

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
BIOMEDICINA
TAMY COOPER FURUSHO

**EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE A DEPRESSÃO E
ANSIEDADE EM RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM FLUOXETINA**

CURITIBA
2016

TAMY COOPER FURUSHO

**EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE A DEPRESSÃO E
ANSIEDADE EM RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM FLUOXETINA**

Trabalho de Conclusão de Curso II (Projeto de Trabalho),
apresentado à Universidade Federal do Paraná - UFPR,
Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas, como
requisito parcial para obtenção do título de bacharel em
BIOMEDICINA.

Orientação: Janaína Menezes Zanoveli

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu bondoso Pai Celestial e por seu infinito amor por mim.

Aos meus pais, Vitório e Eliane Furusho, que desde cedo me encorajaram a estudar e me deram o incentivo e suporte necessários para alcançar meus sonhos. Obrigada pela inspiração que vocês são para mim.

Agradeço ao meu marido, Davi Obata, que em meio a tantas mudanças e novidades em nossas vidas, me apoiou e ajudou para que esse trabalho se concretizasse.

Agradeço a professora Janaína Zanoveli, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório, dando a oportunidade de aprender mais e me aceitou como aluna apesar das dificuldades para realizar o projeto. Obrigada por sua orientação.

Minhas colegas do laboratório, Helen Morais e Jéssica Camargo, que se dispuseram a me ajudar nos experimentos e nas dúvidas sobre o trabalho que não poderia ser concluído sem vocês.

Ao biotério do Setor de Ciências Biológicas e aos ratos estudados nesta pesquisa, parte fundamental do estudo.

RESUMO

O diabetes *mellitus* é uma doença crônica muito comum atualmente e geralmente vem acompanhado de muitas comorbidades que agravam a condição do paciente. Dentre estas e de interesse para o presente estudo, há a associação com transtornos de humor e de ansiedade, como depressão e ansiedade generalizada, respectivamente. O tratamento de pacientes diabéticos com determinados antidepressivos pode aumentar a glicemia do paciente, por isso a necessidade de pesquisar tratamentos alternativos, não farmacológicos. A exposição de animais a um ambiente enriquecido tem sido muito pesquisada na área de neurociência e mostra ter efeitos benéficos no cérebro como de neuroproteção e neurogênese. Assim, neste estudo, após o tratamento prolongado (23 dias) com fluoxetina respostas comportamentais de ansiedade/depressão foram analisadas em ratos Wistar machos diabéticos, induzidos com estreptozocina, e expostos ou não a um ambiente enriquecido com roda gigante, túnel de PVC e bolas coloridas com sino. Para identificar e avaliar comportamentos de ansiedade, depressão e atividade locomotora nos animais foram realizados testes de comportamento, como teste do labirinto em T, teste de transição claro e escuro, teste de natação forçada e teste de campo aberto. O tratamento isolado com a fluoxetina teve efeito panicolítico e antidepressivo em animais normoglicêmicos e diabéticos, nos testes do labirinto em T elevado e natação forçada, respectivamente. O ambiente enriquecido mostrou ser antidepressivo, panicolítico e ansiolítico nos testes realizados em ratos diabéticos em seus respectivos testes. Houve um efeito do tipo sinérgico sobre o comportamento de avaliação de fuga dos animais diabéticos testados no teste do labirinto em T elevado com a junção da exposição ao ambiente enriquecido e o tratamento com fluoxetina. Não houve diferenças do efeito entre os tratamentos na análise da atividade locomotora, teste de campo aberto. Os resultados com ambiente enriquecido encontrados neste trabalho mostraram o potencial de utilizá-lo como adjuvante no tratamento de depressão, ansiedade e transtorno do pânico em diabéticos.

Palavras-chave: diabetes, depressão, ansiedade, ambiente enriquecido

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a common chronic disease that usually comes with many comorbidities that further aggravate the condition of the patient. Of interest to this study, there is an association of diabetes with mood and anxiety disorders, such as depression and generalized anxiety disorder, respectively. The treatment with certain antidepressant drugs can increase the glucose of the patient, reinforcing the need to search for an alternative, non-pharmacological treatment. The exposure of animals to an enriched environment has been studied in many works and shows beneficial effects on the brain such as neuroprotective and neurogenic effect. In this study, we analyze the effect of the exposure to an environment enriched or not with ferris wheel, PVC tunnel and colored ball with a bell in diabetic male Wistar rats induced by streptozotocin, and chronically treated with fluoxetine for 23 days. To identify and analyze anxiety, depression and locomotor activity in animals it was performed behavioral tests such as elevated T-maze, light and dark transition, forced swimming and open field. The isolated treatment with fluoxetine induced a panicolytic and antidepressant effects in normoglycemic and diabetic animals exposed to the elevated T-maze, forced swimming testes, respectively. The enriched environment proved to induce antidepressant, anxiolytic and panicolytic effects when diabetic animals were submitted to the behavioral tests. There was a synergic effect on escape behavior evaluated in the elevated T-maze when diabetic animals were treated with fluoxetine and exposed to the enriched environment. There were no differences between treatments in the analysis of locomotor activity at the open field test. The results about environmental enrichment found in this study shows its potential as an adjuvant in the treatment of depression, anxiety and panic disorders in diabetes.

Keywords: diabetes, depression, anxiety, enriched environment

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

AE - Ambiente Enriquecido

BDNF – *Brain Derived Neurotrophin Factor*

CA - Teste de Campo Aberto

DBT - Diabéticos

FLU - Fluoxetina

LTE - Teste do Labirinto em T Elevado

NGL - Normoglicêmicos

SE - Sem Ambiente Enriquecido

STZ - Estreptozotocina

TCE - Teste de Transição Claro e Escuro

TNF - Teste de Natação Forçada

VEI - Veículo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	10
OBJETIVOS	11
OBJETIVO GERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
MATERIAL E MÉTODOS	12
ANIMAIS	12
DROGAS	13
ENRIQUECIMENTO DO AMBIENTE	13
INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO DIABETES	14
TESTE DO LABIRINTO EM T ELEVADO	15
TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO E ESCURO	16
TESTE DO NADO FORÇADO	16
TESTE DE CAMPO ABERTO	17
EUTANÁSIA	17
ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
RESULTADOS	18
RESULTADOS DO TESTE DO LABIRINTO EM T ELEVADO	18
RESULTADOS DO TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO E ESCURO	19
RESULTADOS DO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA	22
RESULTADOS DO TESTE DE CAMPO ABERTO	23
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	23
CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	28

INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* é uma doença metabólica que pode se tornar progressiva quando não tratada corretamente. Esta doença crônica ocorre quando o organismo não produz insulina (tipo 1) e/ou não consegue utilizar este hormônio adequadamente (tipo 2), afetando os níveis de glicose no sangue. Esta condição traz sérias consequências para todo o corpo. De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes a glicemia alta pode trazer complicações para os rins, pés e membros inferiores (causadas pela má circulação do sangue e neuropatia), problemas de visão (ex.: glaucoma e retinopatia), uma pele mais sensível e suscetível a desidratação, coceiras, infecções por fungos e bactérias, doenças cardiovasculares, dentre outras complicações. Para prevenir e/ou controlar os sintomas e complicações, o paciente diabético precisa ter uma dedicação e cuidado sobre sua saúde, seguindo dietas especiais e balanceadas, monitorando frequentemente a glicemia e controlando-a com a aplicação diária de insulina, e/ou drogas hipoglicemiantes e exercício físico.

Não apenas esses sintomas supracitados são associados ao diabetes, mas também comorbidades psiquiátricas, como a depressão e a ansiedade (WILLIS, 1971). Sabe-se que essas psicopatologias, bem como o diabetes, são doenças consideradas problemas de saúde pública em todo o mundo. Estudos relacionam estes transtornos ao diabetes como tendo uma relação bidirecional, ou seja, pacientes diabéticos são suscetíveis a desenvolver ansiedade e depressão, assim como pacientes depressivos/ansiosos tendem a desenvolver o diabetes (COLLINS, CORCORANT, PERRY 2009; CAMPAYO, GÓMEZ-BIEL, LOBO, 2011). Sem dúvida, a presença destas psicopatologias interfere na qualidade de vida dos pacientes diabéticos além de aumentar a morbidade e a mortalidade desses pacientes (EGEDE & ELLIS, 2010; KOHEN *et al.*, 1998; MOSAKU *et al.*, 2008, PASCHALIDES *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da depressão pode agravar a condição diabética, ou seja, sintomas depressivos como a anedonia, mudanças no padrão de sono, fadiga, falta de concentração, nervosismo e/ou culpa atrapalham o dia a dia do paciente, muitas vezes desencorajando-o a exercer os cuidados diários de sua saúde. Estima-se que há aproximadamente 340 milhões de indivíduos que sofrem com a depressão (EGEDE & ELLIS, 2010), sendo a prevalência da depressão em portadores de diabetes o dobro

do que se observa na população normal (PEYROT & RUBIN, 1997). O Dr. Thomas Willis, fisiologista britânico, há mais de 300 anos, percebeu uma ligação entre a depressão e o diabetes quando sugeriu que o diabetes era resultado de tristeza ou tristeza prolongada (WILLIS, 1971). Estudos sugerem que a patofisiologia da depressão associada ao diabetes teria uma origem causal complexa, podendo ser resultante do aumento de estresse oxidativo e nitrosativo, desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, desregulação de neurotransmissores, inflamação e alterações epigenéticas (CAMPAYO, GÓMEZ-BIEL, LOBO, 2011. ZANOVELI *et al.*, 2015. De MORAIS, 2014).

Além da depressão, a ansiedade é outro transtorno mental que pode se desenvolver durante o diabetes associado ou não a depressão. Acredita-se que um dos fatores para o desenvolvimento desta condição seja a pressão psicológica de ser portador do diabetes e os cuidados diários que devem ser mantidos (SMITH *et al.*, 2012; ZANOVELI *et al.*, 2015). Ao pesquisar a prevalência da ansiedade em doenças crônicas, Thomas *et al.* (2003) observou que 36% dos pacientes com ansiedade eram diabéticos. De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtorno Mentais (DSM-V) a ansiedade é caracterizada por sintomas como inquietação, perturbação do sono, falta de ar, irritabilidade, impaciência, preocupação excessiva. Há vários tipos de transtornos de ansiedade, dentre estes o transtorno do pânico (TP), transtorno de ansiedade generalizada (TAG), agorafobia, transtorno de ansiedade social, mutismo seletivo, entre outros. O TAG é um dos transtornos de ansiedade mais prevalentes em diabéticos. Em um estudo com 200 pacientes diabéticos, foi constatado que 21% destes apresentavam o TAG (MAIA *et al.*, 2012).

Quanto a efetividade dos antidepressivos para o tratamento de depressão e/ou ansiedade em pacientes diabéticos, apesar de algumas contradições, uma revisão sistemática desses estudos mostra que o uso de antidepressivos como a fluoxetina pode ser efetivo para o controle de sintomas relacionados com a depressão e/ou ansiedade, mas não para o controle da condição diabética em si (EGEDE & ELLIS, 2010; ZANOVELI *et al.*, 2015). Assim, alguns estudos mostram que o uso de determinados antidepressivos pode aumentar a glicemia em diabéticos e não diabéticos (DEUSCHLE, 2013), além de interferir com hipoglicemiantes (Zanoveli *et al.*,

2015). Andersohn *et al.* (2009) em um estudo com pacientes depressivos verificaram que o tratamento a longo prazo com antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina aumentam o risco de desenvolver diabetes. Tendo em vista a ineficiência desses tratamentos em psicopatologias associadas com o diabetes, a busca por novos agentes ou tratamentos alternativos torna-se urgente.

Sabe-se que o ambiente enriquecido é uma junção de estímulos inanimados e sociais e tem sido cada vez mais utilizado em pesquisas neurocientíficas, no estudo do comportamento e cérebro, principalmente em modelos com roedores (BRENES *et al.*, 2015). O enriquecimento do ambiente tem como objetivo mimetizar seu habitat natural, melhorar a qualidade do ambiente do cativeiro, aumentar a diversidade comportamental, estimular os sentidos do animal e aumentar a habilidade de lidar com desafios. Há vários tipos de ambientes enriquecidos e cada um pode estimular sentidos diferentes. Alguns tipos de enriquecimento encontrados são: enriquecimento social (número de animais adequado), enriquecimento físico (tamanho da gaiola, prateleiras, material para o ninho, tubos e plataformas), enriquecimento sensorial (estímulo tátil, visual, auditivo, olfatório e do paladar) e o enriquecimento nutricional. Para a escolha dos ambientes e itens devem ser levados em consideração a espécie, necessidade do animal e o efeito que é esperado obter (BAUMANS, 2005).

Foi observado que o enriquecimento ambiental apresenta efeitos benéficos sobre processos relacionados com a memória e aprendizagem e proteção neuronal por aumentar a sobrevivência celular, neurotrofinas, neurogênese, sinaptogênese na área do hipocampo, além do atraso no processo de envelhecimento (MORA, SEGOVIA, del ARCO, 2007; KEMPERMANN, GAST, GAGE, 2002). O ambiente enriquecido mostrou ser benéfico em condições patológicas e de estresse. Moncek *et al.* (2004) observaram que o ambiente enriquecido está relacionado com o aumento da secreção basal de corticosterona, aumento do peso das glândulas adrenais e da resposta neuroendócrina. Efeitos positivos também foram vistos em distúrbios do sistema nervoso, como a doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, melhorando a memória e o aprendizado, atraso na progressão dos sintomas e da recuperação da função motora, respectivamente (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN,

2006). O ambiente enriquecido também pode diminuir a ansiedade em camundongos e aumentar a atividade das células natural killers (BENAROYA-MILSHTEIN *et al.*, 2004).

Há poucos estudos relacionando diabetes e o ambiente enriquecido. Nestes, foi observado que o enriquecimento do ambiente pode prevenir déficit de memória (PIAZZA *et al.*, 2011), aumentar a neurogênese, a rede vascular e complexidade dendrítica no hipocampo (BEAUQUIS *et al.*, 2010). Mas, até o presente momento não há nenhum estudo que investigou em animais diabéticos a influência do ambiente enriquecido sobre respostas comportamentais relacionadas a depressão e ansiedade.

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

De acordo com os dados apresentados pela Organização Mundial da Saúde (OMS; 2014), 9% dos adultos acima de 18 anos tem diabetes e a previsão é de que o número de causas de morte como aquelas decorrentes do diabetes, estipulado em 2005, será o dobro em 2030, ocupando o 7º lugar entre as causas de morte. Além disso, a depressão é a doença psiquiátrica mais comum atualmente, descrita pela presença dos sintomas como anedonia, tristeza ou ansiedade persistente, sentimento de impotência ou inferioridade, alteração de peso, distúrbio do sono, dificuldades de concentração, fadiga e problemas psicomotores (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V). Estudos mostraram que pacientes diabéticos são susceptíveis a desenvolver doenças neuropsiquiátricas, como a depressão e a ansiedade, e que parece haver uma relação bidirecional entre o diabetes e essas doenças (CAMPAYO, GÓMEZ-BIEL, LOBO, 2011; ZANOVELI, 2015). Anderson *et al.* (2001) conduziu um estudo de meta-análise envolvendo 42 estudos sobre depressão e diabetes e encontrou que a prevalência clínica significativa de depressão maior em pessoas com diabetes é de 31%. Grigsby *et al.* (2002) em um estudo de população observou que 40% dos pacientes diabéticos apresentavam sintomas de ansiedade. Sabe-se que a utilização de antidepressivos como tratamento para diabéticos com ansiedade e/ou depressão se mostram apenas eficazes em melhorar a condição neuropsiquiátrica do paciente, mas não no controle da glicemia, podendo até mesmo agravar a própria condição diabética (EGEDE & ELLIS, 2010; DEUSCHLE, 2013).

Neste sentido, se faz urgente a realização de estudos focando em terapias alternativas ou coadjuvantes para tratar estes transtornos mentais. O monitoramento diário da glicemia, alimentação regulada e utilização correta dos medicamentos são fundamentais para controle da diabetes e a falta disso pode agravar significativamente o quadro da doença (EGEDE, GRUBAUGH, ELLIS, 2010; GOLDNEY *et al.*, 2004). Interessante que estudos com ratos mostraram que um ambiente rico em estímulos neurológicos pode aumentar a neurogênese, conexões sinápticas, vascularização neural e pode ser eficaz em aliviar comportamentos do tipo ansioso (PAMPLONA, 2009; BEAUQUIS *et al.*, 2010; PAMIDI e NAYAK, 2014; PIAZZA *et al.*, 2011). Cabe ressaltar que os estudos supracitados foram conduzidos em animais não diabéticos. O enriquecimento ambiental propõe mimetizar o máximo possível do ambiente natural do animal e estimular os diversos sentidos sensoriais e socialização no ambiente em que o animal de estudo se encontra amenizando as diferenças entre seu ambiente natural, menos estressante e mais relaxante (BEAVER, 1989; BAUMANS, 2005). Com base no exposto, o presente estudo tem como objetivo investigar a utilização de ambientes enriquecidos sobre as respostas comportamentais associadas com depressão e ansiedade em animais diabéticos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar o efeito do enriquecimento ambiental sobre a depressão e ansiedade em ratos diabéticos tratados ou não com fluoxetina.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da modificação ambiental (com ou sem enriquecimento) em ratos diabéticos tratados com fluoxetina ou seu respectivo veículo em relação aos comportamentos de ansiedade e depressão.

- Avaliar o efeito da modificação ambiental (com ou sem enriquecimento) em ratos normoglicêmicos tratados com fluoxetina ou seu respectivo veículo em relação aos comportamentos de ansiedade e depressão.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia apresentada neste projeto foi aprovada pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA - nº 926). O protocolo do experimento foi realizado conforme a linha do tempo representada na Figura 2.

Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar pesando entre 200 a 250 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Estes animais foram mantidos em condições controladas de iluminação, com água e ração *ad libitum*. Foram mantidos três ratos por caixa (42cm x 34cm x 16cm) com a maravalha trocada diariamente.

O estudo foi conduzido em dois grandes grupos de animais, os normoglicêmicos e os diabéticos. No grupo de animais normoglicêmicos haviam aqueles 1) sem enriquecimento ambiental e tratados com veículo (VEI); 2) com enriquecimento ambiental e tratados com VEI; 3) sem enriquecimento ambiental e tratados com fluoxetina (FLU) e 4) com enriquecimento ambiental e tratados com FLU. No grupo de animais diabéticos: 1) sem enriquecimento ambiental e tratados com VEI; 2) com enriquecimento ambiental e tratados com VEI; 3) sem enriquecimento ambiental e tratados com FLU e 4) com enriquecimento ambiental e tratados com FLU (ver Tabela 1).

	Com enriquecimento do Ambiente	Sem enriquecimento do ambiente
Normoglicêmicos	Tratados com FLU	Tratados com FLU
	Tratados com VEI	Tratados com VEI
Diabéticos	Tratados com FLU	Tratados com FLU
	Tratados com VEI	Tratados com VEI

Tabela 1 - Grupos de ratos Wistar machos que foram utilizados no estudo, totalizando oito grupos, cada grupo teve o número de amostras entre 7-10 animais. Fluoxetina (FLU); Veículo (VEI).

Drogas

Foi utilizado o antidepressivo inibidor de recaptção seletivo de serotonina, a fluoxetina (Daforin®, Brasil) como tratamento e estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich/EUA) para indução da diabetes. A STZ foi diluída em tampão citrato 10 mM, pH 4,5 e administrada por via intraperitoneal na dose de 50 mg/kg. As doses e as vias foram estabelecidas com base em estudos prévios do nosso laboratório (de Moraes et al., 2014). A FLU foi dissolvida em uma solução de salina estéril (10mg/kg) e o tratamento teve duração de 23 dias, contando 7 dias após a confirmação da hiperglicemia nos animais (Zanoveli *et al.*, 2007; Poltronieri, Zangrossi Júnior, Viana, 2003).

Enriquecimento do ambiente

Dez dias após a injeção de STZ, foram colocados brinquedos nos grupos tratados com um ambiente enriquecido. Foi utilizado para a caixa dos grupos com ambiente enriquecido uma grade alta (8 cm), totalizando o espaço de 42 cm x 34 cm x 24 cm. Os objetos utilizados para enriquecer o ambiente são um pedaço de cano PVC

(15 cm de comprimento x 18 cm de diâmetro), uma roda gigante de ferro (18 cm de diâmetro) e uma bola colorida com sino dentro (Figura 1). A exposição a este ambiente teve duração de 23 dias, tendo início junto com o tratamento de fluoxetina. A limpeza das caixas e objetos foi feita com álcool etílico (10%) diariamente.



FIGURA 1 - Fotos do ambiente enriquecido e não enriquecido. (A) Objetos que foram utilizados, (B) caixa com grade alta. (C) Caixa e grade utilizados normalmente em ambientes não enriquecidos.

Indução experimental do diabetes

Após um jejum de 12 horas, o diabetes foi induzido nos ratos através da administração única de STZ. A confirmação do diabetes foi realizada três dias após a injeção de STZ, com uma gota de sangue periférico colhido da cauda dos animais através de fitas teste impregnadas de glicose oxidase (*Accu-Check Active™*, Roche). Foram considerados diabéticos e mantidos no experimento os animais cuja glicemia foi igual ou maior que 250 mg/dL. Os grupos controles normoglicêmicos receberam somente tampão citrato (10 mM, pH 4,5, volume equivalente).

Teste do labirinto em T elevado

Esse modelo foi formulado a partir do Labirinto em Cruz Elevado, um dos modelos de ansiedade mais utilizados mundialmente (PELLOW *et. al.*, 1995). Ambos os modelos etológicos foram construídos com base nas premissas da aversão natural/inata dos roedores por ambientes abertos e elevados. A principal diferença é que o labirinto em T elevado foi desenvolvido a fim de separar duas medidas, o medo condicionado do medo incondicionado. Estudos de validação farmacológica e comportamental sugerem que a esquiva está relacionada com o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), enquanto que a fuga está relacionada com o transtorno do pânico (TP) (ZANGROSSI AND GRAEFF, 1997; GRAEFF *et al.*, 1998; ZANOVELI *et al.*, 2003).

O teste ocorre da seguinte forma:

Habituação: Na quarta semana após a diabetização e após o tempo determinado de cada tratamento, cada animal foi manuseado pelo experimentador durante 5 minutos. A seguir, colocado por 5 minutos em uma caixa de plástico (25 x 15 x 12 cm) com serragem no assoalho que será utilizada como coadjuvante na execução do teste no LTE.

Pré-exposição: Logo após a habituação, cada animal foi exposto por 30 minutos a um dos braços abertos do LTE. Neste procedimento, cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos do LTE, isolado dos demais braços por uma parede de madeira, disposta na linha de separação entre a área central do labirinto e porção proximal do braço aberto. A pré-exposição tem por objetivo tornar a resposta de fuga potencializada, favorecendo, dessa maneira a detecção do efeito de drogas. Esta potencialização da resposta de fuga talvez ocorra por diminuir a atividade exploratória dos animais quando recolocados em um dos braços abertos do LTE no dia do teste (TEIXEIRA *et. al.*, 2000).

Teste: Vinte e quatro horas após a pré-exposição os animais foram testados no LTE. Iniciando pela tomada da esquiva inibitória. Para tal, cada animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado e medido o tempo gasto para a saída, com as quatro patas, deste braço (LATÊNCIA BASAL). A mesma medida foi tomada por mais duas vezes com intervalos de 30 segundos entre elas (ESQUIVA 1 e ESQUIVA 2). O

tempo máximo de permanência do animal neste braço, em cada uma das tomadas de esquivas, foi de 5 minutos.

Trinta segundos após o término da tomada da ESQUIVA 2, o comportamento de fuga foi avaliado. Para tal, cada animal foi colocado na extremidade do braço aberto e medido o tempo gasto para a saída, com as quatro patas, deste braço (FUGA 1). A latência de saída do braço aberto é medida por mais duas vezes (FUGA 2 e FUGA 3) com intervalos de 30 segundos entre elas.

Trinta segundos após a tomada da FUGA 3, cada animal foi colocado individualmente no campo aberto para observação da atividade locomotora.

Teste de Transição Claro e Escuro

No 29º dia 1 minuto após o término do teste do LTE os animais foram expostos ao teste de transição claro e escuro (TCE) para avaliação da ansiedade. Este teste, desenvolvido por Crawley e Goodwin (1980), é composto por uma caixa dividida em dois compartimentos, um totalmente claro e outro totalmente escuro, os compartimentos estão ligados por uma abertura na parede divisória. O animal foi posicionado no lado claro com a cabeça voltada para a divisória, a partir deste momento o teste teve duração de 5 minutos. Foram avaliados durante este período o tempo de permanência total no compartimento claro, o número de transições e o número de riscos (número de vezes que o animal ameaça sair).

Teste do Nado Forçado

No 30º dia após a confirmação do diabetes os ratos foram avaliados através do teste de natação forçada, conforme descrito por Porsolt (1979) e modificado por Detke *et al.* (1995). Na primeira sessão (pré-teste) os animais foram colocados individualmente para nadar em cilindros de plástico (20 cm de diâmetro por 50 cm de altura contendo 30 cm de água na temperatura de $24\pm 1^\circ\text{C}$) por 15 minutos.

Vinte e quatro horas após o pré-teste, os animais foram submetidos a uma sessão de 5 minutos de nado forçado (sessão Teste). Durante esta sessão, o comportamento avaliado a cada 5 segundos foi a frequência de imobilidade do animal

(exceto pequenos movimentos necessários para flutuar). Este teste comportamental caracteriza o comportamento do tipo depressivo como uma redução na frequência de respostas ativas (natação e escalada) e aumento na frequência de resposta passiva (imobilidade). Entre um animal e outro a água utilizada foi trocada por uma água limpa. Após cada sessão (Pré-teste e Teste), os animais foram submetidos à secagem com panos limpos e secos em uma caixa separada antes de retornarem para suas caixas.

Teste de Campo Aberto

No 30º dia antes do teste de nado forçado, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto. Este teste consiste colocar o rato no centro de uma arena quadrada (40cm x 50cm, subdivida em nove quadrantes) cercada por paredes altas. Este teste avalia a atividade locomotora do animal e a ansiedade. A análise da locomoção é feita durante 5 minutos e o parâmetro observado será o número de vezes em que o animal cruza as linhas. Imediatamente após os testes os animais foram expostos à última sessão do teste de nado forçado.

Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada após todos os testes de comportamento. Os ratos receberam injeção intraperitoneal (2,8ml/kg) de hidrato de cloral 15%. Imediatamente após a constatação da perda dos sentidos e reflexos, os ratos foram decapitados pela guilhotina.

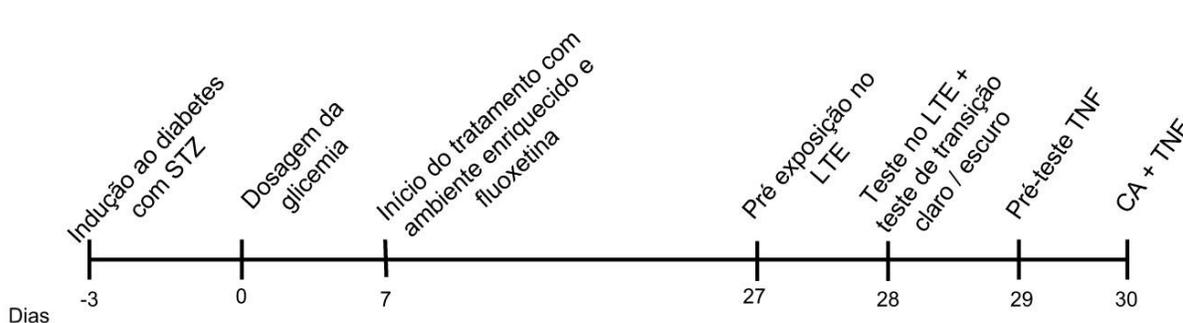


FIGURA 2 - Linha do tempo referente ao protocolo experimental.

Análise Estatística

Os resultados são representados como média \pm EPM de 7 a 10 animais. Em todos os experimentos foi utilizada a ANOVA de duas vias com ou sem medidas repetidas, conforme apropriado, sendo tratamento e ambiente os fatores independentes. Para análise *post-hoc* o teste de Neuman-Keuls foi aplicado. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Resultados do Teste do Labirinto em T Elevado

A ANOVA de 2 vias com medidas repetidas mostrou o efeito do tratamento, do ambiente e interação entre os fatores para as três medidas de esquiva ($p < 0.05$). O grupo controle normoglicêmico (NGL) VEI/SE apresentou o aumento significativo do tempo de esquiva desde a latência basal até a esquiva 2 (ver FIGURA 3A), efeito do tipo ansiogênico ($p < 0.05$). Tanto o tratamento com a fluoxetina, bem como a exposição dos animais em um ambiente enriquecido, independente do ambiente enriquecido, induziram um efeito do tipo ansiolítico (FIGURA 3A). Já na Figura 3B observa-se apenas efeito do ambiente e não do tratamento ($p < 0.05$), ou seja, independente do tratamento, apenas animais diabéticos expostos ao ambiente enriquecido apresentaram efeito ansiolítico ($p < 0,05$). O comportamento de fuga observado tanto nos ratos NGL quanto nos DBT, que receberam apenas VEI, não mostram alterações significativas entre os três tempos de fuga (FIGURA 3C e D). O ambiente não alterou a resposta de fuga dos animais NGL, apenas o tratamento com FLU foi capaz de induzir efeito do tipo panicolítico, independente do tratamento ($p < 0,05$; FIGURA 3C). Já nos animais diabéticos, observa-se que tanto o tratamento com fluoxetina, como o ambiente enriquecido foram importantes em induzir efeito do tipo panicolítico ($p < 0,05$), sendo este efeito mais pronunciado, sugerindo um efeito sinérgico, em animais DBT em ambiente enriquecido e que recebeu fluoxetina ($p < 0,05$; FIGURA 3D).

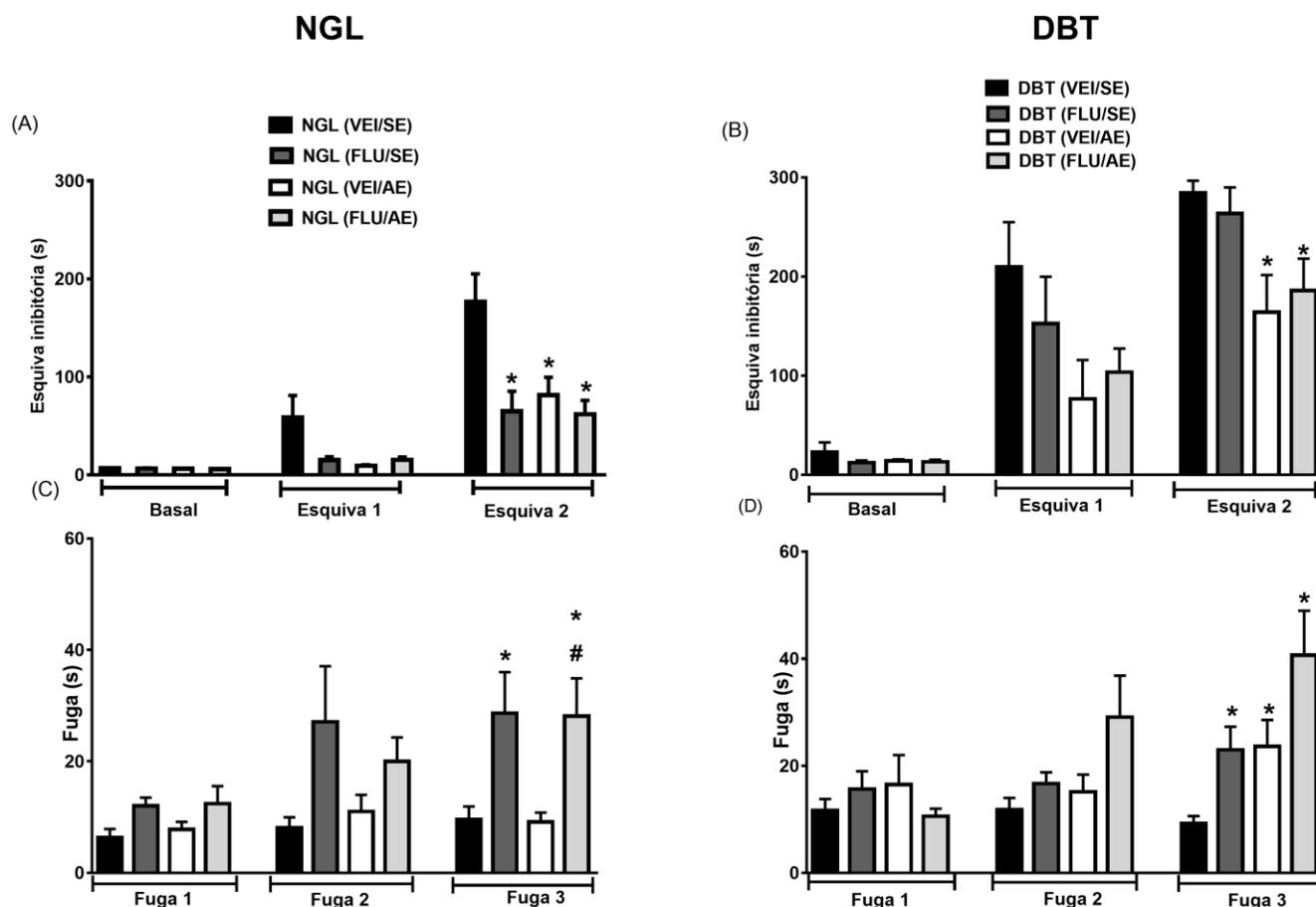


FIGURA 3 – Resultados do LTE. Os dados estão representados como média ± EPM de animais que foram (AE) ou não (SE) expostos ao ambiente enriquecido. Figuras A e C representam animais normoglicêmicos (NGL) tratados com veículo (VEI) ou fluoxetina (FLU, 10mg/kg) e expostos no LTE para avaliação de esquiva inibitória (A) e fuga (C). As figuras B e D são os resultados de animais diabéticos expostos no LTE, esquiva (B) e fuga (D). n = 7 -10. * p<0.05 quando comparado com o grupo VEI/SE; # p<0.05 quando comparado com o grupo VEI/AE.

Resultados do Teste de Transição Claro e Escuro

A FIGURA 4 representa os resultados do teste de transição claro e escuro, aplicado para analisar a ansiedade dos animais em teste. A ANOVA mostra efeito do tratamento e do ambiente ($p < 0,05$). Observa-se no gráfico A que o tempo de permanência no compartimento claro dos animais dos grupos NGL-FLU+SE, NGL-VEI+AE e NGL-FLU+AE foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) quando comparados com o grupo controle NGL-VEI+SE, indicando um efeito ansiolítico. De modo semelhante, observamos um efeito ansiolítico de animais diabéticos tratados com

fluoxetina, independente do enriquecimento ambiental. Apesar dos dados não sugerirem sinergismo, o ambiente por si só também foi capaz de induzir um efeito do tipo ansiolítico ($p < 0,05$); FIGURA 4B). Os gráficos C e D representam os dados referentes ao número de vezes em que os animais fizeram a avaliação de risco, um comportamento que mostra conflito entre entrar ou não no compartimento aversivo (claro), expondo apenas a cabeça ou metade do corpo, lembrando que foi considerada completa a transição se o animal cruzou o compartimento com as quatro patas. Não foram identificadas diferenças significativas do número de risco entre os animais normoglicêmicos após aplicar o teste de Newman-Keuls (gráfico C). O teste post-hoc de Bonferroni também não identificou diferenças significativas entre os grupos de diabéticos representados no gráfico D. A técnica de ANOVA de duas vias foi utilizada para analisar os dados do número de transições ocorridas entre os compartimentos (gráfico E e F). O resultado da análise não mostrou efeito significativo ($p \geq 0.05$) para os grupos de animais NGL e diabéticos (gráficos E e F).

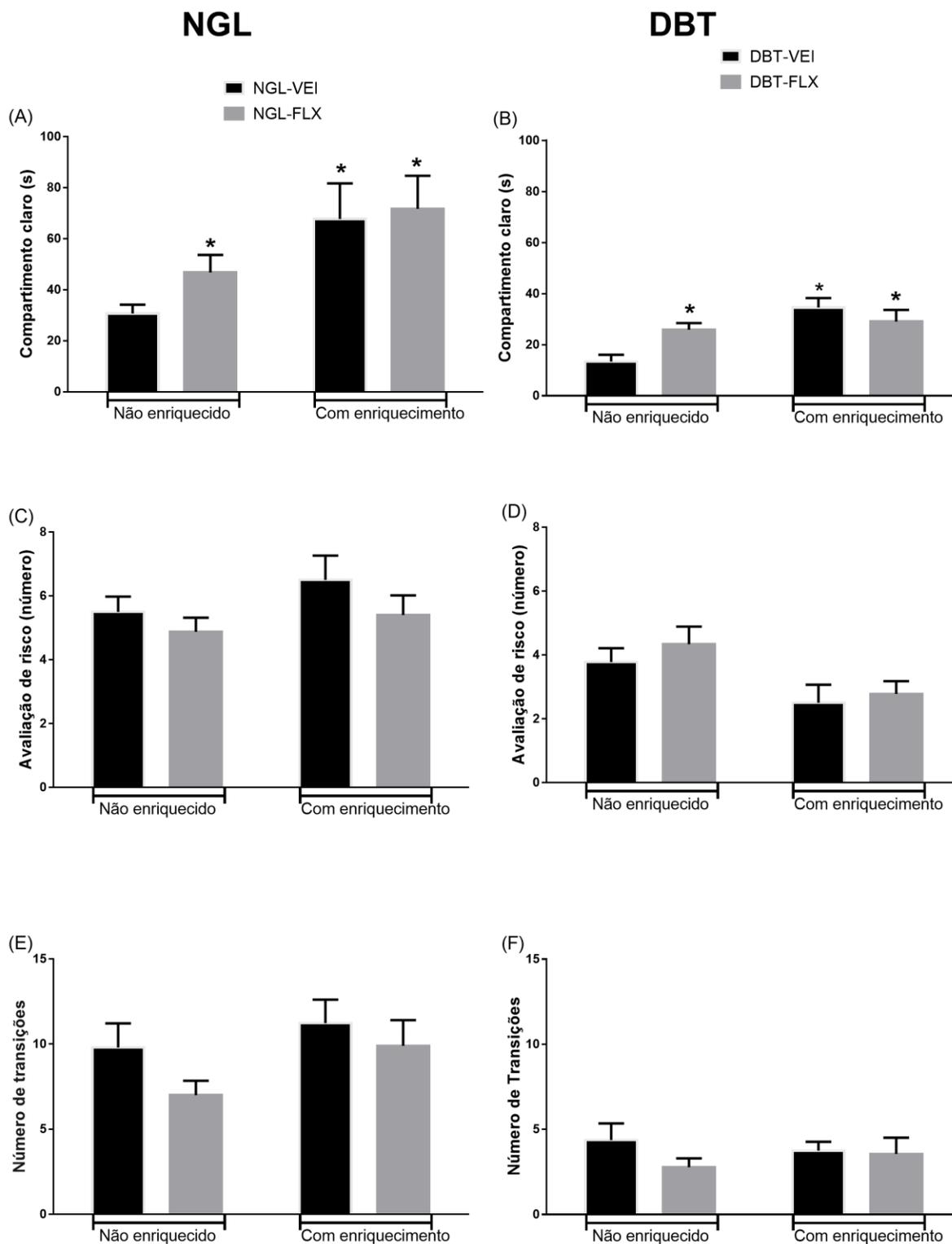


FIGURA 4 - Resultados obtido com o teste de TCE (media \pm EPM). Efeito da exposição (AE) ou não (SE) ao enriquecimento ambiental com tratamento com veículo (VEI) ou fluoxetina (FLU, 10mg/kg) em animais NGL (A, C e E) ou DBT (B, D e F) avaliando o tempo de permanência no compartimento claro

em segundos (s) (A e B), avaliação de risco (C e D) e número de transições (E e F). n = 7 -10. * p<0.05 quando comparado com o grupo NGL-VEI ou DBT-VEI não enriquecido.

Resultados do Teste de Natação Forçada

O TNF foi utilizado neste trabalho para avaliar o comportamento do tipo depressivo dos animais. O grupo DBT-VEI apresentou um tempo de imobilidade no teste maior do que o grupo controle (NGL-VEI) ($p < 0,05$), indicando um comportamento do tipo depressivo mais pronunciado. Na FIGURA 5 (A) observa-se que o efeito da fluoxetina (10mg/kg) nos animais normoglicêmicos (NGL-FLU) diminuiu o tempo de imobilidade no teste e foi considerado significativo ($p \leq 0,05$), assim como o efeito da exposição ao ambiente enriquecido (NGL-AE). A junção do tratamento de fluoxetina com a exposição ao AE também diminuiu o tempo de imobilidade nos animais do grupo NGL-FLU+AE quando comparados com o grupo controle, porém não de um modo sinérgico.

No gráfico B é apresentado os resultados do teste para os animais diabéticos. Da mesma forma os animais diabéticos tratados com fluoxetina (DBT-FLU) e/ou expostos ao ambiente enriquecido (DBT-EE) apresentaram tempo de imobilidade menor do que os animais tratados com veículo (DBT-VEI), um efeito do tipo antidepressivo. A junção do tratamento com a exposição ao ambiente (DBT-FLU+AE) também induziu este mesmo efeito, porém não de um modo sinérgico.

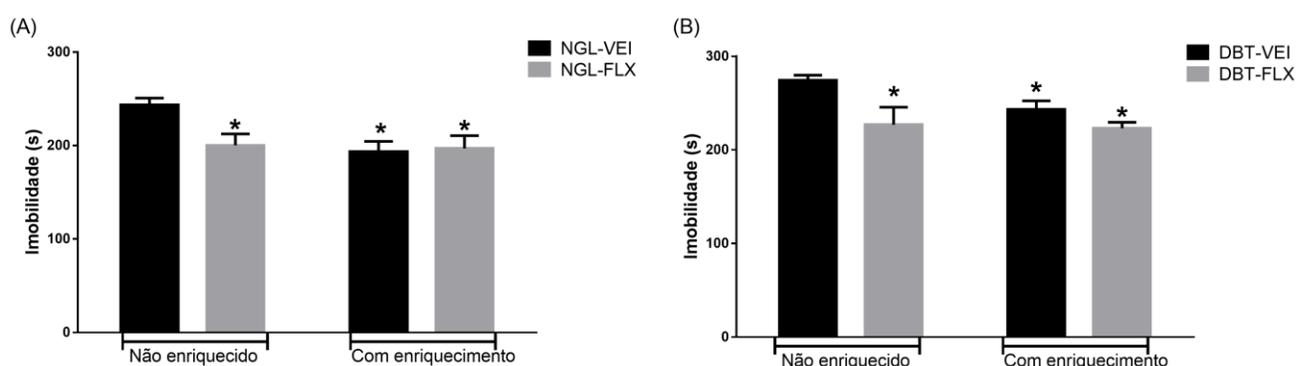


FIGURA 5 - Resultados do TNF (média \pm epm), Efeito da exposição ao AE ou SE com VEI ou FLU (10mg/kg) em animais NGL (A) e DBT (B) avaliado no TNF - tempo de imobilidade em segundos (s). n = 7 -10. * p<0.05 quando comparado com o grupo NGL-VEI ou DBT-VEI.

Resultados do Teste de Campo Aberto

O teste de ANOVA foi aplicado para a avaliação do teste de campo aberto (FIGURA 6) que resultou como insignificante as diferenças de transição de quadrantes entre os grupos de animais NGL ($p > 0,05$). As diferenças de transições nos grupos de animais DBT também foram insignificantes quando comparadas entre si pela ANOVA, sugerindo que não há diferença entre os tratamentos e exposições. Já o teste t de Student não-pareado detectou alterações de transição significantes entre NGL-VEI e DBT-VEI (-14.4 ± 6.35 ; $p > 0,05$). Esses resultados indicam que as diferenças de número de transições observadas são afetadas apenas pela condição do animal e que os tratamentos não tiveram efeitos.

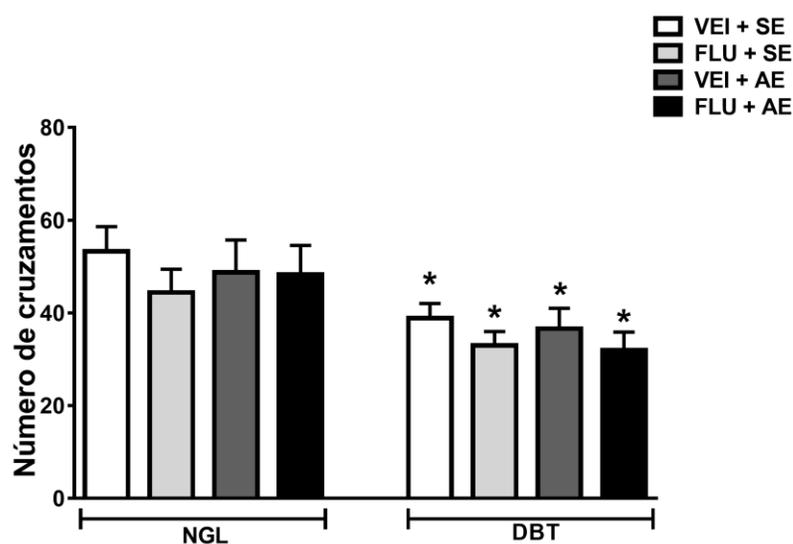


FIGURA 6 - Resultados do CA (média \pm EPM). Efeito da exposição ao AE ou SE com VEI ou FLU (10mg/kg) em animais NGL e DBT avaliando o número de cruzamentos de quadrados. $n = 7 - 10$. * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo NGL-VEI+SE.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Como introduzido inicialmente, sabe-se que pacientes com diabetes *mellitus* têm maior facilidade para desenvolver transtornos de ansiedade e a depressão. Essa comorbidade afeta a qualidade de vida dos pacientes, tornando mais difícil o monitoramento da glicemia, dieta e exercício físico diário necessários para o controle do diabetes. Estudos mostram que apesar do efeito antidepressivo de diversas drogas

em diabéticos, muitas delas acabam contribuindo para a glicemia elevada nos pacientes (PERYOT e RUBIN, 1997; LLOYD, DYER e BARNETT, 2001; ZANOVELI *et al.*, 2015). Pesquisas com ambiente enriquecido tiveram efeitos positivos na memória, neurogênese e comportamentos de ansiedade e depressão (YOUNG *et al.*, 1999; ICKES *et al.*, 2000). Com base nessas informações este estudo teve como objetivo compreender os efeitos do ambiente enriquecido, um tratamento alternativo não-farmacológico, sobre o comportamento de ratos diabéticos tratados com fluoxetina durante 23 dias. Os testes utilizados para geração de dados do comportamento foram modelos animais de depressão e ansiedade (TAG e TP), a análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma ou duas vias, com ou sem medidas repetidas.

A ansiedade nos animais diabéticos pode ser notada neste trabalho através do teste de TCE, em que eles passam menos tempo no compartimento claro do que os animais NGL (CRAWLEY E GOODWIN, 1980). A fluoxetina e a exposição ao ambiente enriquecido tiveram efeito ansiolítico sobre esses animais, aumentando a permanência deles no compartimento claro durante o teste. Com base nestes resultados esperava-se um efeito sinérgico entre a FLU e o AE, mas isto não foi observado.

Para compreendermos mais este efeito ansiolítico dos tratamentos, optamos pelo teste do LTE, que é considerado um teste mais específico para detectar a ansiedade, pois é possível observar e diferenciar dois tipos de comportamento ansioso no teste: o TAG e o TP. A primeira parte do teste baseia-se em cronometrar o tempo de esquiva do animal, três vezes seguidas, podendo avaliar o comportamento do transtorno de ansiedade generalizada (TAG). A interpretação da segunda parte do teste avalia a fuga do animal como transtorno do pânico. Sabe-se que o comportamento de esquiva é um processo de aprendizagem, enquanto a fuga é um comportamento inato do animal (ZANGROSSI AND GRAEFF, 1997; GRAEFF *et al.*, 1998; ZANOVELI *et al.*, 2003), de acordo com a FIGURA 3. Podemos observar que todos os grupos testados tiveram uma aprendizagem do comportamento de esquiva durante o teste, pois a cada rodada permanecem mais tempo no braço fechado.

Observa-se que a FLU e a exposição ao AE tiveram um efeito ansiolítico no comportamento de esquiva dos animais NGL, houve um efeito significativo quando ambos os tratamentos foram aplicados, mas não foi observado sinergismo entre eles.

Já em animais diabéticos apenas a exposição ao ambiente enriquecido mostrou ser ansiolítico, e este mesmo resultado observado no grupo DBT-FLU+AE ocorreu unicamente por causa da exposição ao AE sem sofrer influência do tratamento com FLU. Além do efeito ansiolítico na esquia de animais NGL, a FLU mostrou ter efeito panicolítico na fuga dos mesmos. Por outro lado, o AE não apresentou qualquer influência na resposta de fuga em NGL, concluindo que o resultado do grupo NGL-FLU+AE deve-se unicamente pela influência do tratamento com FLU. Curiosamente, os animais diabéticos tratados com FLU e o AE tiveram um efeito panicolítico significativo na resposta de fuga, e mais interessante notar que houve um sinergismo entre FLU e AE nesses animais, aumentando o tempo de fuga deles. A resposta de fuga/luta é acionada quando a área cinzenta periaquedutal dorsal (dPAG) recebe estímulos químicos ou elétricos, ou seja, esta região do cérebro está ligada com o comportamento defensivo do animal. Devido as semelhanças entre essa reação autonômica e o ataque de pânico, acredita-se que dPAG está envolvido com o transtorno do pânico (GRAEFF *et al.*, 1993; NASHOLD *et al.*, 1969; AMANO *et al.*, 1978). Sabe-se serotonina é um modulador inibitório dessa resposta de fuga (ZANOVELI *et al.*, 2003) e que a fluoxetina pode atuar da mesma maneira (BORELLI *et al.*, 2003). Não foram encontrados estudos que associassem o AE como possível tratamento para o transtorno do pânico ou que associassem o tratamento de AE com drogas antidepressivas ou ansiolíticas. Estes são os primeiros resultados produzidos sobre o efeito do AE no diabetes e que se mostraram satisfatórios no tratamento do transtorno do pânico em animais diabéticos. Grigsby *et al.* (2002) afirma que a prevalência de transtorno do pânico é de 1,3% em diabéticos. É interessante investigar quais mecanismos por traz do sinergismo FLU+AE na resposta de fuga desses animais.

O TNF é um teste validado para a análise de comportamento depressivo em animais, o qual é interpretado como comportamento depressivo o tempo animal fica no imóvel na água, ou seja, quanto maior o tempo maior será o estado de depressão do animal (PORSOLT, 1979). Estudos mostraram que alguns antidepressivos utilizados no tratamento da depressão podem induzir a glicemia alta nos pacientes. Esse efeito de alguns antidepressivos em pacientes e animais diabéticos é prejudicial ao controle

dos níveis glicêmicos e conseqüentemente a qualidade de vida (FRÁGUAS, de SANTA RITA SOARES, BROSTEIN, 2009; GOMEZ *et al.*, 2001). Para este estudo escolhemos a fluoxetina, pois além de ser um dos antidepressivos mais utilizados no tratamento da depressão, seu efeito antidepressivo em ratos diabéticos é conhecido (DULAWA *et al.*, 2004; da SILVA DIAS *et al.*, 2015). Este efeito antidepressivo é observado em nosso trabalho nos animais NGL e DBT, quando comparados com os animais tratados apenas com veículo.

Interessante notar que a exposição ao ambiente enriquecido também teve o efeito antidepressivo nos animais NGL e DBT. Em relação aos NGL, nossos dados corroboram os de Veena *et al.* (2007) e Brenes *et al.* (2008). Apesar de não haverem estudos específicos sobre o efeito do AE no comportamento depressivo em diabéticos, sabe-se que ele estimula a neurogênese hipocampal em animais diabéticos (BEAUQUIS, 2010). Na depressão é observado a diminuição do volume e proliferação das células no hipocampo e no córtex pré-frontal relacionados ao estresse (YU & CHEN, 2011). Além disso foi constatado que nessas regiões do cérebro os níveis de BDNF aparecem diminuídos, assim como no diabetes (SEKI *et al.*, 2004; NITTA *et al.*, 2002), e que após o uso de antidepressivos esta situação é revertida (MARTINOWICH & LU, 2008; PEREIRA, PARK, NEMIROVSKAYA, 2008). Ao compararmos os resultados dessas pesquisas com os nossos resultados, indicam que o ambiente enriquecido atua na neurogênese hipocampal, melhorando os sintomas da depressão observados nos diabéticos. Sabe-se também que o AE estimula a expressão de neurotrofinas como o BDNF no hipocampo (SPIRES *et al.*, 2004; OLSON *et al.*, 2006; ROSSI *et al.*, 2006). Dessa forma, é interessante aprofundar o estudo fazendo a análise e quantificação do BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal, por exemplo, para entendermos melhor os mecanismos envolvidos nos resultados encontrados neste trabalho.

Esperava-se que a junção do tratamento da FLU com a exposição ao AE tivesse um efeito sinérgico no comportamento dos ratos, diminuindo ainda mais o tempo de imobilidade do animal, entretanto, apesar de haverem alterações significativas no tempo de imobilidade, apenas o efeito isolado do antidepressivo e do AE foram percebidos (FIGURA 5B). Algumas suspeitas do porquê o resultado

esperado não ter ocorrido são que (1) o tempo de exposição ao AE não foi suficiente ou (2) os estímulos providos do ambiente escolhido para este trabalho não foram adequados para obter um efeito antidepressivo mais pronunciado nos grupos FLU+AE.

O teste de CA foi realizado para avaliar a atividade locomotora do animal antes do TNF. Nosso resultado não mostrou diferença entre os tratamentos, porém os animais diabéticos transitaram menos no CA do que os normoglicêmicos, o que indica que essa diferença apresentada na FIGURA 6 é causada unicamente pela condição diabética dos animais, independente do tratamento que receberam. O interessante deste resultado é que em outros trabalhos realizados pelo nosso laboratório essa diferença não foi observada (da SILVA DIAS *et al.*, 2015; de MORAIS *et al.*, 2014). Ao comparar as metodologias utilizadas nos artigos citados com as utilizadas aqui, não foram notadas discrepâncias na dose de STZ utilizada para induzir o diabetes, na duração dos experimentos ou no tempo de manipulação dos animais pelo pesquisador, diferenças essas que poderiam estar associadas com a divergência dos resultados. Acredita-se que essas alterações possam ter sido causadas por diferenças naturais de respostas entre os animais, ou ainda, algum outro fator desconhecido. De qualquer forma, foi possível observar efeito dos tratamentos empregados.

A fluoxetina teve efeito ansiolítico apenas nos animais NGL e funcionou como droga panicolítica para os diabéticos. A dose de fluoxetina utilizada neste trabalho foi de 10 mg/kg (Zanoveli *et al.*, 2010) Dulawa *et al.* (2004) em seu trabalho testou doses de até 25 mg/kg e observou efeito antidepressivo e ansiolítico expressivo nas doses de 10 e 18 mg/kg.

Há vários tipos de ambiente enriquecido, sendo que cada um destes pode estimular diferentes sentidos do organismo (BAUMANS, 2005). Vimos que o ambiente utilizado neste trabalho teve resultados significativos sobre o comportamento de ansiedade e depressão, mostrando ser um adjuvante não farmacológico no tratamento dessas psicopatologias em ratos diabéticos. Simpson e Kelly (2011) fizeram um levantamento sobre os tipos de ambiente enriquecido utilizados em pesquisas com animais e quais seriam os efeitos de cada protocolo sobre eles. Há muitos protocolos de ambiente enriquecido que estão sendo utilizados, assim, é interessante discutir que diferentes materiais podem estimular diferentes sentidos do corpo, a duração da

exposição também afeta o efeito do ambiente sobre esses animais. Com esse ponto de vista, é importante experimentar outros protocolos de enriquecimento do ambiente que poderiam acentuar os resultados vistos neste trabalho. As modificações de protocolo de AE sugeridas adicionadas somadas as modificações no tratamento com a FLU poderiam gerar um efeito sinérgico antidepressivo/ansiolítico, como foi observado na resposta de fuga dos animais diabéticos.

CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo a investigar a influência do AE no comportamento de depressão e ansiedade em animais diabéticos. O AE utilizado neste trabalho mostrou ser eficiente como antidepressivo, ansiolítico e panicolítico durante os testes comportamentais em animais diabéticos. Interessante que o tratamento com AE teve um tipo de sinergismo com a fluoxetina, resultando num efeito panicolítico acentuado em animais diabéticos. Importante ressaltar que estes resultados podem qualificar o AE como um possível tratamento no transtorno do pânico no diabetes. Dessa forma é relevante explorar os mecanismos envolvidos no sinergismo observado em nossos dados, investigando quais mecanismos estão envolvidos.

REFERÊNCIAS

AMANO, K.; TANIKAWA, T.; ISEKI, H.; KAWABATAKE, H.; NOTANI, M.; KAWAMURA, H.; KITAMURA, K. **Single Neuron Analysis of the Human Midbrain Tegmentum**. Appl Neurophysiol 1978; 41:66–78.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais DSM-V**. 5th.ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.

ANDERSOHN, F.; SCHADE, R.; SUISSA, S.; GARBE, E. **Long-Term Use of Antidepressants for Depressive Disorders and the Risk of Diabetes Mellitus**. The American Journal of Psychiatry, v. 166, 591-598. 2009

ANDERSON, R. J.; FREEDLAND, K. E.; CLOUSE, R. E.; LUSTMAN, P. J. **The Prevalence of Comorbid Depression in Adults With Diabetes**, A meta-analysis. Diabetes care, v. 24, 1069-1078, 2001.

BAUMANS, V. **Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research.** ILAR Journal, v.46, 162-169. 2005.

BEAUQUIS, J.; ROIG, P.; NICOLA, A. F. DE; SARAVIA, F. **Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice.** Plus One, v 5, i. 11. 2010.

BEAVER, B. V. **Environmental enrichment for laboratory animals.** ILAR News, v. 31. 1989.

BENAROYA-MILSHTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A.; KUKULANKSY, 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, v. 20, 1341–1347. 2004.

BORELLI, K. G.; NOBRE, M. J.; BRANDÃO, M. L.; COIMBRA, N. C. **Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, Volume 77, Issue 3, March 2004, Pages 557–566.

BRENES, J. C.; LACKINGER, M.; HÖGLINGER, G. U.; SCHRATT, G.; SCHWARTING R. K.W.; WÖHR, M. **Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats.** The Journal of Comparative Neurology. 2015.

BRENES, J. C.; RODRÍGUEZ, O.; FORNAGUERA, J. **Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, volume 89, Issue 1, March 2008, Pages 85–93.

CAMPAYO, A.; GOMÉZ-BIEL, C. H.; LOBO, A. **Diabetes and depression.** Curr Psychiatry Rep, 13(1), 26-30. 2011.

COLLINS, M. M.; CORCORANT, P.; PERRY, I. J. **Anxiety and depression symptoms in patients with diabetes.** Diabetic Medicine, v. 26, 153-161. 2009.

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

DA SILVA DIAS, I. C.; CARABELLI, B.; ISHII, D. K.; DE MORAIS, H; DE CARVALHO, M. C.; RIZZO DE SOUZA, L. E.; ZANATA, S. M.; BRANDÃO, M. L. ; CUNHA, T. M.;

FERRAZ, A. C.; CUNHA, J. M.; ZANOVELI, J. M. **Indoleamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes.** *Molecular Neurobiology*. Dez. 2015.

DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C. P.; DA SILVA, L. M.; FERREIRA, D. M.; WERNER, M. F.; ANDREATINI, R.; DA CUNHA, J. M.; ZANOVELI, J. M. **Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behaviour in streptozotocin-diabetic rats.** *Behavioural Brain Research*, v.258, 52-64. 2014

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI I. **Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants.** *Psychopharmacology*, v. 121, 66-72, 1995.

DEUSCHLE, M. **Effects of antidepressants on glucose metabolism and diabetes mellitus type 2 in adults.** *Current Opinion in Psychiatry*, v. 26, 60-65. 2013.

DULAWA, S. C.; HOLICK, K. A.; GUNDERSEN, B.; HEN, R. **Effects of Chronic Fluoxetine in Animal Models in Anxiety and Depression.** *Neuropsychopharmacology* . Jul. 2004.

EGEDE, L. E.; ELLIS, C. **Diabetes and depression: global perspectives.** *Diabetes Research and Clinical Practice*, v.87, 302-312. 2010.

EGEDE, L. E.; GRUBAUGH, A. L.; ELLIS, C. **The Effect of major depression on preventive care and quality of life among adults with diabetes.** *General Hospital Psychiatry*, v 32, 563-569. 2010.

FRÁGUAS, R.; DE SANTA RITA SOARES, S. M.; BRONSTEIN, M. D. **Depressão e diabetes *mellitus*.** *Revista psiquiatria clínica*. vol.36 supl.3 São Paulo, 2009.

GOLDNEY, R.D.; PHILLIPS, P. J.; FISHER, L. J.; WILSON, D. H. **Diabetes, depression, and quality of life.** *Diabetes Care*, v.27, 5. 2004

GOMEZ, R.; HUBER, J.; TOMBINI, G; BARROS, H. M. T. **Acute effect of different antidepressants on glycemia in diabetic and non-diabetic rats.** *Braz J Med Biol Res*, January 2001, Volume 34(1) 57-64.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H. Jr. **The elevated T-maze as an experimental model of anxiety.** *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, v.23, 237-246, 1998.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. **The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam.** Braz J Med Biol Res. 1993; 26(1):67-70.

GRIGSBY, A. B.; ANDERSON, R. J.; FREEDLAND, K.; CLOUSE, R. E.; LUSTMAN, P. J. **Prevalence of anxiety in adults with diabetes: A systematic review.** Journal of Psychosomatic Research, v. 53, i. 6, 1053–1060, dezembro 2002.

ICKES, B. R.; PHAM, T. M.; SANDERS, L. A.; ALBECK, D. S.; MOHAMMED. A. H.; GRANHOLM, A. C. **Long-Term Environmental Enrichment Leads to Regional Increases in Neurotrophin Levels in Rat Brain.** Experimental Neurology, v, July 2000, Pages 45–52.

KEMPERMANN, G.; GAST, D.; GAGE, F. H. **Neuroplasticity in Old Age: Sustained Fivefold Induction of Hippocampal Neurogenesis by Long-term Environmental Enrichment.** Ann Neurology, v. 52, 135-143, 2002.

KOHEN, D.; BURGESS, A. P.; CATALÁN, J.; LANT, A. **The role of anxiety and depression in quality of life and symptom reporting in people with diabetes mellitus.** Quality of Life Research, v.7, 197-204, 1998.

LLOYD, C. E.; DYER, P. H.; BARNETT, A. H. Prevalence of symptoms of depression and anxiety in a diabetes clinic population. **Diabetic Medicine**, Volume 17, Issue 3, pages 198–202, March 2000.

MAIA, A. C. C. de O.; BRAGA, A. de A.; BROUWERS, A.; NARDI, A. E.; OLIVEIRA E SILVA, A. C. de. **Prevalence of psychiatric disorders in patients with diabetes types 1 and 2.** Comprehensive Psychiatry, v. 53, i. 8, 1169–1173, Novembro de 2012.

MARTINOWICH, K.; LU, B. **Interaction between BDNF and Serotonin: Role in Mood Disorders.** Neuropsychopharmacology, 33, 73–83. 2008.

MONCEK, F.; DUNKO, R.; JOHANSSON, B. B., JEZOVA, D. **Effect of environmental enrichment on stress relates systems in rats.** Journal of Neuroendocrinology, v.16, 423-431, 2004.

MORA, F.; SEGOVIA, G.; Del ARCO, A. **Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain.** Brain Research Reviews, v. 55, 78-88, 2007.

MOSAKU, K.; KOLAWOLE, B.; MUME, C.; IKEM, R. **Depression, Anxiety and Quality of Life among Diabetic Patients: A Comparative Study.** Journal of the National Medical Association, v. 100, 73-78, 2008.

NASHOLD JR., B.S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. **Sensations Evoked by Stimulation in the Midbrain of Man.** Journal of Neurosurgery, vol. 30, no. 1, p. 14-24, Janeiro de 1969.

NITTA, A.; MURAI, R.; SUZUKI, N.; ITO, H.; NOMOTO, H.; KATOH, G.; FURUKAWA, Y.; FURUKAWA, S. **Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF.** Neurotoxicology and Teratology, v. 24, 695-701, 2002.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. **Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system.** Nature Reviews Neuroscience, v.7, 697-707. 2006.

OLSON, A. K.; EADIE, B. D.; ERNST, C.; CHRISTIE, B. R. **Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in adult hippocampus via dissociable pathways.** Hippocampus, v. 16, 250-260. 2006.

PASCHALIDES, C.; WEARDEN, A. J.; DUNKERLEY, R.; BUNDY, C.; DAVIES, R.; DICKENS, CM. **The associations of anxiety, depression and personal illness representations with glycaemic control and health-related quality of life in patients with type 2 diabetes mellitus.** Journal of Psychosomatic Research, v.57, 557-564, 2004.

PIAZZA, F. V.; PINTO, G. V.; TROTT, G.; MARCUZZO, S.; GOMEZ, R.; FERNANDES, M. C. **Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats.** Behavioural Brain Research, v. 217, 16-20. (2011).

PEREIRA, T. D.; PARK, S.; NEMIROVSKAYA, Y. **Cognitive role of neurogenesis in depression and antidepressant treatment.** The Neuroscientist. 2008.

PEYROT, M.; RUBIN, R. R. **Levels and Risks of Depression and Anxiety Symptomatology Among Diabetic Adults.** American Diabetes Association. 1997

PRAAG, H. van; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. **Neuronal consequences of environmental enrichment.** Nature Reviews Neuroscience, v.1, 191-198. 2000.

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI JÚNIOR, H.; VIANA, M. de B. **Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze.** Behavioral Brain Research, v. 147, 185-192. 2003

PORSOLT, R. D. **Animal model of depression.** Biomedicine, v.30, 139-140, 1979.

ROSSI, C.; ANGELUCCI, A.; CONSTANTIN, L.; BRASCHI, C.; MAZZANTINI, M.; BABBINI, F.; FABBRI, M. E.; TESSAROLLO, L.; MAFFEI, L.; BERARDI, N.; CALEO, M. **Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment.** European Journal of Neuroscience, v. 24, 1850–1856. 2006.

SEKI, M.; TANAKA, T.; NAWA, H.; USUI, T.; FUKUCHI, T.; IKEDA, K.; ABE, H.; TAKEI, N. **Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Early Retinal Neuropathy of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats** Therapeutic Potential of Brain-Derived Neurotrophic Factor for Dopaminergic Amacrine Cells. *Diabetes*, v. 53, 2412-2419, 2004.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. **The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects.** *Behavioural Brain Research*, volume 222, issue 1, 12 September 2011, Pages 246–264.

SMITH, K. J.; BÉLAND, M.; CLYDE, M.; GARIÉPY, G.; PAGÉ, V.; BADAWI, G.; RABASA-LHORET, R.; SCHMITZ, N. **Association of diabetes with anxiety: A systematic review and meta-analysis.** *Journal of Psychosomatic Research*, v. 74, i. 2, 89-99. 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>>

SPIRES, T. L.; GROTE, H. E.; VARSHNEY, N. K.; CORDERY, P. M.; DELLEN, A. V.; BLAKEMORE, C.; HANNAN, A. J. **Mouse Model of Huntington's Disease, Indicating a Possible Disease Mechanism.** *The Journal of Neuroscience*, v. 24, 2270-2276. 2004.

STRANAHAN, A. M.; LEE, K.; MARTIN, B.; MAUDSLEY, S.; GOLDEN, E.; CUTLER, R. G.; MATTSON, M. P. **Voluntary exercise and caloric restriction enhance hippocampal dendritic spine density and BDNF levels in diabetic mice.** *Hippocampus*, v. 19, 951-961. 2009.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. **Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety.** *Pharmacology Biochemistry Behavioral*, v. 65, 571-576, 2000.

THOMAS, J.; JONES, G.; SCARINCI, I.; BRANTLEY, P. **A Descriptive and Comparative Study of the Prevalence of Depressive and Anxiety Disorders in Low-Income Adults With Type 2 Diabetes and Other Chronic Illnesses.** *Diabetes Care*, v. 26, no. 8, 2311-2317, agosto de 2003.

VEENA, J.; SRIKUMAR, B. N.; RAJU, T. R.; RAO, S. **Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats.** *Neuroscience Letters*, volume 455, issue 3, 22 May 2009, Pages 178–182.

WILLIS, T. **Diabetes: a medical odyssey.** Tuckahoe, Nova Iorque. 1971.

YOUNG, D.; LAWLOR, P. A.; LEONE, P.; DRAGUNOW, M.; DURING, M. J. **Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective.** *Nature Medicine* 5, 448 - 453 (1999).

YU, H.; CHEN, Z. **The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry.** *Acta Pharmacologica Sinica*, 32, 3–11. 2011

ZANGROSSI, H. Jr.; GRAEFF, F. G. **Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety.** *Brain Res. Bull.*, v. 44, 1-5, 1997

ZANOVELI, J. M.; DE MORAIS, H.; DA SILVA DIAS, I. C.; SCHREIBER, A.K.; DE SOUZA, C. P.; DA CUNHA, J. M. **Depression associated with diabetes: from pathophysiology to treatment.** *Current Diabetes Reviews*. 2015.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. Jr. **Enhanced reactivity of 5-HT_{1A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: Evidence from the elevated T-maze.** *Neuropharmacology*, v. 52, 1188-1195, 2007.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. Jr. **Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze.** *European Journal of Pharmacology*, v. 473, 153-161, 2003.