

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS SBFis/UFRRJ.

DISSERTAÇÃO

INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA
EXPRESSÃO COMPORTAMENTAL E DE C-FOS EM
ANIMAIS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO.

Cláudio da Silva Almeida

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS SBFis/UFRRJ.**

**INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA
EXPRESSÃO COMPORTAMENTAL E DE C-FOS EM
ANIMAIS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO.**

Cláudio da Silva Almeida

Sob a Orientação do Professor

Fábio Fagundes da Rocha

Dissertação submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de mestre em Ciências
Fisiológicas, no Programa Multicêntrico de Pós
Graduação em Ciências Fisiológicas.

Seropédica, RJ

Junho de 2012

591.52

A447i

T

Almeida, Cláudio da Silva, 1984-
Influência do enriquecimento
ambiental na expressão
comportamental e de C-fos em animais
submetidos ao labirinto em cruz
elevado/ Cláudio da Silva Almeida. -
2012.
38 f.: il.

Orientador: Fábio Fagundes da Rocha.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas.
Bibliografia: f. 67-71.

1. Animais - Comportamento familiar
- Teses. 2. Neurologia veterinária -
Teses. 3. Camundongo - Comportamento
- Teses. 4. Transtornos da ansiedade
- Teses. I. Rocha, Fábio Fagundes
da, 1975- II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CLÁUDIO DA SILVA ALMEIDA

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

Area de Concentração em Fisiologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14/06/2012



Assinatura


Fábio Fagundes da Rocha (DSc.).UFRRJ

(Orientador)



Assinatura

Marcelo Felipe Santiago. (DSc.). UFRJ



Assinatura

Luis Carlos Reis. (DSc.)

*Esta dissertação é dedicada ao meu sábio, visionário e querido Pai, que teve
uma vida condizente com seu nome que significa vencedor.
Vicente Bastos de Almeida (1945-2012†) in memoriam.*

AGRADECIMENTOS:

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

À minha Família por todo amor que eu sinto por eles e por saber que é recíproco, e também por me aturar.

À minha Mãe Maria Eunice por sua história de lutas, sua dedicação, cuidado e carinho de cada dia, e por toda educação que me deu.

Ao meu Pai Vicente por todo apoio e me proporcionar condições de continuar buscando meus objetivos, por resolver problemas que eu não conseguiria e por me ensinar a brigar com todas as forças e argumentos pelo o que acredito ser certo.

À minha Irmã Eulina pela amizade, companheirismo e coragem de inovar que sempre me incentivou e incentiva até hoje.

Ao meu Irmão Carlos pela amizade, companheirismo por me dar condições de buscar meus objetivos, por me ensinar que temos que nos superar dia após dia, e também por me ensinar a sempre ter um pensamento crítico sobre tudo.

À minha Sobrinha Isabel, por me lembrar do por que trabalhar por um mundo melhor.

Ao meu orientador Professor Fábio Fagundes da Rocha, pelos ensinamentos, discussões, e confiança depositada em mim.

Ao Roberto Laureano Melo, por ter sido meu braço direito (e quando o meu falhava o cérebro também) indispensável nos experimentos, e um lembrete espero seu comparecimento em bebedeiras futuras!

À Juliana Macedo Raimundo, a pessoa mais organizada que existe!

Ao Dr. José Antunes Rodrigues, por ter permitido e ter dado totais condições para a realização dos ensaios imunohistoquímicos no laboratório de neuroendocrinologia da FMRP-USP.

Ao Rafael Sonoda Côrtes que eu sempre pude contar para experimentos e bebedeiras apesar de ser totalmente hipocondríaco.

Ao workaholic e agora já professor concursado, André de Souza Mecawi, essencial por toda ajuda e ensinamentos no período de experimentos em Ribeirão Preto.

Aos professores Luis Carlos Reis, Wellington da Silva Cortes, Armando Sales, Magda Alves de Medeiros e a todos os professores do DCF por suas contribuições e ensinamentos desde os tempos de graduação.

Aos Técnicos e Auxiliares de Laboratório: Sydnei, Ipojucan, Ambrósio, Antônio Vicente e Paulo que desempenham um trabalho sem o qual seria impossível a realização de experimentos no DCF, ao Walter pela ajuda com a microscopia, a Maria Valci e Rubens da FMRP-USP pela ajuda no período de experimentos em Ribeirão Preto.

Aos Discentes: Anderson Luis Bezerra da Silveira (com seu bom humor contagiante e às vezes irritante), Danilo Lustrino (o marrento mais humilde e prestativo que eu conheço), Raquel Nascimento (melodramática e eficiente ao extremo), Iracema Araújo, André Proença, Evandro Gehard Stutz, Beatriz Muguet, Ivaí, Fernando Seara, Lucas Marinho, Fabrícia Viana, Paula Abreu e a todos os discentes do DCF.

Aos meus amigos de fora da ciência por compreenderem as faltas no futebol e outros eventos e também pelos vários galhos quebrados.

Aos camundongos que me propiciaram este trabalho.

As agências de fomento Fundação de amparo a pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro a este trabalho.

E à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro porque eu também teria um desgosto profundo se faltasse a Rural no mundo.

RESUMO

O presente trabalho estudou os efeitos do enriquecimento ambiental (EA) na expressão comportamental de camundongos nos testes do labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto (CA) e suspensão pela cauda (SPC) além de avaliar a expressão de c-fos no encéfalo de camundongos submetidos ao LCE após exposição ao EA em diferentes fases da vida. Casais de camundongos foram colocados em dois ambientes, enriquecido ou padrão e os filhotes destes casais utilizados nos experimentos aos 70 dias de idade. No primeiro experimento, os filhotes foram mantidos no mesmo ambiente de criação dos pais, sendo divididos em três grupos: PD1 (controle, ambiente padrão por toda a vida), ENR-ADAPT (enriquecimento por toda a vida, adaptado às condições padrão por 1 semana antes dos testes), ENR-TOTAL (enriquecimento por toda a vida) que foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais. Em um segundo experimento, foram estudados 4 grupos: ENR (enriquecimento a vida inteira), ENRP (enriquecimento até o desmame), PENR (enriquecimento após o desmame) e CON (controle, vivendo em ambiente padrão por toda a vida) que foram submetidos ao LCE e logo após realizada a imunohistoquímica para c-fos. No experimento 1, os grupos ENR-ADAPT e ENR-TOTAL apresentaram menor grau de ansiedade no LCE, caracterizado principalmente por maior % de tempo de permanência nos braços abertos. No CA, os grupos ENR-ADAPT e ENR-TOTAL apresentaram aumento das atividades motora e exploratória com aumento no número de quadrantes percorridos e levantamentos realizados. O protocolo utilizado não apresentou atividade do tipo antidepressiva no SPC. No experimento 2, todos os grupos submetidos ao EA demonstraram redução da ansiedade no LCE, caracterizada por aumento das % de tempo e entradas nos braços abertos. Na análise da expressão de c-fos não houve diferenças significativas na análise de c-fos dos grupos ENR, ENRP e PENR em relação ao grupo CON na substância cinzenta periaquedutal, córtex cingulado e nos núcleos medial, central e basolateral da amígdala. Assim o enriquecimento ambiental parece promover efeitos ansiolíticos quando implementado em qualquer fase da vida no teste do LCE, este efeito parece não estar correlacionado com alterações na atividade neuronal nas áreas analisadas.

Palavras chave: neuroanatomia funcional, ativação neuronal, ansiolítico.

ABSTRACT

The present work aimed to study the effects of environmental enrichment (EE) on the behavioral expression of mice in elevated plus maze (EPM), open field (OF) and tail suspension (TST) tests as well as evaluate the expression of c-fos in the brain of mice submitted to the EPM after exposure to EE in different stages of life. Pairs of mice were placed in two environments, enriched or standard and the offspring of these couples were used in the experiments at 70 days old. In the first experiment, the pups were kept in the same environment of their parents and were divided into three groups, PD1 (control, standard environment for all their life), ENR-ADAPT (enrichment for all their life but adapted to the standard conditions for 1 week before testing), ENR-TOTAL (enrichment for all their life) who underwent a battery of behavioral tests. In a second experiment, four groups were studied: ENR (enrichment lifetime), ENRP (enrichment up to weaning), PENR (enrichment after weaning) and CON (control, living in standard environment for all their life). These groups were exposed to the EPM and after that were used to perform the immunohistochemistry for c-fos. In experiment 1, the groups ENR-ADAPT and ENR-TOTAL showed lower levels of anxiety in the EPM than PD1 group, characterized mainly by higher % of time spent in the open arms. In the OF, the groups ENR-ADAPT and ENR-TOTAL showed an increase in motor and exploratory activities reflected by an increase in the number of quadrants crossed and rearings. Antidepressant properties were not characterized in the TST. In experiment 2, all groups submitted to the EE showed a reduction in the anxiety expressed in the EPM, characterized by increase in the % time and entries in the open arms. Considering the c-fos expression analysis, no significant differences in the analysis of c-fos between ENR, ENRP, PENR and the CON group in the periaqueductal gray matter, cingulate cortex, medial nucleus of the amygdala, basolateral nucleus of the amygdala and central nucleus of the amygdala. Thus, environmental enrichment seems to promote anxiolytic effects in the EPM test when implemented at any stage of life. This effect seems not to be correlated with changes in neuronal activity in the areas analyzed.

Keywords: functional neuroanatomy, neuronal activation, anxiolytic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

5HT1a: Receptor serotoninérgico do tipo 5HT1a

AMPA: receptor para glutamato do tipo AMPA

AMPC: Monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA: Análise de variância

BLA: Núcleo basolateral da amígdala.

CA: Teste do campo aberto.

CeA: Núcleo central da amígdala.

cm : centímetros

cm³: centímetro cúbico

CON: Grupo controle segundo experimento.

DAB: Diaminobenzidine

DSM-IV-TR: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais

EA: Enriquecimento ambiental.

ENR: Grupo que viveu em ambiente enriquecido durante toda a vida no segundo experimento.

ENR-ADAPT: Grupo de animais criados em ambiente enriquecido até uma semana antes da realização de testes comportamentais no primeiro experimento.

ENR-TOTAL: Grupo que viveu em ambiente enriquecido durante toda a vida no primeiro experimento.

ENRP: Grupo de animais criados em ambiente enriquecido até o desmame e depois criados em ambiente padrão até o fim da vida.

EPM: elevated plus maze.

FMRP-USP: Faculdade de medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

h: hora

LCE: Labirinto em cruz elevado.

LTP: potenciação de longa duração

M: molar

MeA: Núcleo medial da amígdala.

min: minuto

mL: mililitro

mm: milímetro

mm²: milímetro quadrado

N: número de animais

NMDA: receptor para glutamato do tipo NMDA

OF: Open Field test.

PB: tampão fosfato

PENR: Grupo de animais criados até o desmame em ambiente padrão e depois criados até o fim da vida em ambiente enriquecido.

PD1: Grupo de animais criados em ambiente padrão por toda a vida no primeiro experimento.

pH: potencial hidrogeniônico

s: segundos.

SAP: stretched attend postures.

TSC: Teste de suspensão pela cauda.

TST: Tail suspension test.

UFRRJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

°C: Graus celsius

μL: microlitro

μm: micrometro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ambientes de criação.	10
Figura 2: Labirinto em Cruz Elevado.	11
Figura 3: Campo Aberto.	12
Figura 4: Teste de suspensão pela cauda.	12
Figura 5: Protocolo experimental e linha temporal do experimento 1.	13
Figura 6: Protocolo experimental e linha temporal do experimento 2	14
Figura 7: Teste do labirinto em cruz elevado- experimento 1	17
Figura 8: Teste do labirinto em cruz elevado- experimento 1	18
Figura 9: Teste do campo aberto- experimento 1	19
Figura 10: Teste do labirinto em cruz elevado- experimento 2	21
Figura 11: Teste do labirinto em cruz elevado- experimento 2	22
Figura 12: Imunohistoquímica para c- fos após exposição ao LCE	24
Figura 13: Fotos representativas de cortes de amígdala	25
Figura 14: Fotos de neurônios marcados para c-fos	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos transtornos de ansiedade segundo o DSM -IV-TR	2
Tabela 2: Parâmetros comportamentais analisados no teste do campo aberto	19
Tabela 3: Tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda	20
Tabela 4: Peso em gramas dos animais submetidos ao protocolo experimental 2	23
Tabela 5: Análise imunohistoquímica para neurônios imunoreativos para c-fos para cada 0,1mm ² em animais submetido ao LCE	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Transtornos de Ansiedade	1
1.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado	3
1.3. C-fos	5
1.4. Enriquecimento Ambiental	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Animais e Ambientes de Criação	9
2.2. Testes Comportamentais	10
2.2.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado	10
2.2.2 Teste do Campo Aberto	11
2.2.3 Teste de Suspensão Pela Cauda	12
2.3 Experimento 1	13
2.4 Experimento 2	13
2.4.1 Imunohistoquímica	15
2.4.2 Confeção, Fotografia e Análise das Lâminas	15
2.5 Peso corporal, Análise Estatística e Comitê de Ética	16
3. RESULTADOS	16
3.1 Experimento 1	16
3.1.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado	16
3.1.2 Teste do Campo Aberto	18
3.1.3 Teste de Suspensão pela Cauda	20
3.2 Experimento 2	20
3.2.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado	20
3.2.2 Acompanhamento do peso	23
3.2.3 Análise da Expressão de c-fos	23
4. DISCUSSÃO	26
4.1 Experimento 1	26
4.2 Experimento 2	27
5. CONCLUSÕES	33
6. PROPOSTAS DE PESQUISA	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtornos de Ansiedade

As doenças neuropsiquiátricas têm alta prevalência na população, alguns estudos indicam que cerca de 35,5% dos pacientes atendidos em unidades de saúde da cidade do Rio de Janeiro apresenta, sintomas de doenças psiquiátricas (WHO, 2001) Considerando essas condições psiquiátricas, os transtornos de ansiedade são os que têm maior prevalência tanto em adultos quanto em crianças (CASTILLO et al. 2000) como é mostrado neste grupo de pacientes dos quais cerca de 22,6% apresentam sintomas de transtorno de ansiedade (WHO, 2001). Estes dados parecem ser reproduzidos em outras populações ocidentais, por exemplo, alguns estudos estimam que 26,2% da população dos Estados Unidos da América apresentam sintomas de transtornos psiquiátricos classificados segundo o Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, e que cerca de 18,1% da população Norte Americana apresentam sintomas de transtornos de ansiedade, obviamente não excluindo os casos em que essas doenças estão em comorbidade com outras condições psiquiátricas (KESSLER et. al. 2005). Vale salientar também que os transtornos de ansiedade ocorrem junto com outras doenças psiquiátricas, principalmente transtornos de humor como depressão (HETTEMA et al. 2001) ou outros transtornos de ansiedade (BORKOVEC et al. 1995; CASTILLO et al. 2000).

Admitindo que os transtornos de ansiedade possam ser consideradas a classe de doenças mentais de mais alta prevalência na população (SZTAINBERG et al. 2010) seu estudo e a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nessas doenças são de extrema importância para futuras estratégias terapêuticas (SINGEWALD, 2007). Etimologicamente, a palavra ansiedade deriva do termo grego *Anshein* que significa estrangular, sufocar, oprimir (GRAEFF, 1996). Tanto o medo quanto a ansiedade são sentimentos que ocorrem naturalmente em resposta à ameaça. Porém enquanto o medo tem a ver com a presença de um estímulo aversivo real e há apenas o estímulo para o afastamento deste, a ansiedade ocorre quando há um potencial risco, seja pela novidade ou pela memória de outras situações de risco. Além disso, na ansiedade ocorre o conflito entre aproximação e afastamento do perigo (GRAEFF, 2007). Partindo do entendimento que a ansiedade é uma resposta fisiológica alguns autores estabelecem que a ansiedade só é patológica quando é exagerada e interfere na qualidade de vida do indivíduo (SINGEWALD, 2007; CASTILLO et al. 2000). Seguindo este raciocínio, Castilho e colaboradores definem que nos transtornos de ansiedade, os sintomas de ansiedade são as causas primárias da doença e estes não decorrem de outras condições psiquiátricas como esquizofrenia ou depressão (CASTILLO et al. 2000). Complementarmente, outros autores acreditam que os transtornos de ansiedade em humanos podem ser considerados como desordens defensivas em que a avaliação de perigo é feita de maneira falha nos indivíduos acometidos, deflagrando assim comportamentos defensivos exagerados (RODGERS et al. 1997). Os diversos transtornos de ansiedade descritos pelo manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais da associação norte americana de psiquiatria (DSM-IV-TR) estão listados abaixo (tabela 1).

Tabela 1: Adaptado de Brandão & Graeff 2006. Classificação dos transtornos de ansiedade segundo o DSM-IV-TR.

- Transtorno de pânico sem agorafobia
 - Transtorno de pânico com agorafobia
 - Agorafobia sem ataques de pânico
 - Fobia específica
 - Fobia social
 - Transtorno obsessivo- compulsivo
 - Transtorno de estresse pós- traumático
 - Transtorno de estresse agudo
 - Transtorno de ansiedade generalizada
 - Transtorno de ansiedade por condição clínica inespecífica
 - Transtorno de ansiedade induzido por substância
 - Transtorno de ansiedade não especificado
-

De um modo geral os sintomas de transtornos de ansiedade podem incluir cansaço, sudorese, irritabilidade, tonturas, distúrbios de sono e gastrointestinais (ARIKAIN & GORMAN, 2001). De modo específico, podemos citar o transtorno de ansiedade generalizada caracterizado por constante ansiedade e preocupação por aproximadamente 6 meses, os pacientes podem apresentar outros sintomas como palpitações, tensão muscular e boca seca (CASTILLO et al. 2000; ARIKAIN & GORMAN, 2001), segundo Arikain e Gorman, outro transtorno de ansiedade, o transtorno obsessivo-compulsivo é caracterizado por obsessões (pensamentos recorrentes que causam ansiedade e desconforto acentuado) e/ou compulsões (comportamentos estereotipados ou rituais que servem para aliviar a ansiedade) (ARIKAIN & GORMAN 2001), enquanto o transtorno de pânico caracteriza-se pela ocorrência repetida e de maneira inesperada de ataques de pânico. Estes ataques podem ter intensas manifestações autonômicas, tais como: palpitação e dispneia. Devido ao comprometimento e até incapacidade causada por estas doenças se faz necessário a implementação de medidas de diagnóstico e tratamento corretos para impedir a evolução desta, aliviar o sofrimento e os outros custos tanto para o paciente quanto para os serviços de saúde (ARIKAIN & GORMAN, 2001).

Felizmente, para o tratamento dos diversos transtornos de ansiedade se dispõe de fármacos de diferentes classes como benzodiazepínicos, inibidores da monoamina oxidase, agonistas parciais de receptores 5HT_{1A}, antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ARIKAIN & GORMAN, 2001) que podem ser associados ou não à psicoterapia (BORKOVEC et al. 1995). Apesar de haver algumas opções de tratamento para

estas doenças, existem efeitos adversos associados a estes medicamentos, especialmente relacionados ao tratamento crônico, assim como a não responsividade de alguns pacientes, além de fatores que levam a não adesão ao tratamento. Desta forma, um maior conhecimento da neurobiologia da ansiedade, pode proporcionar além da descoberta de novos alvos farmacológicos, o refinamento da terapêutica empregada nessas doenças, já que os mecanismos que envolvem estas doenças não são totalmente conhecidos (SINGEWALD, 2007). Desta forma, é imprescindível que sejam feitas pesquisas neste contexto e para isso uma ferramenta indispensável é a utilização de modelos animais em pesquisas pré clínicas (RODGERS et al. 1997; WEISS et al. 2008). Assim, considerando o estudo da neurobiologia da ansiedade, os estudos com animais têm diversas vantagens como a possibilidade de realizar pesquisas com grande número de indivíduos, um melhor controle do histórico de estresse e a possibilidade de realizar manipulações genéticas. Mas também devemos considerar as desvantagens como haver a possibilidade de que respostas corticais tão refinadas como ocorre em humanos não apareçam em outras espécies (SINGEWALD, 2007).

1.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Como o descrito por Pellow e seus colegas o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) deriva dos trabalhos experimentais com labirinto em Y feitos por Montgomery na década de 1950, que observou que ratos tinham menor atividade exploratória em braços abertos do que em braços fechados. Depois disso foi desenvolvido em 1984 por Handley e Mithani o labirinto X (citado em PELLOW et al. 1985; RODGERS & DALVI, 1997; WEISS et al. 1998) e os resultados conseguidos por estes autores inspiraram Pellow e colaboradores a validarem de forma comportamental, fisiológica e farmacológica o teste do labirinto em cruz elevado para ratos (LISTER, 1987; VIOLLE et al. 2009) e posteriormente Lister validá-lo para camundongos (RODGERS et al. 1997; RODGERS & DALVI, 1997). Dentre os diversos modelos de ansiedade em animais que existem, o mais utilizado é o LCE (RODGERS et al. 1997; RODGERS & DALVI, 1997; VIOLLE et al. 2009), onde são avaliados os efeitos de fatores ambientais e fármacos no comportamento análogo a ansiedade em animais, bem como investigadas as bases neurobiológicas e genéticas destes tipos de comportamentos (VIOLLE et al. 2009).

Vários são os motivos da grande aceitação do LCE, Pellow e colaboradores indicam algumas qualidades comparativas com outros testes de ansiedade que são: (1) a simplicidade do teste aliada ao baixo custo dos equipamentos utilizados, (2) não haver necessidade de treinamento, ou estimulação nociva, ou ainda privação de água ou alimento e o principal, se basear no comportamento espontâneo do animal, (3) discrimina efeitos agudos de benzodiazepínicos e (4) ser bidirecional, respondendo tanto a manipulações ansiogênicas quanto ansiolíticas nas mesmas condições de realização dos testes (PELLOW et al. 1985; RODGERS & DALVI, 1997). Outro motivo que explica sua larga utilização é que o tipo de ansiedade produzida pelo labirinto em cruz elevado nos roedores pode ser comparado com o transtorno de ansiedade generalizada em humanos (RODGERS & DALVI, 1997), devido ao estado de ansiedade que este teste parece promover nos animais ser comandado pelos mesmos circuitos envolvidos na ansiedade patológica em humanos (HOLMES et al. 2000). Também por isso, este teste tem sido usado para avaliar o estado de ansiedade em camundongos e ratos (NISHIKAWA et al. 2004).

O LCE tem como base, a natural aversão que os roedores têm de locais abertos (LISTER, 1987), e esta aversão tem sido ligada a comportamentos defensivos (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Apesar disso, e também por não haver necessidade de treinamento para a realização do teste e deste usar o comportamento espontâneo como supracitado, o LCE não pode ser considerado um teste de resposta incondicionada apenas. Isto, devido ao

aprendizado que ocorre durante o teste mostrado no aumento da aversão aos braços abertos que aumenta proporcionalmente com o decorrer do teste, quando este é avaliado minuto a minuto (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

Os parâmetros clássicos que servem como índice de ansiedade do teste são as porcentagens de entradas nos braços abertos e de tempo de permanência do animal nos braços abertos, estas têm uma correlação inversa com a ansiedade, ou seja, quanto maior forem estas porcentagens, menos ansioso o animal estará (CRUZ et al. 1994; LISTER, 1987; PELLOW et al. 1985; RODGERS & JHONSON 1995; WEISS et al. 1998; VIOLLE et al. 2009). Estes parâmetros são aumentados por drogas ansiolíticas como clorodiazepóxido e diazepam e diminuídos por fármacos ansiogênicos como ioimbina e pentilenotetrazol (PELLOW et al. 1985). No entanto, fármacos que podem causar euforia, e por conta disso alteram parâmetros de atividade locomotora, têm possibilidade de interferir com estes índices de ansiedade produzindo resultados controversos como é o caso da anfetamina (WEISS et al. 1998). Além destes, outro parâmetro clássico relacionado à ansiedade é a defecação que se relaciona diretamente com a ansiedade (PELLOW et al. 1985).

Estudos posteriores, intencionando uma maior compreensão dos comportamentos realizados durante este teste, perceberam a existência de outros parâmetros relacionados à ansiedade, os chamados de comportamentos de avaliação de risco (RODGERS et al. 1997). Desta forma os comportamentos de stretch attend position (posição estendida de atenção ou “estiramentos”) e de sniffing (cheirar) mostraram estar presentes neste teste como comportamentos de avaliação de risco (ROY & CHAMPILLON, 2004; RODGERS & JHONSON, 1995). Além disso, os comportamentos de avaliação de risco podem ser usados para discriminar efeitos ligados a ansiedade de efeitos de comprometimento motor causados por sedação (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Este incremento na avaliação proporcionou uma melhor utilização do teste já que as ações ansiolíticas dependentes de ação 5HT_{1A} só são observadas no LCE quando se consideram parâmetros de avaliação de risco, (RODGERS et al. 1999).

Além dos comportamentos de avaliação de risco, outra classe homóloga de comportamentos e, portanto também relacionada à ansiedade são os comportamentos de tomada de decisão (RODGERS & JHONSON, 1995), estes comportamentos são correlacionados com as seguintes medidas no teste do LCE: porcentagem de tempo despendido na plataforma central (diretamente relacionado à ansiedade), tempo despendido na realização de auto-limpeza e porcentagem de tempo de permanência nos braços fechados (inversamente relacionados) (RODGERS & JHONSON, 1995). Outros parâmetros analisados no LCE não têm ligação direta com a ansiedade, no entanto, devem ser usados para uma melhor elucidação dos resultados. Dentre estes parâmetros podemos destacar, a porcentagem de entradas nos braços fechados que é relacionado à atividade locomotora horizontal, que tem maior correlação com a atividade locomotora do que o número total de entradas nos braços (CRUZ et al. 1994; RODGERS & JHONSON, 1995). Vale ressaltar os comportamentos associados à atividade exploratória geral que se destacam os números totais de mergulhos de cabeça e de estiramentos realizados (CRUZ et al. 1994; RODGERS & JHONSON, 1995) e, parâmetros associados à atividade locomotora vertical, como a duração e o número de episódios do comportamento de erguer-se sob as patas posteriores (RODGERS & JHONSON, 1995).

Apesar das diversas vantagens apresentadas e da minuciosa caracterização dos comportamentos realizados pelos animais neste teste, devemos ter um olhar crítico também sobre possíveis interferentes que podem até mascarar ou subestimar os resultados (RODGERS & DALVI, 1997; VIOLLE et al. 2009). O ambiente do teste deve ser o mais calmo possível como em qualquer ambiente de manipulação de animais, porém outros fatores como iluminação, tamanho da sala e material em que o LCE é construído também podem

alterar os níveis basais de ansiedade (RODGERS & DALVI, 1997; VIOLLE et al. 2009). Considerando apenas os animais, o teste pode ser influenciado pelas seguintes variáveis: espécie, linhagem, sexo, estresse e outros testes que possam ter sido feitos com o animal. Levando em conta as espécies mais utilizadas neste teste, ratos e camundongos, é importante ressaltar que os níveis de ansiedade tendem a serem maiores com o avanço da idade (RODGERS & DALVI, 1997). Mesmo com estes interferentes o teste do LCE tem sido usado para definir quais são as áreas do cérebro relacionadas ao medo e a ansiedade tais como substância cinzenta periaquedutal, hipocampo, diversos núcleos da amígdala, hipotálamo, e córtex pré-frontal medial (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; RODGERS et al. 1997). Estas identificações têm muitas vezes sido feitas com ajuda de técnicas de anatomia funcional como imunohistoquímica para proteína c-fos (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

1.3. c-fos

A imunohistoquímica para proteína c-fos pode ser comparada com outras técnicas de neuroanatomia funcional utilizadas em humanos como a eletroencefalografia que permite um mapa de atividade neuronal com excelente resolução temporal, porém para roedores devido ao pequeno tamanho do encéfalo, esta técnica se torna menos precisa quanto à anatomia, principalmente considerando estudos experimentais de ansiedade. Este problema também está presente em outras técnicas usadas para o mapeamento da atividade neuronal em humanos como a tomografia por emissão de pósitrons (SINGEWALD, 2007). Já a ressonância magnética funcional é usada em humanos e animais e tem uma definição anatômica melhor do que a tomografia por emissão de pósitrons (MUEGGLER et al. 2011), porém estudos com esta técnica em animais podem necessitar de anestesia para diminuir artefatos, sendo isto uma desvantagem importante em comparação com a imunohistoquímica para c-fos que não necessita de prévia anestesia (SINGEWALD, 2007).

Devido à localização da proteína c-fos no núcleo do neurônio esta tem sido muito usada para criação de mapas de ativação neuronal por estímulos específicos, outra vantagem do método é que o mesmo permite que seja feita dupla marcação imunohistoquímica mostrando qual o fenótipo neuronal marcado (HOFFMAN & LYO, 2002; NIKOLAEV et al. 2002; SILVEIRA et al. 2001). Outras três características fazem com que a expressão de c-fos seja uma ótima ferramenta de neuroanatomia funcional, (1) seus baixos níveis de expressão basal, (2) sua expressão ser influenciada por vários estímulos transcricionais trans sinápticos e (3) tempo curto entre o aparecimento do RNA mensageiro e a produção da proteína pela célula (KOVACS, 1998; SINGEWALD, 2007). Por conta disso a indução da expressão de c-fos é a ferramenta mais usada para o mapeamento da atividade neuronal em roedores (KOVACS, 1998).

No início da década de 1980 percebeu-se que vários estímulos que provocavam a ativação neuronal induziam a expressão da proteína c-fos (SINGEWALD, 2007). Esta proteína, que é produto da expressão do pró-oncogene c-fos, foi a primeira proteína caracterizada da família fos (DUNCAN et al. 1996; HOFFMAN et al. 1993; SILVEIRA et al. 2001). Enquanto a expressão da proteína c-fos é rápida e induzida por modificações agudas, outros membros da família fos apresentam outras características de indução de suas expressões. O gene fos B e seu Splice variante Δ fosB produzem outras proteínas desta família como a 33 fos-like induzida por estímulos agudos, a Fra-1 (Fos related antigens-1) que é expressa por estímulos crônicos e repetidos e a FRA-2 (Fos related antigens-2) que também responde a estímulos crônicos e repetidos. Os FRAs também são relacionados à estimulação tônica de neurônios (KOVACS, 1998). Estas proteínas possuem na sua estrutura um zíper de leucina que permitem sua heterodimerização com membros da família jun (como c-jun, jun-B e jun-D), formando o fator de transcrição da proteína AP-1, sendo que o complexo formado

pelo heterodímero e a proteína AP-1 age em regiões de regulação de outros genes, estimulando ou reprimindo a transcrição destes (HOFFMAN et al. 1993; KOVACS, 1998; SINGEWALD, 2007).

De um modo geral, os neurônios não expressam ou expressam pouca c-fos em níveis de atividade basais (HOFFMAN et al.1993), porém quando estimulados, os níveis máximos de proteína c-fos são encontrados de uma a três horas após a ocorrência do estímulo que induziu sua expressão e desaparecem de 4 a 6 horas depois deste estímulo (KOVACS, 1998; SINGEWALD, 2007). A expressão dela ocorre pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio ou AMP cíclico, ou ainda por qualquer fator que promova a fosforilação do fator de transcrição elemento responsivo a AMPc (CREB) (KOVACS, 1998; SILVEIRA et al. 2001; SINGEWALD, 2007). Outros fatores têm sido implicados como interferentes na expressão de c-fos, como o elemento indutível por sis (SIE) em condições especiais, e a proteína AP-1 que pode agir promovendo um mecanismo de retroalimentação negativa. Além do fato que repetidos estímulos podem dessensibilizar a expressão de c-fos para o mesmo estímulo, ou aumentar o limiar para que este produza a expressão da proteína c-fos. Outro fator a ser considerado é que o limiar para expressão de c-fos também pode variar em função da região do encéfalo (KOVACS, 1998).

Somado a esses fatores que podem interferir na expressão de c-fos , outro fator que deve ser considerado criticamente em ensaios imunohistoquímicos para proteína c-fos é que pode ocorrer expressão de c-fos sem despolarização e despolarização sem a expressão de c-fos. Por exemplo, no estriado a dopamina aumenta os níveis de AMPc e por sua ação em receptores D1 diminui a taxa de disparo, assim nessa situação ocorre a expressão de c-fos que não tem relação com a atividade neuronal. Outro problema é que enquanto alguns neurônios sempre expressam c-fos, outros não expressam esta proteína mesmo quando estimulados (HOFFMAN & LYO, 2002; SINGEWALD, 2007). Levando-se em conta outras técnicas de neuroanatomia funcional, a imunohistoquímica para fos apresenta as seguintes desvantagens: (1) como c-fos é um marcador indireto da atividade neuronal pode ocorrer à expressão de c-fos sem haver a despolarização do neurônio, (2) a ativação neuronal também pode ocorrer e não se refletir em expressão de c-fos, (3) a proteína c-fos não ser responsiva a estímulos inibitórios, devido aos seus baixos níveis basais e (4) sua resolução temporal ruim, ou seja, com essa técnica não é possível a avaliação de variações em intervalos de tempo consecutivos como, por exemplo, é conseguida com técnicas de eletroencefalografia (SINGEWALD, 2007).

Mesmo com essas limitações o uso da técnica de imunohistoquímica para c-fos pode revelar informações sobre como os estímulos alteram a atividade no sistema nervoso e assim proporcionar uma melhor compreensão deste estímulo (HOFFMAN et al.1993), e segundo Duncan e colaboradores, mesmo a expressão de fos não sendo um marcador universal de ativação neuronal a sua avaliação promove um bom mapa de ativação neuronal dos comportamentos do animal (DUNCAN et al. 1996). Interessantemente, fatores ambientais, como novos ambientes, podem interferir na expressão de c-fos (BECK & FIBIGER, 1995; KOVACS, 1998). Adicionalmente, a imunohistoquímica para c-fos tem sido usada para entender os efeitos comportamentais induzidos pelo enriquecimento ambiental em protocolos que mimetizam a abstinência e avalia comportamentos homólogos a dependência de drogas de abuso (CHAUVET et al. 2011), e da modulação das respostas promovidas ao enriquecimento ambiental quando os animais são submetidos a estímulos aversivos (NIKOLAEV et al. 2002).

1.4. Enriquecimento Ambiental

O enriquecimento ambiental pode ser definido como uma condição ambiental que proporciona melhores condições de vida para animais cativos, isto ocorre porque os animais em enriquecimento ambiental têm maiores chances de desenvolver o comportamento natural de sua espécie, já que é permitido a esses animais maiores possibilidades de interações sociais e com objetos inanimados mais próximos do que eles encontrariam em seu habitat natural, promovendo assim uma melhoria do bem estar animal (BAUMANS, 2005; SHYNE, 2006).

Estratégias de enriquecimento ambiental têm sido largamente usadas para a melhoria do bem estar animal em animais laboratórios e de zoológicos na prevenção e tratamento de comportamentos estereotipados (SHYNE, 2006), comportamentos estes que segundo Marashi e colaboradores são movimentos sem função apreciável, feito repetidas vezes, que em animais são relacionados a transtornos comportamentais (MARASHI et al. 2005). Além disso, o enriquecimento ambiental é implementado tanto em zoológicos quanto em laboratórios, na intenção de diminuir os níveis de estresse de animais cativos (BELZ et al. 2003; BOERE, 2001). Considerando apenas animais de laboratório, a estratégia adotada para enriquecimento ambiental tem sido o uso de objetos e desenhos diferenciados de gaiolas, quebrando o ambiente monótono presente nas condições padrão de criação (BELZ et al. 2003), sempre se levando em consideração também o custo e a praticidade na manutenção dos animais bem como a higienização da caixa e objetos de enriquecimento (BAUMANS, 2005).

Quanto aos níveis de corticosterona basais e as respostas endócrinas destes animais quando são submetidos ao estresse há controvérsias na literatura sobre o enriquecimento ambiental, ocorrendo dados que indicam aumento, diminuição ou não alteração dessas mensurações de animais com ambientes enriquecidos quando comparados com animais criados em ambiente padrão (FOX et al. 2006). Por exemplo, Belz e colaboradores mostraram uma diminuição dos níveis basais de corticosterona, enquanto o grupo de Benaroya-Milshtein observou o contrário, um aumento destes níveis, porém estes animais apresentaram uma menor responsividade ao estresse (BELZ et al. 2003; BENAROYA-MILSHTEIN et al. 2004), o que sugere que o enriquecimento ambiental seria um estressor leve que melhoraria a responsividade aos glicocorticóides e conseqüentemente a outros estressores, além de prevenir os efeitos deletérios do estresse (BENAROYA-MILSHTEIN et al. 2004; FOX et al. 2006).

Apesar de o enfoque inicial ser o bem estar animal, o enriquecimento ambiental tem se mostrado uma excelente ferramenta para o estudo de alterações cerebrais dependentes da experiência (FOSTER & DUMAS 2001; ICKES et al. 2000; KEMPERMANN et al. 1997, 1998; NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006). Como o descrito por Simpson e Kelly o primeiro a trabalhar com enriquecimento ambiental do ponto de vista neurobiológico foi Donald Hebb, no fim da década de 1940 que demonstrou que ratos que viviam em um ambiente mais variado tinham melhor aprendizado que animais que viviam em seu no laboratório em condições padrão de criação (citado em SIMPSON & KELLY, 2011). Mesmo com as críticas da falta de controle dos experimentos de Hebb (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006), estes trabalhos foram o ponto de partida para diversos estudos que demonstraram alterações comportamentais, que podem resultar em mudanças morfológicas no sistema nervoso central como espessura do córtex e alterações bioquímicas no cérebro (NIKOLAEV et al. 2002; NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006).

Neste sentido, diversos trabalhos vêm demonstrando que o enriquecimento ambiental altera tanto fenômenos neuroquímicos quanto a expressão comportamental de animais submetidos a estes protocolos. Dentre estes efeitos demonstrados estão: a melhoria de aspectos cognitivos, como aprendizado e memória, a redução da ansiedade e a facilidade de recuperação frente a lesões cerebrais, assim como, retardo no aparecimento de sintomas provenientes de doenças neurodegenerativas (FOX et al., 2006; NITHIANANTHARAJAH &

HANNAN, 2006). Provavelmente, grande parte destes efeitos está relacionada a uma série de fenômenos de neuroplasticidade cerebrais induzidas pelo enriquecimento ambiental, incluindo o aumento da neurogênese hipocampal e a redução da apoptose nesta área (KEMPERMANN et al., 1997, 1998; YOUNG et al. 1999), isto pode ocorrer pelo aumento nos níveis de neurotrofinas, entre elas o fator de crescimento do nervo, o fator de crescimento derivado do cérebro, neurotrofina 3 (ICKES et al., 2000; NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006; KEMPERMANN et al., 1997, 1998) e aumento dos níveis de fator de crescimento vascular endotelial (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006). Somado a isto, o enriquecimento ambiental ainda aumenta no número de sinapses e a densidade de espinhas dendríticas, além de alterações na própria transmissão sináptica (FOSTER & DUMAS, 2001). Adicionalmente às alterações provocadas pelo enriquecimento ambiental já descritas que podem interferir nas tarefas de aprendizado e memória, o enriquecimento ambiental pode modular o sistema glutamatérgico de forma importante, alterando a expressão de receptores NMDA e AMPA e também fenômenos neuroplásticos como a potencialização de longa duração (LTP) (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006), bem como aumentar a função de receptores AMPA e mecanismos para a formação de LTP (FOSTER & DUMAS 2001). Outro ponto a ser considerado é que os efeitos do enriquecimento ambiental nos níveis de neurotrofinas podem influenciar o sistema colinérgico no prosencéfalo basal e de neuropeptídeos que modulam o sistema límbico (ICKES et al. 2000). Soma-se a isso ainda que o enriquecimento ambiental promove o aumento da quantidade e da capacidade de ligação de receptores 5HT1_A (GALANI et al. 2007) e os conteúdos de serotonina e noradrenalina no hipocampo (BRENES et al. 2009).

Devido aos vários efeitos que o enriquecimento ambiental promove nos sistemas de neurotransmissores e no sistema límbico, facilmente se deduz que o enriquecimento ambiental pode influenciar comportamentos inclusive as similares a ansiedade em animais. Por conta disso, em um primeiro experimento promovemos uma bateria de testes comportamentais sugerida por Brenes e colaboradores (BRENES et al. 2009), porém com a utilização do teste de suspensão pela cauda ao invés do nado forçado como teste de avaliação de comportamento similar a desespero (BAI et al. 2001). O uso de baterias de testes comportamentais apresenta a vantagem de permitir uma avaliação comportamental mais ampla utilizando um menor número de animais do que a realização de testes independentes (PAYLOR et al. 2006). A partir de resultados que indicavam efeito ansiolítico no LCE decidimos investir neste modelo de ansiedade em roedores com o mapeamento da expressão de c-fos em diversas áreas do encéfalo após a exposição ao LCE.

Um dos efeitos comportamentais imputados ao enriquecimento ambiental é a redução da ansiedade (BENAROYA-MILSHTEIN et al., 2004; CHAMPILLON et al. 1999; FOX et al. 2006). Porém quanto ao LCE alguns resultados na literatura são conflitantes com o próprio grupo de Champillon que em um experimento onde o enriquecimento ambiental começando aos 7 dias de gestação das mães e mantidos neste protocolo até o 49º dia de vida promove efeito ansiolítico, enquanto outro experimento do mesmo grupo não mostra efeito ansiolítico. Esta diferença foi imputada a alterações nos níveis de luminosidade durante a realização do teste (CHAMPILLON et al. 1999; ROY et al., 2001). Outro grupo que também não obteve efeito ansiolítico com enriquecimento ambiental foi o grupo de Brenes que introduziu os ratos em ambiente enriquecido aos 32 dias pós desmame (BRENES et al. 2009). No entanto, foi demonstrado um efeito tipo ansiolítico, mesmo após 3 meses de exposição ao enriquecimento, em camundongos cuja mãe foi submetida ao enriquecimento ambiental porém no segundo dia pós-desmame os filhotes cresceram sob condições padrão sugerindo que alterações no ambiente no período perinatal podem influenciar a atividade futura no LCE (FRISKE & GAMMIE, 2005). Considerando estas questões, este trabalho intencionou avaliar a influência do enriquecimento ambiental no período perinatal e pós-desmame no comportamento de

camundongos e analisar a expressão de c-fos após estímulo pelo labirinto em cruz elevado. Assim podemos descrever os objetivos deste trabalho nos itens abaixo:

- Avaliar os efeitos gerais do enriquecimento ambiental em alguns testes de atividade no Sistema Nervoso Central
- Observar a influência da experiência de vida em ambientes mais complexos, em diversos momentos da vida, no teste do LCE.
- Verificar se os protocolos de enriquecimento ambiental adotados podem promover alterações na expressão de c-fos em animais submetidos ao LCE.
- Avaliar se as possíveis alterações na expressão da proteína c-fos podem ser relacionadas a expressão comportamental desses animais que viveram em ambientes enriquecidos no LCE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e Ambientes de Criação

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss machos e fêmeas para formar casais com 60 dias de idade fornecidos pelo Biotério de Criação de Roedores do Departamento de Ciências Fisiológicas / UFRRJ, estes casais foram alocados em dois tipos de ambientes: padrão e enriquecido (figura 1). O ambiente enriquecido utilizado foi uma adaptação do protocolo de enriquecimento proposto por MARASHI et al. (2003), e consistiu em uma caixa de polipropileno opaca branca de 34 x 40 x 20 cm (l x c x a), uma tampa com uma parte 4,5 cm mais alta que a altura máxima da caixa, túneis circulares de PVC (cloreto de polivinila) de 7 x 7 cm (comprimento x diâmetro), e tuneis semi circulares de 5,5 x 3,5 cm (comprimento x raio), e tocas de PVC 16 x 7cm (comprimento x diâmetro), as tocas diferiam dos túneis além do tamanho porque uma das extremidades era fechada. Além disso, existia material para aninhamento que era papel toalha, dois pedaços de aproximadamente 10 x 45 cm (l x c) por caixa e uma plataforma de acrílico opaco branco de 15,5 x 13,5 cm (l x c) suspensa por fios de arame e presa a parte mais alta da tampa, ficando suspensa a 3 cm do nível da maravalha. No ambiente enriquecido o volume total era de 26244 cm³ sem ser descontado o volume ocupado pela maravalha e materiais de enriquecimento. O Ambiente Padrão consistiu em uma caixa de polipropileno opaca branca de 20 x 30 x 13 cm (l x c x a) contendo apenas maravalha e a tampa de metal, o volume total deste ambiente sem descontar o volume ocupado pela maravalha foi de 7254 cm³. Após o nascimento dos animais estes foram mantidos nos ambientes que os pais viviam (enriquecido ou padrão) até o desmame. Após o desmame foram mantidos 6 animais machos por cada caixa independentemente do tipo de ambiente. Todos os animais foram mantidos em temperatura (22 ± 1°C) e iluminação (iluminado de 7:00h às 19:00h / escuro de 19:00h às 7:00h) controladas, assim como, fornecimento de água e ração *ad libitum*.



AE = Ambiente Enriquecido

AP = Ambiente Padrão

Figura 1: Ambientes de criação.

2.2. Testes Comportamentais

Todos os testes comportamentais foram gravados através da câmera infra-vermelha TopWay Collor ccd (Topway do Brasil), e utilização do software GeoVision GV 800 System para posterior análise, que foi realizada manualmente.

2.2.1. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Este ensaio foi baseado no modelo proposto de LISTER (1990) para camundongos, e consistiu de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos. Os braços abertos e fechados eram conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma, as paredes laterais dos braços fechados eram confeccionadas em acrílico transparente. O aparelho estava elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. O teste foi iniciado quando o animal foi colocado na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados e a duração do teste foi de 5 minutos. Os testes foram realizados sob luz vermelha, e no período de 6:00 às 12:00 horas.

As medidas comportamentais registradas no LCE foram: porcentagem de tempo permanecido nos braços abertos e de entradas nos braços abertos em relação ao total, número de entradas nos braços fechados e porcentagem de tempo de permanência na plataforma central, estiramentos e mergulhos de cabeça (Head Dipping) e estiramentos (Stretched attend postures – SAP) totais realizados, e as porcentagens de estiramentos e mergulhos de cabeça realizados em áreas protegidas em relação ao total realizado de cada um desses comportamentos (RODGERS AND JHONSON, 1995). Os animais foram submetidos ao teste comportamental na idade de 70 ± 2 dias.

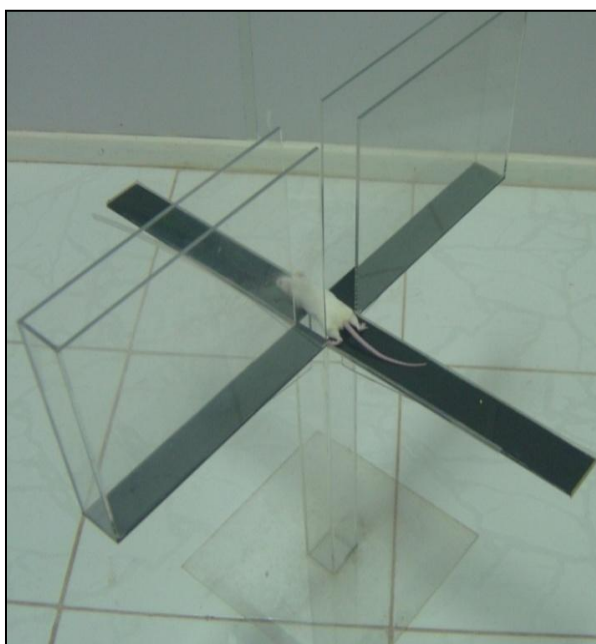


Figura 2: Labirinto em Cruz Elevado.

2.2.2. Teste do Campo Aberto

Dois dias depois do teste do LCE do experimento 1 foi realizado o teste do campo aberto. Este teste foi realizado em uma caixa de plástico com chão preto (30 x 30 cm) dividido em 9 quadrantes iguais e com paredes de 15 cm de altura transparentes, os animais foram colocados no centro do campo aberto e avaliados durante os 5 minutos (ROCHA et al. 2011). Os seguintes parâmetros foram avaliados: quadrantes cruzados para a avaliação da atividade locomotora horizontal, levantamentos (rearing) para a avaliação da atividade exploratória vertical, auto-limpezas (Grooming) realizadas e seu tempo de duração e tempo de inatividade (ARCHER, 1973; BRENES et al. 2009). Este teste foi usado para a avaliação da atividade locomotora.

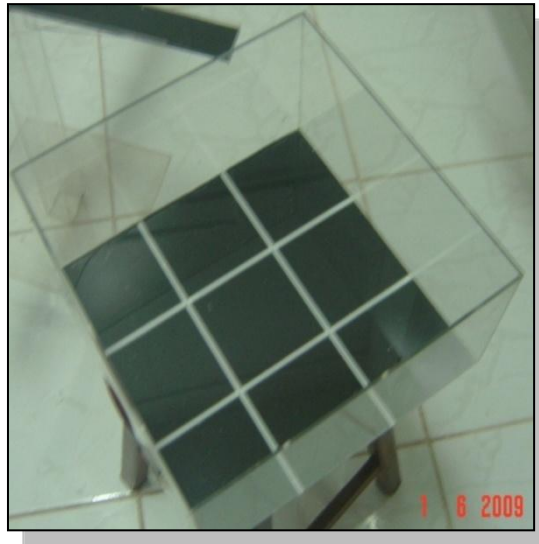


Fig. 3 Campo Aberto.

2.2.3. Teste de Suspensão Pela Cauda (SPC)

Dois dias após o teste do campo aberto foi realizado o teste de suspensão pela cauda. Este teste foi utilizado para avaliação de potenciais manipulações antidepressivas (STERU et al. 1985), foi realizado da seguinte forma: a cauda do animal foi presa cuidadosamente com fita adesiva e fixada deixando o animal a 50 cm do chão da sala por 6 minutos sendo contado o tempo de imobilidade do animal nos 4 minutos finais. (HEDLUND et al. 2005).



Figura 4: Teste de suspensão pela cauda. Obtido de <http://cfnewsads.thomasnet.com/images/large/828/828524.jpg>

2.3. Experimento 1

Os animais foram mantidos após o desmame nos mesmos ambientes em que viviam, até os 65 dias de idade. Neste momento, o grupo de animais que estavam em enriquecimento ambiental foi subdividido em dois grupos um foi colocado em ambiente padrão (ENR-ADPT) por 5 dias até a bateria de testes comportamentais e outro mantido em ambiente enriquecido durante toda a vida (ENR-TOTAL). Os animais em ambiente padrão (PD1) foram mantidos neste ambiente durante todo o experimento. Após o período de adaptação, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais realizados na seguinte ordem: teste do Labirinto em Cruz Elevado, teste do Campo Aberto e teste de Suspensão pela cauda com intervalo de dois dias entre eles. Ao final da Bateria de testes comportamentais os animais sofreram eutanásia por decapitação.

Experimento 1

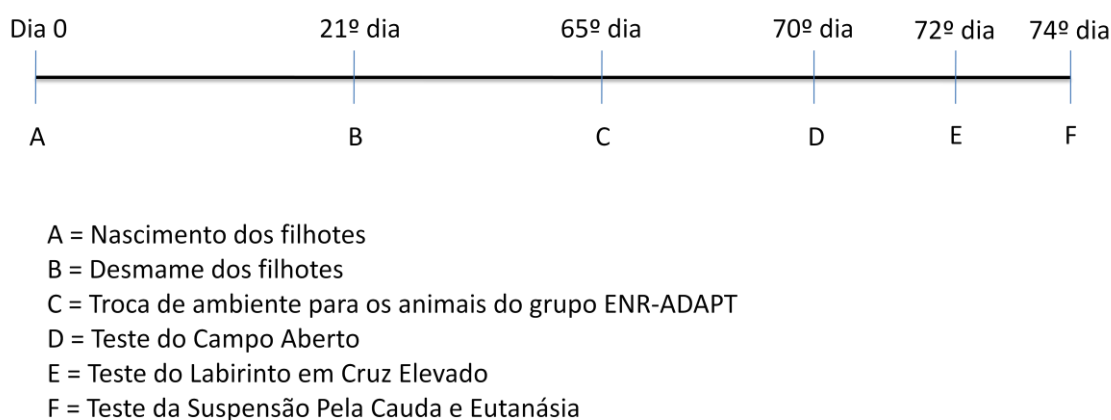


Figura 5: Protocolo experimental e linha temporal do experimento 1.

2.4. Experimento 2

Os filhotes oriundos destes casais foram criados em mesmos ambientes dos pais até o desmame onde foram colocados seis machos por caixa, os filhotes foram mantidos no mesmo ambiente ou foram criados no outro ambiente de criação após o desmame gerando os quatro grupos listados abaixo:

Grupo CON: Casais em ambiente padrão, filhotes mantidos em ambiente padrão. **Grupo**

ENR: Casais em ambiente enriquecido, filhotes mantidos em ambiente enriquecido.

Grupo PENR: Casais em ambiente padrão, filhotes mantidos em ambiente enriquecido após o desmame.

Grupo ENRP: Casais em ambiente enriquecido, filhotes mantidos em ambiente padrão após desmame.

Experimento 2

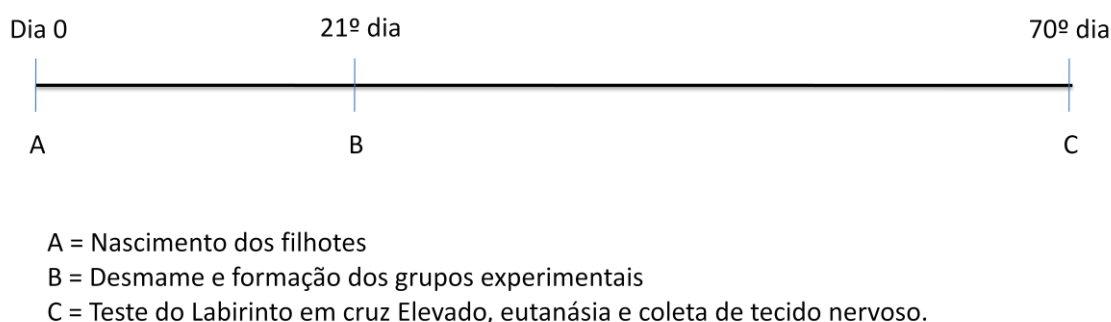


Figura 6: Protocolo experimental e linha temporal do experimento 2.

Aos 70 ± 2 dias de vida os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado durante 5 min. (Linden et al. 2003, 2004) e duas horas depois, os animais sofreram eutanásia por perfusão sob anestesia com sobredose de tiopental sódico (200mg/kg, i.p. Crisatália produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, SP Brasil), no momento em que o animal não apresentava reação ao estímulo nociceptivo de pinçamento da cauda foi realizada a cirurgia para a introdução da cânula para a perfusão intracardíaca. Esta cirurgia consistiu em incisar a parede abdominal com uma tesoura até evidenciar a cartilagem xifóide, pinçamento da cartilagem xifóide e incisão do diafragma com posterior exposição do coração. Com o coração ainda batendo foi introduzida uma cânula de 10,8 mm de tamanho e 1,2 mm de calibre ligada a uma bomba peristáltica (EL-500 insigth Ltda, Ribeirão Preto- SP Brasil).

Foram infundidas duas soluções com fluxo constante de 10 mL/minuto. Primeiro, foram perfundidos 20 mL de salina 0,9% contendo heparina 50UI por litro, sendo seguida de perfusão de 100 mL de uma solução contendo 4% de paraformaldeído (VETEC Química Fina Ltda, Duque de Caxias-RJ Brasil) em tampão fosfato em um pH de 7,6. Todas as soluções usadas na perfusão estavam a 4°C, desta forma, a perfusão sob anestesia foi o método de eutanásia utilizado.

Após a eutanásia, a calota craniana foi retirada e o encéfalo cuidadosamente retirado e imerso em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 4°C, permanecendo por 4 horas nesta solução. Após este período, o encéfalo foi colocado em uma solução de sacarose a 30% em tampão fosfato, e estocado a 4°C para posterior processamento (VILHENA-FRANCO et al. 2011).

Os encéfalos foram cortados em criostato (Microm, Walldorf, Alemanha) (-20°C) em secções coronais de 30 μ m de espessura, sendo os cortes divididos em duas duplicatas acondicionadas em dois eppendorfs para cada uma das duplicatas, contendo uma solução anti-freezen que era composta de 300mL de etilenoglicol, 200mL de glicerol e 500 mL de PB 0,1M pH 7,2 sendo estocados a -20°C. Apenas uma destas duplicatas foi utilizada para imunohistoquímica.

2.4.1. Imunohistoquímica (realizado no Laboratório de neuroendocrinologia FMRP-USP)

A imunohistoquímica seguiu o protocolo realizado por Vilhena-Franco e colaboradores (2011). Inicialmente foram realizadas três lavagens dos cortes com PB (0,01M por 5 minutos) para retirar a solução anti-freezer, sendo então, realizado o ensaio imunohistoquímico propriamente dito. Os cortes foram incubados em solução contendo 100 mL de PB 0,1 M, 300 µL de H₂O₂ e 300 µL de Triton X-100 (Sigma) por 30 minutos (esta etapa promove a inibição da peroxidase endógena que ainda possa estar ativa no tecido). Logo após isso os cortes foram incubados em solução contendo 100 mL de PB 0,1 M, 300 µL de TritonX-100 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) e 5g de albumina bovina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) por uma hora. A albumina presente nesta solução dificulta a ligação inespecífica dos anticorpos primários contra c-fos que serão adicionados na etapa seguinte.

Em seguida os cortes foram incubados com 20 µL de anticorpo anti c-fos (Ab-5, rabbit; Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) diluído na proporção de 1:10000 em solução contendo 60 µL de TritonX-100, 400 µL de soro normal de cabra, em PB 0,1M e completando o volume total da solução que foi de 20 mL, esta incubação foi realizada por 18 horas. A incubação posterior foi realizada na seguinte solução: 50 µL do anticorpo secundário contra o anticorpo primário (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA.) produzido em cabras (goat anti rabbit) diluído na proporção de 1:200 na seguinte solução 300 µL de soro normal de cabra, 60 µL de triton X-100 em PB 0,1M com volume final de 20 mL, durante uma hora. Nos últimos 20 minutos desta incubação, foi preparada a solução para a incubação seguinte.

Os cortes foram então incubados em solução contendo avidina biotina peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA.). Os cortes então foram incubados na seguinte solução: 2 gotas do reagente A (avidina), 2 gotas do reagente B (biotina), 60 µL de TritonX-100 e 20 mL de PB 0,1 M, incubados por uma hora. Após isso os cortes foram incubados em solução de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) intensificado até apresentarem a coloração escurecida (15 minutos). A solução de DAB intensificado foi a seguinte: 5 mg de DAB, 50 µL de H₂O₂, 1 mL de NiSO₄, 1,25 mL de CoCl₄ e foi completado até o volume final de 100 mL com PB 0,1 M. Após este processamento, foram realizadas as últimas três lavagens por 5 minutos em PB 0,01 M e então os cortes foram acondicionados em solução de PB 0,01 M a 4°C até sua colocação em lâminas previamente gelatinizadas, este prazo não excedeu 3 dias. Exceto antes da incubação na solução contendo anticorpo primário, antes e após todas as incubações foram realizadas três lavagens com PB 0,01M, e todas as incubações e lavagens foram realizadas sob agitação leve e em temperatura ambiente (25°C).

2.4.2. Confeção, Fotografia e Análise das Lâminas

Os cortes foram colocados nas lâminas e depois de secos, as lâminas foram colocadas em xilol por 5 minutos e depois rapidamente colocadas as lamínulas previamente untadas com entelam® (Merck Chemicals, Darmstadt, Alemanha) e então foram guardadas para posterior análise.

As lâminas foram fotografadas em câmera Nikon DS-Fi 1 acoplada ao microscópio Nikon eclipse 200 na objetiva de 10x. As regiões foram identificadas com ajuda de atlas FRANKLIN & PAXINOS, 2007. Foram retiradas fotos da substância cinzenta periaquedutal (-4,04 mm do Bregma a -4,48 mm do Bregma) usando como referência anatômica o aqueduto

mesencefálico, núcleos medial, central e basolateral da amígdala (-1,06 mm do Bregma a -1,82 mm do Bregma) usando como referência anatômica o trato óptico e de córtex cingulado (0,98 mm do Bregma a 0,14 mm do Bregma) usando como referência anatômica o fórceps menor do corpo caloso. Todas as fotos identificadas como presentes nas regiões/ núcleos definidas através do atlas, tiveram uma área padrão onde as células foram contadas. Esta foi feita manualmente com auxílio do programa imagej (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>), foram contadas todos os cortes obtidos destas regiões pré-definidas acima, e foi feita uma média por animal para cada região analisada da contagem de células imunorreativas, após isso os resultados foram normalizados pela área de 0,01mm.

2.5. Peso corporal, Análise Estatística e Comitê de Ética

Após o desmame no experimento 2 todos os animais foram pesados semanalmente. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey, já para a análise dos pesos foi realizada análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni, todas essas avaliações estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas Graphpad Prism[®] versão 4.0 e SPSS versão 19. Os experimentos seguiram todos os preceitos éticos e legais para o uso de animais de experimentação, tendo parecer favorável a realização dos experimentos pelo comitê de ética da UFRRJ (COMEP-UFRRJ- 172/2011).

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1

3.1.1. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

No teste do LCE, os grupos ENR-ADAPT ($20,0 \pm 3,7\%$; $p = 0,014$) e ENR-TOTAL ($24,0 \pm 1,9 \%$; $p = 0,002$) apresentaram aumento significativo na porcentagem de tempo em que permaneceram nos braços abertos em relação ao grupo PD1 ($6,9 \pm 3,2 \%$) (figura 7A). Ocorreu um aumento significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas no grupo ENR-TOTAL ($32,2 \pm 1,8\%$; $p = 0,001$) em relação ao grupo PD1 ($11,7 \pm 4,2 \%$), porém isso não foi observado no grupo ENR-ADAPT ($23,3 \pm 3,4 \%$; $p = 0,054$) (figura 7B). Em relação ao número total de entradas nos diversos braços, percebeu-se um aumento significativo tanto no grupo ENR-ADAPT ($17,3 \pm 1,5$; $p = 0,044$) quanto no ENR-TOTAL ($18,2 \pm 1,6$; $p = 0,021$) em relação ao grupo PD1 ($11,6 \pm 1,7$) (figura 7C). No que se refere ao tempo de permanência na plataforma central, o grupo ENR-ADAPT ($62,3 \pm 5,9$ s; $p = 0,021$) mostrou um aumento significativo em relação ao grupo PD1 ($36,2 \pm 7,9$ s) que não foi observado no grupo ENR-TOTAL ($50,6 \pm 5,1$ s; $p = 0,275$) (figura 7D).

O número de estiramentos realizados durante o teste se mostrou significativamente diminuído nos grupos ENR-ADAPT ($33,2 \pm 2,3$; $p = 0,035$) e ENR-TOTAL ($31,9 \pm 4,1$; $p = 0,021$) em relação ao grupo PD1 ($44,2 \pm 2,4$) (figura 8A), quando avaliamos a porcentagem de estiramentos realizados em áreas protegidas em relação ao total desses comportamentos ocorreu uma diminuição significativa no grupo ENR-TOTAL ($71,0 \pm 5,9 \%$, $p = 0,005$) em relação ao grupo PD1 ($92,8 \pm 2,9 \%$), no entanto não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos ENR-ADAPT ($79,9 \pm 4,5 \%$; $p = 0,110$) e PD1 (figura 8B). O número de mergulhos de cabeça realizados se mostrou significativamente aumentado nos animais ENR-TOTAL ($21,6 \pm 1,7$; $p = 0,011$) em relação ao grupo PD1 ($12,2 \pm 1,5$) o que não foi observado no grupo ENR-ADAPT ($15,9 \pm 2,7$; $p = 0,423$) (figura 8C). Quando comparamos a porcentagem de mergulhos de cabeça realizados em áreas protegidas

em relação ao total de mergulhos de cabeça realizados durante o teste ocorreu uma diminuição significativa no grupo ENR-TOTAL ($49,5 \pm 4,1$ %; $p = 0,005$) em relação ao grupo PD1 ($85,9 \pm 5,6$ %), diferença esta, não observada no grupo ENR-ADAPT ($72,4 \pm 5,4$ %; $p = 0,110$) em relação ao PD1 (figura 8D). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ENR-TOTAL, ENR-ADAPT e PD1 nos parâmetros entradas nos braços fechados ($12,3 \pm 1,1$; $p = 0,996$; $13,4 \pm 1,3$; $p = 0,884$ e $9,8 \pm 1,2$; respectivamente) e número de levantamentos realizados ($31,0 \pm 3,3$; $p = 0,126$; $22,8 \pm 1,9$; $p = 0,994$ e $23,2 \pm 2,9$; respectivamente).

TESTE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO - EXPERIMENTO 1

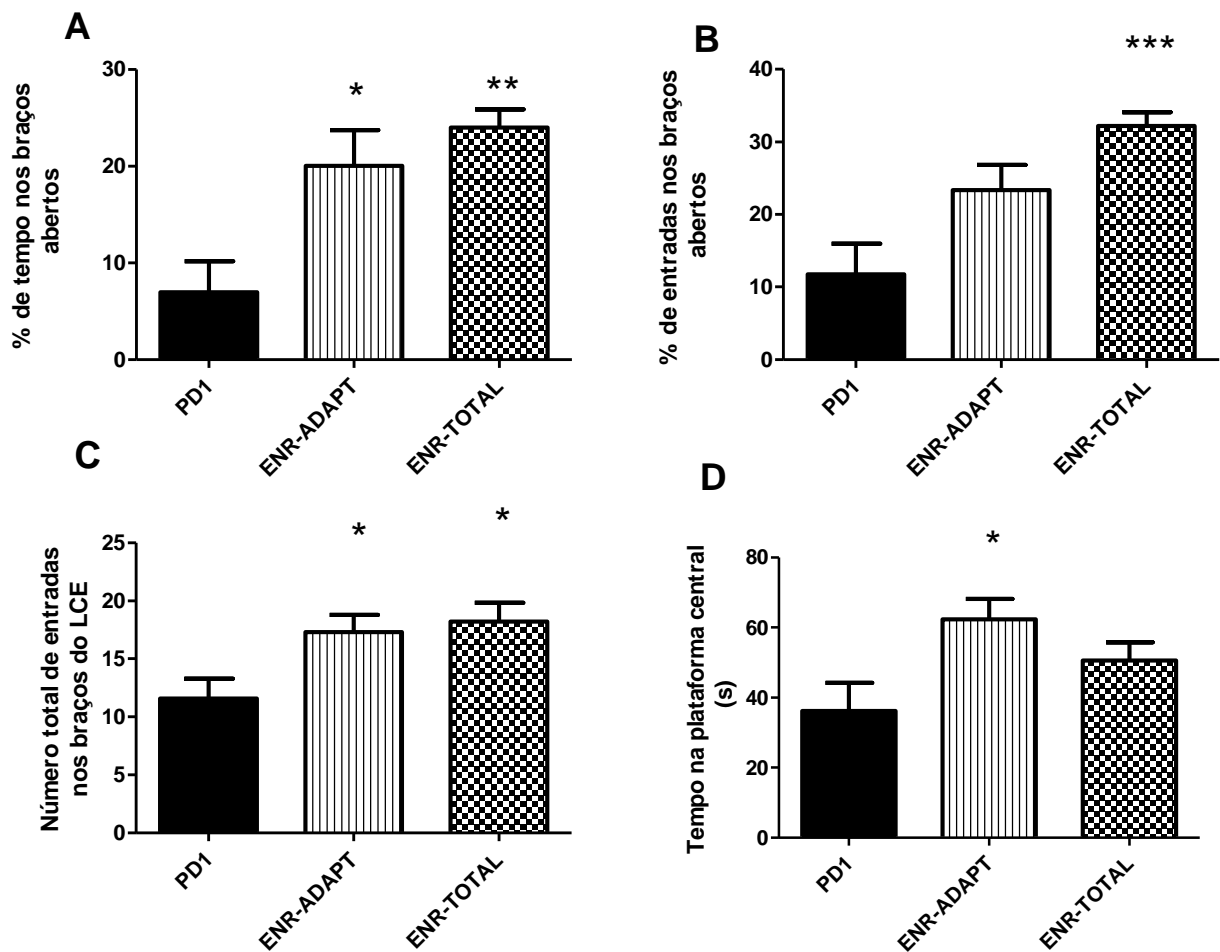


Figura 7: Parâmetros comportamentais avaliados durante exposição por 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado. Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (A), porcentagem de entradas nos braços abertos (B), número total de entradas (C), porcentagem de tempo despendido na plataforma central (D). As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey. N = 11-12.

TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO - EXPERIMENTO 1

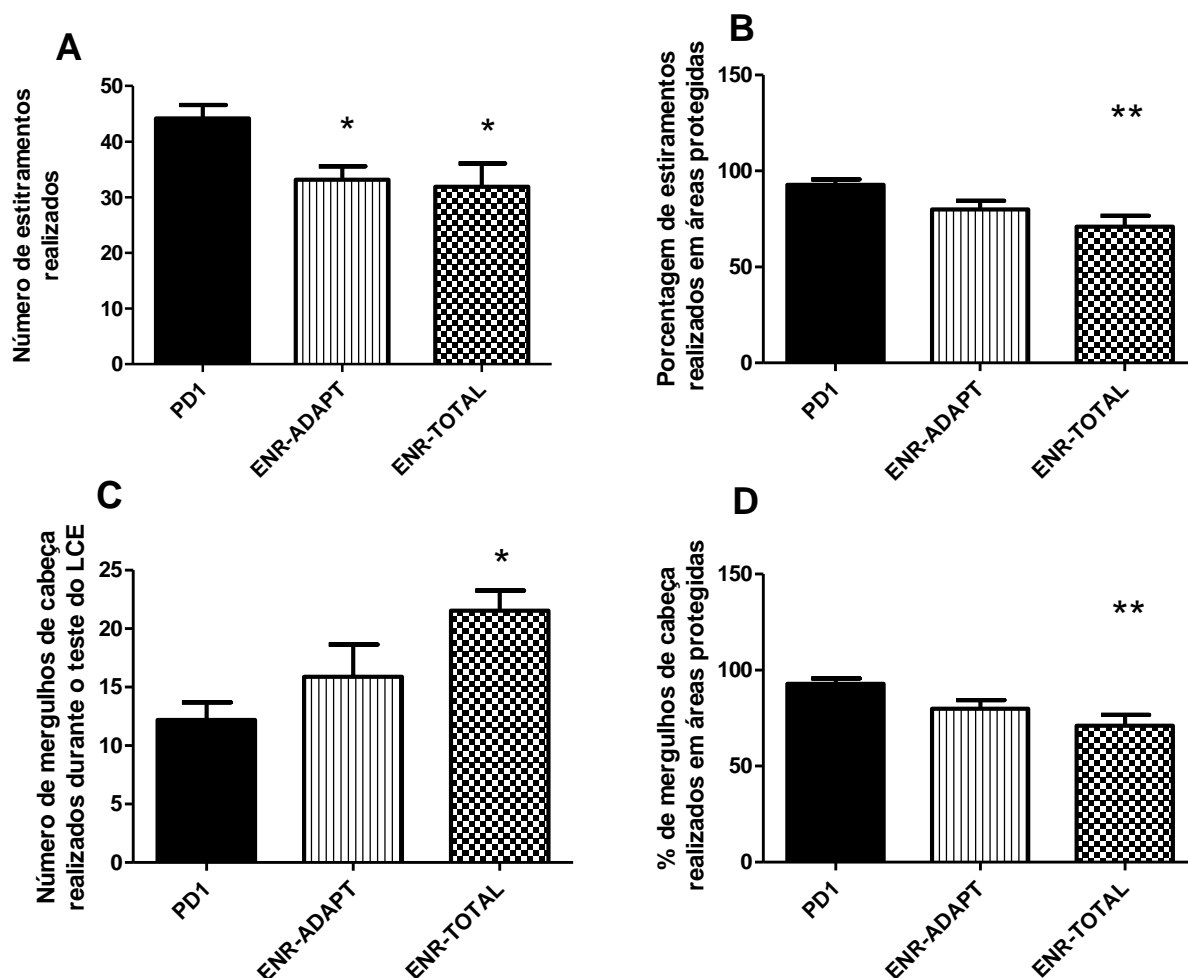


Figura 8: Parâmetros comportamentais avaliados durante exposição por 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado. Número de estiramentos realizados (A), porcentagem de estiramentos realizados em áreas protegidas (B), número total de mergulhos de cabeça (C), Porcentagem de mergulhos de cabeça realizados em áreas protegidas (D). As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey. $N = 11-12$.

3.1.2 Teste do Campo Aberto

Os animais do grupo ENR-ADAPT ($139,3 \pm 9,0$; $p = 0,013$) e do grupo ENR-TOTAL ($133,8 \pm 9,7$; $p = 0,026$) apresentaram aumento significativo do número de quadrantes percorridos em relação ao grupo PD1 ($96,7 \pm 9,6$) (figura 9A) assim como foi observado aumento significativo no número de levantamentos realizados nos grupos ENR-ADAPT ($60,0 \pm 6,7$; $p = 0,013$) e ENR-TOTAL ($69,3 \pm 3,4$; $p < 0,001$) vs. PD1 ($37,7 \pm 4,7$) (figura 9B). Outros parâmetros analisados como episódios e tempo de duração de auto-limpezas e o tempo de inatividade não diferiram entre os grupos e estão sumarizados na tabela 2.

TESTE DO CAMPO ABERTO – EXPERIMENTO 1

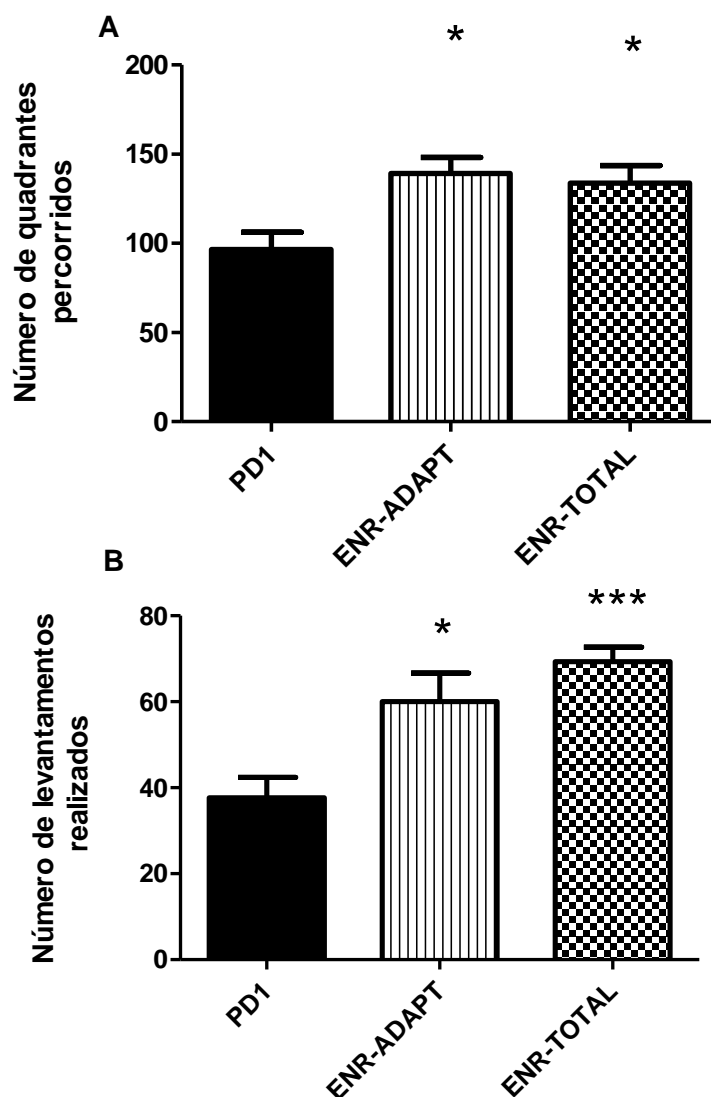


Figura 9: Parâmetros comportamentais avaliados durante exposição por 5 min no teste do campo aberto. Número de quadrantes percorridos (A), número de levantamentos realizados (B). As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey. $N = 11-12$.

Tabela 2: Parâmetros adicionais analisados no teste do campo aberto (experimento 1). Os resultados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média. $N=11-12$.

	PD1	ENR-ADAPT	ENR-TOTAL
Episódios de Auto-limpeza	$2,7 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,4$ ($p = 0,369$)	$2,3 \pm 0,5$ ($p = 0,994$)
Tempo de duração da Auto-limpeza (s)	$10,0 \pm 1,6$	$14,1 \pm 1,9$ ($p = 0,756$)	$15,2 \pm 6,4$ ($p = 0,133$)
Tempo de Inatividade (s)	$8,4 \pm 1,8$	$3,5 \pm 0,8$ ($p = 0,126$)	$4,8 \pm 2,0$ ($p = 0,284$)
Bolos fecais	$1,7 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,5$ ($p = 0,173$)	$1,4 \pm 0,4$ ($p = 0,895$)

3.1.3. Teste de Suspensão Pela Cauda

Neste teste foi analisado o tempo de imobilidade do animal, este parâmetro não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Os resultados estão sumarizados no quadro 2.

Tabela 3: Tempo de imobilidade teste de suspensão pela cauda. Valores em um total de 4 minutos. Os resultados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média. N= 11-12.

	PD1	ENR-ADAPT	ENR-TOTAL
Tempo de Imobilidade (em segundos)	91,73 \pm 10,83	63,91 \pm 15,01 (p = 0,465)	60,67 \pm 13,24 (p = 0,589)

3.2. Experimento 2

3.2.1. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Após exposição dos animais ao Labirinto em Cruz Elevado foi observado um aumento significativo na porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos nos grupos ENR (20,42 \pm 2,7 %; p = 0,002), ENRP (19,23 \pm 2,7%; p = 0,004) e PENR (22,7 \pm 3,2%; p = 0,001) em relação ao grupo CON (5,2 \pm 1,5%) (figura 10A), assim como um aumento significativo na porcentagem de entradas realizadas aos braços abertos nos grupos ENR (33,7 \pm 2,8 %; p = 0,001), ENRP (28,3 \pm 4,4 %; p = 0,023) e PENR (33,5 \pm 4,2%; p = 0,003) em relação ao grupo CON (12,1 \pm 3,0 %) (figura 10 B). O número total de entradas nos braços (abertos e fechados) apresentou-se significativamente aumentado nos grupos ENR (16,4 \pm 1,4; p = 0,039), ENRP (16,7 \pm 0,9; p = 0,026) e PENR (20,8 \pm 1,8; p < 0,001) em relação ao grupo CON (11,1 \pm 1,0) (figura 10 C) enquanto o número entradas nos braços fechados se mostrou aumentado significativamente apenas no grupo PENR (13,7 \pm 1,3; p = 0,025) em relação ao grupo CON (9,5 \pm 0,7), os grupos ENR (10,6 \pm 0,8; p = 0,873) e ENRP (11,7 \pm 0,8; p = 0,390) não apresentaram esta diferença (figura 10D). Já o número de estiramentos apresentou-se significativamente diminuído nos grupos ENR (3,6 \pm 0,7; p = 0,002), ENRP (3,8 \pm 0,8; p = 0,003) e PENR (2,1 \pm 0,5; p < 0,001) em relação ao grupo CON (8,9 \pm 1,7) (figura 11A). Os mergulhos de cabeça apresentaram-se significativamente aumentados nos grupos ENR (18,0 \pm 1,5; p = 0,038) e PENR (18,2 \pm 2,0; p = 0,046) em relação ao grupo CON (10,9 \pm 1,6) resultado não verificado no grupo ENRP (13,2 \pm 1,8; p = 0,798) (figura 11B). A porcentagem de estiramentos realizados em áreas protegidas se mostrou diminuída significativamente no grupo PENR (44,4 \pm 13,7 %; p = 0,004) em relação ao grupo CON (97,3 \pm 1,8 %;), porém não houve diferença estatística entre os grupos ENR (67,1 \pm 8,4 %; p = 0,145) e ENRP (69,2 \pm 10,4 %; p = 0,193) (figura 11C) neste parâmetro. Já no que se refere à porcentagem de mergulhos de cabeça realizados em áreas protegidas os grupos ENRP (57,5 \pm 5,6 %; p = 0,003) e PENR (57,6 \pm 5,2 %; p = 0,006) diminuíram significativamente este parâmetro quando comparados com o CON (84,6 \pm 4,6 %) enquanto o grupo ENR (71,0 \pm 4,2 %; p = 0,258) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo CON (figura 11D). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CON, ENR, ENRP e PENR nos parâmetros Tempo de permanência na plataforma central (14,0 \pm 1,9; 19,9 \pm 1,9; p = 0,063; 20,5 \pm 1,9; p = 0,092 e 18,9 \pm 2,0; p = 0,114 respectivamente) e número de

levantamentos realizados ($17,0 \pm 1$; $20,3 \pm 2,0$; $p = 0,650$ $19,0 \pm 1,5$; $p = 0,900$ e $21,5 \pm 2,6$; $p = 0,468$ respectivamente).

TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO- EXPERIMENTO 2

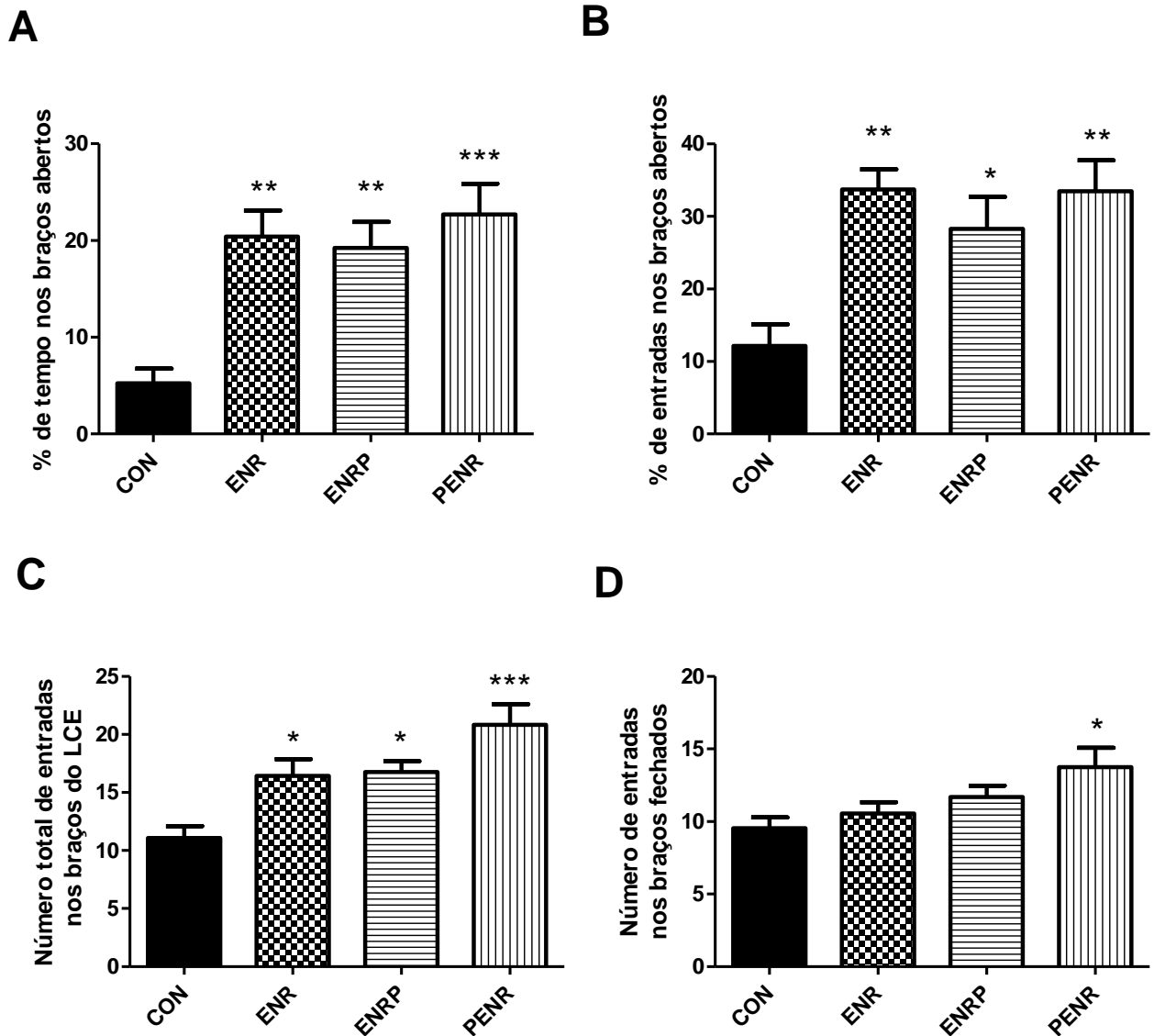


Figura 10: Parâmetros comportamentais avaliados durante exposição por 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado. Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (A), porcentagem de entradas nos braços abertos (B), número total de entradas (C), número de entradas nos braços fechados (D). As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey. $N = 12$.

TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO- EXPERIMENTO 2

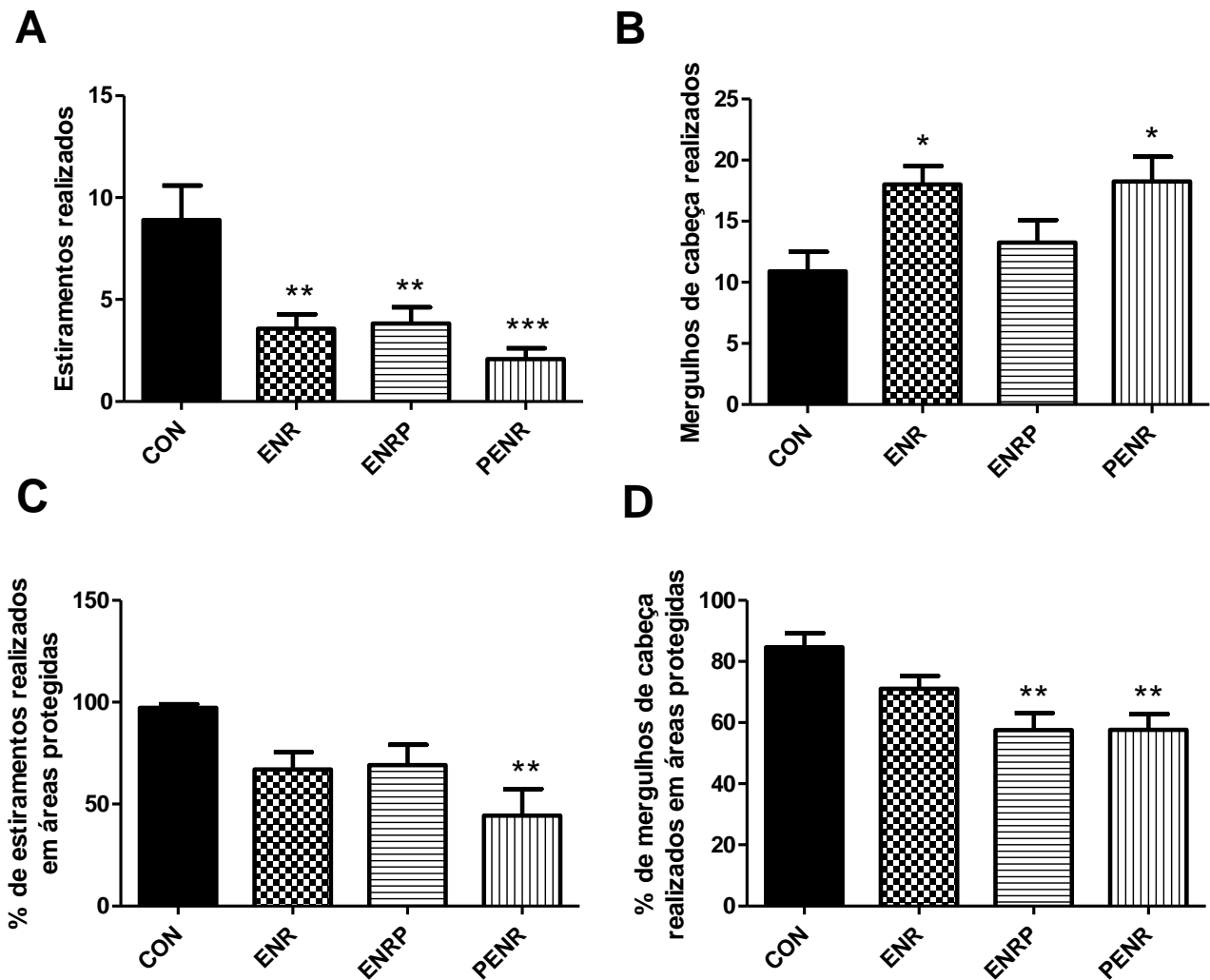


Figura 11: Parâmetros comportamentais avaliados durante exposição por 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado. Número total de estiramentos realizados (A), número total de mergulhos de cabeça realizados (B), porcentagem de estiramentos realizados em áreas protegidas (C), Porcentagem de mergulhos de cabeça realizados em áreas protegidas (D). As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey. N = 12.

3.2.2. Acompanhamento de peso

Não foi observada qualquer diferença estatística nos pesos dos animais dos diversos grupos. Os resultados são sumarizados abaixo na tabela 4.

Tabela 4: Peso em gramas dos animais submetidos ao protocolo experimental 2.

	CON	ENR	ENRP	PENR
Semana 4	19,9 ± 1,6	23,7 ± 0,7	21,7 ± 1,8	19,7 ± 1,6
Semana 5	28,6 ± 0,9	32,1 ± 0,7	30,4 ± 1,9	28,7 ± 1,1
Semana 6	33,4 ± 0,8	35,8 ± 0,5	33,4 ± 2,4	34,0 ± 1,3
Semana 7	38,6 ± 1,1	38,2 ± 0,5	39,8 ± 1,6	36,3 ± 1,2
Semana 8	40,9 ± 0,9	41,5 ± 0,6	42,2 ± 1,4	39,9 ± 0,8
Semana 9	42,5 ± 1,5	42,7 ± 0,8	45,1 ± 1,4	41,0 ± 1,0
Semana 10	44,6 ± 1,2	43,6 ± 0,8	45,9 ± 1,4	41,6 ± 0,7

Os valores estão representados por média ± erro padrão da média. Os valores estatístico para a ANOVA com medidas repetidas foram F= 1,275; p=0,305.

3.2.3. Análise da expressão de *c-fos*

Não houve diferenças significativas na contagem de *c-fos* na substância cinzenta periaquedutal dorsal e no córtex cingulado (tabela 5). No núcleo medial da amígdala não foi encontrada diferenças significativas nas contagens de células imunorreativas dos grupos ENR (5,6 ± 1,1; p = 0,876), ENRP (6,8 ± 0,8; p = 1,000) e PENR (6,8 ± 1,6; p = 1,000) em relação ao grupo CON (6,9 ± 1,1) (figura 12 A). Do mesmo modo, também não foram observadas diferenças estatísticas nas contagens de *c-fos* dos grupos ENR (1,6 ± 0,5; p = 0,519), ENRP (2,8 ± 0,9; p = 0,999) e PENR (2,0 ± 0,4; p = 0,833) em relação ao grupo CON (2,7 ± 0,5) no núcleo central da amígdala (figura 12 B). Também não foram encontradas diferenças significativas entre as contagens de células imunorreativas para *c-fos* entre os grupos ENR (1,6 ± 0,3; p = 0,201), ENRP (2,8 ± 0,3; p = 0,999) e PENR (1,8 ± 0,3; p = 0,385) em relação ao grupo CON (2,7 ± 0,6) no núcleo basolateral da amígdala (figura 12 C).

Tabela 5: Análise imunohistoquímica para neurônios imunoreativos para *c-fos* para cada 0,01mm² em animais submetido ao LCE.

	CON	ENR	ENRP	PENR
PAG	5,4 ± 0,43	4,3 ± 0,32 (p = 0,722)	3,7 ± 0,97 (p = 0,378)	4,7 ± 0,53 (p = 0,912)
Córtex Cingulado	1,4 ± 0,24	0,7 ± 0,02 (p = 0,992)	2,2 ± 0,36 (p = 0,770)	1,7 ± 0,20 (p = 1,000)

Os valores são representados por média ± erro padrão da média. PAG = Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal

IMUNOHISTOQUÍMICA PARA C- FOS APÓS EXPOSIÇÃO AO LCE

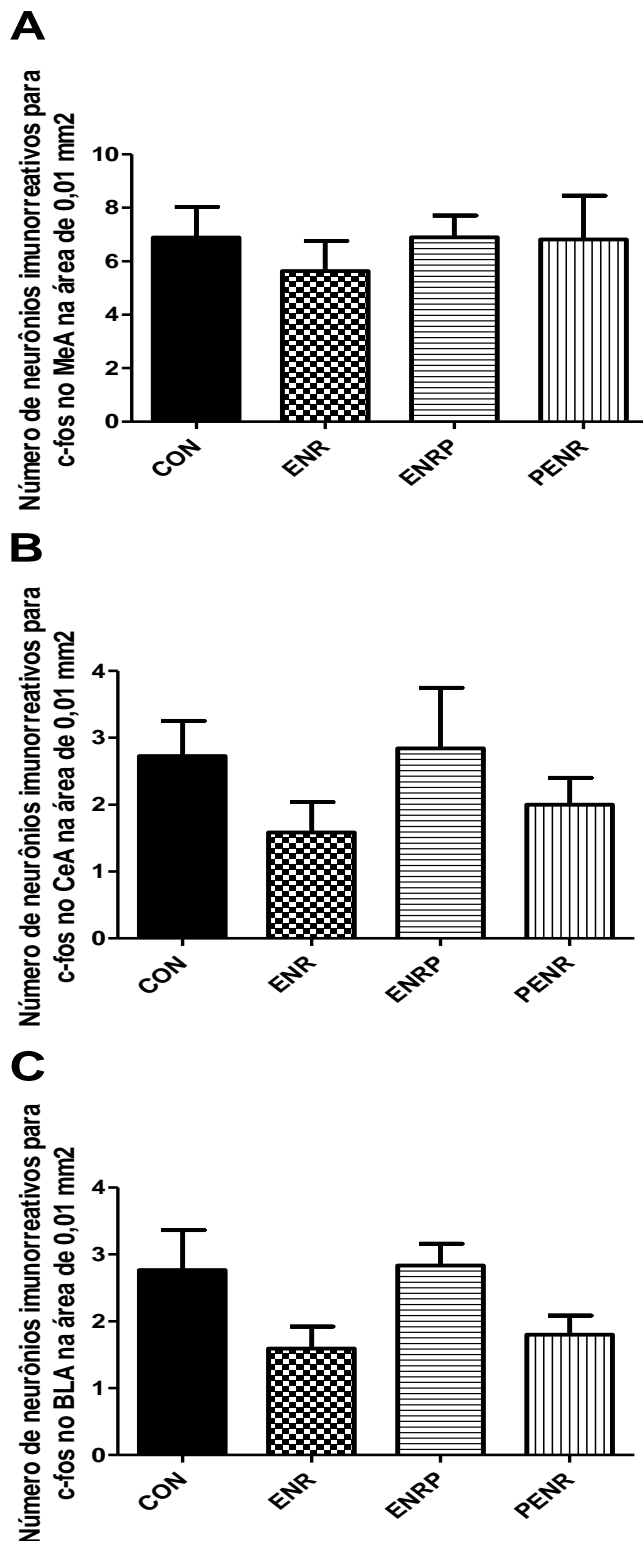


Figura 12: Número de células imunoreativas para c-fos na área de 0,01 mm² após exposição por 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado. (A) núcleo medial amígdala (MeA), (B) núcleo central da amígdala (CeA), (C) núcleo basolateral da amígdala (BLA). As barras representam as médias e linhas os erros padrões das médias. * $p < 0,05$; ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey. $N = 5$.

FOTOS REPRESENTATIVAS DE CORTES DE AMÍGDALA

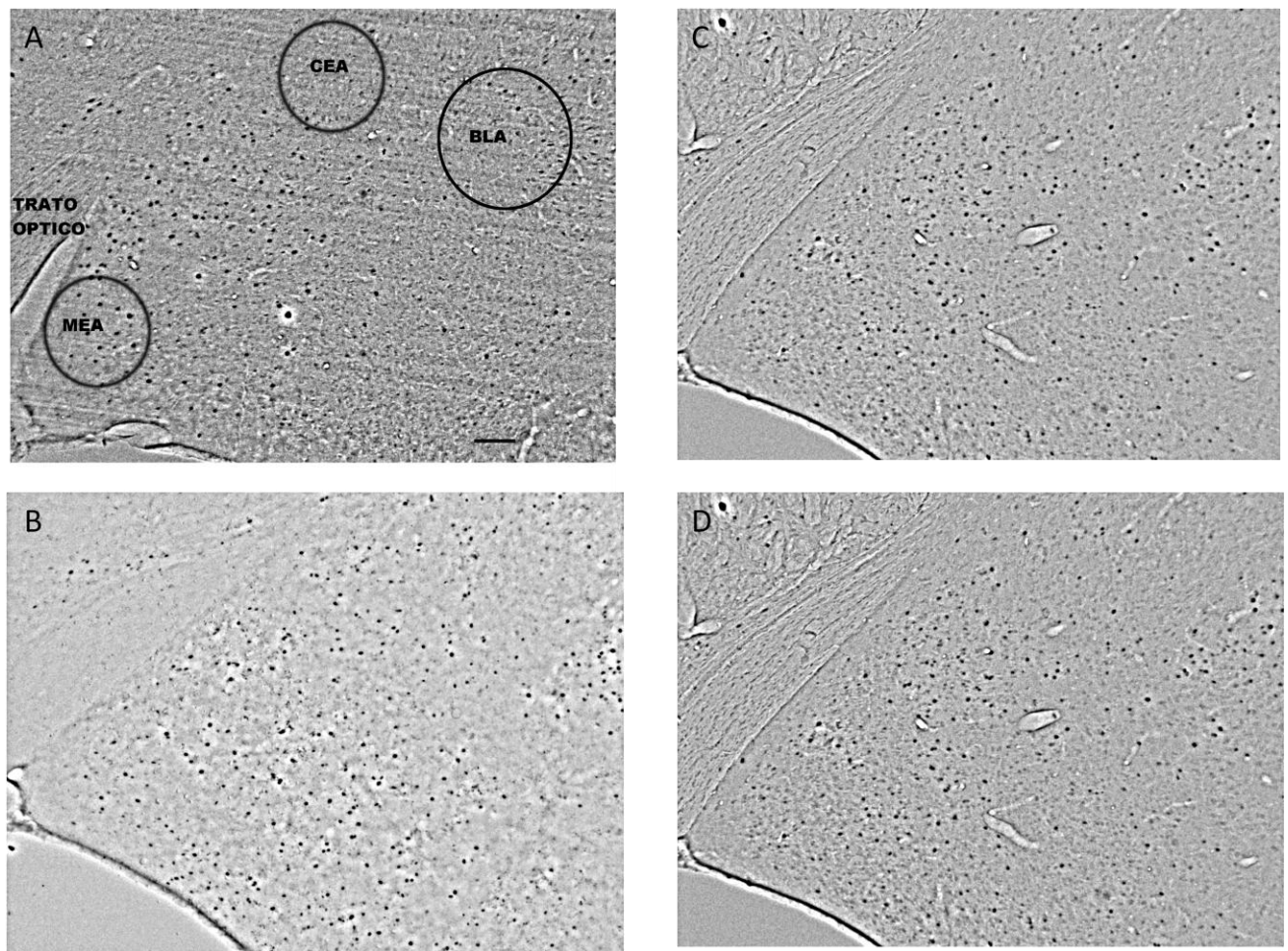


Figura 13: Fotos representativas da amígdala aumento de 10x, a relação entre as fotos e os grupos é apresentada a seguir: A = CON, B = ENR, C = ENRP e D = PENR. Barra de calibração presente na foto A mede 100 μm.

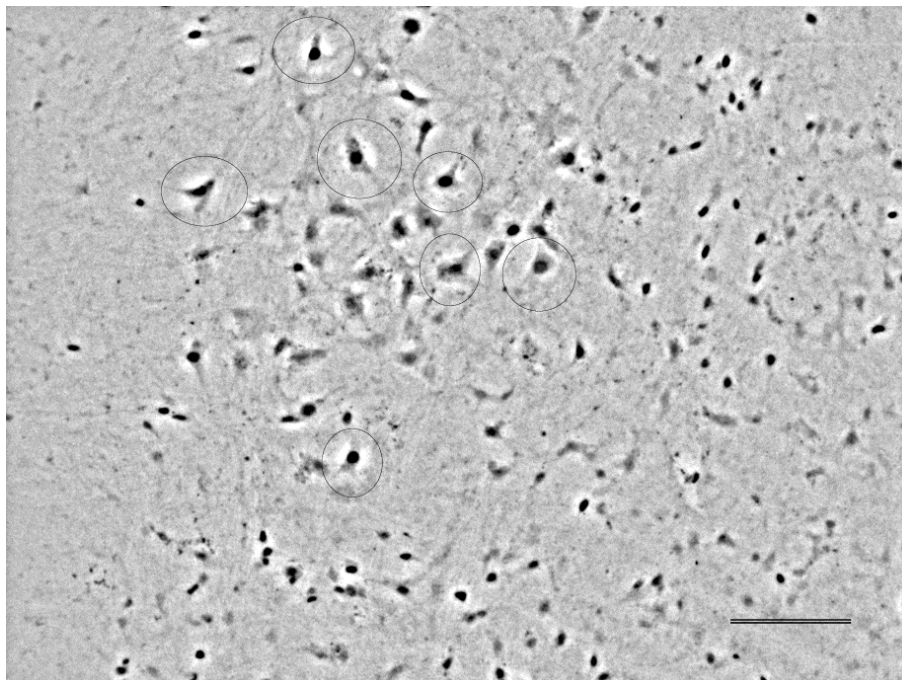


Figura 14: Foto de neurônios da substância cinzenta periaquedutal com núcleos imunoreativos para c-fos, aumento de 20x. Barra de calibração presente na foto mede 100 μm .

4. DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1

O experimento 1 visou analisar os possíveis efeitos do enriquecimento ambiental em uma bateria de testes comportamentais composta por CA, LCE e SPC. Apesar de relatos na literatura de que o enriquecimento ambiental apresenta efeito na redução de comportamentos análogos a depressão, neste experimento o teste de SPC não apresentou diferenças entre os grupos. A ausência de efeito no teste SPC sugere que o protocolo por nós utilizado não tem potencial de reduzir comportamentos análogos à depressão (BAI et al. 2001). Já no teste do CA o aumento de quadrantes percorridos reflete um aumento da atividade locomotora, enquanto o número de levantamentos realizados reflete atividade exploratória (ARCHER, 1973; BRENES et al. 2009). Estes resultados concordam com a proposição de Roy e colaboradores de que animais submetidos ao enriquecimento ambiental têm uma maior motivação em explorar o ambiente devido à redução do medo a ambientes novos (ROY et al. 2001).

Em relação ao teste do LCE os grupos submetidos aos protocolos de enriquecimento ambiental apresentaram um aumento da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total do teste, este parâmetro é largamente aceito como um

indicativo de redução dos níveis de ansiedade. Do mesmo modo, a porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas nos diversos braços (abertos e fechados) também é associada à redução da ansiedade (CRUZ et al. 1994; LISTER, 1987; PELLOW et al. 1985; RODGERS & JHONSON, 1995; WEISS et al. 1998; VIOLLE et al. 2009), neste ultimo parâmetro só se observou aumento no grupo ENR-TOTAL. Já o número total de entradas nos diversos braços mostra-se aumentado nos dois grupos submetidos ao enriquecimento ambiental neste experimento. Este resultado pode ser correlacionado com o aumento da atividade locomotora no teste. Apesar do parâmetro número total de entradas ser relacionado ao aumento de atividade motora, devemos considerar que este parâmetro é influenciado pelo número de entradas nos braços abertos que é um índice de ansiedade neste teste e do número de entradas nos braços fechados. Considerando o número de entradas nos braços fechados que é um parâmetro relacionado à atividade locomotora, não foi observada diferença estatística nos grupos, apesar das médias dos grupos submetidos ao enriquecimento serem maiores o que pode ter contribuído para o resultado no número de entradas totais realizadas (CRUZ et al. 1994; RODGERS & JHONSON, 1995).

Devemos ser cautelosos e considerar estes resultados junto com o aumento de atividade motora no teste do campo aberto, já que segundo Weiss e colaboradores o aumento da atividade locomotora pode gerar confusão na análise de ansiedade no LCE, porém estes mesmos autores destacaram que o aumento do número total de entradas foi acompanhado pelo aumento da preferência aos braços abertos quando os animais foram tratados com drogas ansiolíticas (WEISS et al. 1998). Adicionalmente o aumento na porcentagem de permanência na plataforma central apresentado pelo grupo ENR-ADAPT pode ser associado como um comportamento de tomada de decisão (RODGERS & JHONSON, 1995). Então considerando as variáveis clássicas do LCE acreditamos haver um efeito ansiolítico nos animais criados em ambiente enriquecido.

Os grupos ENR-TOTAL e ENR-ADAPT apresentaram redução nos estiramentos realizados, este parâmetro é diretamente relacionado a comportamentos de avaliação de risco, portanto a redução destes comportamentos é um indicativo de redução dos níveis de ansiedade (RODGERS & JHONSON, 1995), já que comportamentos de avaliação de risco foram caracterizados como comportamentos defensivos realizados em situações de alto nível de medo e/ou ansiedade (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; WEISS et al. 1998). No que se refere ao número total de mergulhos de cabeça realizados, apenas o grupo ENR-TOTAL apresentou um aumento, este resultado pode ser associado à maior atividade exploratória no teste (HOLMES et al. 2000; RODGERS & JHONSON, 1995). Considerando que o LCE pode ser dividido em duas regiões, áreas desprotegidas representadas pelos braços abertos e áreas protegidas representadas pelos braços fechados e pela plataforma central (HOLMES et al. 2000; RODGERS et al. 2004), quando analisamos preferência de regiões protegidas do LCE para a realização dos comportamentos de estiramentos e de mergulhos de cabeça, percebemos uma diminuição nesses dois parâmetros nos animais do grupo ENR-TOTAL, a diminuição dessas porcentagens pode ser associada à redução da ansiedade nesse teste (RODGERS & JHONSON, 1995).

4.2. Experimento 2

Em virtude dos resultados do experimento 1, foi realizado o segundo experimento para avaliar a influência do enriquecimento ambiental em diferentes fases da vida no estado de ansiedade. Associado a isso foi feito também um estudo de neuroanatomia funcional para avaliar se a diferença no comportamento apresentado pelos animais era refletida na expressão de proteína c-fos um marcador geral de atividade neuronal (KOVÁCS, 1998).

Conforme observado no experimento 1, no teste do LCE houve aumento da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em todos os grupos submetidos ao enriquecimento ambiental, esse resultado é associado à diminuição da ansiedade em roedores neste teste. Além disso, os grupos ENR, ENRP e PENR também apresentaram aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos que também sugere uma diminuição de comportamentos análogos à ansiedade no LCE (CRUZ et al. 1994; LISTER, 1987; PELLOW et al. 1985; RODGERS & JHONSON, 1995; WEISS et al. 1998; VIOLLE et al. 2009). Quando observamos o número total de entradas há um aumento em todos os grupos submetidos ao enriquecimento ambiental, sendo este parâmetro associado a atividade locomotora durante este teste (CRUZ, et al. 1994; RODGERS & JHONSON 1995; WEISS et al. 1998). Mas quando consideramos outro parâmetro associado à atividade motora neste teste o número de entradas nos braços fechados (CRUZ et al. 1994; RODGERS & JHONSON, 1995), percebemos um aumento apenas no grupo PENR. Somado a isso todos os grupos que foram submetidos ao enriquecimento mostraram redução no número de estiramentos realizados. Esta redução pode ser associada à redução dos níveis de ansiedade como já descrito anteriormente. Em relação aos mergulhos de cabeça observamos um aumento nos grupos ENR e ENRP, indicando assim um aumento da atividade exploratória nesses grupos (HOLMES et al. 2000; RODGERS & JHONSON, 1995). Porém, quando consideramos a preferência de realização de mergulhos de cabeça em áreas protegidas do LCE, percebemos uma redução nos grupos ENRP e PENR não sendo observada no grupo ENR, além disso, também foi observada uma redução dos estiramentos realizados em áreas protegidas apenas no grupo PENR, não sendo observada nos outros grupos. Estes são mais dois indicativos de redução da ansiedade nestes animais (RODGERS & JHONSON, 1995).

Assim, admitindo que o LCE possa ser usado para avaliar o estado de ansiedade dos animais (CHAMPILLON et al. 1999; NISHIKAWA et al. 2004), apesar de pequenas diferenças quando consideramos parâmetros isolados, apresentamos aqui dois experimentos que indicam um efeito ansiolítico dos protocolos de enriquecimento ambiental adotado. Uma possível explicação para esses resultados é que o enriquecimento ambiental proporciona melhores possibilidades de expressão comportamental de animais cativos durante a vida em relação aos animais criados em ambiente padrão de laboratório, e isso se reflete em testes comportamentais (BAUMANS, 2005). Isso concorda com vários autores que observaram efeitos ansiolíticos proporcionados por protocolos de enriquecimento ambiental (CHAMPILLON et al. 1999; FOX et al. 2006) mesmo quando adotado depois do desmame (SIMPSON & KELLY, 2011). Assim, nosso protocolo de enriquecimento ambiental baseado no controle do ambiente e em um ambiente com sem alterações frequentes, parece reduzir comportamentos análogos à ansiedade e promover maior atividade exploratória nos animais criados nele quando submetidos ao LCE. Isso independentemente se a adoção do protocolo de enriquecimento ambiental é feita antes ou depois do desmame e mesmo se é retirado após o desmame.

Após duas horas do teste do LCE os animais sofreram eutanásia e seus encéfalos foram coletados para avaliação da expressão de proteína c-fos. A avaliação imunohistoquímica para c-fos pode ser considerada um mapeamento da ativação neuronal em resposta a um estímulo, e tem sido usada associada a exposição de roedores ao LCE (BEIJAMINI & GUIMARÃES, 2006; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). No nosso experimento foram analisadas as seguintes regiões: parte dorsal da substância cinzenta periaqueductal, núcleos basolateral, medial e central da amígdala, e córtex cingulado. Estas áreas estão envolvidas com comportamentos defensivos inclusive os comportamentos realizados pelos animais no LCE (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; DUNCAN et al. 1996; HINKS et al. 1996; LINDEN et al. 2004; GRAEFF et al. 1993).

A substância cinzenta periaquedutal (PAG) é uma área ativada pelo medo em animais e em humanos e parece ter função na organização de comportamentos defensivos, desta forma não é surpreendente que esta seja uma das regiões implicadas na fisiopatologia de transtornos de ansiedade (GRAEFF et al. 1993; SILVEIRA et al. 1993). Esta região recebe e emite projeções para diversas outras áreas relacionadas ao comportamento de medo e ansiedade como amígdala hipotálamo, e córtex medial pré-frontal (DAVIS et al. 1992; GRAEFF et al. 1993; KICHENSKI & CAROBREZ, 2010; SAH et al. 2003). Evidências experimentais mostram que estimulações elétricas e químicas na PAG dorsal provocam em animais comportamentos semelhantes a ataques de pânico em humanos (ANDRADE et al. 2012; SILVEIRA et al. 2001; SIQUEIRA et al. 2010), também é sugerido que os sintomas apresentados por pacientes com síndrome de pânico podem ocorrer por disfunção na atividade da PAG (GRAEFF et al. 1993).

Além da participação na síndrome do pânico, Graeff e seus colaboradores perceberam que a injeção de midazolam (um benzodiazepínico) na PAG dorsal induziu efeitos ansiolíticos no LCE, e a administração anterior de flumazenil (um antagonista competitivo de receptores de benzodiazepínicos) ao midazolam aboliu esta resposta ansiolítica, indicando que uma menor atividade da PAG reflete em diminuição dos comportamentos análogos a ansiedade no LCE (GRAEFF et al. 1993). Isto é reforçado pela observação de Kishenski e Carobrez de que a administração de antagonistas glutamatérgicos na PAG induz um comportamento ansiolítico neste teste (KICHENSKI & CAROBREZ, 2010). Por conta disso, a PAG também pode estar envolvida no transtorno de ansiedade generalizada, já que o LCE induz aumento do estado de ansiedade que pode ser associado com o transtorno de ansiedade generalizada (RODGERS & DALVI, 1997). Além disso, a administração sistêmica de drogas que induzem ansiedade em humanos também aumenta a expressão de c-fos na PAG (SINGEWALD & SHARP, 2000). Nossos resultados não mostram qualquer alteração na expressão de c-fos em animais submetidos ao enriquecimento ambiental nesta região. Isso concorda com os dados obtidos com o tratamento sistêmico com midazolam que mesmo promovendo efeitos ansiolíticos no teste do LCE, não promoveu diferenças na expressão de c-fos na PAG de animais expostos a este teste (ALBRECHET-SOUZA et al. 2009).

Outra região analisada foi a amígdala, segundo Sah e colaboradores, o complexo amigdalóide que compreende 13 divisões está localizado no lobo temporal, e pode ser dividido em três grandes complexos: complexos basolateral (composto pelos núcleos basolateral, lateral e basal acessório), corticomedial (que tem diversos núcleos sendo eles: núcleo lateral do trato olfatório, núcleo leito do trato olfatório, núcleo cortical e o córtex pré-amigdalóide) e centromedial (consistindo nos núcleos central, medial e a parte amigdalóide do núcleo leito da estria terminal e ainda outros núcleos como núcleo intercalar, área amigdal anterior e área amígdalo-hipocampal (SAH et al. 2003). Apesar de muitos núcleos que compõem o complexo amígdalóide receberem e emitirem projeções para outras áreas encefálicas, a principal entrada de informações para a amígdala é o complexo basolateral, e a principal saída é o núcleo central da amígdala (DAVIS, 1992; SAH et al. 2003). A amígdala recebe projeções de regiões relacionadas com todas as modalidades sensoriais, como diversas regiões sensoriais do córtex, e com áreas que compõe os circuitos responsáveis por comportamentos defensivos, como o córtex medial pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e PAG (GRAEFF et al. 1993; HEIDBREder & GROENEWEGEN, 2003; SAH et al. 2003).

Neurônios localizados na amígdala emitem projeções ao hipotálamo, modulando as respostas endócrinas e autonômicas relacionadas ao medo e ansiedade. A amígdala também altera as respostas autonômicas através da inervação à PAG, e por inervação direta ao núcleo dorsal do nervo vago. Além disso, a amígdala também modula outros comportamentos característicos de situações que envolvem medo e ansiedade como sobressaltos, através de projeções para o núcleo reticular pontino caudal e a expressão facial de medo em humanos

devido à inervação ao núcleo motor do nervo trigêmeo (DAVIS, 1992). Estudos em humanos mostraram que a estimulação elétrica da amígdala produz sensações de medo e ansiedade, que são acompanhadas de aumento dos níveis de glicocorticóides circulantes, aumento da pressão arterial e ritmo cardíaco que são alterações autonômicas e endócrinas associadas a essas sensações. Esta região tem grandes concentrações de receptores GABAérgicos com sítios de ligação para benzodiazepínicos e parece ter importância na fisiopatologia do transtorno de ansiedade generalizada (DAVIS, 1992; GRAEFF et al. 1993).

Estudos com animais utilizando tanto protocolos de medo condicionado ou incondicionado também mostram o envolvimento da amígdala (NICOLAEV et al. 2002; SAH et al. 2003), soma-se a isso que estudos com animais submetidos a estímulos aversivos mostram aumento da expressão de c-fos na amígdala (DUNCAN et al. 1996; NIKOLAEV et al. 2002; SILVEIRA et al. 2001). Quando consideramos o enriquecimento ambiental, a simples exposição a ambientes mais complexos por curtos períodos pode induzir um aumento na expressão de c-fos nesta região (ALI et al. 2009), o enriquecimento ambiental também pode induzir diminuição na expressão desta proteína induzida por estímulos aversivos (NIKOLAEV et al. 2002). No nosso experimento nós avaliamos especificamente os núcleos: medial, basolateral e central da amígdala.

O núcleo medial da amígdala pode ser uma região envolvida com a resposta comportamental no teste do LCE (BEJAMINI & GUIMARÃES, 2006), soma-se a isso que a administração sistêmica de drogas ansiogênicas pode aumentar a expressão de c-fos neste núcleo (SINGEWALD et al. 2003). Adicionalmente, Nikolaev e colaboradores (2002) mostraram que o enriquecimento ambiental reduz a expressão desta proteína nesse núcleo induzida por choque na pata de ratos, apesar disso, em nosso experimento não encontramos qualquer diferença entre os grupos na expressão de c-fos neste núcleo, isso concorda com outros autores que também não observaram diferença na expressão de c-fos neste núcleo em camundongos expostos ao LCE e pré-tratados com midazolam (ALBRECHET-SOUZA et al. 2009) ou LY354740, outra droga ansiolítica (LINDEN et al. 2004).

Outro núcleo analisado foi o núcleo basolateral, integrante do complexo basolateral da amígdala, que pode ser considerado a principal porta entrada de informações da amígdala. Este complexo é composto por diversos núcleos que se interconectam entre eles o núcleo lateral e o núcleo basolateral da amígdala (ANDRADE et al. 2012; SAH et al. 2003). O núcleo lateral é a principal porta de entrada para informações sensoriais provenientes do tálamo e córtex para a amígdala. O núcleo lateral emite projeções principalmente para os núcleos basolateral, basomedial e central da amígdala (ANDRADE et al. 2012). Já o núcleo basolateral recebe conexões de diversas outras regiões de fora da amígdala tais como o córtex pré frontal (ANDRADE et al. 2012), e o núcleo da rafe associados a responsividade ao estresse (HALE et al. 2012). Por conta da convergência de informações para o núcleo basolateral da amígdala não é surpreendente que este núcleo esteja envolvido com a aquisição e retenção de memória relativa a estímulos aversivos (NIKOLAEV et al. 2002; SAH et al. 2003). Ainda mais quando é considerado que o núcleo basolateral da amígdala emite projeções para várias regiões corticais envolvidas com a memória tais como os córtices parahipocampal, entorrinal e perirrinal (SAH et al. 2003). Essa ideia sobre a participação do núcleo basolateral é reforçada devido ao aumento da expressão de c-fos no núcleo basolateral tanto em estudos que utilizam protocolos de medo condicionado (ANDRADE et al. 2012) como em outros que usam protocolos de medo incondicionado (BECK & FIBIGER, 1995), mostrando que este núcleo pode ter a expressão de c-fos aumentada após a exposição dos animais a estímulos aversivos.

No nosso experimento não observamos alteração na expressão de c-fos no núcleo basolateral da amígdala em nenhum dos grupos analisados em relação ao grupo padrão. Este resultado corrobora com o que foi relatado com animais tratados com drogas ansiolíticas e

depois expostos ao LCE, na qual não foi evidenciada alteração na expressão desta proteína no núcleo basolateral da amígdala (ALBRECHET-SOUZA et al. 2009; LINDEN et al. 2004). Já quando animais foram expostos a ambientes enriquecidos por uma hora, foi evidenciado um aumento da expressão de c-fos neste núcleo da amígdala (ALI et al. 2009). Segundo estes autores a exposição ao ambiente enriquecido pode promover aumento da expressão de c-fos nesse núcleo por conta do leve estresse que decorre da exposição a um novo ambiente, estresse este já descrito como um indutor da expressão de c-fos (BECK & FIBIGER, 1995). Interessantemente animais criados em protocolos de criação em ambientes enriquecidos, assim como protocolos de manipulação neonatal têm mostrado efeitos de menor responsividade a estressores (ABRAHAM & KOVÁCS, 2000). Mesmo assim, apesar dos resultados comportamentais de animais criados em ambientes enriquecidos nos indicarem uma menor responsividade ao estresse, devido à diminuição dos comportamentos análogos a ansiedade, a não alteração na expressão de c-fos nos sugere que essa melhor resposta ao evento estressor não está relacionada com alteração da atividade neuronal neste núcleo.

O núcleo basolateral da amígdala emite projeções para o núcleo central da amígdala (SAH et al. 2003) e sua estimulação pode aumentar a atividade do núcleo central da amígdala (LINDEN et al. 2004). Também devemos considerar que o transtorno de ansiedade generalizada pode estar associado a disfunção da atividade do núcleo basolateral da amígdala (CARVALHO et al. 2010), e que pacientes acometidos por esta doença podem apresentar conexões alteradas entre os núcleos basolateral e central da amígdala (ANDRADE et al. 2012). Apesar disso, o núcleo central da amígdala foi outra região da amígdala na qual foi avaliada a expressão de c-fos, é uma região mais fortemente relacionada ao comportamento de roedores no LCE segundo alguns autores (CARVALHO et al. 2010).

Como anteriormente descrito o núcleo central da amígdala é a principal via de saída das informações oriundas da amígdala e a ativação elétrica deste núcleo específico promove diversos efeitos como respostas autonômicas associadas ao medo. Isso ocorre porque este núcleo emite eferências para várias regiões envolvidas com este tipo de resposta como o hipotálamo, o núcleo do trato solitário e vários núcleos localizados no tronco cerebral, como a substância cinzenta periaquedutal. Além disso, o núcleo central da amígdala também se comunica com outras áreas associadas com comportamentos defensivos como o núcleo dorsal da rafe e córtex pré frontal medial (HALE et al. 2012; LINDEN et al. 2004; SAH et al. 2003).

A expressão de c-fos neste núcleo é aumentada pela administração de drogas ansiogênicas (LINDEN et al. 2004; SINGEWALD, 2003) e outras situações associadas ao aumento de ansiedade (KOVÁCS, 1998; KRAMER et al. 2006). Porém quando drogas ansiolíticas são administradas sistemicamente e os animais expostos ao LCE, a expressão de c-fos se mostra sem alteração ou aumentada neste núcleo (ALBRECHET-SOUZA et al. 2009; LINDEN et al. 2004). Adicionalmente, Linden e colaboradores mostraram que apenas a administração de drogas ansiolíticas pode promover a expressão de c-fos no núcleo central da amígdala (LINDEN et al. 2004). Por outro lado, Abraham e Kovács mostraram prevenção do aumento da expressão de c-fos no núcleo central da amígdala em animais submetidos à manipulação neonatal. Estes autores sugerem que esta alteração possa ocorrer por haver uma menor responsividade ao estresse nestes animais, e ainda admitem a possibilidade que a diminuição na expressão de c-fos no núcleo central observada por eles, possa estar relacionada à redução da ansiedade observada em testes comportamentais com animais submetidos à manipulação neonatal (ABRAHAM & KOVÁCS, 2000).

Em nosso experimento não registramos nenhuma alteração na expressão de c-fos no núcleo central dos grupos analisados em relação ao grupo padrão. Por conta disso, sugerimos que a ativação neuronal do núcleo central da amígdala, não esteja diretamente relacionada à redução da ansiedade no LCE apresentada pelos animais submetidos ao enriquecimento ambiental. Apesar de na literatura haver observações de que o aumento da atividade deste

núcleo induz o aumento da ansiedade (DAVIS, 1992; SAH et al. 2003) e que a inibição farmacológica do núcleo central da amígdala promove respostas ansiolíticas no LCE (CARVALHO et al. 2012), não encontramos nenhum relato de que respostas comportamentais ansiolíticas que eram acompanhadas de diminuição na expressão de c-fos. Assim acreditamos que as respostas ansiolíticas obtidas no teste do LCE não podem ser relacionadas diretamente a atividade neuronal geral deste núcleo.

A última região entre as já analisadas foi o córtex cingulado, esta região junto com os córtices infralímbico e pré-límbico compõe o córtex pré-frontal medial (ALBRECHET-SOUZA et al. 2008, 2009; HEIDBREDEDER & GROENEWEGEN, 2003; SINGEWALD, 2007). O córtex pré-frontal medial apresenta maior atividade tanto em pacientes com transtornos de ansiedade e em animais submetidos ao LCE (ALBRECHET-SOUZA et al. 2009; DUNCAN et al. 1996), além de modular a atividade em outras regiões também envolvidas com a ansiedade como área septal, hipocampo, hipotálamo e amígdala (ANDRADE et al. 2012; DIORIO et al. 1993; SAH et al. 2003). O córtex cingulado pode promover um efeito modulatório no hipotálamo que é refletido em respostas endócrinas quando os animais são submetidos a estresse (DIORIO et al. 1993). Esta região também é atribuída como uma das áreas envolvidas nas ações ansiolíticas de benzodiazepínicos (ALBRECHET-SOUZA et al. 2009). Do mesmo modo que o núcleo basolateral, a exposição a ambientes enriquecidos por curtos períodos também induz aumento da expressão de c-fos no córtex cingulado (ALI et al. 2009). Neste experimento não encontramos diferenças entre os grupos submetidos ao enriquecimento quando comparados com animais criados em ambiente padrão.

Assim devemos considerar que pode haver outros mecanismos neurofisiológicos envolvidos nessas alterações comportamentais não evidenciados aqui. Não descartamos o fato de que regiões associadas a comportamentos defensivos e resposta a estressores ainda não analisadas como: os córtices pré-límbico e infralímbico (SINGEWALD, 2007), núcleo paraventricular do hipotálamo (DIORIO et al. 1993) e núcleo dorsal da rafe (HALE et al. 2012), possam ter sua atividade alterada e contribuir para esta resposta comportamental. Ou mesmo que outros processos não detectáveis pela avaliação imunohistoquímica aplicada estejam envolvidos no comportamento apresentado por estes animais no LCE, como por exemplo, alteração nas concentrações de neurotransmissores liberados, ou na expressão de receptores (SZTAINBERG et al. 2010). Ainda devemos considerar a possibilidade de que essas respostas comportamentais se devam a populações específicas de neurônios nas áreas já analisadas, ou mesmo em outras áreas que ainda serão analisadas, já que para a identificação do fenótipo neuronal teria que ter sido feita dupla marcação na imunohistoquímica (HOFFMAN & LYON, 2002), não realizada neste trabalho.

Contudo com os resultados comportamentais obtidos nos dois experimentos, sugerimos um efeito ansiolítico causado pela introdução de elementos inanimados de enriquecimento ambiental em qualquer fase da vida. No entanto ao não conseguirmos relacionar os resultados comportamentais obtidos com a contagem de células imunorreativas para c-fos, obtivemos um indicativo de que não há relação entre os resultados comportamentais e os da imunohistoquímica, pelo menos nas áreas analisadas até este momento. Por conta disso, mais estudos serão necessários para a elucidação dos processos fisiológicos que levam as respostas comportamentais observadas aqui.

5. CONCLUSÕES

Assim podemos chegar às seguintes conclusões enumeradas abaixo.

- 1- Após a bateria de testes foi observado uma resposta comportamental ansiolítica no teste do LCE e de aumento de atividade locomotora no teste do campo aberto, promovida pelo enriquecimento ambiental.
- 2- No teste do LCE constatamos que a vivência em ambientes mais complexos em qualquer fase da vida promove efeitos ansiolíticos
- 3- Ao avaliar a expressão de c-fos, constatamos que o enriquecimento ambiental não alterou a expressão de c-fos nas áreas estudadas.
- 4- E por fim como não houve alteração na expressão de c-fos, não podemos relacionar a expressão de c-fos com a expressão comportamental destes animais.

6. RECOMENDAÇÕES DE PESQUISA

A partir deste trabalho surgem algumas dúvidas que só podem ser elucidadas com a continuação deste estudo e com experimentos futuros. Assim além de completar o mapeamento funcional em áreas associadas à ansiedade sugerimos alguns experimentos para uma melhor entendimento dessa modulação comportamental causada pelo enriquecimento ambiental. A primeira sugestão é replicar o experimento e realizar marcação dupla para a discriminação do fenótipo dos neurônios ativados em diferentes grupos. Outra possibilidade interessante seria a avaliação de como é o comportamento e se há uma modulação diferencial quando estes animais são expostos a um segundo ensaio no LCE, bem como avaliar essas variáveis (expressão comportamental e de proteína c-fos) em outros testes associados a comportamentos análogos a ansiedade como a caixa claro-escuro e o teste de esconder esferas, além da exposição a odores de predadores, ou mesmo a um maior tempo de exposição ao LCE, dos animais submetidos a este protocolo de enriquecimento ambiental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, I. M.; KOVÁCS, K. J. *Postnatal handling alters the activation of stress-related neural circuits*. European Journal of Neuroscience, vol. 12, pp. 3003-3014, 2000.

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. *Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze*. Journal of Neuroscience Methods 169, 109–118, 2008.

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; CARVALHO, M. C.; BRANDÃO, M. L. *The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and fos immunoreactivity*. Neuroscience 164, 387–397, 2009.

ALI, A. E. E.; WILSON, Y. M.; MURPHY, M. *A single exposure to an enriched environment stimulates the activation of discrete neuronal populations in the brain of the fos-tau-lacZ mouse*. Neurobiology of Learning and Memory 92, 381–390, 2009.

ANDRADE, J. S.; ABRÃO, R. O.; CESPEDES, I. C.; GARCIA, M. C.; NASCIMENTO, J. O. G.; SPADARI-BRATFISH, R. C.; MELLO, L. L.; SILVA, R. C. B.; VIANA, M. B. *Acute restraint differently alters defensive responses and fos immunoreactivity in the rat brain*. Behavioural Brain Research, 232, 20–29, 2012.

ARCHER, J. *Tests for emotionality in rats and mice: a review*. Anim. Behav., 21, 205-235, 1973.

ARIKAIN, S.R. & GORMAN, J.M. *A Review of the Diagnosis, Pharmacologic Treatment, and Economics Aspects of Anxiety Disorders*. Primary Care Companion J.Clin. Psychiatry, (3) 110-117, 2001.

- BAI, F.; LI, X.; CLAY, M.; LINDSTROM, T.; SKOLNICK, P. *Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair"*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 70, 187–192, 2001.
- BAUMANS, V. *Environmental Enrichment for Laboratory Rodents and Rabbits: Requirements of Rodents, Rabbits, and Research*. *ILAR Journal*. Volume 46, Number 2 2005.
- BECK, C.H.M. & FIBIGER, H.C. *Conditioned Fear-induced Changes in Behavior and in the Expression of the Immediate Early Gene c-fos: With and Without Diazepam Pretreatment*. *The Journal of Neuroscience*, 15 (1), 709-720, 1995.
- BEIJAMINI, V & GUIMARÃES, F. S. *Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze*. *Brain Research Bulletin* 69, 347–355, 2006.
- BELZ, E.E.; KENNEL, J.S.; CZAMBEL, R.K.; RUBIN, R.T.; RHODES, M.E. *Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats*. *Pharmacol Biochem Behav*, 76:481–486, 2003.
- BENAROYA-MILSHTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A.; KUKULANSKY, T; RAZ, N; WILF, A.; YANIV, I.; PICK, C.G. *Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity*. *European Journal of Neuroscience*, 20: 1341–1347, 2004.
- BOERE, V. *Environmental enrichment for neotropical primates in captivity*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.3, p.543-551, 2001.
- BORKOVEC, T.D.; ABEL, J.L.; NEWMAN, H. *Effects of Psychotherapy on Comorbid Conditions in Generalized Anxiety Disorder*. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, Vol.63, No. 3. 479-483, 1995.
- BRANDÃO M. L. & GRAEF F .G. *Neurobiology of mental disorders*. Capítulo 3. Páginas 44 e 45. Nova Science Publish inc. New York. 2006.
- BRENES, J.C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. *A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats*. *Behavioural Brain Research*, 197, 125–137, 2009.
- CAROBREZ, A. P. & BERTOGLIO, L. J. *Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 29, 1193–1205, 2005.
- CARVALHO, M. C.; MOREIRA, C. M.; ZANOVELI, J. M.; BRANDÃO, M. L. *Central, but not basolateral, amygdala involvement in the anxiolytic-like effects of midazolam in rats in the elevated plus maze*. *J Psychopharmacol*, 26 (4) 543-554, 2012.
- CASTILLO, A. R. G. L.; RECONDO, R.; ASBAHR, F. R.; MANFRO, G.G. *Transtornos de ansiedade*. *Rev Bras Psiquiatr*, 22 (Supl II): 20-3, 2000.
- CHAPILLON, P.; MANNECHE, C.; BELZUNG, C.; CASTON, J. *Rearing Environmental Enrichment in Two Inbred Strains of Mice: Effects on Emotional Reactivity*. *Behavior Genetics*, 29: 41-46, 1999.
- CHAUVET, C.; LAURDEX, V.; JABER, M.; SOLINAS, M. *Brain regions associated with the reversal of cocaine conditioned place preference by environmental enrichment*. *Neuroscience* 184, 88–96, 2011.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. *Ethopharmacological Analysis of Rat Behavior on the Elevated Plus-Maze*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 49, No. 1, p. 171-176, 1994.
- DAVIS, M. *The role of the amygdala in fear and anxiety*. *Annu. Rev. Neurosci*, 15, 353-75, 1992.
- DIORIO, D.; VIAU, V.; MEANEY, M. J. *The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress*. *The Journal of Neuroscience*, September, 13(9), 3839-3847, 1993.

American Psychiatric Association. *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*. Artmed, Porto Alegre, 4.ed.-texto revisado, 2007.

DUNCAN, G.E.; KNAPP, D.J.; BREESE, G.R. *Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety*. Brain Research, 713, 79-91, 1996.

FOSTER, T. C. & DUMAS, T. C. *Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience*. Journal of Neurophysiology, 85, 1377–1383, 2001.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. *Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress*. Behavioural Brain Research, 175, 1–8, 2006.

FRANKLIN, K. B. J. & PAXINOS, G. *The mouse Brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press is an imprint of Elsevier, New York, USA. Terceira edição 2007.

FRISKE, J.E.; & GAMMIE, S.C. *Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice*. Physiology & Behavior 85, 187 – 194, 2005.

GALANI, R.; BERTHEL, M.; LAZARUS, C.; MAJCHRZAK, M.; BARBELIVIEN, A.; KELCHE, C.; CASSEL, J. *The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry*. Neurobiology of Learning and Memory, 88, 1–10, 2007.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In Graeff, F.G. & Brandão, M.L. *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo, Brasil, Editora Lemos, 3a. edição, 109-144, 1996.

GRAEFF, F.G. *Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal*. Rev Bras Psiquiatr, 29 (Supl I):S3-6, 2007.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M. C. L.; NOGUEIRA, R. L.; AUDI, E. A.; OLIVEIRA, R. M. W. *Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic*. Behavioural Brain Research, 58, 123-131, 1993.

HALE, M. W.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C. A. *Stress-related Serotonergic Systems: Implications for Symptomatology of Anxiety and Affective Disorders*. Cell Mol Neurobiol, 32, 695-708, 2012.

HEDLUND, P. B., HUITRON-RESENDIZ, S., HENRIKSEN, S. J., SUTCLIFFE, J. G. *5-HT7 Receptor Inhibition and Inactivation Induce Antidepressantlike Behavior and Sleep Pattern*. Biol. Psychiatry, 58, 831–837, 2005.

HEIDBREder, C. A. & GROENEWEGEN, H. J. *The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 27, 555–579, 2003.

HETTEMA, J.M.; NEALE, M.C.; KENDLER, K.S. *A Review and Meta-Analysis of the Genetic Epidemiology of Anxiety Disorders*. Am J Psychiatry, 158, 1568–1578, 2001.

HINKS, G. L., BROWN, P., FIELD, M., POAT, J. A., HUGHES, J. *The anxiolytics CI-988 and chlórdiazepoxide fail to reduce immediate early gene mRNA stimulation following exposure to the rat elevated X-maze*. European Journal of Pharmacology 312, 153-161, 1996.

HOFFMAN, G.E & LYO, D. *Anatomical Markers of Activity in Neuroendocrine Systems: Are we all 'Fos-ed out'?* Journal of Neuroendocrinology, Vol. 14, 259–268, 2002.

HOFFMAN, G.E.; SMITH, M.S.; VERBALIS, J.G. *c-fos e related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems*. Frontiers in Neuroendocrinology, vol.14 n° 3 pp 173-213, 1993.

HOLMES, A.; PARMIGIANI, S.; FERRARI, P. F.; PALANZA, P.; RODGERS, R. J. *Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety*. Physiology & Behavior, 71, 509 – 516, 2000.

<http://cfnewsads.thomasnet.com/images/large/828/828524.jpg> retirado de <http://news.thomasnet.com/fullstory/Test-Equipment-screens-anti-depressant-activity-in-mice-828524> em 2/4/2012.

- ICKES, B. R.; PHAM, T. M.; SANDERS, L. A.; ALBECK, D. S.; MOHAMMED, A. H.; GRANHOLM, A. C. *Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain*. *Experimental Neurology*, 164, 45–52, 2000.
- KEMPERMANN, G., KUHN, H.G.; GAGE, F.H. *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment*. *Nature*, 386, 493–495, 1997.
- KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F.H. *Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus*. *The Journal of Neuroscience*, 18, 3206–3212, 1998.
- KESSLER, R.C.; CHIU, W.T.; DEMLER, O.; WALTERS, E.E. *Prevalence, Severity, and Comorbidity of Twelve-month DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication (NCSR)*. *Arch Gen Psychiatry*, 62(6), 617–627, junho 2005.
- KICHENSKI, G. C. & CAROBREZ, A. P. *The dorsal periaqueductal gray modulates the increased fear-like behavior exhibited by experienced rats in the elevated plus-maze*. *Behavioural Brain Research* 206, 120–126, 2010.
- KOVÁCS, K.J. *C-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map*. *Neurochem Int*, 33: 287–297, 1998.
- KRAMER, K. M., CHOE, C., CARTER, C. S., CUSHING, B. S. *Developmental effects of oxytocin on neural activation and neuropeptide release in response to social stimuli*. *Hormones and Behavior*, 49, 206 – 214, 2006.
- LINDEN, A.M.; BAEZ, M.; BERGERON, M.; SCHOEPP, D.D. *Increased c_fos expression in the centromedial nucleus of the thalamus in metabotropic glutamate 8 receptor knock-out mice following the elevated plus maze test*. *Neuroscience*, 121, 167–178, 2003.
- LINDEN, A.M.; GREENE, S. J.; BERGERON, M.; SHOEP, D. D. *Anxiolytic Activity of the MGLU2/3 Receptor Agonist LY354740 on the Elevated Plus Maze is Associated with the Suppression of Stress-Induced c-Fos in the Hippocampus and Increases in c-Fos Induction in Several Other Stress-Sensitive Brain Regions*. *Neuropsychopharmacology*, 29, 502–513, 2004.
- LISTER, R.G. *The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse*. *Psychopharmacology*, 92, 180–185, 1987.
- MARASHI, V.; BARNEKOW, A.; OSSENDORF, E.; SACHSER, N. *Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice*. *Horm Behav.*, 43, 281–292, 2003.
- MUEGGLER, T.; RAZOUX, F.; RUSSIG, H.; BUEHLER, A.; FRANKLIN, T. B.; BALTES, C.; MANSUY, I. M.; RUDIN, M. *Mapping of CBV changes in 5-HT1A terminal fields by functional MRI in the mouse brain*. *European Neuropsychopharmacology*, 21, 344–353, 2011.
- NIKOLAEV, E.; KACZMAREK, L.; ZHU, S.W.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A.H. *Environmental manipulation differentially alters c-Fos expression in amygdaloid nuclei following aversive conditioning*. *Brain Research*, 957, 91–98, 2002.
- NISHIKAWA, H.; HATA, T.; ITHO, E.; FUNAKAMI, Y. *A Role for Corticotropin-Releasing Factor in Repeated Cold Stress- Induced Anxiety-Like Behavior during Forced Swimming and Elevated Plus-Maze Tests in Mice*. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (3), 352—356, 2004.
- NITHIANANTHARAJAH, J. & HANNAN, A. J. *Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system*. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 697–709, 2006.
- PAYLOR, R.; SPENCER, C.M.; YUVA-PAYLOR, L. A.; PIEKE-DAHL, S. *The use of behavioral test batteries, II: Effect of test interval*. *Physiology & Behavior*, 87, 95 – 102, 2006.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. *Validation of open: closed arm entries in a elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat*. *Journal of Neuroscience Methods*, 4, 149-167, 1985.

- ROCHA, F. F.; ALMEIDA, C. S.; SANTOS, R. T.; SANTANA, S. A.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R.; VANDERLINDE, F. A. *Anxiolytic-like and sedative effects of Hydrocotyle umbellata extract in mice*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21(1), 115-120, Jan./Feb. 2011.
- RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. *Animal models of anxiety: an ethological perspective*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 289-304, 1997.
- RODGERS, R. J. & DALVI, A. *Anxiety, Defence and the Elevated Plus-maze*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Vol. 21, No. 6, pp. 801–810, 1997.
- RODGERS, R. J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALAZS, J.; WALTON, T. J.; BRAIN, P. F. *Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice*. *Physiology & Behavior*, 68, 47–53, 1999.
- RODGERS, R. J. & JHONSON, J. T. *Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Plus-Maze Test of Anxiety*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 52, No. 2, pp. 297-303, 1995.
- ROY, V.; BELZUNG, C.; DELARUE, C., CHAPILLON, P. *Environmental enrichment in BALB/c mice Effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor*. *Physiology & Behavior*, 74, 313– 320, 2001.
- SAH, P.; FABER, E. S. L.; LOPES DE ARMENTIA, M.; POWER, J. *The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology*. *Physiol. Rev.*83, 803–834, 2003.
- SHYNE, A. *Meta-Analytic Review of the Effects of Enrichment on Stereotypic Behavior in Zoo Mammals*. *Zoo Biology*, 25, 317–337, 2006.
- SILVEIRA, M. C.; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. *Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze*. *Behavioural Brain Research*, 56, 115-118, 1993.
- SILVEIRA, M.C.; ZANGROSSI, H.; DE BARROS VIANA, M.; SILVEIRA, R.; GRAEFF, F.G. *Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze*. *Behav Brain Res*, 126, 13–21, 2001.
- SIMPSON, J.& KELLY, J.P. *The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects*. *Behavioural Brain Research*, 222, 246–264, 2011.
- SINGEWALD, N. *Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping Neuroscience and Biobehavioral*. *Reviews*, 31, 18–40, 2007.
- SINGEWALD, N.; SALCHNER, P.; SHARP, T. *Induction of c-Fos Expression in Specific Areas of the Fear Circuitry in Rat Forebrain by Anxiogenic Drugs*. *Biol Psychiatry*, 53, 275–283, 2003.
- SINGEWALD, N & SHARP, T. *Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by fos immunocytochemistry*. *Neuroscience*, Vol. 98, No. 4, pp. 759–770, 2000.
- SIQUEIRA, C. C.; ROSSONI, R. R.; SCHENBERG, L. C. *Dorsal periaqueductal gray matter-evoked panic-like behaviors are markedly inhibited by a low peripheral dose of thyrotropin releasing hormone*. *Psychoneuroendocrinology*, 35, 262—271, 2010.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. *The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice*. *Psychopharmacology*, 85, 367-370, 1985.
- SZTAINBERG, Y.; KUPERMAN, Y.; TSOORY, M.; LEBOW, M.; CHEN, A. *The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1*. *Molecular Psychiatry*, 1–13, 2010.

VILHENA-FRANCO,T.; MECAWI, A.S.; ELIAS, L.L.K.; ANTUNES-RODRIGUES, J. *Oestradiol Potentiates Hormone Secretion and Neuronal Activation in Response to Hypertonic Extracellular Volume Expansion in Ovariectomised Rats*. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 481–489, 2011.

VIOLLE, N.; BALANDRAS, F.; LE ROUX, Y.; DESOR, D.; SHOEREDER, H. *Variations in illumination, closed wall transparency and/or extramaze space influence both baseline anxiety and response to diazepam in the rat elevated plus-maze*. *Behavioural Brain Research*, 203, 35–42, 2009.

WEISS, S. M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C. T. *Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23, 265–271, 1998.

WHO 2001 - World Health Organization. *Burden of mental and behavioural disorders*. Capitulo 2. Pagina 24. [2007 Junho 3] Disponível em: URL: www.who.int/entity/whr/2001/chapter2/en/