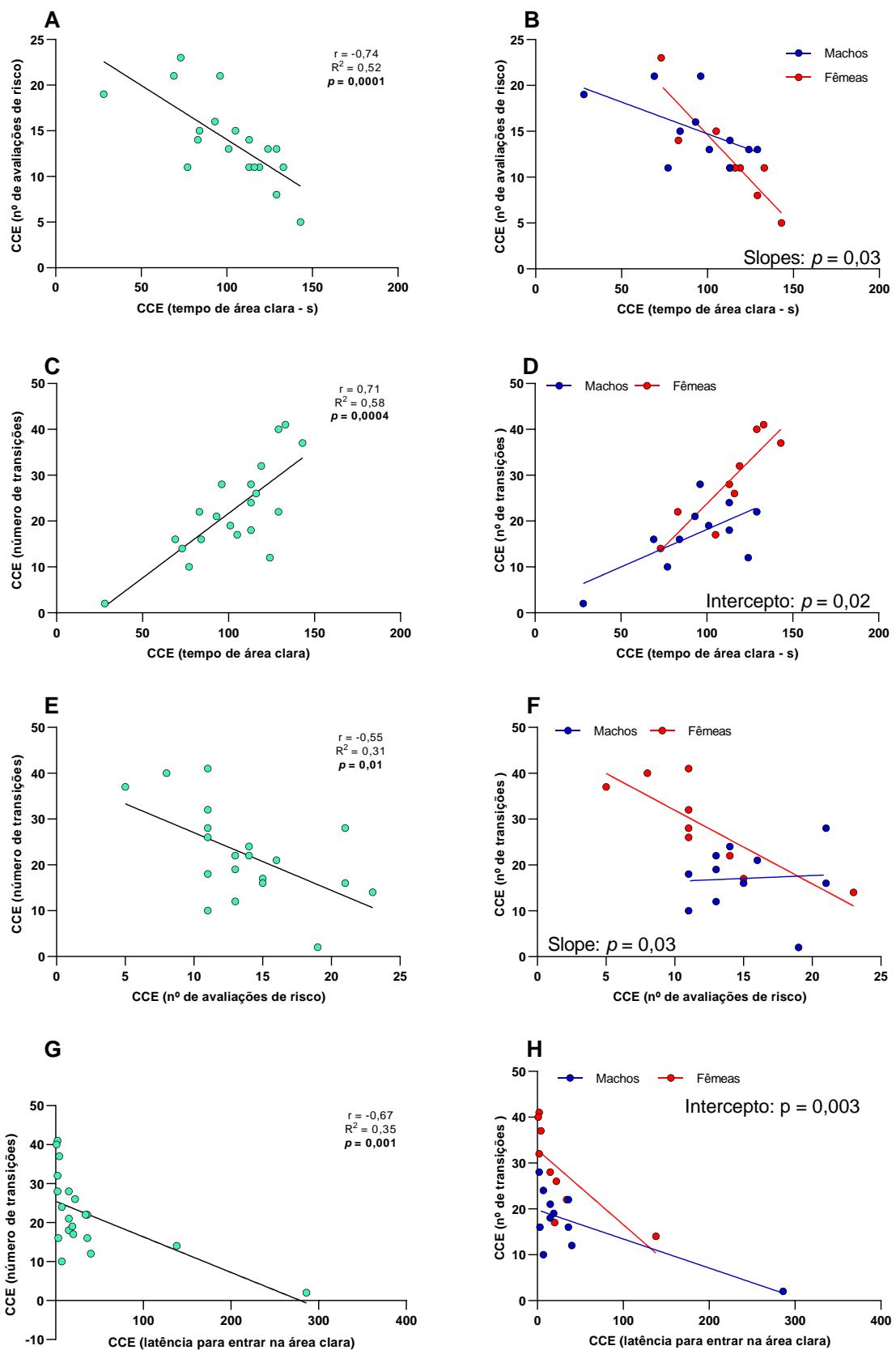
**Figura 39.** Correlações entre parâmetros comportamentais no teste da caixa claro-escuro (CCE) e o número de cruzamentos na área clara no teste da CCE dos animais adultos. (A) Correlação negativa entre o número de cruzamentos na área clara e a latência para a entrada nesse compartimento pela primeira vez. (B) Diferença significativa entre os *slopes* na comparação entre os grupos APP e AEP para a relação entre o número de cruzamentos na área clara e a latência para entrada na área clara. (C) Correlação positiva entre o número de cruzamentos na área clara e o número de transições entre os compartimentos. (D) Diferença significativa entre os interceptos na comparação entre os grupos APP e AEP para a relação entre o número de cruzamentos na área clara e o número de transições. (E) Correlação negativa entre o número de cruzamentos na área clara e o número de avaliações de risco. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

Na análise de correlação entre o tempo de área clara e o número de avaliações de risco na CCE, foi encontrada uma correlação negativa ( $r = -0,74$ ;  $R^2 = 0,52$ ;  $p = 0,0001$ ), indicando que quanto maior o tempo de permanência na área clara, menor era o número de avaliações de ricos que o animal realizava (Figura 40A). Na regressão linear entre Machos e Fêmeas, foi observada diferença entre os *slopes* ( $p = 0,03$ ), sugerindo uma maior associação entre esses parâmetros nas fêmeas (Figura 40B).

Entre o tempo de área clara e o número de transições foi observada uma correlação positiva ( $r = 0,71$ ;  $R^2 = 0,58$ ,  $p = 0,0004$ ), indicando quanto mais tempo um animal permanecia na área clara, mais transições entre os compartimentos ele realizava (Figura 40C). A análise de regressão linear entre Machos vs. Fêmeas, indicou uma diferença significativa entre os interceptos ( $p = 0,02$ ), sugerindo que os machos apresentavam um número basal de transições do que as fêmeas (Figura 40D).

Na análise entre o número de avaliações de risco e o número de transições foi observada uma correlação negativa ( $r = -0,55$ ;  $R^2 = 0,31$ ;  $p = 0,01$ ), indicando que quanto mais um animal realizava avaliações de risco, menos ele transitava entre os ambientes (Figura 40E). Na análise por regressão linear entre Machos e Fêmeas, houve uma diferença significativa entre os *slopes* ( $p = 0,03$ ), sugerindo que associação entre esses parâmetros era maior nos machos do que nas fêmeas (Figura 40F).

Na análise de correlação entre o tempo de latência para entrar na área clara e o número de transições entre os compartimentos da CCE, foi identificada uma correlação negativa ( $r = -0,67$ ;  $R^2 = 0,35$ ;  $p = 0,001$ ), sugerindo que os animais que mais demoravam para entrar pela primeira vez na área clara, realizavam menos transições (Figura 40G). Na regressão linear entre Machos e Fêmeas, foi identificada uma diferença entre os interceptos ( $p = 0,003$ ), indicando que o número basal de transições em relação ao tempo de latência para entrar na área clara era maior nas fêmeas (Figura 40H). Não foram observadas diferenças significativas nos *slopes* ou nos interceptos ao comparar os grupos APP vs. AEP.

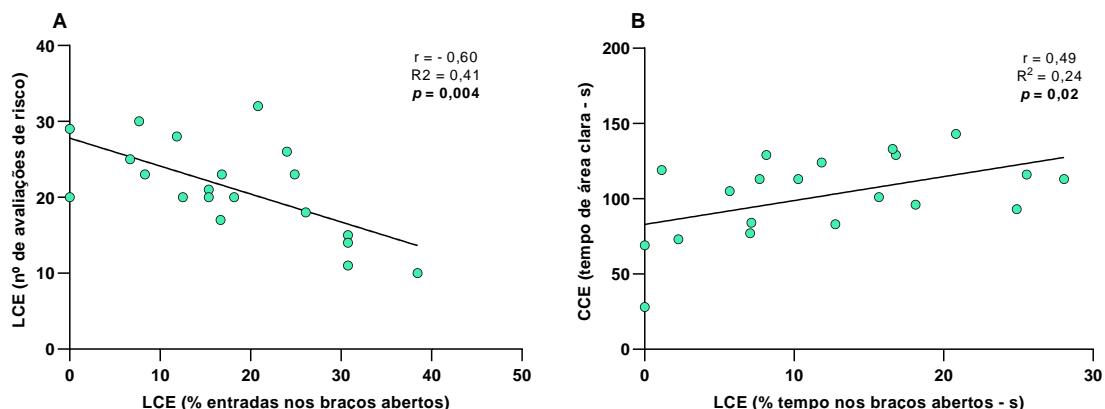


**Figura 40.** Correlações entre parâmetros comportamentais no teste da caixa claro-escuro (CCE) dos animais adolescentes. (A) Correlação negativa entre o tempo de permanência na área clara e o número de avaliações de risco. (B) Diferença significativa entre os *slopes* na comparação entre Machos e Fêmeas para a relação entre o tempo de área clara e o número de avaliações de risco. (C) Correlação positiva entre o tempo de permanência na

área clara e o número de transições entre os compartimentos. (D) Diferença significativa entre os interceptos na comparação entre Machos e Fêmeas para a relação entre o tempo na área clara e o número de transições. (E) Correlação negativa entre o número de avaliações de risco e o número de transições entre os compartimentos. (F) Diferença significativa entre os *slopes* na comparação entre Machos e Fêmeas para a relação entre o número de avaliações de risco e o número de transições. (G) Correlação negativa entre o tempo de latência para entrar na área clara e o número de transições entre os compartimentos. (H) Diferença significativa entre os interceptos na comparação entre Machos e Fêmeas para a relação entre o tempo de latência para entrada na área clara e o número de transições. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

Conforme mostrado na figura 41A, foi observado uma correlação negativa entre a % de entradas nos braços abertos no LCE e o número de avaliações de risco no mesmo teste ( $r = -0,60$ ;  $R^2 = 0,41$ ;  $p = 0,004$ ), indicando que quanto mais um animal permanecia nos braços abertos, menos avaliações de risco ele realizava. Não foram observadas diferenças significativas nos *slopes* ou nos interceptos ao comparar os grupos APP vs. AEP e Machos vs. Fêmeas.

Na análise de correlação entre os parâmetros dos testes da CCE e do LCE, foi observada correlação positiva entre a % de tempo despendido nos braços abertos do LCE o tempo de permanência na área clara na CCE ( $r = 0,49$ ;  $R^2 = 0,24$ ;  $p = 0,02$ ) (Figura 41B). Não foram observadas diferenças significativas entre os *slopes* e entre os interceptos ao se comparar os grupos APP vs. AEP e Machos vs. Fêmeas.



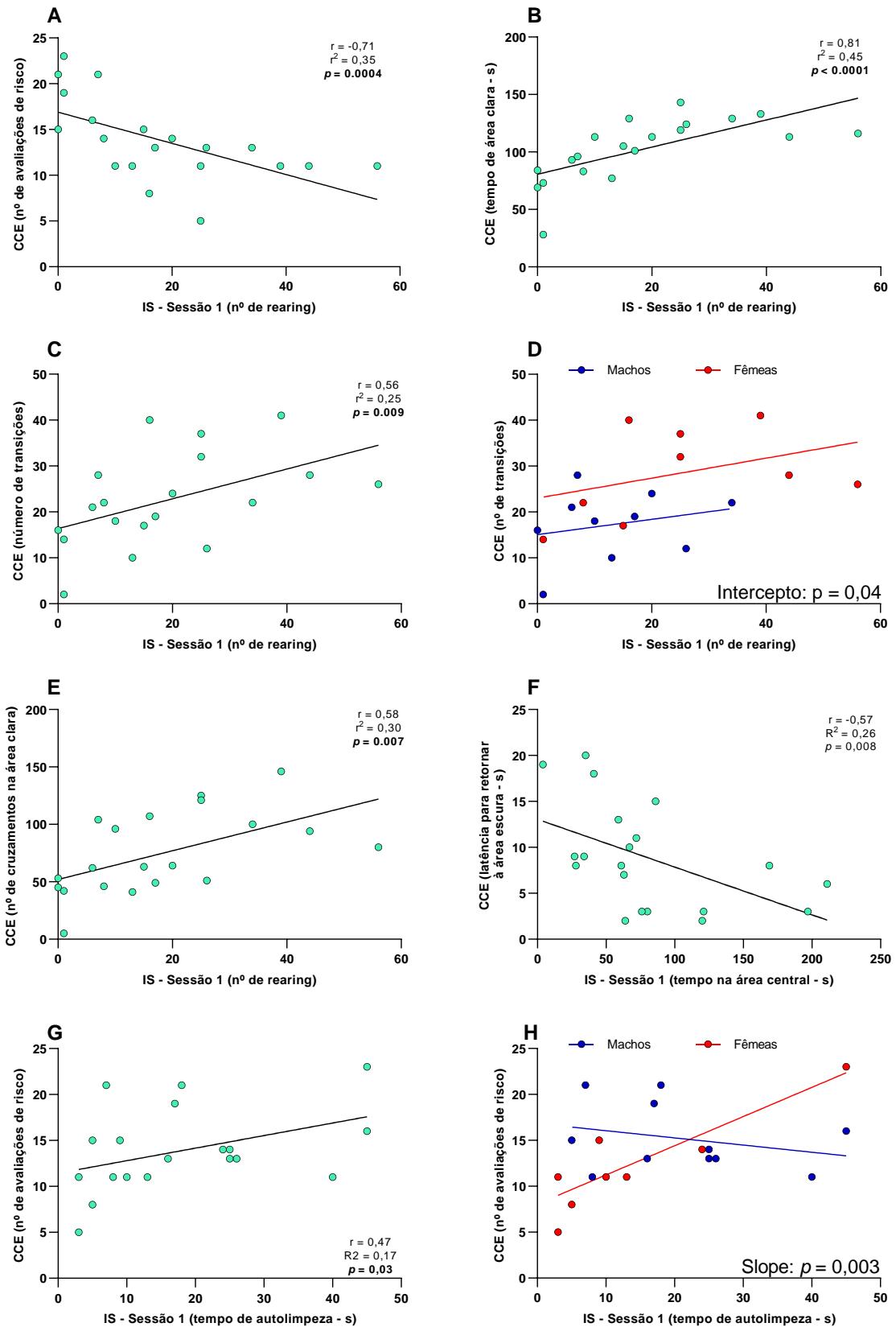
**Figura 41.** Correlações dos dados comportamentais do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e da caixa claro-escuro (CCE) dos animais adultos. (A) Correlação negativa entre a porcentagem de entradas nos braços abertos e o número de avaliações de risco no LCE, (B) Correlação positiva entre a porcentagem de tempo nos braços abertos no LCE e o tempo de permanência na área clara da CCE. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

Na análise de correlação entre os parâmetros avaliados no teste da CCE e no teste de IS dos animais adultos, foi observada uma correlação negativa entre o número de avaliações de risco (CCE) e o número de *rearings* na sessão 1 (teste de IS) ( $r = -0,71$ ;  $R^2 = 0,35$ ;  $p = 0,0004$ , figura 42A).

Conforme podemos observar nas figuras 42B, C e E, foi identificada correlação positiva entre o número de *rearing* na sessão 1 e o tempo de permanência na área clara, o número de transições entre os compartimentos e o número de cruzamentos na área clara da CCE ( $r = 0,81$ ;  $R^2 = 0,42$ ;  $p < 0,0001$ ,  $r = 0,56$ ;  $R^2 = 0,25$ ;  $p = 0,009$ ,  $r = 0,58$ ;  $R^2 = 0,30$ ;  $p = 0,007$  respectivamente). Não foram identificadas diferenças significativas entre os *slopes* e entre os interceptos ao se comparar os grupos APP vs. AEP e Machos vs. Fêmeas, exceto na comparação entre do número de *rearing* e o número de transições, onde foi observada diferença significativa entre os interceptos de Machos vs. Fêmeas ( $p = 0,04$ ), indicando que as fêmeas apresentavam um maior número basal de transições entre os compartimentos em comparação aos machos (Figura 42D).

Entre o tempo de permanência na área central no teste de IS e a latência para retornar ao compartimento escuro da CCE, foi observada uma correlação negativa sugerindo que os animais que mais permaneciam na área central do aparato do teste de IS, apresentavam menor latência para retornar à área escura da CCE ( $r = -0,57$ ;  $R^2 = 0,26$ ;  $p = 0,008$ , figura 42F).

Na análise entre o tempo de autolimpeza no teste de IS e o número de avaliações de risco na CCE, foi identificada uma correlação positiva ( $r = 0,47$ ;  $R^2 = 0,17$ ;  $p = 0,03$ ), sugerindo que os animais que realizam maior tempo de autolimpeza tendem a apresentar um maior número de avaliações de risco na CCE (figura 42G) e conforme podemos observar no gráfico 42H, a análise de regressão linear entre machos e fêmeas, identificou uma diferença significativa entre os *slopes* ( $p = 0,003$ ). Desta forma, nos machos, um aumento no tempo de autolimpeza não está associado a um aumento expressivo no número de avaliações de risco (*slope* = 0,07), enquanto nas fêmeas, o *slope* de 0,71 sugere que o tempo de autolimpeza tem um impacto maior na quantidade de avaliações de risco realizadas. Devido a essa diferença, não é possível afirmar se os interceptos se diferenciam significativamente.



**Figura 42.** Correlações dos dados comportamentais do teste de interação social (IS), sessão 1, e da caixa claro-escuro (CCE) dos animais adultos. (A) Correlação negativa entre o número de *rearing* no teste de IS e o número de avaliações de risco na CCE. (B) Correlação positiva entre o número de *rearing* no teste de IS e o tempo de permanência na área clara da CCE. (C) Correlação positiva entre o número de *rearing* no teste de IS e o número de transições entre os compartimentos da CCE. (D) Correlação negativa entre o tempo de permanência na área

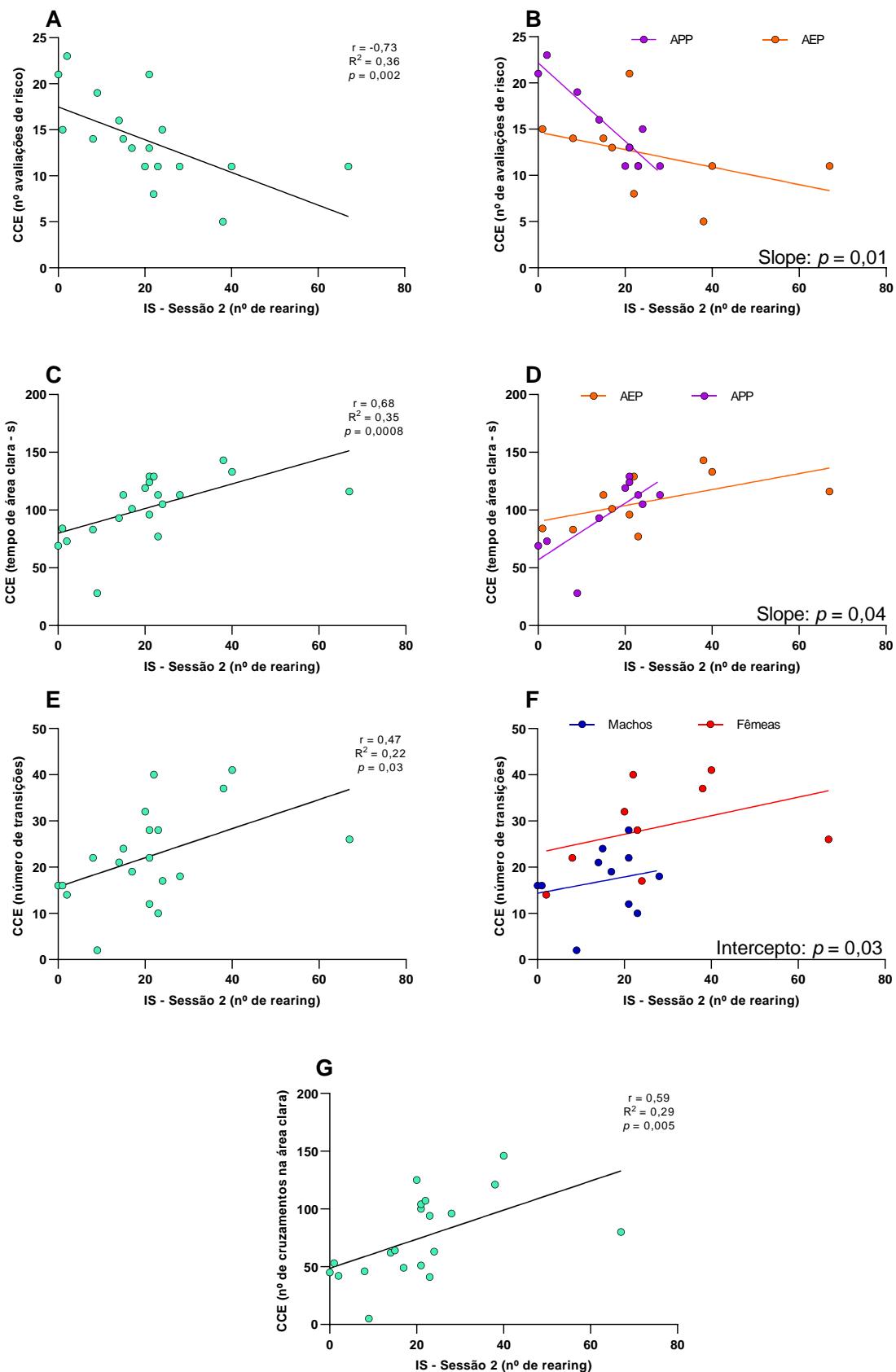
central no teste de IS e a latência para retornar ao compartimento escuro da CCE. (E) Correlação positiva entre o número de *rearing* no teste de IS e o número de cruzamentos na CCE (F) Correlação entre os grupos Machos e Fêmeas, demonstrando diferença significativa nos interceptos na correlação entre o número de *rearing* no teste de IS e o número de transições entre compartimentos na CCE. (G) Correlação positiva entre entre o tempo de autolimpeza do teste de IS e o número de avaliações de risco na CCE. (H) Correlação entre os grupos Machos e Fêmeas, demonstrando diferença significativa entre os *slopes* entre o tempo de autolimpeza no teste de IS e o número de avaliações de risco na CCE. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

Na análise de correlação do número de *rearing* da sessão 2 do teste de IS, foi identificada uma correlação negativa com o número de avaliações de risco na CCE ( $r = -0,73$ ;  $R^2 = 0,38$ ;  $p = 0,002$ ), sugerindo que quanto mais um animal realizava *rearing*, menos avaliações de risco ele fazia na CCE (Figura 43A). Na análise de regressão linear entre os grupos APP e AEP, foi demonstrado uma diferença significativa entre os *slopes* ( $p = 0,01$ ), sendo que nos animais do grupo enriquecido, o número de *rearing* tinha menos impacto sob o número de avaliações de risco (Figura 43B). Devido a essa diferença, não é possível afirmar se os interceptos se diferenciam significativamente.

Similarmente à sessão 1, na sessão 2 do teste de IS o número de *rearing* se correlaciona positivamente com o tempo de permanência na área clara da CCE ( $r = 0,68$ ;  $R^2 = 0,38$ ;  $p = 0,0008$ ; Figura 43C), demonstrando que quanto mais *rearing* um animal realizava, maior era o seu tempo de permanência no compartimento claro. Na análise de regressão linear entre os grupos APP e AEP, foi identificado uma diferença significativa entre os *slopes* ( $p = 0,04$ ), sugerindo que o número de *rearing* realizado por animais enriquecidos tem menos impacto sobre o tempo de permanência na área clara (Figura 43D). Devido a essa diferença, não é possível afirmar se os interceptos se diferenciam significativamente.

O número de *rearing* na sessão 2 do teste de IS também demonstrou correlação positiva com o número de transições realizadas no teste da CCE ( $r = 0,47$ ;  $R^2 = 0,22$ ;  $p = 0,03$ ), onde foi observado que quanto mais *rearing* o animal realizava, maior era o seu número de transições entre os compartimentos da caixa (Figura 43E). Na análise de regressão linear entre os grupos Machos e Fêmeas, foi identificado uma diferença significativa entre os interceptos ( $p = 0,03$ ), onde as fêmeas apresentavam um número basal de *rearing* maior do que os machos (Figura 43F). Não foram identificadas diferenças significativas entre os *slopes* e os interceptos ao se comparar os grupos APP vs. AEP.

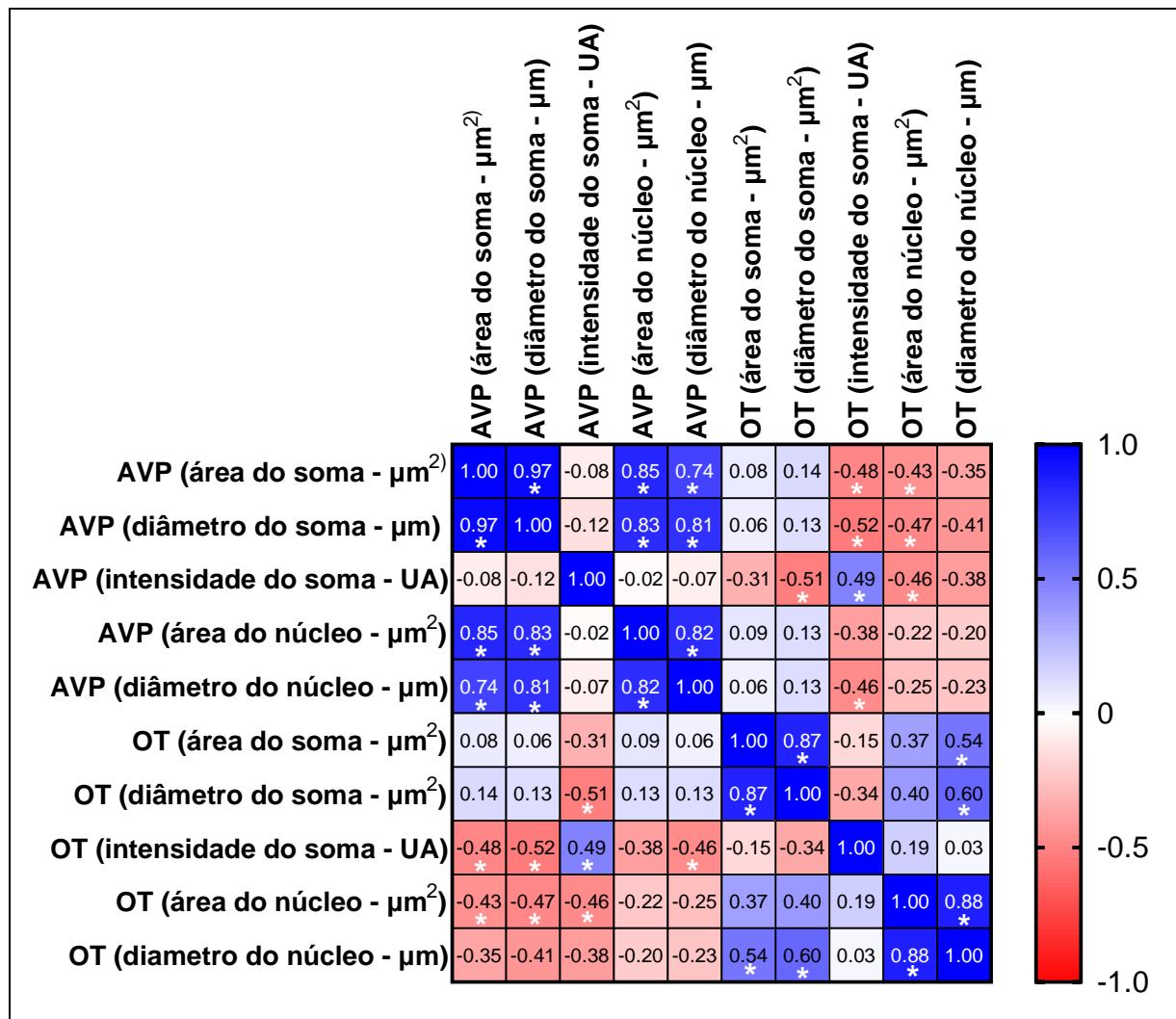
Conforme demonstrado na figura 43G, o número de *rearing* também apresentou correlação positiva com o número de cruzamentos na área clara da CCE ( $r = 0,59$ ;  $R^2 = 0,29$ ;  $p = 0,005$ ). Não foram identificadas diferença as significativas entre os *slopes* e entre os interceptos ao se comparar os grupos APP vs. AEP e Machos vs. Fêmeas.



**Figura 43.** Correlações entre o número de *rearing* na sessão 2 do teste de Interação Social (IS) e os parâmetros comportamentais avaliados na Caixa Claro-Escuro (CCE) dos animais adultos. (A) Correlação negativa entre o número de *rearing* do teste de IS e o número de avaliações de risco na CCE. (B) Diferença significativa entre os

*slopes* na regressão linear entre os grupos APP e AEP. (C) Correlação positiva entre o número de *rearing* do teste de IS e o tempo de permanência na área clara da CCE. (D) Diferença significativa entre os *slopes* entre os grupos APP e AEP o número de *rearing* no teste de IS e o tempo de permanência na área clara da CCE. (E) Correlação positiva entre o número de *rearing* e o número de transições entre os compartimentos da CCE. (F) Diferença significativa entre os interceptos dos grupos de machos e fêmeas entre o número de *rearing* no teste de IS e o número de transições entre os compartimentos da CCE (G) Correlação positiva entre o número de *rearing* no teste de IS e o número de cruzamentos na área clara da CCE. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

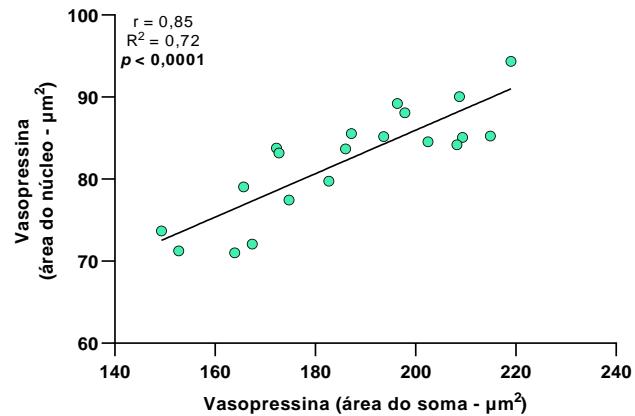
A matriz de correlação de Spearman e os valores do coeficiente de correlação (r) entre os parâmetros avaliados por imunofluorescência dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos está apresentada na figura 44.



**Figura 44:** Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos dos animais adultos. Dados analisados por correlação de Spearman, \* $p<0,05$ .

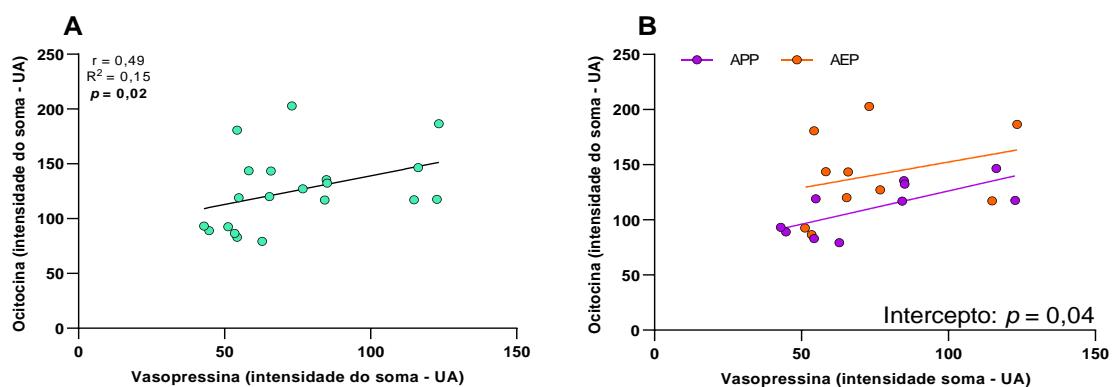
Na análise de correlação entre a área do soma dos neurônios vasopressinérgicos e área do núcleo desses neurônios, foi identificada uma correlação positiva ( $r = 0,85$ ;  $R^2 = 0,72$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando que quanto maior a área do soma, maior a área do respectivo núcleo (Figura 45A). Na comparação entre

os grupos APP *vs.* AEP e entre Machos *vs.* Fêmeas, não houve diferença entre os *slopes* e entre os interceptos.



**Figura 45:** Correlação positiva entre a área do soma e a área do núcleo dos neurônios vasopressinérgicos dos animais adultos. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

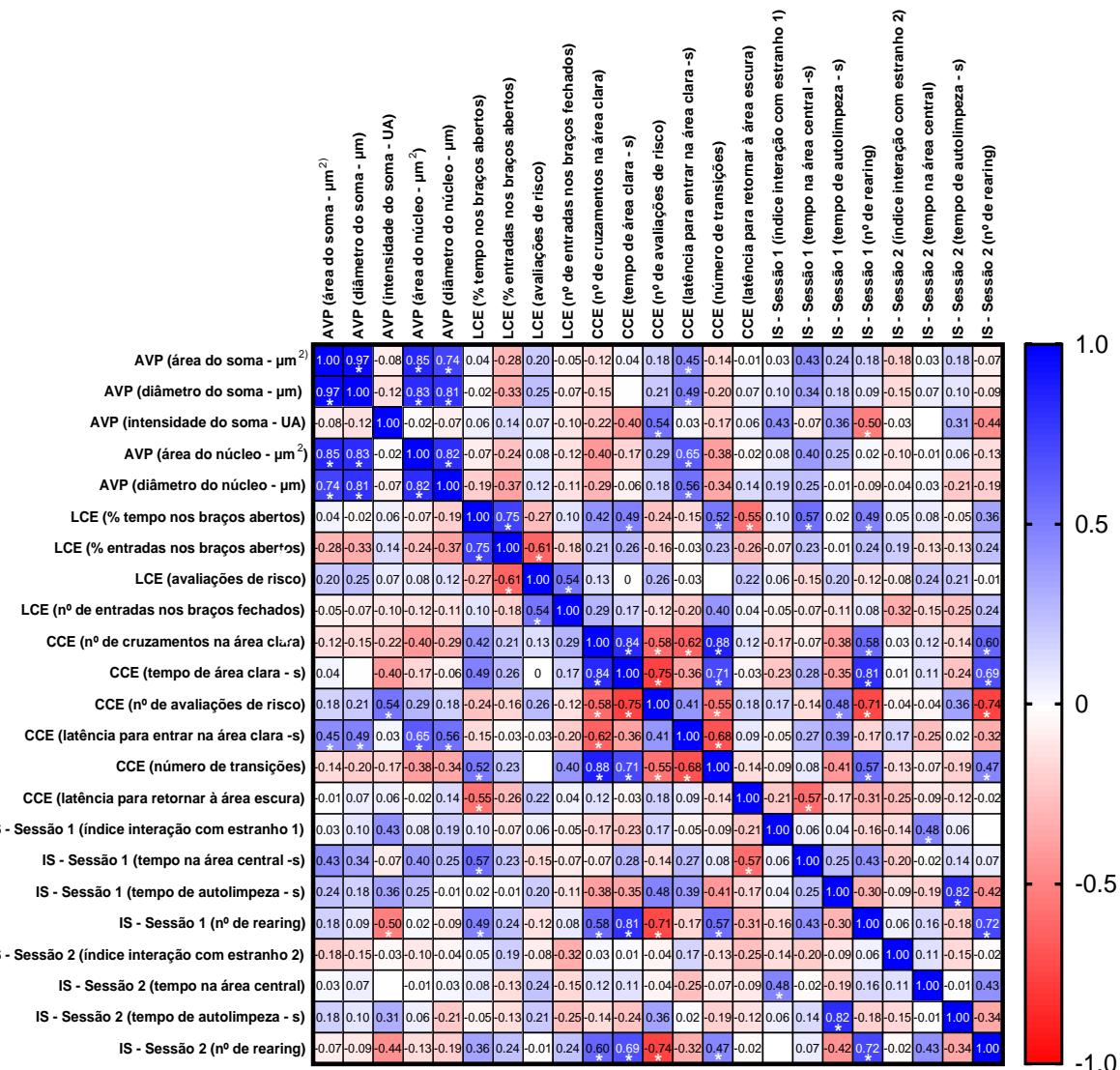
De forma similar aos animais adolescentes, nos adultos a análise de correlação de Spearman revelou uma correlação positiva entre a intensidade de marcação do soma dos neurônios vasopressinérgicos e dos neurônios ocitocinérgicos, indicando que quanto maior a intensidade de marcação vasopressinérgica, maior a intensidade de marcação dos neurônios ocitocinérgicos ( $r = 0,49$ ;  $R^2 = 0,15$ ;  $p = 0,02$ ) (Figura 46A). Na análise de regressão linear entre os grupos APP *vs.* AEP, foi identificada uma diferença significativa entre os interceptos ( $p = 0,04$ ), indicando que o grupo AEP apresentou uma intensidade basal maior de marcação dos neurônios ocitocinérgicos em comparação ao grupo APP (Figura 46B). Na comparação entre Machos *vs.* Fêmeas, não foram observadas diferenças significativas entre os *slopes* e os interceptos.



**Figura 46.** Correlação entre a intensidade de marcação dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos em animais adultos. (A) Correlação positiva entre a intensidade do soma dos neurônios vasopressinérgicos e dos

neurônios ocitocinérgicos. (B) Comparação entre os grupos APP e AEP, demonstrando a diferença significativa entre os interceptos. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

A matriz de correlação de Spearman e os valores dos coeficientes de correlação ( $r$ ) entre os parâmetros avaliados por imunofluorescência dos neurônios vasopressinérgicos e os resultados dos testes comportamentais está apresentada na figura 47.



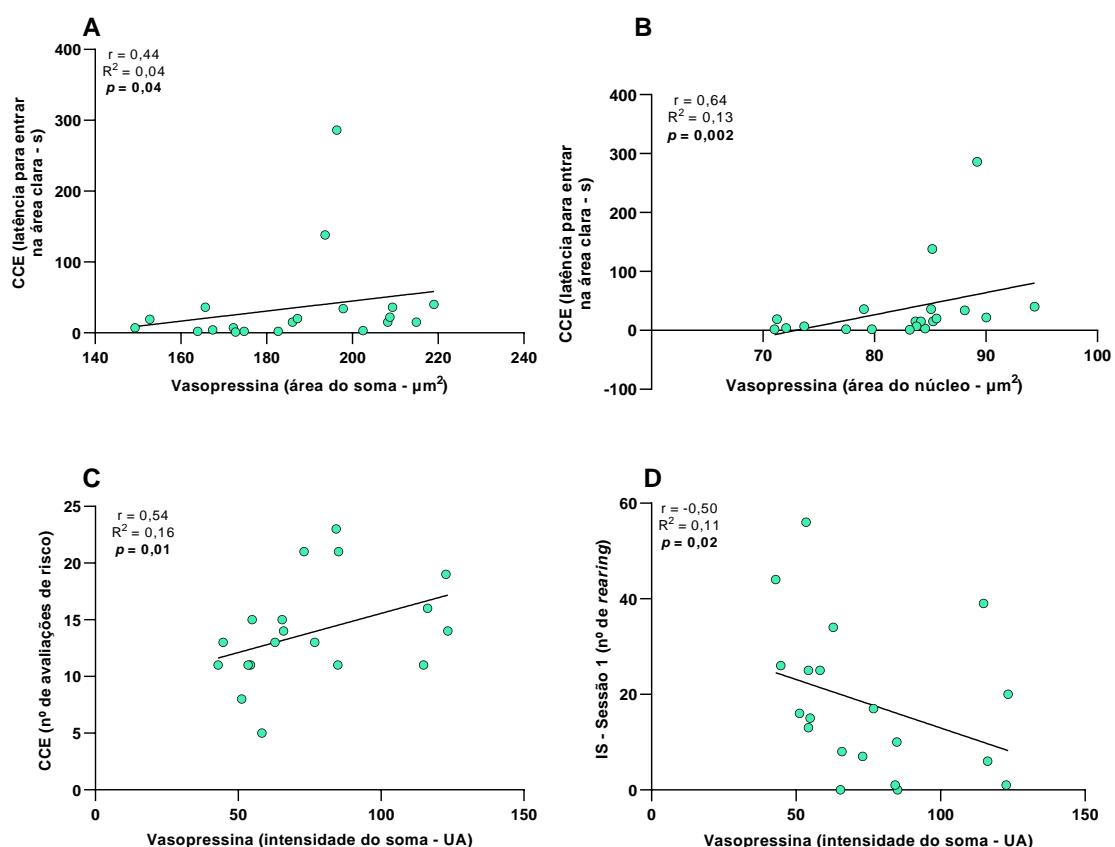
**Figura 47.** Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios vasopressinérgicos e os resultados dos parâmetros analisados dos testes comportamentais dos animais adultos. Dados analisados por correlação de Spearman,  $*p < 0,05$ .

Na análise de correlação entre a área do soma e do núcleo do neurônio vasopressinérgico e a latência para entrar na área clara da CCE foi observada uma correlação positiva ( $r = 0,44$ ;  $R^2 = 0,04$ ;  $p = 0,04$  e  $r = 0,64$ ;  $R^2 = 0,13$ ;  $p = 0,002$  respectivamente), sugerindo que quanto maior a área do soma e

do núcleo desses neurônios, mais o animal demorava para entrar na área clara (Figura 48A e B respectivamente). Na comparação entre os grupos APP vs. AEP e Machos vs. Fêmeas, de ambas análises, não houve diferença entre os *slopes* e os interceptos.

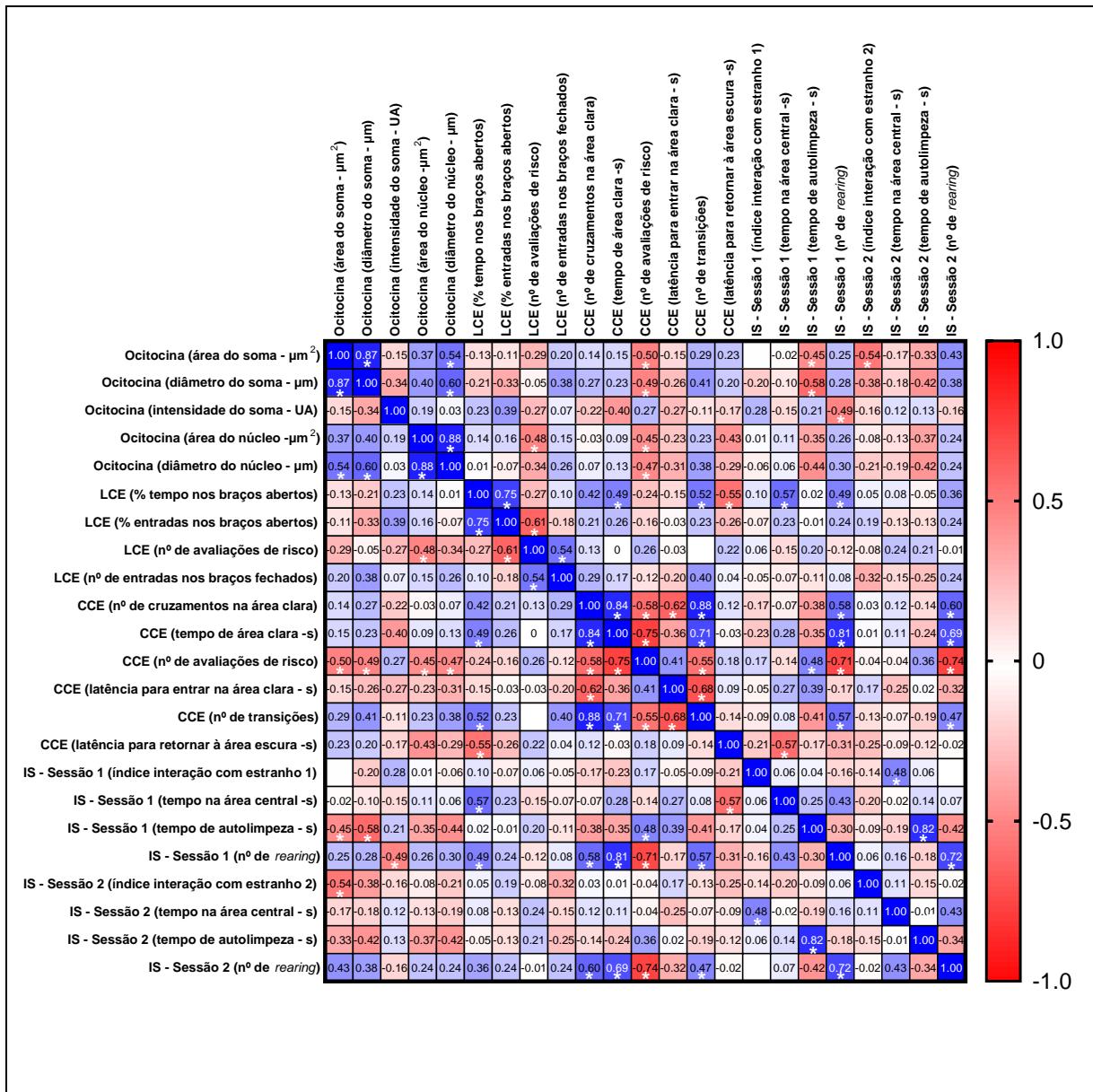
Similarmente, foi observada uma correlação positiva entre a intensidade do soma dos neurônios vasopressinérgicos e o número de avaliações de risco na CCE ( $r = 0,54$ ;  $R^2 = 0,16$ ;  $p = 0,01$ ), sugerindo que quanto maior intensidade do AVP apresentada pelo animal, maior era o número desse comportamento (Figura 48C). Na comparação entre os grupos APP vs. AEP, Machos vs. Fêmeas, não houve diferença entre os *slopes* e os interceptos.

No teste de IS, a análise demonstrou uma correlação negativa entre a intensidade de marcação do soma dos neurônios vasopressinérgicos e o número de *rearing* realizados na sessão 1 deste teste ( $r = -0,50$ ;  $R^2 = 0,11$ ;  $p = 0,02$ ), indicando que quanto maior for a intensidade de AVP, menor será a quantidade de *rearing* (Figura 48D). Na comparação entre os grupos APP vs. AEP, Machos vs. fêmeas, não houve diferença entre os *slopes* e os interceptos.



**Figura 48.** Correlação entre parâmetros analisados dos neurônios vasopressinérgicos e comportamentos no teste CCE e de interação social (IS) dos animais adultos. (A) Correlação positiva entre a área do soma dos neurônios vasopressinérgicos e a latência para entrada no compartimento claro da CCE. (B) Correlação positiva entre a área do núcleo dos neurônios vasopressinérgicos e a latência para entrada na área clara. (C) Correlação positiva entre a intensidade do soma dos neurônios vasopressinérgicos e o número de avaliações de risco no CCE. (D) Correlação negativa entre a intensidade do soma dos neurônios vasopressinérgicos e o número de *rearing*s realizados na sessão 1 do teste de IS. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

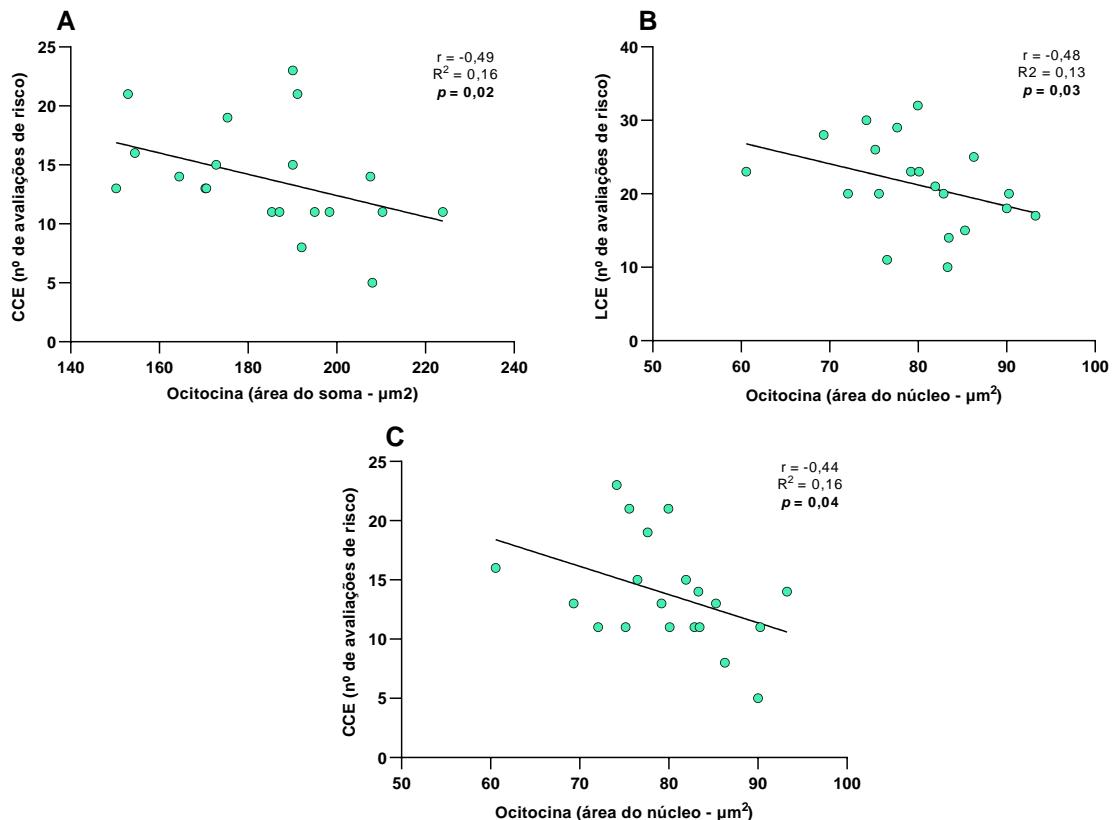
A análise de correlação entre os parâmetros avaliados por imunofluorescência dos neurônios ocitocinérgicos e os resultados dos testes comportamentais estão o gráfico matriz de correlação e os valores do coeficiente de correlação ( $r$ ) estão mostrados na figura 48.



**Figura 49.** Matriz de correlação entre parâmetros analisados por imunofluorescência entre os neurônios ocitocinérgicos e os resultados dos testes comportamentais dos animais adultos. Dados analisados por correlação de Spearman,  $*p < 0,05$ .

Na análise de correlação entre os neurônios ocitocinérgicos e os testes comportamentais, foi identificada correlação negativa entre a área do soma e o número de avaliações de risco no teste da CCE ( $r = -0,49$ ;  $R^2 = 0,16$ ;  $p = 0,02$ ), sugerindo que, quanto maior a área do soma desses neurônios, menor o número de avaliações de risco o animal realizava (Figura 50A). De forma semelhante, foi identificada correlação negativa entre a área do núcleo do neurônio ocitocinérgico e o número de avaliações de risco no LCE ( $r = -0,48$ ;  $R^2 = 0,13$ ,  $p = 0,03$ ) e no

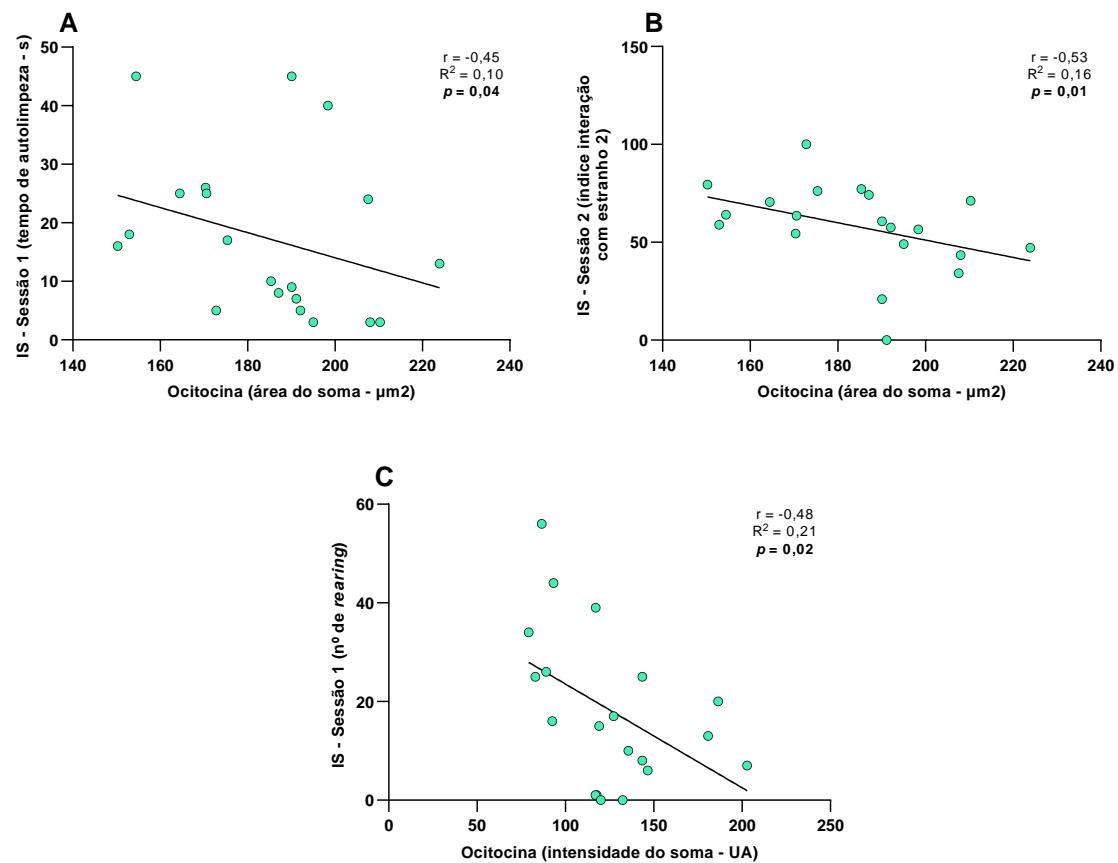
teste da CCE ( $r = -0,44$ ;  $R^2 = 0,16$ ;  $p = 0,04$ ), demonstrando que quanto maior a área do núcleo, menor a quantidade de avaliações de risco os animais realizam nesses testes (Figuras 50B e 52C respectivamente). Na comparação entre APP vs. AEP não houve diferença entre os *slopes* e os interceptos, assim como na comparação entre Machos vs. Fêmeas.



**Figura 50.** Correlações entre os parâmetros dos neurônios ocitocinérgicos e os comportamentos nos testes da caixa claro-escuro (CCE) e do labirinto em cruz elevado (LCE) dos animais adultos. (A) Correlação negativa entre a área do soma dos neurônios ocitocinérgicos e o número de avaliações de risco no teste da CCE. (B) Correlação negativa entre a área do núcleo dos neurônios ocitocinérgicos e o número de avaliações de risco no LCE. (C) Correlação negativa entre a área do núcleo dos neurônios ocitocinérgicos e o número de avaliações de risco na CCE. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

Na análise da correlação entre os parâmetros dos neurônios ocitocinérgicos e os comportamentos no teste de IS, foi identificada correlação negativa entre a área do soma e o tempo de autolimpeza na sessão 1 ( $r = -0,45$ ;  $R^2 = 0,10$ ;  $p = 0,04$ ), indicando que quanto maior a área do soma, menor o tempo de autolimpeza realizado pelo animal (Figura 51A). Também foi identificada uma correlação negativa entre a área do soma e o índice de interação com o estranho 2 (sessão 2) ( $r = -0,53$ ;  $R^2 = 0,16$ ;  $p = 0,01$ ), sugerindo que animais com maior área do soma apresentaram menor índice de interação social com o estranho 2 (Figura 51B). Além disso, observou-se uma correlação negativa entre a intensidade do soma ocitocinérgico e o número de *rearing* ( $r = -0,48$ ;  $R^2 = 0,21$ ;  $p = 0,02$ ), sugerindo que maior intensidade de marcação

está associada a um menor número de *rearing* realizados pelo animal (Figura 51C). Na comparação entre os grupos APP vs. AEP e Machos vs. Fêmeas, não foram encontradas diferenças significativas nos *slopes* e entre os interceptos.



**Figura 51.** Correlações entre os parâmetros dos neurônios ocitocinérgicos e os comportamentos no teste de interação social (IS) dos animais adultos. (A) Correlação negativa entre a área do soma e o tempo de autolimpeza na sessão 1. (B) Correlação negativa entre a área do soma dos neurônios ocitocinérgicos e o índice de interação com o estranho 2 (sessão 2). (C) Correlação negativa entre a intensidade do soma ocitocinérgico e o número de *rearing* na sessão 1. Dados analisados por correlação de Spearman e regressão linear.

## 5 DISCUSSÃO

## 5.1 Avaliação comportamental

O período perinatal é uma importante fase de desenvolvimento do sistema nervoso central e é altamente sensível às variações ambientais, contudo, poucos estudos têm investigado os impactos do enriquecimento ambiental promovido durante todo esse período, que abrange desde a concepção até o desmame. No presente trabalho, o EA foi realizado de forma espacial, e estrutural (físico-estático). Este protocolo adotado se diferencia dos encontrados na literatura, exceto pelo já realizado anteriormente em nosso laboratório (Silva-Almeida et al., 2024).

No presente trabalho investigamos inicialmente os efeitos promovidos pelo EA perinatal sob os comportamentos sociais e do tipo ansioso em curto e longo prazo.

### 5.1.1 Adolescentes

Na avaliação da interação e brincadeira social dos animais adolescentes, os animais enriquecidos demonstraram aumento de comportamentos pró-sociais, destacando-se os comportamentos de solicitação de brincadeira. Este tipo de teste em camundongos adolescentes enriquecidos ambientalmente está presente de forma limitada na literatura o que dificulta a análise comparativa. Em um estudo, foi demonstrado que o EA durante o período pré-natal é capaz de aumentar os comportamentos sociais de brincadeira em ratos machos adolescentes (ZUENA et al., 2016). E Sparling et al. (2018) relataram que o EA pré e pós-natal era capaz de aumentar os comportamentos sociais em ratos machos e fêmeas adolescentes (SPARLING; BAKER; BIELAJEW, 2018). Neste sentido, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os efeitos benéficos do EA perinatal sobre os comportamentos sociais em roedores adolescentes.

Conforme proposto por Terranova e Laviola, (1995) e Thor & Holloway (1984), o aumento de interações sociais em roedores jovens indicam possível avanço ontogênico podendo ser atribuído a um aumento das capacidades sensório-motoras (LIVIA TERRANOVA; LAVIOLA, 1995b; THOR; HOLLOWAY, 1984).

De fato, o EA tem sido amplamente associado à melhora das capacidades cognitivas, de forma que é capaz de estimular o neurodesenvolvimento. Esse efeito é atribuído à presença de objetos com diferentes formatos e texturas, além de maior liberdade de movimentação proporcionada pelo espaço disponível nesse tipo de ambiente (CANCEDDA et al., 2004; CÁRDENAS et al., 2015; GOLDSTEIN et al., 2021). No entanto, é importante considerar que o EA também pode estimular diretamente o comportamento social, por ser capaz de promover plasticidade social, que é a capacidade de adaptar interações sociais com base em experiências

anteriores. Essa adaptação ocorre devido à complexidade presente em ambientes enriquecidos, que favorecem maior interação entre os indivíduos (GUBERT; HANNAN, 2019).

Para avaliarmos o perfil de comportamentos ansiosos e a atividade exploratória nos animais AEP, utilizamos dois testes, o LCE e a CCE

No teste do LCE, os animais adolescentes do grupo AEP não diferiram dos animais APP, exceto pelo aumento no número de entradas nos braços fechados, um indicativo de maior atividade locomotora (RODGERS' AND et al., 1995). No teste do CCE, o enriquecimento ambiental não foi capaz de promover alterações significativas nos parâmetros avaliados.

Semelhante aos nossos resultados, estudos mostram que o EA em períodos iniciais de vida não parece alterar o comportamento ansioso em animais adolescentes. Por exemplo, em Mao et al. (2020), o EA realizado durante duas semanas, a partir do PND 30, não alterou o comportamento de camundongos machos no teste da CCE (MAO et al., 2020). De forma similar, Maikoo et al. (2022) relataram que ratos machos enriquecidos entre os PNDs 22 e 26 não apresentaram diferenças comportamentais em comparação ao grupo controle durante a adolescência nesse mesmo teste. Contudo, é interessante comentar que neste mesmo trabalho, o EA foi capaz de reduzir os níveis de ansiedade em ratos machos adolescentes que haviam sido submetidos a estresse pré e pós-natal, reduzindo os níveis basais de corticosterona, indicando possíveis efeitos de resiliência ao estresse promovidos pelo EA (MAIKOO; WILKINS; QULU, 2022).

Por outro lado, alguns estudos apresentam resultados divergentes. Por exemplo, Whitaker et al. (2016) observaram que camundongos adolescentes machos e fêmeas da expostos ao EA nos períodos pré e pós-natal apresentaram redução no comportamento ansioso (WHITAKER et al., 2016), enquanto em Li et al. (2016), foi observado aumento dos níveis de ansiedade em ratos enriquecidos do nascimento até o desmame (LI; LUND; VOIGT, 2016). Similarmente, Connors et al. (2015) e Sparling et al. (2018) relataram que ratos submetidos ao EA nos períodos pré e pós-natal exibiram um perfil ansioso durante a puberdade (CONNORS et al., 2015; SPARLING; BAKER; BIELAJEW, 2018). Além disso, Rosenfeld e Weller (2012) demonstraram que o EA exclusivamente no período pré-natal também pode induzir comportamento ansioso em ratos adolescentes (ROSENFELD; WELLER, 2012).

Um achado relevante no nosso trabalho, é que as fêmeas adolescentes, independente do ambiente a qual foram submetidas durante o período perinatal, no teste do CCE apresentaram aumento no número de cruzamentos na área clara, maior número de transições entre os compartimentos e menor latência para entrarem no compartimento claro pela primeira vez. O

aumento nas transições e na distância percorrida na área clara, sem alteração no tempo de permanência nesse compartimento, são indicadores de maior atividade exploratória (BOURIN; HASCOËT, 2003). Por outro lado, a redução na latência para entrar no compartimento claro, um ambiente considerado aversivo, pode indicar um menor índice de ansiedade (COSTALL et al., 1989). No entanto, como os outros parâmetros relacionados à ansiedade, como o tempo de permanência na área clara e comportamentos de avaliação de risco não foram alterados, podemos sugerir que essa redução na latência esteja associada principalmente ao aumento da atividade exploratória (CHAOUOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997).

É importante destacar a influência das flutuações dos hormônios sexuais durante o ciclo estral no desempenho de fêmeas em testes comportamentais, que pode interferir na interpretação dos resultados (ROCKS; CHAM; KUNDAKOVIC, 2022). No entanto, os animais avaliados neste estudo estavam no período pré-puberal, caracterizado pelo início do amadurecimento do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, mas ainda sem o estabelecimento do ciclo estral, o que impossibilita uma análise sob essa perspectiva (BELL, 2018; BRUST; SCHINDLER; LEWEJOHANN, 2015).

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o enriquecimento ambiental espacial-estrutural durante todo o período perinatal é eficaz em promover um aumento nos comportamentos sociais em camundongos adolescentes, sem, contudo, impactar os níveis de ansiedade em contextos não sociais. Além disso, esse tipo de enriquecimento também demonstrou a capacidade de aumentar a atividade locomotora e exploratória, sugerindo efeitos positivos sobre aspectos gerais do comportamento.

### **5.1.2 Adultos**

No teste de IS (sessão 1), os animais enriquecidos não se diferenciaram significativamente no tempo de interação com o estranho 1, assim como não se diferenciaram na preferência pela novidade social (sessão 2). Em ambas as sessões, os animais AEP apresentaram aumento no número de *rearing* sem alterar o tempo de autolimpeza e tempo despendido na área central, indicando um aumento na atividade exploratória sem relação com comportamentos relativos à ansiedade em contexto social (KIM et al., 2019).

Semelhante aos nossos resultados, Sparling et al. (2018) demonstraram que o EA físico e social aplicado no período pré e pós-natal, até a fase peripuberal, aumentou os comportamentos sociais em ratos adolescentes, mas não teve impacto nos comportamentos sociais na idade adulta (SPARLING; BAKER; BIELAJEW, 2018). Por outro lado, em Zheng

et al. (2020) foi demonstrado que o EA físico e social, mantido desde o primeiro dia pós-natal até a idade adulta é capaz de promover um aumento significativo da sociabilidade em camundongos adultos (ZHENG et al., 2020).

Esses resultados, alinhados aos dados da presente pesquisa, sugerem que o EA perinatal pode gerar efeitos de curto prazo nos comportamentos sociais aumentando a sociabilidade dos animais adolescentes, mas que estes efeitos não persistem ao longo da vida.

Quando realizamos o teste do LCE durante a fase adulta, os animais enriquecidos demonstraram redução do comportamento ansioso, onde apresentaram significativo aumento no tempo e no número relativo de entradas nos braços abertos, assim como redução do número de avaliações de risco. Esses resultados são semelhantes ao estudo anteriormente realizado em nosso laboratório, onde os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de enriquecimento e tiveram redução dos comportamentos ansiosos (SILVA-ALMEIDA et al., 2024). Contudo, essa redução dos comportamentos ansiosos neste teste foi mais evidente nos machos, pois nos parâmetros de número relativo de entradas nos braços abertos e número de avaliações de risco, o EA provocou alterações comportamentais apenas nos animais deste sexo.

No teste da CCE realizado durante a fase adulta, os animais enriquecidos demonstraram redução no tempo de latência para deixarem a área escura e explorarem a área clara pela primeira vez e um aumento de transições entre os ambientes. Estes resultados sugerem uma maior atividade exploratória combinada com a desinibição em explorar novos ambientes, sem de fato indicarem redução da ansiedade (BOURIN; HASCOËT, 2003; CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997; COSTALL et al., 1989).

Poucos estudos exploraram os efeitos do EA nos períodos iniciais de vida sem a interação com outras variáveis além do ambiente padrão. Dentre os estudos que tiveram como foco o EA em condições basais, algumas pesquisas indicaram que o EA realizado em ratos, aplicado durante os períodos pré e pós-natal, não altera o comportamento ansioso na idade adulta (FISCH et al., 2017; SPARLING; BAKER; BIELAJEW, 2018). Além disso, outros estudos apontaram um efeito ansiogênico do EA quando implementado exclusivamente no período pré-natal (ROSENFELD; WELLER, 2012; ZUENA et al., 2016). Mas é importante observar que enquanto no nosso protocolo o enriquecimento é de caráter físico/estático com baixo grau de instabilidade e ausência de hiperestimulação, apenas com aumento da área da caixa e com presença de objetos simples mas propícios a exploração e nidação, estes trabalhos citados utilizaram maior (ROSENFELD; WELLER, 2012; SPARLING; BAKER; BIELAJEW, 2018; ZUENA et al., 2016) ou menor (FISCH et al., 2017) complexidade.

Por outro lado, estudos têm demonstrado os efeitos benéficos do EA sobre o comportamento ansioso em animais submetidos a estresse. Corredor et al. (2022) demonstraram que ratos submetidos a uma combinação de estresse pré e pós-natal apresentaram redução nos comportamentos ansiosos quando expostos a um enriquecimento de forrageio entre os PND 28 e 49 (CORREDOR et al., 2022). De forma semelhante, alguns estudos relataram que animais submetidos a estresse de separação materna, quando criados em um ambiente social e fisicamente enriquecido após o desmame, exibiram menores níveis de comportamento ansioso na fase adulta (DANDI et al., 2018; JI; JIANG; XIA, 2022). Adicionado a isso, em camundongos submetidos a estresse pré-natal, o EA físico após o desmame também foi eficaz em reduzir os comportamentos ansiosos nos animais adultos (RAZAVINASAB et al., 2022; ZHANG et al., 2022).

Uma limitação do nosso trabalho, é determinar se os efeitos comportamentais promovidos pelo enriquecimento ambiental são devido à sua exposição no período pré ou pós-natal e se esses efeitos são de forma direta (filhote-ambiente) ou indireta (ambiente-mãe-filhote).

Durante o período pré-natal, fase crítica do desenvolvimento, fatores ambientais como estresse, restrição nutritiva e ativação imune promovem alterações fisiológicas no corpo materno sendo capazes de alterar o desenvolvimento do embrião. A interação entre ambiente e genes podem modular a organização e plasticidade de diferentes sistemas do feto em desenvolvimento, como sistema nervoso central e endócrino, e são determinantes para respostas ao estresse ao longo da vida, desde o comportamento, resiliência ao estresse, ou até mesmo no desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas (ABBOTT et al., 2018; BOCK et al., 2015; VAN DEN BERGH et al., 2020).

E durante o período pós-natal (pré-desmame), não podemos descartar a possibilidade de que as diferenças comportamentais dos filhotes enriquecidos em relação aos filhotes de ambiente padrão podem ter sido devido a alterações do comportamento maternal em relação à prole. De fato, os estudos indicam que o EA é capaz de aumentar significativamente a maioria dos comportamentos de cuidados maternais (CURLEY et al., 2009; MOREIRA et al., 2019; SALE et al., 2004). Mas por outro lado, alguns estudos demonstram que pode reduzir o tempo de presença no ninho (CONNORS et al., 2015; LI; LUND; VOIGT, 2016). Estes trabalhos variam no tipo de enriquecimento (físico e/ou social), e essas diferenças de comportamento materno se justificam pelas diferenças nestes protocolos que mimetizam o ambiente natural, onde a mãe pode despender mais tempo em atividades como forrageio e exploração, podendo

permanecer menos tempo no ninho (CONNORS et al., 2015). Mas por outro lado, as mães enriquecidas apresentam maior qualidade nos cuidados maternais como amamentação com as costas arqueadas, limpando e lambendo os filhotes, além de demonstrarem a capacidade de construir ninhos com maior complexidade (SPARLING et al., 2020). Além disso, em um estudo anterior em nosso laboratório, utilizando o mesmo protocolo de enriquecimento, foi verificado que as mães enriquecidas durante a gestação e o período de amamentação exibiam maior comportamento de cuidado com os filhotes, com redução evidente dos comportamentos ansiosos da prole (JOBIM, 2016).

Outro fator importante a se considerar, é que, ao nascimento, camundongos são extremamente imaturos, com capacidade apenas de detectar sinais táticos, térmicos e olfatórios. São totalmente dependentes da mãe, da qualidade do ninho e da posição na ninhada para manterem sua temperatura. O sistema auditivo se desenvolve completamente somente por volta do PND13, no mesmo período da abertura dos olhos. Após essa fase, junto com o desenvolvimento das capacidades motoras, os camundongos já começam a explorar o ambiente. Somente por volta do PND21, adquirem total independência da mãe e já podem se alimentar exclusivamente de alimentos sólidos (BRUST; SCHINDLER; LEWEJOHANN, 2015). Visto que em nosso trabalho os animais foram retirados do ambiente enriquecido logo após o desmame (PND21), percebe-se que a interação direta filhote-ambiente com total desenvolvimento das capacidades sensório-motoras, foi por um período curto (PND13 ao PND21), comparando-se ao tempo de enriquecimento ao qual a mãe foi submetida ao EA (cerca de 50 dias), assim como o tempo em que os filhotes ficaram sob os cuidados maternos (cerca de 21 dias).

Portanto, observando-se o delineamento do nosso protocolo experimental, podemos sugerir que os efeitos benéficos do EA perinatal sobre o comportamento de camundongos adolescentes e adultos, podem ser em grande parte devido ao enriquecimento das mães, modulando o desenvolvimento fetal, assim como melhorando a qualidade dos cuidados maternos.

## **5.2 Análise dos neurônios vasopressinérgicos e octocinérgicos do PVN**

Neuropeptídeos hipotalâmicos, como AVP e OT, estão envolvidos no comportamento desde o início da vida até a idade adulta (HAMMOCK, 2015; KOROSI; BARAM, 2008; SOUMIER et al., 2022). O estabelecimento das redes neurais vasopressinérgicas e octocinérgicas, assim como a expressão desses hormônios e seus receptores é modulada através

da experiência e estudos recentes tem demonstrado que fatores ambientais nos períodos perinatais, como estresse, agentes infecciosos e má nutrição, são capazes de promover alterações nesses sistemas que podem persistir durante toda vida (BREACH et al., 2024; WEI et al., 2021a, 2021b).

Portando, para investigarmos se o EA perinatal é capaz de promover alterações nos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do PVN, realizamos análises morfométricas e da intensidade de marcação através da técnica de imunofluorescência, nos animais experimentais no período da adolescência e na idade adulta.

### **5.2.1 Neurônios vasopressinérgicos**

Na análise dos neurônios vasopressinérgicos dos adolescentes, os animais do grupo AEP não se diferiram em relação aos animais APP. Por outro lado, na avaliação dos animais adultos, o EA perinatal demonstrou evidente efeito sobre a área e diâmetro do soma desses neurônios, que se apresentavam menores que dos animais APP. Contudo, foi identificada interação entre os fatores sexo e ambiente nestes dois parâmetros, demonstrando que o EA perinatal tem efeito apenas sobre os machos. Resultado semelhante foi observado em relação aos respectivos núcleos, onde apenas os machos enriquecidos apresentavam menor área e diâmetro.

Uma questão a se comentar sobre os resultados encontrados nos neurônios vasopressinérgicos dos machos adultos, é que, apesar do soma e núcleo reduzidos, não foram encontradas diferenças em relação aos níveis de AVP no soma. Por outro lado, neurônios com soma e núcleos maiores são possíveis indicadores de maior atividade por terem uma maior demanda metabólica e capacidade de síntese e armazenamento, e consequentemente um maior número de organelas como mitocôndrias, retículos endoplasmáticos, complexos golgiense e ribossomos (LUCASSEN et al., 1994; VAN DEN POL, 2012). Portanto, nossos resultados podem indicar um efeito reducional na atividade de neurônios vasopressinérgicos, contudo um estudo mais aprofundado seria necessário para verificar se esse aumento de atividade está realmente relacionado a maior expressão e síntese de AVP.

Estudos que investigam os efeitos do EA, sendo ele físico ou social, sobre o sistema vasopressinérgico são limitados e podemos citar apenas dois trabalhos que demonstram que o EA pode modular esse sistema de maneira significativa em roedores. Curley et al. (2009) observaram que o EA, na forma de ninho comunal, reduziu os níveis de receptores de V1aR no SL de camundongos fêmeas (machos não foram avaliados) (Curley et al., 2009). E Prounis et al. (2018) demonstraram que o EA (físico e social) aplicado logo após o desmame reduziu os

níveis de V1aR em diversas regiões do encéfalo em machos *prairie voles* (*Microtus ochrogaster*), incluindo a MeA, hipotálamo ventrolateral, NLET e núcleo supraquiasmático, mas não promoveu alterações nas fêmeas (PROUNIS; THOMAS; OPHIR, 2018).

Por outro lado, estudos destacam como o estresse em períodos iniciais da vida pode influenciar o sistema vasopressinérgico de forma duradoura. Por exemplo, Alcántara-Alonso et al. (2017) observaram que estresse de separação maternal aumenta a expressão de AVP no PVN e os níveis plasmáticos de vasopressina em machos adultos (fêmeas não foram avaliadas) (ALCÁNTARA-ALONSO et al., 2017). De maneira semelhante, Veenema et al. (2007) identificaram um aumento nos níveis de vasopressina no PVN de machos adultos, sem alterações detectadas em fêmeas (VEENEMA; BREDEWOLD; NEUMANN, 2007). Já o estudo de Zhang et al. (2012) identificou um aumento na expressão de RNA mensageiro de AVP em machos tanto na fase pré-puberal quanto na fase adulta (fêmeas não foram avaliadas) (ZHANG et al., 2012). Esses achados indicam que a modulação do sistema vasopressinérgico causada por estressores precoces pode ter efeitos de longo prazo, com alterações que podem persistir até a vida adulta, podendo ser sexo-dependentes.

Um ponto a ser discutido é que apesar de observarmos efeitos do EA perinatal sobre os neurônios vasopressinérgicos dos animais adultos, na adolescência não identificamos diferenças. Fazendo uma análise do delineamento experimental, a eutanásia e perfusão para coleta dos encéfalos ocorreu quando os animais tinham entre 36 e 41 dias de vida. Exatamente neste período, ocorre o pico de testosterona em camundongos machos (BELL, 2018). A testosterona centralmente interage com receptores androgênicos presentes em neurônios vasopressinérgicos e estimula a expressão gênica desse neuropeptídeo, o que poderia ter levado a um aumento da atividade desses neurônios nos animais enriquecidos, removendo uma possível diferença entre os grupos (TSUDA; YAMAGUCHI; OGAWA, 2011; VIAU et al., 1999).

### **5.2.2 Neurônios ocitocinérgicos**

Na análise morfométrica e da intensidade de marcação dos neurônios ocitocinérgicos dos animais adolescentes foi identificado aumento significativo da área e diâmetro do soma dos animais submetidos ao EA perinatal. De forma similar, nos adultos o EA perinatal foi capaz de promover o aumento da área e do diâmetro dos núcleos dos neurônios ocitocinérgicos além de aumentar os níveis de ocitocina no soma neuronal. Estes resultados sugerem a capacidade do

EA perinatal modificar a atividade dos neurônios ocitocinérgicos durante o período da adolescência persistindo até a idade adulta.

Corroborando nossos resultados, diversos estudos demonstram que o EA nos períodos iniciais de vida é capaz de modular no sistema ocitocinérgico a curto e a longo prazo. Por exemplo, Curley et al. (2009) demonstraram que o EA social e físico durante os períodos pré e pós-natal aumentou a ligação de ocitocina aos seus receptores em diversas regiões encefálicas, incluindo o SL, o NLET e o córtex insular, em camundongos fêmeas adolescentes (CURLEY et al., 2009). Neal et al. (2018) identificaram que o EA físico pós-desmame elevou a porcentagem de imunorreatividade para ocitocina no PVN de ratos machos adolescentes (NEAL et al., 2018). Além disso, Wei, Li, et al. (2021) demonstraram que o EA social e físico pós-desmame aumentou o número de neurônios ocitocinérgicos no PVN de machos adultos (WEI et al., 2021a), e Wei, Zhang, et al. (2021) observaram resultados semelhantes em fêmeas adultas (WEI et al., 2021b).

Por outro lado, estímulos estressantes durante os períodos iniciais da vida podem modular o sistema ocitocinérgico de diferentes maneiras, dependendo do tipo e momento do estresse. Por exemplo, Oreland et al. (2010) demonstraram que o estresse pós-natal, como a separação maternal, reduz os níveis de ocitocina dos neurônios do PVN durante a adolescência (ORELAND; GUSTAFSSON-ERICSON; NYLANDER, 2010). De maneira semelhante, De Souza et al. (2013) observaram que o estresse pré-natal, induzido por restrição materna, diminui o número de neurônios ocitocinérgicos no PVN dos filhotes quando atingem a idade adulta (DE SOUZA et al., 2013). Em contraste, Tsuda et al. (2011) relataram que a separação maternal no período pós-natal aumentou os níveis de ocitocina no PVN de animais na adolescência, evidenciando respostas diversas do sistema ocitocinérgico frente a diferentes tipos de estresse (TSUDA; YAMAGUCHI; OGAWA, 2011).

Outro dado importante encontrado em nosso trabalho, é o tamanho aumentado e a redução na intensidade de marcação dos neurônios ocitocinérgicos das fêmeas adultas em relação aos machos. Já foi definido que existem diferenças sexo dependente na arquitetura do sistema ocitocinérgico (como o padrão das projeções, número de neurônios contidos no PVN, assim como a distribuição dos receptores) (DUMAIS; VEENEMA, 2016; FREDA et al., 2022). Contudo, apesar da síntese de OT ser maior em fêmeas (VEENEMA; BREDEWOLD; DE VRIES, 2013), diferente dos nossos achados, trabalhos anteriores não identificaram diferenças morfométricas entre machos e fêmeas (CHEN et al., 2022; MINHAS et al., 2016).

Apesar de não termos avaliado a fase do ciclo estral a qual as fêmeas se encontravam no momento dos testes, sabe-se que os níveis plasmáticos de estrógenos apresentam flutuações de acordo com diferentes fases e são capazes de influenciar a atividade dos neurônios ocitocinérgicos estimulando a transcrição e a síntese de ocitocina assim como do seu receptor (DE KOCK et al., 2003; QUINTANA et al., 2024; ROSALIE GREER et al., 1986; YANG et al., 2014). Contudo, ainda não há estudos que investiguem alterações morfométricas em neurônios ocitocinérgicos em diferentes fases do ciclo estral de camundongos. Portanto, se torna interessante um estudo aprofundado sobre o dimorfismo sexual sobre a morfologia dos neurônios ocitocinérgicos além de possíveis diferenças ao longo do ciclo estral para melhor esclarecer o perfil dessa espécie.

### **5.3 Análise de correlação**

Considerando a complexidade do envolvimento da AVP e da OT nos comportamentos emocionais e sociais, a realização de análises de correlação se mostrou essencial para explorar possíveis associações entre eles. A AVP e a OT desempenham papéis cruciais na regulação do comportamento, de forma que alterações na atividade dos neurônios que sintetizam esses neuropeptídos podem refletir em respostas comportamentais. Assim, ao correlacionar os resultados encontrados neste trabalho, buscamos reforçar a robustez dos resultados além de compreender melhor a relação entre os parâmetros comportamentais e dados obtidos por imunofluorescência.

#### **5.3.1 Comportamento**

A análise das correlações entre os parâmetros comportamentais nos testes realizados em animais adolescentes e adultos revelou associações entre medidas relacionadas à avaliação de comportamentos do tipo ansioso na CCE. Observamos que animais que permaneciam por mais tempo na área clara e realizavam mais cruzamentos nesse comportamento apresentavam menor latência para entrar nessa área e menor número de avaliações de risco. Além disso, no animais adultos, identificamos que a porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE também estava positivamente associada ao tempo de permanência na área clara da CCE, enquanto o aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos se correlacionava com a redução do número de avaliações de risco. Esses achados reforçam a interdependência entre diferentes medidas na avaliação dos comportamentos ansiosos.

Também foi possível, principalmente nos animais adultos, observar correlações entre parâmetros indicativos de comportamento exploratório e ansiedade, sugerindo que um maior

nível de exploração está inversamente associado a indicadores de ansiedade. Isso foi evidenciado pela correlação positiva entre o número de transições entre os compartimentos e o aumento do tempo e dos cruzamentos na área clara, bem como pela correlação negativa entre o número de transições e a latência para entrar na área clara, número de avaliações de risco na CCE. Essas análises também revelaram diferenças comportamentais entre machos e fêmeas, sugerindo que o padrão de comportamento é sexo-dependente.

Nos animais adultos, também identificamos correlações significativas entre parâmetros indicativos dos níveis de ansiedade nos testes da CCE e IS, onde o aumento do tempo de permanência na área central do teste de IS estava relacionado a uma menor latência para retornar à área escura da CCE, enquanto um maior tempo de autolimpeza no teste de IS foi associado a um número aumentado de avaliações de risco na CCE.

De forma semelhante, identificamos correlações entre parâmetros indicativos de comportamento exploratório e ansiosos nos testes de IS e CCE. Observamos que um maior número de *rearing* no teste de IS estava associado à redução do número de avaliações de risco e da latência para entrar na área clara pela primeira vez. Além disso, o aumento do número de *rearing* correlacionou-se com um maior tempo e número de cruzamentos na área clara da CCE, bem como com um aumento no número de transições entre os compartimentos.

### **5.3.2 Imunofluorescência vs. comportamento**

Na análise de correlação, tanto nos animais adolescentes quanto nos animais adultos, foi observado que o aumento da área do soma dos neurônios vasopressinérgicos está relacionado a um aumento na área dos respectivos núcleos. Além disso, foi observado que o aumento dos níveis de vasopressina está relacionado a um aumento dos níveis de ocitocina no soma neuronal. E nos animais adultos enriquecidos foi identificado maiores níveis basais de ocitocina.

A AVP está associada ao aumento dos níveis de ansiedade, e evidências sugerem que a elevação de sua expressão no PVN, bem como sua ligação aos receptores específicos, estão relacionadas a um fenótipo comportamental mais ansioso (BAYERL; HÖNIG; BOSCH, 2016; MURGATROYD et al., 2004; WOTJAK et al., 2001; ZHANG et al., 2012). Em nosso estudo, nos animais adultos, a análise de correlação revelou que o aumento da área do soma e do núcleo dos neurônios vasopressinérgicos está associado a um maior tempo de latência para entrar no compartimento claro da CCE. Além disso, foi observado que quanto maior a intensidade de marcação de vasopressina no soma, maior era o número de avaliações de risco na CCE

apresentado pelo animal (BOURIN; HASCOËT, 2003; CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997). Além disso, no teste de IS realizado no nosso estudo, os animais enriquecidos apresentaram um aumento nos comportamentos exploratórios, evidenciado pelo maior número de *rearings*. E em nossa análise de correlação, foi identificado que o aumento dos níveis de vasopressina está associado à redução dos episódios de *rearing*, reforçando o entendimento sobre os efeitos inibitórios da AVP sobre a atividade exploratória conforme observado no estudo de Škopková et al (1987) (ŠKOPKOVÁ et al., 1987).

O aumento dos níveis de OT tem sido associado à redução da ansiedade por meio da modulação da síntese e liberação de neurotransmissores como glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA) (AYERS et al., 2011; KNOBLOCH et al., 2012; SABIHI et al., 2017; YOSHIDA et al., 2009), além de modular a atividade do eixo HHA (WINTER; JUREK, 2019). Em nossa análise de correlação, nos adultos observamos que o aumento da área do soma dos neurônios ocitocinérgicos está associado à redução do número de avaliações de risco no teste da CCE. De forma semelhante, o aumento da área do núcleo desses neurônios correlacionou-se à diminuição do número de avaliações de risco tanto na CCE quanto no LCE. Além disso, também foi observado que o aumento da área do soma ocitocinérgico está correlacionado com a redução do tempo de autolimpeza no teste de IS. Tanto a redução no número de avaliações de risco nos testes da CCE e da LCE assim como a redução no tempo de autolimpeza no teste de IS são indicadores de menor perfil ansioso (BOURIN; HASCOËT, 2003; CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997; CRAWLEY, 2004; LISTER, 1987).

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que o enriquecimento ambiental perinatal exerce efeitos significativos sobre o comportamento e a morfometria dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo.

Observamos que o EA perinatal promove um aumento dos comportamentos sociais e da atividade locomotora em animais adolescentes. Nos animais adultos, além de promover aumento a atividade exploratória, o enriquecimento ambiental perinatal foi capaz de reduzir comportamentos ansiosos, sendo esse efeito mais evidente nos machos.

O enriquecimento ambiental perinatal induziu um aumento da área e do diâmetro do soma dos neurônios ocitocinérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo em animais adolescentes. Nos machos adultos, foi observada uma redução da área e do diâmetro do soma e do núcleo dos neurônios vasopressinérgicos. Além disso, o EA perinatal aumentou a intensidade de marcação do soma dos neurônios ocitocinérgicos do PVN em animais adultos, acompanhada por um aumento na área e no diâmetro do núcleo dessas células.

Os dados também evidenciam correlações entre os comportamentos exploratórios e do tipo ansioso dentro do mesmo teste comportamental e entre os testes do labirinto em cruz elevado, teste da caixa claro-escuro e teste de sociabilidade e preferência pela novidade social. Além disso, identificamos correlações entre os comportamentos ansiosos e exploratórios e a morfometria dos neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do PVN.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, P. W. et al. Prenatal stress and genetic risk: How prenatal stress interacts with genetics to alter risk for psychiatric illness. *Psychoneuroendocrinology*, v. 90, p. 9–21, 1 abr. 2018.

ADHIKARI, A. Distributed circuits underlying anxiety. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 8, n. APR, p. 82707, 1 abr. 2014.

ALCÁNTARA-ALONSO, V. et al. Altered functionality of the corticotrophin-releasing hormone receptor-2 in the hypothalamic paraventricular nucleus of hyperphagic maternally separated rats. *Neuropeptides*, v. 63, p. 75–82, 1 jun. 2017.

ALLEN, A. J.; LEONARD, H.; SWEDO, S. E. Current Knowledge of Medications for the Treatment of Childhood Anxiety Disorders. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, v. 34, n. 8, p. 976–986, 1 ago. 1995.

AYERS, L. W. et al. Oxytocin Reduces Background Anxiety in a Fear-Potentiated Startle Paradigm: Peripheral vs Central Administration. *Neuropsychopharmacology* 2011 36:12, v. 36, n. 12, p. 2488–2497, 27 jul. 2011.

BAHI, A.; DREYER, J. L. Dopamine transporter (DAT) knockdown in the nucleus accumbens improves anxiety- and depression-related behaviors in adult mice. *Behavioural Brain Research*, v. 359, p. 104–115, 1 fev. 2019.

BARACZ, S. J.; EVERETT, N. A.; CORNISH, J. L. The impact of early life stress on the central oxytocin system and susceptibility for drug addiction: Applicability of oxytocin as a pharmacotherapy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 110, p. 114–132, 1 mar. 2020.

BARIBEAU, D. A.; ANAGNOSTOU, E. Oxytocin and vasopressin: Linking pituitary neuropeptides and their receptors to social neurocircuits. *Frontiers in Neuroscience*, v. 9, n. SEP, p. 160850, 24 set. 2015.

BAYERL, D. S.; HÖNIG, J. N.; BOSCH, O. J. Vasopressin V1a, but not V1b, receptors within the PVN of lactating rats mediate maternal care and anxiety-related behaviour. *Behavioural Brain Research*, v. 305, p. 18–22, 15 maio 2016.

BEERY, A. K.; KAUFER, D. Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents. *Neurobiology of Stress*, v. 1, n. 1, p. 116–127, 1 jan. 2015.

BELL, M. R. Comparing Postnatal Development of Gonadal Hormones and Associated Social Behaviors in Rats, Mice, and Humans. *Endocrinology*, v. 159, n. 7, p. 2596–2613, 1 jul. 2018.

BIELSKY, I. F. et al. The V1a Vasopressin Receptor Is Necessary and Sufficient for Normal Social Recognition: A Gene Replacement Study. *Neuron*, v. 47, n. 4, p. 503–513, 18 ago. 2005.

BLACK, M. M. et al. Early childhood development coming of age: science through the life course. *The Lancet*, v. 389, n. 10064, p. 77–90, 7 jan. 2017.

BOCK, J. et al. Stress In Utero: Prenatal Programming of Brain Plasticity and Cognition. *Biological Psychiatry*, v. 78, n. 5, p. 315–326, 1 set. 2015.

BORLAND, J. M. et al. Role of oxytocin in the ventral tegmental area in social reinforcement. *Psychoneuroendocrinology*, v. 95, p. 128–137, 1 set. 2018.

BORROW, A. P. et al. Chronic Variable Stress Induces Sex-Specific Alterations in Social Behavior and Neuropeptide Expression in the Mouse. *Endocrinology*, v. 159, n. 7, p. 2803–2814, 1 jul. 2018.

BORROW, A. P. et al. Chronic variable stress alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the female mouse. *Physiology & Behavior*, v. 209, p. 112613, 1 out. 2019.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, n. 1–3, p. 55–65, 28 fev. 2003.

BREACH, M. R. et al. Prenatal allergic inflammation in rats confers sex-specific alterations to oxytocin and vasopressin innervation in social brain regions. *Hormones and Behavior*, v. 157, p. 105427, 1 jan. 2024.

BREDEWOLD, R. et al. Involvement of dopamine, but not norepinephrine, in the sex-specific regulation of juvenile socially rewarding behavior by vasopressin. *Neuropsychopharmacology* 2018 43:10, v. 43, n. 10, p. 2109–2117, 22 maio 2018.

BRUST, V.; SCHINDLER, P. M.; LEWEJOHANN, L. Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). *Frontiers in Zoology*, v. 12, n. 1, p. 1–14, 24 ago. 2015.

BURFORD, N. G.; WEBSTER, N. A.; CRUZ-TOPETE, D. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Modulation of Glucocorticoids in the Cardiovascular System. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 2150, v. 18, n. 10, p. 2150, 16 out. 2017.

CALDWELL, H. K. Oxytocin and sex differences in behavior. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, v. 23, p. 13–20, 1 out. 2018.

CANCEDDA, L. et al. Acceleration of Visual System Development by Environmental Enrichment. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 20, p. 4840–4848, 19 maio 2004.

CÁRDENAS, L. et al. Enriched environment restricted to gestation accelerates the development of sensory and motor circuits in the rat pup. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 41, p. 68–73, 1 abr. 2015.

CARTER, C. S. The oxytocin-vasopressin pathway in the context of love and fear. *Frontiers in Endocrinology*, v. 8, n. DEC, p. 322440, 22 dez. 2017.

CHAOUOFF, F.; DURAND, M.; MORMÈDE, P. Anxiety-and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behavioural Brain Research*. [s.l: s.n.].

CHAOUOFF, F.; DURAND, M.; MORMÈDE, P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behavioural Brain Research*, v. 85, n. 1, p. 27–35, 1 abr. 1997.

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.

CHEN, P.; HONG, W. Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron*, v. 98, n. 1, p. 16–30, 4 abr. 2018.

CHEN, S. et al. Morpho-Electric Properties and Diversity of Oxytocin Neurons in Paraventricular Nucleus of Hypothalamus in Female and Male Mice. *Journal of Neuroscience*, v. 42, n. 14, p. 2885–2904, 6 abr. 2022.

CHEN, X. et al. Human pharmacology of positive GABA-A subtype-selective receptor modulators for the treatment of anxiety. *Acta pharmacologica Sinica*, v. 40, n. 5, p. 571–582, 1 maio 2019.

CONNORS, E. J. et al. Environmental enrichment models a naturalistic form of maternal separation and shapes the anxiety response patterns of offspring. *Psychoneuroendocrinology*, v. 52, n. 1, p. 153–167, 1 fev. 2015.

CORREDOR, K. et al. Behavioral effects of environmental enrichment on male and female wistar rats with early life stress experiences. *Frontiers in Physiology*, v. 13, p. 837661, 26 set. 2022.

COSTALL, B. et al. Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 32, n. 3, p. 777–785, 1 mar. 1989.

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, 1 ago. 1980.

CRAWLEY, J. N. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, v. 10, n. 4, p. 248–258, 2004.

CURLEY, J. P. et al. Social enrichment during postnatal development induces transgenerational effects on emotional and reproductive behavior in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 3, n. SEP, p. 816, 15 set. 2009.

CYMERBLIT-SABBA, A. et al. Prenatal Enriched Environment improves emotional and attentional reactivity to adulthood stress. *Behavioural Brain Research*, v. 241, n. 1, p. 185–190, 15 mar. 2013.

DANDI, E. et al. Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 67, p. 19–32, 1 jun. 2018.

DE KOCK, C. P. J. et al. Somatodendritic Secretion in Oxytocin Neurons Is Upregulated during the Female Reproductive Cycle. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 7, p. 2726–2734, 1 abr. 2003.

DE SOUZA, M. A. et al. Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats. *Neurochemical Research*, v. 38, n. 7, p. 1479–1489, 30 jul. 2013.

DÖLEN, G. et al. Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature* 2013 501:7466, v. 501, n. 7466, p. 179–184, 11 set. 2013.

DOUGLAS, A. J. Vasopressin and oxytocin. *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*, v. 15, n. PART 1, p. 205–229, 1 jan. 2005.

DUMAIS, K. M.; VEENEMA, A. H. Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 40, p. 1–23, 1 jan. 2016.

DUQUE-WILCKENS, N. et al. Inhibition of vasopressin V1a receptors in the medioventral bed nucleus of the stria terminalis has sex- and context-specific anxiogenic effects. *Neuropharmacology*, v. 110, p. 59–68, 1 nov. 2016.

DURÁN-CARABALI, L. E. et al. Prenatal and Early Postnatal Environmental Enrichment Reduce Acute Cell Death and Prevent Neurodevelopment and Memory Impairments in Rats Submitted to Neonatal Hypoxia Ischemia. *Molecular Neurobiology*, v. 55, n. 5, p. 3627–3641, 1 maio 2018.

FERRAGUTI, F. Metabotropic glutamate receptors as targets for novel anxiolytics. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 38, p. 37–42, 1 fev. 2018.

FISCH, J. et al. Effects of environmental enrichment on reproductive performance and quantity and morphology of cumulus-oocyte complexes obtained from *Rattus norvegicus*. *Theriogenology*, v. 94, p. 114–119, 1 maio 2017.

FREDA, S. N. et al. Brainwide input-output architecture of paraventricular oxytocin and vasopressin neurons. *bioRxiv*, p. 2022.01.17.476652, 18 jan. 2022.

FROEMKE, R. C.; YOUNG, L. J. Oxytocin, Neural Plasticity, and Social Behavior. *Annual Review of Neuroscience*, v. 44, n. Volume 44, 2021, p. 359–381, 8 jul. 2021.

GOLDSTEIN, E. Z. et al. Prolonged Environmental Enrichment Promotes Developmental Myelination. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 665409, 26 abr. 2021.

GRINEVICH, V.; LUDWIG, M. The multiple faces of the oxytocin and vasopressin systems in the brain. *Journal of neuroendocrinology*, v. 33, n. 11, 1 nov. 2021.

GUBERT, C.; HANNAN, A. J. Environmental enrichment as an experience-dependent modulator of social plasticity and cognition. *Brain Research*, v. 1717, p. 1–14, 15 ago. 2019.

GUNAYDIN, L. A. et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*, v. 157, n. 7, p. 1535–1551, 19 jun. 2014.

HAMMOCK, E. A. D. Developmental Perspectives on Oxytocin and Vasopressin. *Neuropsychopharmacology*, v. 40, n. 1, p. 24, 1 jan. 2015.

HAN, R. T. et al. Long-Term Isolation Elicits Depression and Anxiety-Related Behaviors by Reducing Oxytocin-Induced GABAergic Transmission in Central Amygdala. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 11, p. 398858, 14 ago. 2018.

HAN, Y. et al. The role of enriched environment in neural development and repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 16, p. 890666, 21 jul. 2022.

HERNÁNDEZ, V. S. et al. Extra-neurohypophyseal axonal projections from individual vasopressin-containing magnocellular neurons in rat hypothalamus. *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 9, n. OCT, p. 151582, 6 out. 2015.

HERNÁNDEZ, V. S. et al. Hypothalamic vasopressinergic projections innervate central amygdala GABAergic neurons: Implications for anxiety and stress coping. *Frontiers in Neural Circuits*, v. 10, n. NOV, p. 230703, 18 nov. 2016.

HUNG, L. W. et al. Gating of social reward by oxytocin in the ventral tegmental area. *Science*, v. 357, n. 6358, p. 1406–1411, 29 set. 2017.

JAKUBOVSKI, E. et al. Systematic review and meta-analysis: Dose–response curve of SSRIs and SNRIs in anxiety disorders. *Depression and Anxiety*, v. 36, n. 3, p. 198–212, 1 mar. 2019.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 2015 517:7534, v. 517, n. 7534, p. 284–292, 14 jan. 2015.

JI, N. N.; JIANG, H.; XIA, M. The influence of the enriched environment in different periods on neonatal maternal separation-induced visceral pain, anxiousness, and depressive behaviors. *Translational Pediatrics*, v. 11, n. 9, p. 1562–1569, 1 set. 2022.

JIN, Y. et al. The Role of Oxytocin in Early-Life-Stress-Related Neuropsychiatric Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 10430, v. 24, n. 13, p. 10430, 21 jun. 2023.

JOBIM, C. M. N.; 073.525.166-54; <HTTP://LATTES.CNPQ.BR/4464338559548820>. Efeito do enriquecimento ambiental perinatal de fêmeas em comportamentos relacionados a ansiedade na sua prole. 25 maio 2016.

JUREK, B.; NEUMANN, I. D. The oxytocin receptor: From intracellular signaling to behavior. *Physiological Reviews*, v. 98, n. 3, p. 1805–1908, 1 jul. 2018.

KAIDANOVICH-BEILIN, O. et al. Assessment of Social Interaction Behaviors. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n. 48, p. 2473, 2011.

KHOSRAVI, H.; KHALILZADEH, E.; VAFAEI SAIAH, G. Pain-induced aggression and changes in social behavior in mice. *Aggressive Behavior*, v. 47, n. 1, p. 89–98, 1 jan. 2021.

KIM, D. G. et al. Social Interaction Test in Home Cage as a Novel and Ethological Measure of Social Behavior in Mice. *Experimental Neurobiology*, v. 28, n. 2, p. 247, 1 abr. 2019.

KNOBLOCH, H. S. et al. Evoked Axonal Oxytocin Release in the Central Amygdala Attenuates Fear Response. *Neuron*, v. 73, n. 3, p. 553–566, 9 fev. 2012.

KOROSI, A.; BARAM, T. Z. The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *European Journal of Pharmacology*, v. 583, n. 2–3, p. 204–214, 7 abr. 2008.

KUNDAKOVIC, M.; JARIC, I. The Epigenetic Link between Prenatal Adverse Environments and Neurodevelopmental Disorders. *Genes* 2017, Vol. 8, Page 104, v. 8, n. 3, p. 104, 18 mar. 2017.

LI, K. et al. A Cortical Circuit for Sexually Dimorphic Oxytocin-Dependent Anxiety Behaviors. *Cell*, v. 167, n. 1, p. 60- 72.e11, 22 set. 2016.

LI, K. A.; LUND, E. T.; VOIGT, J. P. W. The impact of early postnatal environmental enrichment on maternal care and offspring behaviour following weaning. *Behavioural Processes*, v. 122, p. 51–58, 1 jan. 2016.

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

LIU, H. et al. Neonatal exposure to sevoflurane impairs preference for social novelty in C57BL/6 female mice at early-adulthood. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 593, p. 129–136, 19 fev. 2022.

LIVIA TERRANOVA, M.; LAVIOLA, G. Individual differences in mouse behavioural development: effects of precocious weaning and ongoing sexual segregation. *Animal Behaviour*, v. 50, n. 5, p. 1261–1271, 1 jan. 1995a.

LIVIA TERRANOVA, M.; LAVIOLA, G. Individual differences in mouse behavioural development: effects of precocious weaning and ongoing sexual segregation. *Animal Behaviour*, v. 50, n. 5, p. 1261–1271, 1 jan. 1995b.

LUBY, J. L.; ROGERS, C.; MCLAUGHLIN, K. A. Environmental Conditions to Promote Healthy Childhood Brain/Behavioral Development: Informing Early Preventive Interventions for Delivery in Routine Care. *Biological Psychiatry Global Open Science*, v. 2, n. 3, p. 233–241, 1 jul. 2022.

LUCASSEN, P. J. et al. Activation of Vasopressin Neurons in Aging and Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 6, n. 6, p. 673–679, 1 dez. 1994.

LUKAS, M. et al. Oxytocin mediates rodent social memory within the lateral septum and the medial amygdala depending on the relevance of the social stimulus: Male juvenile versus female adult conspecifics. *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, n. 6, p. 916–926, 1 jun. 2013.

MADRIGAL, M. DEL P.; JURADO, S. Specification of oxytocinergic and vasopressinergic circuits in the developing mouse brain. *Communications Biology* 2021 4:1, v. 4, n. 1, p. 1–16, 14 maio 2021.

MAIKOO, S.; WILKINS, A.; QULU, L. The effect of oxytocin and an enriched environment on anxiety-like behaviour and corticosterone levels in a prenatally stressed febrile seizure rat model. *IBRO Neuroscience Reports*, v. 13, p. 47–56, 1 dez. 2022.

MAO, Y. et al. Concurrent environmental enrichment and chronic restraint stress: Effects on innate anxiety and depressive-like behavior in male adolescent mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 80, n. 8, p. 730–736, 1 dez. 2020.

MARTIN, E. I. et al. The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, n. 4, p. 865–891, 1 dez. 2010.

MARTINEZ, A. R.; BRUNELLI, S. A.; ZIMMERBERG, B. Communal nesting exerts epigenetic influences on affective and social behaviors in rats selectively bred for an infantile trait. *Physiology & Behavior*, v. 139, p. 97–103, 1 fev. 2015.

MEYER-LINDENBERG, A. et al. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nature Reviews Neuroscience* 2011 12:9, v. 12, n. 9, p. 524–538, 19 ago. 2011.

MILBOCKER, K. A. et al. Glia-Driven Brain Circuit Refinement Is Altered by Early-Life Adversity: Behavioral Outcomes. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 15, p. 786234, 2 dez. 2021.

MINHAS, S. et al. Stress-induced oxytocin release and oxytocin cell number and size in prepubertal and adult male and female rats. *General and Comparative Endocrinology*, v. 234, p. 103–109, 1 ago. 2016.

MOREIRA, V. B. et al. Parental behavior and anxiety in isogenic and outbred mice given access to two types of nesting materials. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 215, p. 68–76, 1 jun. 2019.

MOY, S. S. et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, brain, and behavior*, v. 3, n. 5, p. 287–302, out. 2004.

MURGATROYD, C. et al. Impaired Repression at a Vasopressin Promoter Polymorphism Underlies Overexpression of Vasopressin in a Rat Model of Trait Anxiety. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 35, p. 7762–7770, 1 set. 2004.

NEAL, S. et al. Enriched environment exposure enhances social interactions and oxytocin responsiveness in male long-evans rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 12, p. 395307, 5 set. 2018.

NEWMAN, S. W. The Medial Extended Amygdala in Male Reproductive Behavior A Node in the Mammalian Social Behavior Network. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 877, n. 1, p. 242–257, 1 jun. 1999.

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

NYGAARD, K. R.; MALONEY, S. E.; DOUGHERTY, J. D. Erroneous inference based on a lack of preference within one group: Autism, mice, and the social approach task. *Autism Research*, v. 12, n. 8, p. 1171–1183, 1 ago. 2019.

ONAKA, T.; TAKAYANAGI, Y. The oxytocin system and early-life experience-dependent plastic changes. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 33, n. 11, 1 nov. 2021.

OPAS – ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Relatório sobre a saúde no mundo: transtornos mentais em crescimento. OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde Washington, D.C., 2018.

ORELAND, S.; GUSTAFSSON-ERICSON, L.; NYLANDER, I. Short- and long-term consequences of different early environmental conditions on central immunoreactive oxytocin and arginine vasopressin levels in male rats. *Neuropeptides*, v. 44, n. 5, p. 391–398, 1 out. 2010.

ORGANIZATION, W. H. World mental health report: transforming mental health for all. 2022.

OYOLA, M. G. et al. Distribution and chemical composition of estrogen receptor  $\beta$  neurons in the paraventricular nucleus of the female and male mouse hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, v. 525, n. 17, p. 3666–3682, 1 dez. 2017.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. [s.l.] Academic press, 2019.

PAYLOR, R. et al. The use of behavioral test batteries, II: Effect of test interval. *Physiology & Behavior*, v. 87, n. 1, p. 95–102, 30 jan. 2006.

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, 1 ago. 1985.

PORCELLI, S. et al. Social brain, social dysfunction and social withdrawal. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 97, p. 10–33, 1 fev. 2019.

PROUNIS, G. S.; THOMAS, K.; OPHIR, A. G. Developmental trajectories and influences of environmental complexity on oxytocin receptor and vasopressin 1A receptor expression in male and female prairie voles. *Journal of Comparative Neurology*, v. 526, n. 11, p. 1820–1842, 1 ago. 2018.

PSYCHIATRIC ASSOCIATION, A. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5 - 5a Edição. [s.d.].

QUINTANA, D. S. et al. The interplay of oxytocin and sex hormones. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 163, p. 105765, 1 ago. 2024.

QURESHI, S. et al. Diabetes insipidus: Celebrating a century of vasopressin therapy. *Endocrinology (United States)*, v. 155, n. 12, p. 4605–4621, 1 dez. 2014.

RAE, M. et al. Oxytocin and vasopressin: Signalling, behavioural modulation and potential therapeutic effects. *British Journal of Pharmacology*, v. 179, n. 8, p. 1544–1564, 1 abr. 2022.

RANA, T. et al. Exploring the role of neuropeptides in depression and anxiety. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 114, p. 110478, 2 mar. 2022.

RAZAVINASAB, M. et al. Early environmental enrichment prevents cognitive impairments and developing addictive behaviours in a mouse model of prenatal psychological and physical stress. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 82, n. 1, p. 72–84, 1 fev. 2022.

RIGNEY, N. et al. Oxytocin, Vasopressin, and Social Behavior: From Neural Circuits to Clinical Opportunities. *Endocrinology*, v. 163, p. 1–13, 2022.

RIGNEY, N.; DE VRIES, G. J.; PETRULIS, A. Modulation of social behavior by distinct vasopressin sources. *Frontiers in Endocrinology*, v. 14, p. 1127792, 13 fev. 2023.

ROCKS, D.; CHAM, H.; KUNDAKOVIC, M. Why the estrous cycle matters for neuroscience. *Biology of Sex Differences*, v. 13, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2022.

RODGERS' AND, R. J. et al. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Plus-Maze Test of Anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. [s.l: s.n.].

ROSALIE GREER, E. et al. Variations in concentration of oxytocin and vasopressin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during the estrous cycle in rats. *Life Sciences*, v. 38, n. 25, p. 2311–2318, 23 jun. 1986.

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, 1 ago. 2012.

SABIHI, S. et al. Oxytocin in the medial prefrontal cortex attenuates anxiety: Anatomical and receptor specificity and mechanism of action. *Neuropharmacology*, v. 125, p. 1–12, 1 out. 2017.

SALE, A. et al. Enriched environment and acceleration of visual system development. *Neuropharmacology*, v. 47, n. 5, p. 649–660, 1 out. 2004.

SHACKMAN, A. J.; GEE, D. G. Maternal Perinatal Stress Associated With Offspring Negative Emotionality, But the Underlying Mechanisms Remain Elusive. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.20230630>, v. 180, n. 10, p. 708–711, 2023.

SILVA-ALMEIDA, C. et al. Perinatal environmental enrichment changes anxiety-like behaviours in mice and produces similar intergenerational benefits in offspring. *Behavioural Brain Research*, v. 456, p. 114700, 5 jan. 2024.

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, 12 set. 2011.

ŠKOPKOVÁ, J. et al. The effect of AVP and DGAVP on the exploratory activity of rats. *Peptides*, v. 8, n. 5, p. 785–790, 1 set. 1987.

SMITH, A. S. et al. Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Molecular Psychiatry* 2016 21:8, v. 21, n. 8, p. 1137–1144, 5 jan. 2016.

SMITH, C. J. W.; DIBENEDICTIS, B. T.; VEENEMA, A. H. Comparing vasopressin and oxytocin fiber and receptor density patterns in the social behavior neural network: Implications for cross-system signaling. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 53, p. 100737, 1 abr. 2019.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 8, n. 4, p. 383–395, 31 dez. 2006.

SONG, Z.; ALBERS, H. E. Cross-talk among oxytocin and arginine-vasopressin receptors: Relevance for basic and clinical studies of the brain and periphery. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 51, p. 14–24, 1 out. 2018.

SOUMIER, A. et al. Differential fate between oxytocin and vasopressin cells in the developing mouse brain. *iScience*, v. 25, n. 1, p. 103655, 21 jan. 2022.

SPARLING, J. E. et al. Environmental enrichment and its influence on rodent offspring and maternal behaviours, a scoping style review of indices of depression and anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 197, p. 172997, 1 out. 2020.

SPARLING, J. E.; BAKER, S. L.; BIELAJEW, C. Effects of combined pre- and post-natal enrichment on anxiety-like, social, and cognitive behaviours in juvenile and adult rat offspring. *Behavioural Brain Research*, v. 353, p. 40–50, 1 nov. 2018.

STEIN, M. B.; SAREEN, J. CLINICAL PRACTICE. Generalized Anxiety Disorder. *The New England journal of medicine*, v. 373, n. 21, p. 2059–68, 19 nov. 2015.

STRÖHLE, A.; GENSICHEN, J.; DOMSCHKE, K. The Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 115, n. 37, p. 611, 14 set. 2018.

TANG, Y. et al. Social touch promotes interfemal communication via activation of parvocellular oxytocin neurons. *Nature Neuroscience* 2020 23:9, v. 23, n. 9, p. 1125–1137, 27 jul. 2020.

TERRANOVA, M. L.; LAVIOLA, G. Scoring of social interactions and play in mice during adolescence. *Current protocols in toxicology*, v. Chapter 13, 2005.

THOR, D. H.; HOLLOWAY, W. R. Developmental analyses of social play behavior in juvenile rats. *Bulletin of the Psychonomic Society*, v. 22, n. 6, p. 587–590, 5 nov. 1984.

THORSELL, A.; NÄTT, D. Maternal stress and diet may influence affective behavior and stress-response in offspring via epigenetic regulation of central peptidergic function. *Environmental Epigenetics*, v. 2, n. 3, 1 ago. 2016.

TIRKO, N. N. et al. Oxytocin Transforms Firing Mode of CA2 Hippocampal Neurons. *Neuron*, v. 100, n. 3, p. 593- 608.e3, 7 nov. 2018.

TSUDA, M. C.; YAMAGUCHI, N.; OGAWA, S. Early life stress disrupts peripubertal development of aggression in male mice. *NeuroReport*, v. 22, n. 6, p. 259–263, 20 abr. 2011.

VAN DEN BERGH, B. R. H. et al. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 117, p. 26–64, 1 out. 2020.

VAN DEN POL, A. N. Neuropeptide Transmission in Brain Circuits. *Neuron*, v. 76, n. 1, p. 98–115, 4 out. 2012.

VEENEMA, A. H.; BREDEWOLD, R.; DE VRIES, G. J. Sex-specific modulation of juvenile social play by vasopressin. *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, n. 11, p. 2554–2561, 1 nov. 2013.

VEENEMA, A. H.; BREDEWOLD, R.; NEUMANN, I. D. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: Link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology*, v. 32, n. 5, p. 437–450, 1 jun. 2007.

VIAU, V. et al. Independent and Overlapping Effects of Corticosterone and Testosterone on Corticotropin-Releasing Hormone and Arginine Vasopressin mRNA Expression in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Stress-Induced Adrenocorticotropic Hormone Release. *Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 15, p. 6684–6693, 1 ago. 1999.

WEI, F. et al. Experiences affect social behaviors via altering neuronal morphology and oxytocin system. *Psychoneuroendocrinology*, v. 129, p. 105247, 1 jul. 2021a.

WEI, F. et al. Oxytocin system driven by experiences modifies social recognition and neuron morphology in female BALB/c mice. *Peptides*, v. 146, 1 dez. 2021b.

WHITAKER, J. W. et al. Effects of Enrichment and Litter Parity on Reproductive Performance and Behavior in BALB/c and 129/Sv Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, v. 55, n. 4, p. 387, 1 jul. 2016.

WINTER, J.; JUREK, B. The interplay between oxytocin and the CRF system: regulation of the stress response. *Cell and Tissue Research*, v. 375, n. 1, p. 85–91, 28 jan. 2019.

WOTJAK, C. T. et al. Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *European Journal of Neuroscience*, v. 13, n. 12, p. 2273–2281, 1 jun. 2001.

YANG, C.; QI, Y.; SUN, Z. The Role of Sonic Hedgehog Pathway in the Development of the Central Nervous System and Aging-Related Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 8, p. 711710, 8 jul. 2021.

YANG, F. et al. Estradiol decreases rat depressive behavior by estrogen receptor beta but not alpha: No correlation with plasma corticosterone. *NeuroReport*, v. 25, n. 2, p. 100–104, 2014.

YOSHIDA, M. et al. Evidence That Oxytocin Exerts Anxiolytic Effects via Oxytocin Receptor Expressed in Serotonergic Neurons in Mice. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 7, p. 2259–2271, 18 fev. 2009.

ZHANG, L. et al. Hypothalamic vasopressin system regulation by maternal separation: Its impact on anxiety in rats. *Neuroscience*, v. 215, p. 135–148, 26 jul. 2012.

ZHANG, Y. M. et al. Environmental Enrichment Reverses Maternal Sleep Deprivation-Induced Anxiety-Like Behavior and Cognitive Impairment in CD-1 Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 16, 13 jul. 2022.

ZHENG, J. J. et al. Enriched Environment Rearing from Birth Reduced Anxiety, Improved Learning and Memory, and Promoted Social Interactions in Adult Male Mice. *Neuroscience*, v. 442, p. 138–150, 21 ago. 2020.

ZUENA, A. R. et al. Maternal exposure to environmental enrichment before and during gestation influences behaviour of rat offspring in a sex-specific manner. *Physiology & Behavior*, v. 163, p. 274–287, 1 set. 2016.

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/ICBS

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Estudo dos possíveis mecanismos moduladores envolvidos no comportamento análogo à ansiedade, no comportamento social e no aprendizado e memória promovidos pelo enriquecimento ambiental perinatal”** registrada com o nº **CEUA 08/2022**, sob a responsabilidade de Fábio Fagundes da Rocha, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal -CONCEA, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA-ICBS-UFRRJ)**, em reunião de 26 de outubro de 2022.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2022 a 31/10/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus/ Swiss</i>
Nº de animais	248
Peso/idade	35-40 gramas/ 21-70 dias
Sexo	124 machos e 124 fêmeas
Origem	Biotério de Criação de Roedores do Departamento de Ciências Fisiológicas - UFRRJ

We certify that the protocol CEUA number 08/2022, entitled **“Study of possible modulating mechanisms involved in anxiety-like behavior, social behavior and learning and memory promoted by perinatal environmental enrichment”** is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Institute of Biological Sciences and Health of Federal Rural University of Rio de Janeiro in October 26, 2022.

Ana Cláudia Ferreira Souza  
Coordenadora CEUA-ICBS-UFRRJ

*Emitido em 04/11/2022*

CERTIFICADO N° 680/2022 - DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

*(Assinado digitalmente em 04/11/2022 13:42 )*

ANA CLAUDIA FERREIRA SOUZA

*DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)*

*Matrícula: ###925#9*

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 680, ano: 2022, tipo: CERTIFICADO, data de emissão: 04/11/2022 e o código de verificação: 5e252978b9