

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BETINA DITTMAR BLUM

**COMPARAÇÃO ENTRE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E INOCULAÇÃO DE
ESTRESSE NA INFÂNCIA SOBRE A RESILIÊNCIA NA VIDA ADULTA EM
CAMUNDONGOS**

CURITIBA
2017

BETINA DITTMAR BLUM

**COMPARAÇÃO ENTRE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E INOCULAÇÃO DE
ESTRESSE NA INFÂNCIA SOBRE A RESILIÊNCIA NA VIDA ADULTA EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Biomedicina da Universidade Federal do
Paraná como requisito parcial à obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Profº Bruno Jacson Martynhak

CURITIBA
2017

Ao Criador de cérebros e neurônios e sinapses e neurotransmissores e comportamentos, ao que nos permite estudá-los e nos maravilhar com eles, ao que um dia irá restaurar todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que me sustenta com sua graça e que criou um universo maravilhoso para ser investigado e estudado.

Agradeço à minha família por todo o apoio, cuidado e sacrifícios que fizeram junto comigo. Muitas vezes programas em família foram impedidos por experimentos no final de semana e feriados, mas eles sempre foram muito compreensivos.

Um agradecimento especial ao meu irmão Lucas Dittmar Blum, que, com sua forma de pensar de engenheiro, me ajudou a resolver vários problemas durante a execução do projeto e durante a escrita do trabalho.

Também a meu pai, Luiz Carlos Blum, por sua ajuda na confecção das grades para o estresse predatório; e a minha mãe, Irmi Dittmar Blum, por sua paciência e carinho nos meus momentos de grande estresse e dificuldades.

Agradeço ao Professor Bruno Martynhak, que, desde a minha chegada no laboratório tem me orientado com dedicação e paciência. Não hesita em colocar o jaleco e pôr a mão na massa junto comigo quando necessário, é realmente muito paciente para explicar estatística e bondoso com todos. Também é o responsável por manter o laboratório funcionando, bancando materiais de uso rotineiro nos experimentos do próprio bolso.

Agradeço aos meus colegas do laboratório: Marina Saade, Maria Carolina Michalak, Kamila Souza Costa, Franco Souza, Vinícius Guilhen, Rebeca Buest e Bárbara Schneider. Esse trabalho não teria sido possível sem a ajuda de todos.

Agradeço também a Débora Spisla, que dividiu momentos de angústia e alegria e me ajudou na realização do projeto quando foi preciso; e Adam Sugi, companheiro de almoços, discussões de hipóteses científicas e resolução de problemas.

Aos meus dois companheiros de trabalho duro no biotério: Malu, sempre chegava cedo em dia de troca de caixas para cuidar de seus mais de cem ratos; e Tugstênio, companhia certa em feriados e finais de semana e sempre prestativo com todos.

Agradeço à professora Rosana, que gentilmente realizou as dosagens de

corticosterona.

Agradeço à equipe do Biotério pela estrutura disponibilizada, por gentilmente cederem caixas e materiais fora da rotina e por se preocuparem com o bem-estar dos animais.

Às vidas dos animais que foram utilizados neste estudo e à de todos que, involuntariamente, contribuem para o avanço do conhecimento científico.

Agradeço ao Departamento de Fisiologia e ao Laboratório de Neurofisiologia.

Ao Departamento de Farmacologia, pela parceria na realização dos experimentos, pelo empréstimo de garrafas de água, de aparatos para testes comportamentais e pelas amizades.

Agradeço às professoras Débora do Rocio Klisiowicz e Katya Nailwaiko pelo trabalho na coordenação do curso de Biomedicina e por cuidarem de nós como segundos filhos. Ao secretário Rodrigo, por sempre atender os alunos gentilmente e solucionar problemas.

Por último, um agradecimento especial aos dois professores que despertaram em mim o amor pela neurociência: Marcelo Lima e Luana Fischer, sua paixão e excelência no que fazem me inspira! Espero um dia me tornar um pouco dos professores que vocês são. Obrigada!

“Sei quem eu era quando me levantei esta manhã, mas acho que já passei por várias mudanças desde então.”

- Alice no País das Maravilhas

RESUMO

O estresse é um fator importante para o desenvolvimento de depressão maior. No entanto, nem todos os indivíduos submetidos a estresse intenso se tornam deprimidos. Estes são chamados resilientes. A exposição crônica a estressores brandos, conhecida como inoculação de estresse, é um fator que contribui para a resiliência em modelos animais. Semelhantemente, o enriquecimento ambiental é uma manipulação que pode conferir resiliência a animais submetidos a modelos de depressão. O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que o enriquecimento ambiental age como um inoculador de estresse. Após o desmame, os animais foram submetidos a um protocolo de estresse predatório leve ou enriquecimento ou não foram manipulados por 28 dias. Após esse período, foram dosadas as concentrações de corticosterona fecal basal e de corticosterona plasmática após um estresse agudo de imobilização. Também foram realizados os testes comportamentais de campo aberto, labirinto em cruz elevado, caixa claro/escuro, teste de suspensão pela cauda e *splash test*. O efeito dessas manipulações também foi testado no comportamento após estresse crônico brando e imprevisível (UCMS). A corticosterona plasmática dos grupos estresse predatório e enriquecimento não foi significativamente diferente do controle após um estresse de imobilização, mas foi observado um efeito protetor do estresse predatório e do enriquecimento contra a queda da preferência por sacarose durante o UCMS. O estresse predatório também protegeu contra a redução no ganho de peso durante o protocolo. Foi observado, ainda, um efeito ansiogênico do enriquecimento ambiental logo após o fim do protocolo bem como ao fim do UCMS, 5 semanas mais tarde, indicando efeitos negativos duradouros. Assim, apesar dos efeitos do estresse predatório e do enriquecimento serem similares em alguns aspectos, eles não são idênticos. Além disso, esse estudo sugere que o estresse predatório é uma forma ainda mais eficiente de conferir resiliência em comparação com o enriquecimento.

Palavras-chave: Estresse predatório. Estresse crônico brando e imprevisível. Modelo animal de depressão.

ABSTRACT

Stress is an important factor in the development of major depression. However, not all individuals who experience events of intense stress become depressed. They are called resilient. Chronic exposure to mild stressors, known as stress inoculation, is a contributing factor to resilience in animal models. Similarly, environmental enrichment can confer resilience to animals subjected to models of depression. The objective of this work was to test the hypothesis that environmental enrichment works as a stress inoculator. After weaning, the animals underwent either a mild predatory stress protocol or enrichment or absence of manipulation for 28 days. We dosed basal corticosterone in fecal samples and plasma corticosterone after an acute restraint stress. Animals were also tested on the open field, elevated plus maze, light/dark box, tail suspension test and splash test. The behavioral effects of these manipulations were also tested on the unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression. Plasma corticosterone after the acute restraint stress was not altered on the predatory stress and enrichment groups when compared to the control group, but we observed that the two groups were protected against reduction in sucrose preference during UCMS. Predatory stress also protected against reduction in weight gain during the protocol. Furthermore, it was observed an anxiogenic effect in the enrichment group after the 28 days and at the end of the UCMS protocol, five weeks later, which suggests long-lasting negative effects. Though the effects of mild predatory stress and enrichment were similar in some aspects, they were not identical. In addition, this study suggests that predatory stress is more efficient when conferring resilience when compared to enrichment.

Keywords: Predatory stress. Unpredictable chronic mild stress. Animal model of depression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 PROBLEMA	10
1.2 OBJETIVOS	13
1.2.1 Objetivo Geral	13
1.2.2 Objetivos Específicos	13
1.3 JUSTIFICATIVA	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 DEPRESSÃO MAIOR	15
2.2 INOCULAÇÃO DE ESTRESSE.....	15
2.3 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	17
2.4 ENRIQUECIMENTO COMO INOCULAÇÃO	18
2.5 ESTRESSE CRÔNICO BRANDO E IMPREVISÍVEL.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 ANIMAIS.....	21
3.2 MANIPULAÇÕES NA INFÂNCIA	21
3.2.1 Estresse predatório	21
3.2.2 Enriquecimento ambiental	22
3.3 ESTRESSE DE IMOBILIZAÇÃO	23
3.4 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA	23
3.5 ESTRESSE CRÔNICO BRANDO E IMPREVISÍVEL.....	24
3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	24
3.6.1 Preferência por sacarose	25
3.6.2 Campo aberto.....	25
3.6.3 Suspensão pela cauda.....	26
3.6.4 <i>Splash test</i>	26
3.6.5 Labirinto em cruz elevado	27
3.6.7 Caixa claro/escuro.....	27
3.7 DESENHO EXPERIMENTAL	28
3.7.1. Experimento 1	28

3.7.2. Experimento 2	29
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4 RESULTADOS.....	30
4.1 EXPERIMENTO 1	30
4.1.1 Campo aberto.....	30
4.1.2 Suspensão pela cauda	31
4.1.3 <i>Splash test</i>	32
4.1.4 Labirinto em cruz elevado	32
4.1.5 Caixa claro/escuro.....	34
4.1.6 Corticosterona	34
4.2 EXPERIMENTO 2	35
4.2.1 Preferência por sacarose	35
4.2.2 Peso	37
4.2.3 Campo aberto.....	38
4.2.4 Suspensão pela cauda	40
4.2.5 <i>Splash test</i>	40
4.2.6 Labirinto em cruz elevado	41
4.2.7 Caixa claro/escuro.....	42
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROBLEMA

A depressão é um transtorno psiquiátrico complexo que afeta 4,4% das pessoas no mundo, o equivalente a 322 milhões de pessoas (WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017)). No Brasil, 11,5 milhões de pessoas sofrem com a doença. A OMS afirma que, dentre todas as causas de incapacidade, a depressão é o maior contribuinte, sendo responsável por 7,5% dos anos vividos em incapacidade em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O transtorno tem origem multifatorial e o estresse tem sido apontado como uma das principais causas não genéticas (NESTLER et al., 2002). Entretanto, há pacientes diagnosticados com depressão que não vivenciaram uma situação estressante bem definida (NESTLER et al., 2002; VAN PRAAG, 2004). Bem como também não são todos os indivíduos submetidos a situações extremamente estressantes que desenvolvem o transtorno. Estes são denominados resilientes (RUSSO et al., 2012).

Existem vários fatores que podem contribuir para a resiliência, tanto genéticos como ambientais. Dentre os fatores não genéticos está a exposição crônica a estressores de baixa intensidade, conhecida como inoculação de estresse (RUSSO et al., 2012). A inoculação foi primeiramente descrita por Levine (1957), pela observação de que ratos manipulados na infância demonstraram menor responsividade a um estresse fisiológico. A manipulação consistia em retirar o filhote do ninho, colocá-lo em outro compartimento e logo em seguida retorná-lo à caixa. Os animais manipulados ingeriram mais água e apresentaram adrenais de menor peso em comparação aos não manipulados após a injeção de solução de glucose 20%, indicando menor secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e hormônio antidiurético (ADH) e uma menor responsividade fisiológica dos animais manipulados em resposta ao estresse. Desde então, diversos trabalhos confirmaram e estenderam os achados de Levine (BROCKHURST et al., 2015; KATZ et al., 2009; LEE et al., 2014; LEE et al., 2016; LEVINE et al., 1967; LYONS et al., 1999; PARKER et al., 2004; PARKER et al., 2006).

Em paralelo às pesquisas sobre inoculação de estresse, o enriquecimento

ambiental tem se destacado como uma manipulação animal que promove a resiliência em modelos animais de transtornos psiquiátricos como depressão, ansiedade e abuso de substâncias (CROFTON et al., 2015). Apesar de não existir consenso metodológico entre os laboratórios sobre como prover enriquecimento, a abordagem consiste basicamente em criar um espaço com três características principais: exercício físico, novidade e contato social (CROFTON et al., 2015).

Em geral, é bem aceito que o enriquecimento ambiental tem efeitos benéficos para os animais. No entanto, ainda não se sabe como a manipulação gera esses efeitos positivos. Crofton e colaboradores (2015) sugeriram que o enriquecimento ambiental funciona como uma forma de inoculação, apontando que os componentes do enriquecimento agem como pequenos estressores diários que são adaptativos e inoculam os animais gerando resiliência. Apesar dessa hipótese encontrar respaldo na literatura, ainda não há dados sobre os efeitos comparativos do enriquecimento e da exposição a baixos níveis de estresse em um modelo animal de depressão.

Dos modelos animais de depressão, o estresse crônico brando e imprevisível (UCMS) (WILLNER et al., 1987) é um dos modelos baseados em estresse mais estudados. O protocolo consiste em apresentar um ou mais estressores brandos por dia ao longo de 4 semanas ou mais. Alguns dos estressores utilizados são privação de comida e água, luzes acesas durante a fase escura, inclinação da caixa e períodos de cepilho molhado (WILLNER et al., 1987). O protocolo leva à redução da preferência por sacarose dos animais após algumas semanas, caracterizando anedonia. Apesar dos estressores serem brandos, a imprevisibilidade acaba elevando a intensidade a um nível de estresse geralmente não-adaptativo (CROFTON et al., 2015).

Nesse contexto, uma abordagem ainda não explorada consiste em comparar um grupo enriquecido e um grupo submetido a níveis brandos de estresse em um modelo animal de depressão com a intenção de avaliar se o estresse brando é capaz de proteger contra os efeitos do UCMS e se as respostas são semelhantes às do grupo enriquecido, o que seria observado de acordo com a hipótese de que o enriquecimento age como inoculação de estresse.

Assim, esperamos que o grupo enriquecido não desenvolva anedonia em resposta ao estresse crônico brando e imprevisível. Hipotetizamos que o grupo

submetido a estresse predatório leve apresente resposta comportamental similar ao grupo enriquecido. Também esperamos que o grupo controle tenha sua preferência por sacarose significativamente diminuída ao longo das semanas de UCMS. Adicionalmente, esperamos que o grupo controle apresente alterações em outros testes comportamentais após o protocolo de UCMS e que os grupos enriquecido e levemente estressado se mantenham semelhantes aos grupos não estressados.

Paralelamente, esperamos que o grupo submetido a estresse predatório leve apresente resposta corticoide diminuída em resposta a estresse agudo por imobilização em comparação ao controle, assim como menor tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda maior tempo de *grooming* no *splash test* e menores medidas de ansiedade no campo aberto, labirinto em cruz e caixa claro/escuro. Hipotetizamos que a resposta do grupo enriquecido será similar ao do grupo inoculado.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Compreender os efeitos do enriquecimento ambiental e da inoculação de estresse na resiliência a estresses agudo e crônico.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar o nível de corticosterona plasmática após estresse agudo nos grupos estresse predatório leve, enriquecimento e controle;
- Comparar o comportamento tipo-depressivo no teste de suspensão pela cauda e no *splash test* em animais enriquecidos, levemente estressados e controles;
- Investigar o comportamento de ansiedade no teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro/escuro em animais enriquecidos, levemente estressados e controles;
- Avaliar a anedonia em animais levemente estressados, enriquecidos e controle submetidos ao estresse crônico brando e imprevisível;
- Analisar o comportamento tipo-depressivo no teste de suspensão pela cauda e no *splash test* após o protocolo de estresse crônico brando e imprevisível;
- Analisar o comportamento de ansiedade no teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro/escuro após o protocolo de estresse crônico brando e imprevisível.

1.3 JUSTIFICATIVA

Ainda não se conhece de que forma o enriquecimento ambiental leva aos efeitos positivos observados em testes que avaliam comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso. Crofton e colaboradores (2015) sugerem que o enriquecimento age como pequenas quantidades de estresse leve, inoculando os animais e aumentando sua capacidade adaptativa. Também não se sabe com clareza os efeitos da inoculação de estresse e do enriquecimento num modelo animal de depressão. Assim, o objetivo deste trabalho é testar a hipótese de que o enriquecimento age como um estressor leve, inoculando os animais. Estudar manipulações que levam ao desenvolvimento de resiliência em modelos animais pode levar à maior compreensão dos mecanismos pelos quais elas agem e assim levar ao desenvolvimento de terapias tanto farmacológicas como não farmacológicas em humanos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DEPRESSÃO MAIOR

Segundo a OMS (2017, p. 7), “transtornos depressivos são caracterizados por tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimento de culpa ou baixa auto-estima, alterações no sono ou apetite, cansaço e baixa concentração”. Também segundo a OMS, 788 mil pessoas morreram por suicídio no ano de 2015, sendo que a depressão é um dos maiores contribuintes para essa causa de morte.

A depressão maior tem origem multifatorial, tanto genética como ambiental, sendo que dentre os fatores ambientais o estresse se destaca (NESTLER et al., 2002). De acordo com o relatório da OMS de 2017, os riscos para o desenvolvimento de depressão incluem pobreza, desemprego e eventos como a morte de um familiar, quebras de relacionamento, doença física e problemas relacionados ao abuso de álcool e drogas. Entretanto, não é necessário que o indivíduo vivencie uma dessas situações estressantes para desenvolver o transtorno. Há pacientes com diagnóstico de depressão sem a presença de um fator estressante bem delimitado (NESTLER et al., 2002; VAN PRAAG, 2004). Assim como também não são todos os indivíduos submetidos a essas ou outras situações estressantes que desenvolvem o transtorno. Estes são denominados resilientes. A resiliência tem sido bastante estudada em modelos animais (RUSSO et al., 2012), associada às experiências na fase neonatal e infância.

2.2 INOCULAÇÃO DE ESTRESSE

A inoculação de estresse é uma manipulação que consiste na exposição crônica a estressores de baixa intensidade, e é um dos fatores que contribuem para a resiliência (RUSSO et al., 2012). O termo é emprestado da imunologia, pois assim como uma vacina, em que um patógeno morto ou enfraquecido é capaz de gerar uma resposta imune e proteger o organismo contra o patógeno em si, a exposição a pequenas quantidades de estresse prepara o organismo para suportar estressores futuros (ASHOKAN et al., 2016). A inoculação começou a ser estudada por Seymour

Levine na década de 1950, intrigado pela teoria freudiana de que um trauma vivenciado na infância tem efeitos duradouros sobre a personalidade do adulto (STERN et al., 2010). Ao contrário da teoria de Freud, Levine (1957) observou que ratos brevemente separados de suas mães na infância demonstraram menor responsividade a um estresse fisiológico. Os animais foram injetados com solução de glicose 20% e, após uma restrição alimentar e hídrica de 24h tiveram novamente acesso à água. Foram avaliados ingestão de água e o peso das adrenais após sacrifício. Os animais manipulados apresentaram menores adrenais em comparação aos não manipulados, indicando menor secreção de ACTH, e tomaram mais água, provavelmente por uma menor produção de ADH. Ambos os resultados sugerem uma menor reatividade fisiológica dos animais manipulados em resposta ao estresse.

Em 1967, Levine também demonstrou os efeitos comportamentais da inoculação. Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de manipulação do trabalho de 1957, ou seja, do dia pós natal 1 (DPN 1) até DPN 20 os filhotes eram separados da mãe e alocados individualmente por 3 minutos, uma vez ao dia. Os animais manipulados apresentaram menor taxa de defecação e maior atividade no campo aberto em comparação aos não manipulados, medidas relacionadas à baixa emocionalidade. Levine também demonstrou que os animais manipulados apresentaram menores níveis de corticosterona plasmática após serem submetidos ao campo aberto, também sugerindo que os animais manipulados são menos responsivos a uma situação de novidade.

Em seguida, demonstrou-se que macacos expostos a breves separações maternas apresentaram menores níveis de cortisol e menores intensidade e frequência de chamado materno durante separações maternas posteriores comparados com macacos que nunca haviam sido separados de suas mães (LYONS et al., 1999). Outro estudo em macacos confirmou esses achados: macacos jovens designados para a condição de estresse por breves isolamentos sociais demonstraram menor comportamento de ansiedade em um novo ambiente (PARKER et al., 2004) e menor reatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em resposta a um estresse de contenção (PARKER et al., 2006) em comparação a macacos criados em situações menos estressantes.

Em humanos, a inoculação é usada como terapia cognitivo-comportamental principalmente em pessoas que trabalham em ambientes onde ocorre exposição constante a estresse intenso, como equipes médicas, militares, policias e bombeiros (SAUNDERS et al., 1996). É baseada na terapia de exposição, que consiste em incentivar a confrontação pela criação de imagens mentais envolvendo situações estressantes de diferentes níveis, e encoraja a interação com estressores reais (MCNALLY, 2007). Também já foi demonstrado que crianças expostas a pequenos níveis de estresse apresentam níveis menores de ansiedade na vida adulta (EDGE et al., 2009).

Mais recentemente, a inoculação de estresse foi modelada em camundongos por Brockhurst et al. (2015). Camundongos C57BL/6 foram randomizados para o grupo controle ou para exposições intermitentes de 15 minutos a camundongos Swiss reprodutores aposentados. Os pesquisadores observaram que o grupo de camundongos inoculado apresentou uma menor concentração de corticosterona plasmática após estresse agudo por imobilização em comparação com o grupo não inoculado. Além disso, o grupo inoculado apresentou menor tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e menor tempo de freezing no campo aberto em comparação com o controle não inoculado.

Trabalhos subsequentes continuam demonstrando os efeitos positivos da inoculação de estresse em diversos modelos animais. (KATZ et al., 2009; LEE et al., 2014; LEE et al., 2016; LYONS, 2009; LYONS et al., 2010; LYONS; PARKER, 2007).

Assim, um grande escopo de referências na literatura demonstra que a exposição a estressores de baixa intensidade podem promover a resiliência e melhorar performance em face de adversidades futuras, principalmente quando aplicados em fases de maturação do sistema nervoso central e grande neuroplasticidade.

2.3 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

O enriquecimento ambiental é uma abordagem comumente utilizada e que promove a resiliência em modelos animais de transtornos psiquiátricos como depressão, ansiedade e abuso de substâncias (CROFTON et al., 2015).

Até agora, os laboratórios que estudam os efeitos do enriquecimento não chegaram a uma metodologia padronizada para prover um ambiente enriquecido. Ainda assim, a abordagem consiste basicamente em criar um espaço onde os animais possam se exercitar, ser apresentados constantemente à novidade e ter contato social. Também é aceito que uma das principais características do enriquecimento é que ele produza um benefício geral para o organismo (CROFTON et al., 2015).

Alguns trabalhos mostraram um efeito tipo-antidepressivo do enriquecimento ambiental em ratos. Brenes et al. (2008) e Hajheidari et al. (2015) observaram menor tempo de imobilidade no nado forçado em ratos criados em ambiente enriquecido em comparação com ratos controle. Similarmente, o estudo de Brenes Sáenz et al. (2006) demonstrou um maior consumo de sacarose no teste da preferência por sacarose e menor tempo de imobilidade na natação forçada em ratos enriquecidos em comparação com as condições isolada e padrão.

Em camundongos, Lehmann e Herkenham (2011) mostraram que camundongos enriquecidos e posteriormente submetidos ao protocolo de derrota social passaram menos tempo imóveis no teste de suspensão pela cauda e natação forçada em comparação com os grupos não enriquecidos. Além disso, no teste da natação forçada, o tempo de imobilidade do grupo enriquecimento-derrota social se assemelhou ao dos grupos não submetidos à derrota, sugerindo que o grupo enriquecido apresenta um fenótipo resiliente.

Com relação ao comportamento tipo-ansioso, os dados são mais controversos, mas vários estudos relataram que ratos e camundongos enriquecidos passaram mais tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (FRISKE; GAMMIE, 2005; HAJHEIDARI et al., 2015; LEAL-GALÍCIA et al., 2007). Leal-Galícia (2007) também observou que os ratos enriquecidos exploraram mais o campo aberto, outra medida de ansiedade reduzida.

2.4 ENRIQUECIMENTO COMO INOCULAÇÃO

Crofton e colaboradores propuseram em 2015 que o enriquecimento ambiental tem seus efeitos benéficos porque age como uma forma de inoculação. O trabalho

sugere que os componentes do enriquecimento agem como pequenos estressores diários que são adaptativos e inoculam os animais, gerando fenótipos pré-clínicos de resiliência a depressão, ansiedade e adição.

Uma observação que dá suporte a essa hipótese é a de que várias respostas e características são encontradas tanto em animais que passaram repetidamente por estressores brandos como em animais enriquecidos. Por exemplo, animais submetidos a estresse crônico leve apresentam resposta de elevação de corticosterona diminuída a estressores subsequentes (BARNUM et al., 2007; BROCKHURST et al., 2015; MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995; e NATELSON et al., 1988), assim como o enriquecimento leva a uma diminuição da resposta corticoide em animais submetidos a estresse (SKWARA et al., 2012). Exposição repetida a estressores brandos também reduz a secreção de ACTH e adrenalina (GADEK-MICHALSKA; BUGAJSKI, 2003; KVETNANSKY et al., 2009); assim, como o enriquecimento (MONCEK et al., 2004; SKWARA et al., 2012). Além disso, ambas as manipulações produzem diminuição de peso corporal nos animais (HARRIS et al., 2004; PEÑA et al., 2009).

No entanto, ainda não há dados sobre os efeitos comparativos do enriquecimento e da exposição a baixos níveis de estresse em um modelo animal de depressão. Os efeitos benéficos do enriquecimento já foram demonstrados em modelos de depressão, revertendo efeitos deletérios da memória e aprendizado (HUTCHINSON et al., 2012) e prevenindo o surgimento de comportamento tipo-depressivo (ZANCA et al., 2015), mas ainda não há dados mostrando os efeitos da inoculação.

2.5 ESTRESSE CRÔNICO BRANDO E IMPREVISÍVEL

Dentre os modelos animais de depressão que usam o estresse como fator causal, o estresse crônico brando e imprevisível (UCMS), desenvolvido inicialmente por Willner et al. (1987), é um dos mais estudados. O protocolo se baseia na apresentação de um ou dois estressores brandos por dia ao longo de 4 semanas ou mais, se necessário. Alguns dos estressores utilizados são: privação de comida e água, luzes acesas durante a fase escura, inclinação da caixa e períodos de cepilho molhado (WILLNER et al., 1987). O protocolo é bem conhecido por induzir anedonia nos animais

após algumas semanas, com redução da preferência por sacarose em pelo menos 20%. Apesar dos estressores serem leves, a característica imprevisível de sua apresentação acaba elevando a intensidade a um nível maior e geralmente não-adaptativo (CROFTON et al., 2015). É um modelo com alta validade de constructo, pois compartilha um fator causal da depressão em humanos: o estresse. Além disso, induz ou predispõe a alterações vistas como comorbidades em pacientes depressivos, como aumento do comportamento de ansiedade (D'AQUILA et al., 1994), lesão gástrica (NASSAR et al., 2011), intolerância à glicose (PAN et al., 2013) e alterações neurobiológicas como a redução dos níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), baixos tanto no hipocampo de roedores submetidos a UCMS (SONG et al., 2006) e em soro de pacientes deprimidos (SHIMIZU et al., 2003).

A literatura não é muito ampla sobre os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o estresse crônico brando e imprevisível. Vega-Rivera et al. (2016) demonstraram recentemente que o enriquecimento tem efeitos benéficos em camundongos submetidos ao protocolo. O enriquecimento preveniu a redução da preferência por sacarose em comparação com o grupo não-enriquecido submetido a estresse. Além disso, a preferência na semana 4 foi semelhante à dos grupos não submetidos a estresse. Os camundongos enriquecidos também apresentaram menor tempo de imobilidade no teste da natação forçada, apesar de terem níveis semelhantes de corticosterona plasmática.

Assim, esperamos contribuir para o entendimento dos efeitos da inoculação de estresse e do enriquecimento ambiental num modelo animal de depressão e para a melhor compreensão dos paralelos entre as duas manipulações. Esperamos que ao fim do UCMS os animais do grupo enriquecido e estresse predatório leve tenham uma preferência significativamente mais alta em comparação ao grupo controle submetido ao UCMS, e que sejam semelhantes às preferências dos grupos não estressados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 120 camundongos Swiss machos com 21 dias de idade fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos no próprio biotério, em salas com temperatura controlada ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) em ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h). O grupo enriquecido foi alocado em gaiolas de 41 x 34 x 16 cm com 4-5 animais por gaiola, enquanto os grupos estresse leve e controle foram alocados em grupos de 4-5 animais em gaiolas de 28 x 17 x 14 cm. Durante o protocolo de estresse crônico brando imprevisível os animais foram mantidos isolados em caixas de 28 x 17 x 14 cm. Todas as caixas tinham cepilho como forro. Água e ração estiveram disponíveis à vontade durante a maior parte do protocolo.

Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Universidade Federal do Paraná e foram submetidos ao Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (protocolo aprovado nº 1084).

3.2 MANIPULAÇÕES NA INFÂNCIA

3.2.1 Estresse predatório

A exposição por 21 dias, de forma intermitente, dia sim, dia não, a camundongos reprodutores experientes, porém já aposentados, levou animais mais jovens a apresentarem redução da secreção de corticosterona quando imobilizados em contensores, além de reduzir o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda

(BROCKHURST et al., 2015). Pela indisponibilidade de utilizar camundongos reprodutores, adaptamos o protocolo de estresse social de Brockhurst (2015) para um protocolo de estresse predatório, utilizado por outros autores (BURGADO et al., 2014; CALVO-TORRENT et al., 1999).

Os animais do grupo experimental foram expostos individualmente a ratos Wistar machos durante 15 minutos, separados por uma tela, em uma gaiola previamente ocupada apenas pelo rato (FIGURA 1). As exposições ocorreram toda segunda, quarta e sexta-feira por 28 dias, totalizando 12 exposições.



Figura 1. Exemplo de caixa onde ocorreram as exposições a estresse predatório.

3.2.2 Enriquecimento ambiental

Apesar de não existir consenso metodológico entre os laboratórios, o procedimento de enriquecimento mais comum envolve criar os animais em gaiolas espaçosas, com objetos novos e contato social. Este protocolo fornece os 3 aspectos chave do enriquecimento: novidade, contato social e exercício físico (CROFTON et al., 2015).

Os animais do grupo enriquecido foram agrupados em 5 e alojados em gaiolas maiores, de 41 x 34 x 16 cm, com tampas altas, por 28 dias. A caixa continha algodão, uma roda de atividade para camundongos e objetos de diversos tamanhos, formas e cores, incluindo tubos/abrigos, os quais foram rearranjados três vezes por semana para maximizar o componente de novidade (FIGURA 2).



Figura 2. Exemplo da caixa de enriquecimento ambiental.

3.3 ESTRESSE DE IMOBILIZAÇÃO

O estudo de Brockhurst et al. (2015) demonstrou que uma sessão de imobilização de 15 minutos foi suficiente para observar aumento na secreção de corticosterona significativamente menor nos animais submetidos à inoculação.

Os animais passaram por uma sessão de 15 minutos de imobilização em falcons de 50 ml perfurados para permitir a circulação de ar e foram decapitados 5 minutos após o fim da sessão para coleta de sangue para dosagem de corticosterona.

3.4 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

A dosagem de corticosterona foi feita em 1 ml de sangue coletado por decapitação após o estresse de imobilização e em amostras de fezes coletadas ao fim do protocolo de estresse na infância. As fezes foram coletadas das caixas-moradia onde os animais estavam agrupados 24 horas após a troca de caixas. A quantificação foi feita pelo método de ELISA utilizando anticorpos anti-corticosterona conjugados com a peroxidase HRP. O procedimento foi realizado pelo laboratório da Prof^a Rosana Nogueira de Moraes do Departamento de Fisiologia da UFPR. Os animais selecionados para dosagem do hormônio sérico foram retirados dos grupos estresse predatório leve, enriquecimento e controle, mas não passaram pelos testes comportamentais para evitar interferências dos aspectos estressantes dos testes. A decapitação foi feita 5 min após a sessão de imobilização. A coleta foi realizada durante a fase clara.

3.5 ESTRESSE CRÔNICO BRANDO E IMPREVISÍVEL

O estresse crônico brando e imprevisível (UCMS) desenvolvido por Willner et al (1987) é um modelo de depressão cuja principal característica é modelar a anedonia, medida pela redução da responsividade a recompensa pelo teste da preferência por sacarose. O protocolo consiste na administração de pequenos estressores em ordem imprevisível, para evitar habituação.

Neste trabalho, o UCMS foi utilizado para comparar os efeitos do enriquecimento e da exposição a estresse predatório leve na infância sobre o surgimento de comportamento tipo-depressivo durante estresse crônico. O procedimento realizado foi uma adaptação do protocolo utilizado por Casarotto e Andreatini (2007). Os estressores foram aplicados individualmente ou combinados, num total de 5 semanas.

Os estressores aplicados foram:

- Caixa com cepilho úmido por 8h
- Caixa sem cepilho por 8h
- Lâmina de água com 7 mm de profundidade por 1h
- Privação de água por 16 h
- Privação de água por 16h seguida de exposição a uma garrafa vazia por 2h
- Privação de ração por 16 h
- Privação de ração por 16h seguida de exposição a um pellet de ração por 1h
- Luz acesa à noite
- Luz apagada durante o dia
- Caixa com inclinação de 45° por 16 h
- Imobilização por 2h

3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.6.1 Preferência por sacarose

O teste de preferência por sacarose é de grande utilidade para observar anedonia em modelos animais de depressão baseados em estresse (EAGLE; MAZEI-ROBINSON, 2016). Roedores têm uma preferência natural por soluções e alimentos doces, a qual é reduzida durante protocolos de estresse crônico e revertida por tratamento crônico com antidepressivos (WILLNER et al., 1992).

Para o teste da preferência por sacarose, os animais foram inicialmente habituados com solução de sacarose 2%. A habituação ocorreu por 72h, sendo que nos dois primeiros dias os animais foram mantidos agrupados e tiveram acesso apenas à garrafa com solução de sacarose. No terceiro dia foram isolados e expostos a uma garrafa com água de torneira e outra com a solução. O teste consiste em apresentar aos animais uma garrafa com água e outra com solução de sacarose, previamente pesadas, por 24h. Após esse período as garrafas são novamente pesadas para avaliação do consumo. A preferência é expressa em porcentagem de solução de sacarose consumida em relação à ingestão total de líquido.

3.6.2 Campo aberto

O campo aberto consiste em uma arena grande na qual o rato ou camundongo pode explorar livremente. É usado tanto como medida geral de locomoção, como de exploração em um ambiente novo e de ansiedade. Roedores tipicamente passam menos tempo explorando a área central desprotegida em comparação com a periferia da arena (BAILEY; CRAWLEY, 2009), sendo que drogas ansiolíticas reduzem medidas de ansiedade observadas no teste como o tempo de exploração na periferia (Gogas et al., 2007).

Os animais foram colocados no centro de uma arena de plástico azul escuro redonda com 60 cm de diâmetro. O teste teve duração de 10 minutos. A análise dos dados foi feita com o software SMART 3.0 Panlab (Smart Junior), com o qual a arena foi subdividida manualmente em centro e periferia. Os parâmetros avaliados incluíram distância total, entradas na periferia e no centro, tempo e distância percorrida no centro

e na periferia, latência para deixar a área central e quantidade de bolos fecais produzidas durante o teste.

3.6.3 Suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda é um teste utilizado em camundongos para avaliar efeito de drogas antidepressivas e outras manipulações que podem afetar comportamento do tipo depressivo (CAN et al., 2011). Os animais são suspensos pela cauda, presos por uma fita a uma superfície de forma que não possam escapar ou se segurar em superfícies próximas. O teste consistiu em uma sessão de 6 minutos em que a latência para imobilidade, imobilidade total e a imobilidade nos últimos 4 minutos foi avaliada.

3.6.4 *Splash test*

O *splash test* é uma medida de comportamento tipo-depressivo e se baseia no comportamento natural de roedores iniciarem comportamento de *grooming* para manutenção da higiene (KALUEFF et al., 2016). Observa-se que animais submetidos a estresse crônico apresentam uma redução do autocuidado, medido subjetivamente pela avaliação do estado de limpeza do pelo em diferentes regiões do corpo (CULIG et al., 2017). Após espirrar uma solução concentrada de sacarose, os roedores naturalmente iniciam *grooming* para limpeza do pelo, sendo que o estresse crônico geralmente leva à diminuição da frequência de *grooming* (FRISBEE et al., 2015; SURGET et al., 2008) e antidepressivos levam a diminuição da latência para iniciar *grooming* e aumentam duração total de *grooming* (SANTARELLI et al., 2003). Sacarose é a solução de escolha por sua viscosidade e por não ser aversiva para o paladar.

Os animais foram isolados em caixas separadas e ambientaram ao espaço por no mínimo 1 hora. O teste consistiu em espirrar uma solução de sacarose 10% no dorso dos animais até que o pelo ficasse molhado e o comportamento foi gravado por 5 minutos. Foram avaliadas a latência para iniciar e duração total de *grooming*.

3.6.5 Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado tem o objetivo de medir comportamento tipo-ansioso em ratos e camundongos e é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos e altos. O teste é capaz de medir os efeitos tanto de agentes ansiolíticos como ansiogênicos (LISTER, 1987).

O labirinto é constituído por 2 braços fechados (30 x 5 x 15 cm) com o teto aberto e 2 braços abertos (30 x 5 cm) com borda de 0,5 cm, sendo que todo o aparato é elevado do chão a uma altura de 50 cm. Os dois principais índices de ansiedade são o número de entradas nos braços abertos, expresso como porcentagem do total de entradas nos braços, e tempo gasto no braço aberto, expresso como porcentagem do tempo passado nos braços abertos e fechados. Medidas etológicas também são coletadas, como frequência de avaliação de risco (esticar o corpo em direção ao braço aberto) e frequência de mergulho de cabeça (movimento feito com a cabeça para baixo dos braços aberto, em direção ao chão). Os animais foram colocados no centro da plataforma, voltados para o braço fechado e o tempo total de teste foi de 5 min.

3.6.7 Caixa claro/escuro

O teste da caixa claro/escuro é baseado no conflito apresentado por roedores noturnos entre o comportamento clássico de exploração de ambientes novos e sua aversão inata a espaços abertos e claros (BOURIN; HASCOËT, 2003). O teste foi inicialmente desenvolvido por Crawley e Goodwin (1980) como um modelo para avaliação do efeito ansiolítico de drogas, pela observação de que benzodiazepínicos facilitavam o comportamento exploratório em uma caixa com uma arena aberta e iluminada ocupando dois terços do espaço total e outra fechada e escura, ocupando o outro terço da caixa e separados por uma pequena abertura.

O aparato utilizado nestes experimentos consistiu em uma caixa de acrílico de tamanho 73 x 28 x 30 cm, sendo o comprimento da arena clara 58 cm e da arena escura 15 cm. A divisória entre as duas arenas possui uma pequena abertura de 4 x 4 cm. O animal foi inicialmente colocado na arena clara voltado para a parede onde se

encontrava a abertura. Os parâmetros avaliados foram: latência para passar da arena clara para a escura, número de trocas entre arenas, tempo gasto na arena clara, tempo gasto na arena escura e frequência de *rearing* na arena clara. O tempo total de teste foi de 5 minutos.

3.7 DESENHO EXPERIMENTAL

3.7.1. Experimento 1

Para avaliar os efeitos comportamentais do estresse predatório e do enriquecimento e verificar se essas manipulações levam a uma secreção diminuída de corticosterona após o estresse agudo por imobilização, os animais foram divididos em 3 grupos: estresse predatório leve, enriquecimento e controle.

Logo após o desmame, no DPN 21, o grupo estresse predatório foi exposto ao estressor no decorrer de 28 dias, como já detalhado anteriormente. Durante esse mesmo período, o grupo enriquecido foi exposto ao protocolo de enriquecimento. O grupo controle foi mantido sem manipulações exceto pelas trocas de caixas semanais.

Ao final dos 28 dias, foram coletadas fezes das caixas moradia um e dois dias após o fim dos protocolos. Na sexta-feira ocorreu a troca de caixas, a última exposição ao estresse e a última troca de objetos do enriquecimento. No sábado foram coletadas fezes de todas as caixas e os animais foram alocados em caixas limpas. No domingo, ocorreu nova coleta de fezes e troca de caixas.

Em seguida, os animais foram divididos, sendo metade de cada grupo para os testes comportamentais e outra metade para a avaliação de corticosterona plasmática pós-estresse agudo de imobilização. Assim, na semana após os 28 dias de manipulações na infância parte dos animais foram testados no *splash test*, campo aberto, teste de suspensão pela cauda (TST), caixa claro/escuro e labirinto em cruz elevado e parte passou pela imobilização e decapitação para coleta de sangue e futura dosagem de corticosterona. Durante a semana de testes comportamentais, os animais enriquecidos foram mantidos nas caixas com os objetos e a roda de atividade para evitar possíveis efeitos negativos da retirada do enriquecimento (SMITH et al., 2017). A Figura 3 esquematiza o desenho do experimento 1.

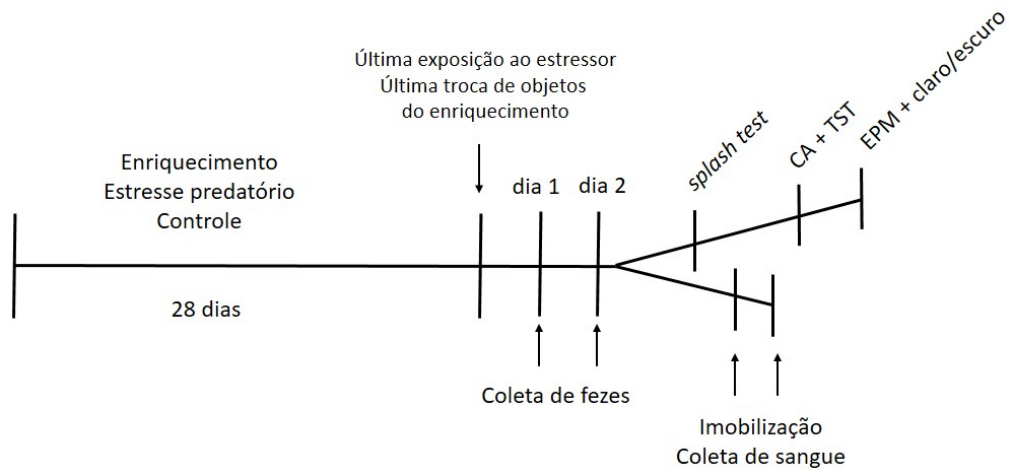


Figura 3. Efeitos do enriquecimento e estresse predatório sobre o comportamento e sobre a secreção de corticosterona pós estresse agudo de imobilização.

3.7.2. Experimento 2

Uma vez caracterizados os efeitos comportamentais do estresse predatório leve e do enriquecimento sobre um estresse agudo por imobilização, o efeito dessas mesmas manipulações sobre o estresse crônico brando e imprevisível foi avaliado.

No DPN 21 os animais foram novamente divididos nos 3 grupos experimentais: estresse predatório leve, enriquecimento e controle. Ao fim dos 28 dias, os animais foram isolados e tiveram a preferência por sacarose avaliada. Em seguida, cada grupo foi randomizado em dois subgrupos: UCMS e controle não estressado. No dia seguinte à realização da preferência por sacarose, o protocolo de UCMS teve início. Todos os animais tiveram sua preferência por sacarose avaliada semanalmente e ao fim de 5 semanas foram submetidos aos testes comportamentais (FIGURA 4).

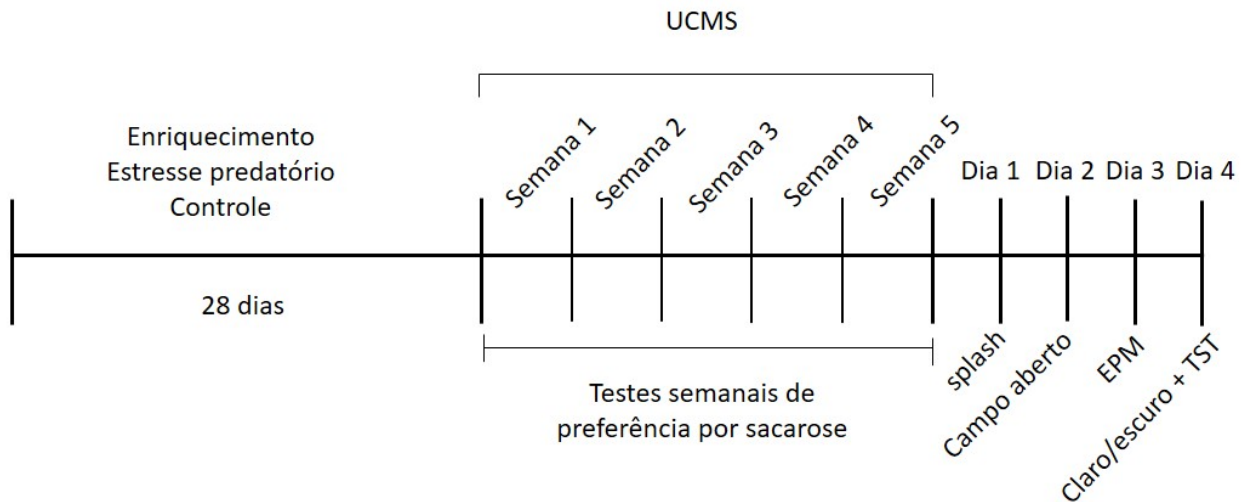


Figura 4. Efeitos do estresse predatório e enriquecimento sobre a resiliência a modelo de depressão.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados do primeiro experimento foi feita por ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de Newman-Keuls e pelo teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. No segundo experimento as análises foram feitas por ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Newman-Keuls ou de ANOVA de medidas repetidas seguida do *post hoc* LSD de Fisher. O *post hoc* LSD de Fisher foi utilizado devido ao grande número de comparações que não são de interesse na ANOVA de medidas repetidas para o teste de preferência por sacarose.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1 Campo aberto

Na bateria de testes comportamentais realizada logo ao fim dos 28 dias de estresse predatório e enriquecimento ambiental foi observado um aumento significativo na distância total percorrida pelo grupo estresse ($F_{(2,26)}=7,74$; $p=0,0023$), bem como na distância percorrida na periferia ($F_{(2,26)}=8,03$; $p=0,0019$) (FIGURA 5A e 5B). Não houve

diferença entre os grupos quanto a distância no centro ($F_{(2,26)}=2,61$; $p=0,093$) ou tempo no centro ($F_{(2,26)}=1,23$; $p=0,31$) (FIGURA 5C e 5D). Também não houve diferença significativa para a quantidade de bolos fecais produzidos durante 10 minutos de teste ($H_{(2,29)}=4,72$; $p=0,09$) (FIGURA 5E).

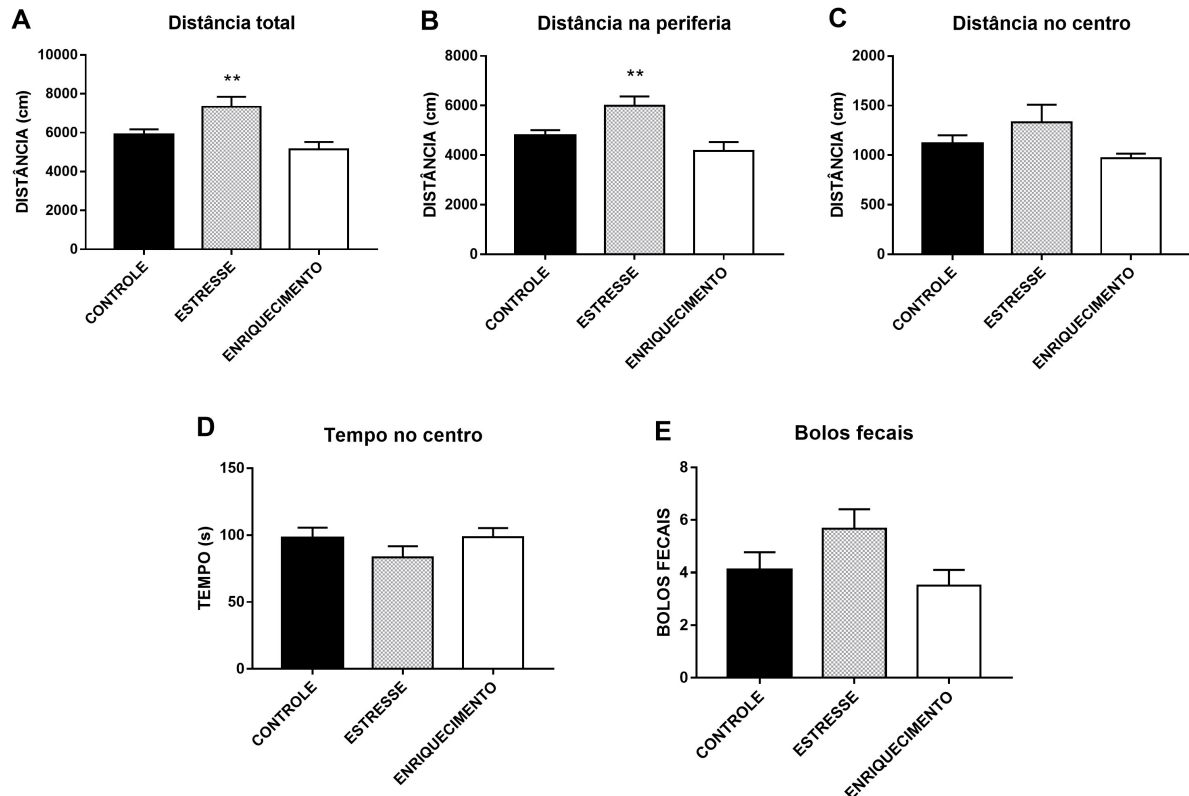


Figura 5. Efeito do estresse predatório e enriquecimento ambiental na infância sobre distância total percorrida no teste de campo aberto (A), distância percorrida na periferia (B), distância percorrida no centro (C), tempo passado no centro (D) e quantidade de bolos fecais após 10 minutos de teste (E). As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados dos gráficos A, B C e D foram analisados por ANOVA de uma via seguida do post hoc de Newman-Keuls. Dados do gráfico E foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. ** $p \leq 0,01$ em comparação com ambos os grupos. $n(\text{controle})=10$; $n(\text{estresse})=9$; $n(\text{enriquecimento})=10$.

4.1.2 Suspensão pela cauda

No teste de suspensão pela cauda não foi observada diferença para latência para imobilidade ($F_{(2,26)}=0,95$; $p=0,40$), imobilidade nos seis minutos totais de teste ($F_{(2,26)}=0,76$; $p=0,48$), nem para imobilidade nos últimos 4 minutos de teste ($F_{(2,26)}=0,60$; $p=0,55$) (FIGURA 6).

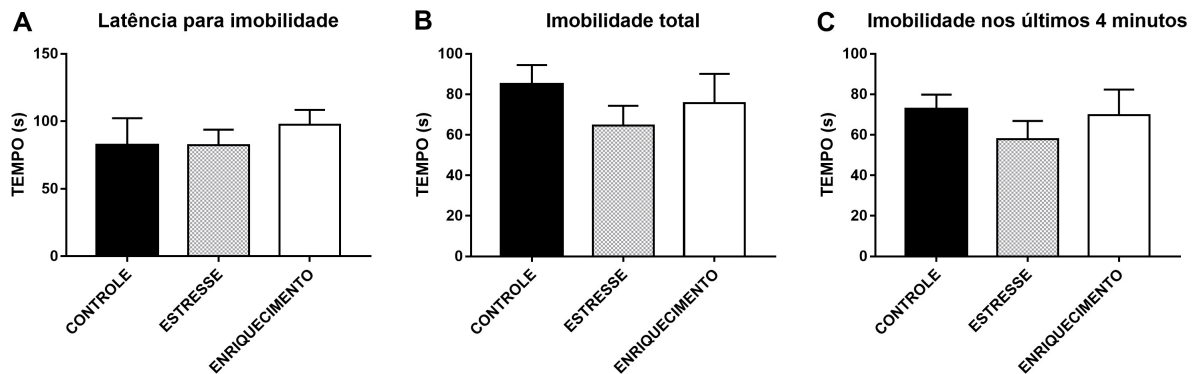


Figura 6. Efeito do estresse predatório e enriquecimento na infância sobre latência para imobilidade (A), imobilidade total (B) e imobilidade nos últimos 4 minutos do teste de suspensão pela cauda (C). As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. $n(\text{controle})=10$; $n(\text{stress})=9$; $n(\text{enriquecimento})=10$.

4.1.3 *Splash test*

Similarmente, no *splash test* não foi encontrada diferença significativa entre os grupos para latência para *grooming* ($F_{(2,26)}=1,46$; $p=0,25$) ou para duração de *grooming* ($F_{(2,26)}=0,49$; $p=0,62$) (FIGURA 7).

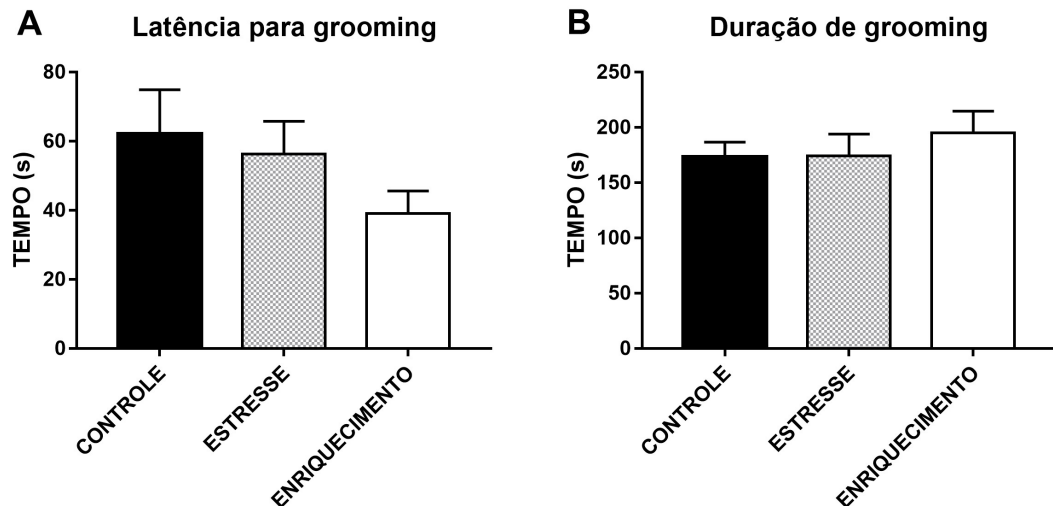


Figura 7. Efeito do estresse predatório e enriquecimento na infância sobre latência para início de comportamento de *grooming* (A) e duração total de *grooming* (B) no *splash test*. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. $n(\text{controle})=10$; $n(\text{estresse})=9$; $n(\text{enriquecimento})=10$.

4.1.4 Labirinto em cruz elevado

No labirinto em cruz elevado, foi detectada uma tendência para diminuição da

porcentagem de tempo passada no braço aberto para os animais do enriquecimento ($F_{(2,25)}=3,27$; $p=0,055$) (FIGURA 8A). O *post hoc* de Newman-Keuls detectou uma diferença significativa entre os grupos controle e enriquecimento ($p=0,04$). Também houve diminuição significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos realizadas pelo grupo enriquecimento ($F_{(2,25)}=3,73$; $p=0,04$) (FIGURA 8B). Essa diferença foi observada tanto em comparação com o grupo estresse ($p=0,05$) como com o grupo controle ($p=0,04$). Não houve diferença quanto ao comportamento de avaliação de risco ($H_{(2,28)}=0,83$; $p=0,67$) (FIGURA 8C), mas o grupo enriquecimento realizou significativamente menos mergulhos de cabeça no braço aberto ($H_{(2,28)}=8,99$; $p=0,01$) (FIGURA 8D).

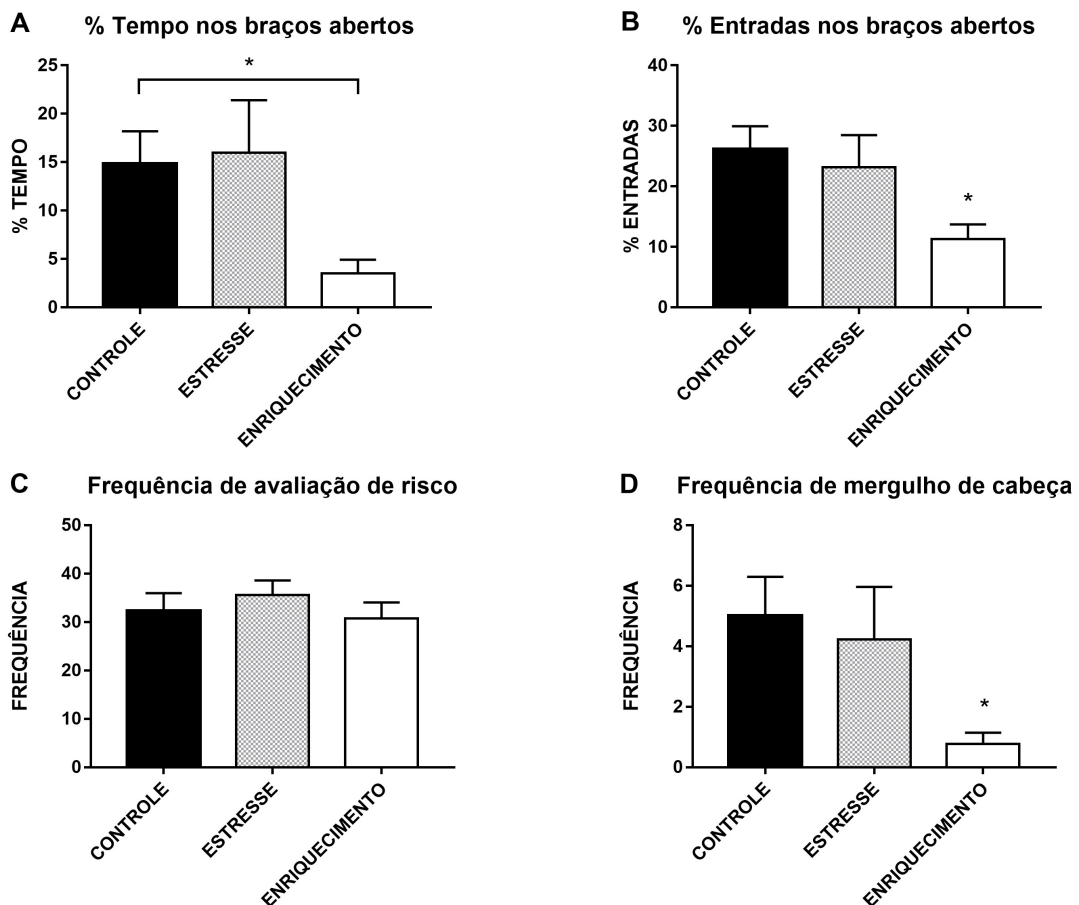


Figura 8. Efeito do estresse predatório e enriquecimento na infância sobre a porcentagem de tempo nos braços abertos sobre a soma do tempo nos braços abertos e fechados (A), porcentagem de entradas nos braços abertos sobre total de entradas (B), frequência de avaliação de risco (C) e frequência de mergulho de cabeça (D). As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados dos gráficos A e B foram analisados por ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. Dados dos gráficos C e D analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. * $p \leq 0,05$ em comparação com

ambos os grupos onde não indicado. n(controle)=10; n(estresse)=9; n(enriquecimento)=10.

4.1.5 Caixa claro/escuro

Na caixa claro/escuro não foi observada diferença entre os grupos para tempo no claro ($F_{(2,26)}=2,33$; $p=0,12$) e latência para passar da arena clara para a arena escura ($F_{(2,26)}=0,93$; $p=0,41$) (FIGURA 9A e 9B). O número de trocas entre arenas foi significativamente menor para o grupo enriquecimento ($F_{(2,26)}=7,97$; $p=0,002$), tanto em comparação com o grupo estresse ($p=0,001$) como com o grupo controle ($p=0,02$) (FIGURA 9C).

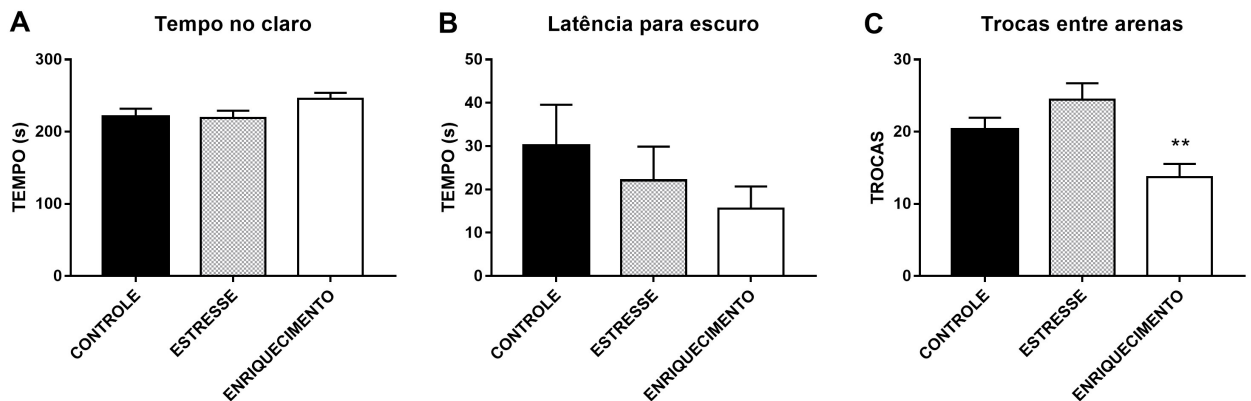


Figura 9. Efeito do estresse predatório e enriquecimento na infância sobre tempo na arena clara da caixa claro/escuro (A), latência para passar para arena escura (B) e número de trocas entre arenas (C). As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. ** $p \leq 0,01$ em comparação com ambos os grupos. n(controle)=10; n(estresse)=9; n(enriquecimento)=10.

4.1.6 Corticosterona

Não houve diferença entre os grupos nos níveis de corticosterona sérica 5 minutos após o estresse agudo de 15 minutos de imobilização ($F_{(2,27)}=2,20$; $p=0,13$) (FIGURA 10A).

Quanto aos níveis basais de corticosterona dosada nas fezes um e dois dias após o último dia de estresse predatório e trocas de objeto do enriquecimento, não houve efeito do fator dia ($F_{(1,9)}=0,56$; $p=0,47$), nem do fator grupo ($F_{(2,9)}=3,78$; $p=0,06$), mas houve interação entre os dois fatores ($F_{(2,9)}=5,27$; $p=0,03$) (FIGURA 10B). A

corticosterona fecal do grupo enriquecimento no dia 2 foi significativamente diferente tanto do grupo controle ($p=0,03$) como do grupo estresse ($p=0,03$) no dia 2. Além disso, houve uma tendência para o aumento da corticosterona do grupo enriquecimento no dia 2 em comparação com os níveis do dia 1 ($p=0,053$).

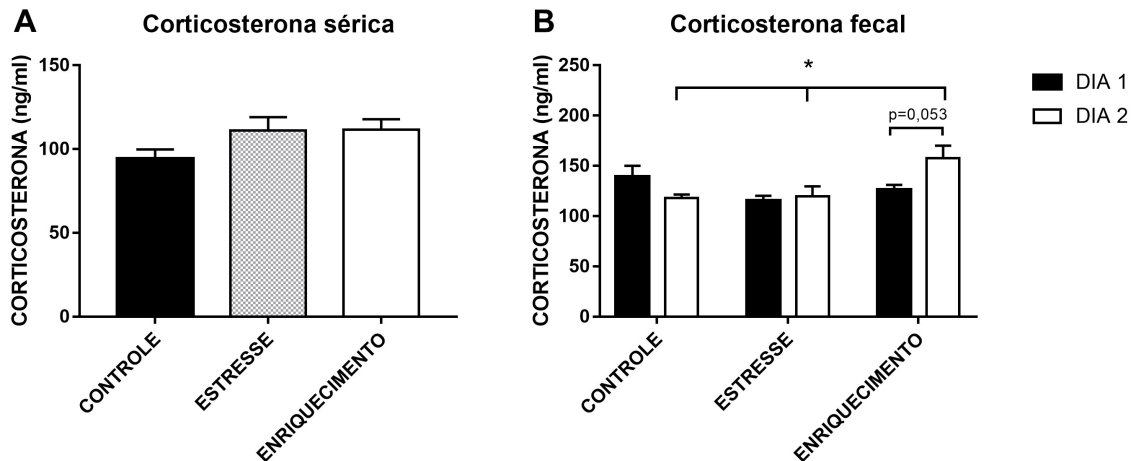


Figura 10. Corticosterona sérica 5 minutos após o fim do estresse agudo de imobilização (A) e corticosterona fecal um e dois dias após o último dia de estresse predatório e troca de objetos do enriquecimento (B). As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Dados do gráfico A analisados por ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. Dados do gráfico B analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. * $p \leq 0,05$ em comparação com ambos os grupos no dia 2. $n(\text{cortico sérica})=10/\text{grupo}$; $n(\text{cortico fecal})=4/\text{grupo}$.

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1 Preferência por sacarose

Houve um efeito do fator infância para a preferência por sacarose durante o protocolo de UCMS ($F_{(2,42)}=4,37$; $p=0,02$), do fator semana ($F_{(5,210)}=7,52$; $p \leq 0,001$) e uma tendência para interação entre os fatores semana e UCMS ($F_{(5,210)}=2,22$; $p=0,053$) (FIGURA 11), mas não foi detectado efeito do fator UCMS ($F_{(1,42)}=2,76$; $p=0,10$), interação entre infância e UCMS ($F_{(2,42)}=0,21$; $p=0,81$), interação entre os fatores semana e infância ($F_{(10,210)}=0,64$; $p=0,78$) nem interação entre os três fatores ($F_{(10,210)}=0,66$; $p=0,76$).

Não houve diferença significativa entre as preferências basais dos três grupos ($F_{(2,48)}=1,07$, $p=0,35$), indicando que as manipulações na infância não alteraram a

preferência por sacarose antes do início do UCMS.

Na primeira semana, o grupo controle submetido ao UCMS teve sua preferência significativamente reduzida em comparação com o seu basal ($p \leq 0,001$), assim como o grupo estresse ($p=0,04$) e enriquecimento ($p=0,009$) (FIGURA 11). Na semana 3, o grupo controle-UCMS teve queda significativa na preferência em comparação com o basal ($p=0,01$), mas o mesmo não ocorreu para o grupo estresse-UCMS ($p=0,11$). Para o grupo enriquecimento-UCMS, houve tendência para a redução da preferência na semana 3, mas a diferença não foi significativa ($p=0,06$). Na semana 5, apenas o grupo controle-UCMS teve redução significativa da preferência em comparação com o basal ($p=0,02$), enquanto o grupo estresse-UCMS manteve a preferência similar ao basal ($p=0,25$), bem como o grupo enriquecimento-UCMS ($p=0,39$).

O grupo controle-controle apresentou queda da preferência por sacarose na semana 1 ($p=0,03$), efeito não observado nos grupos estresse-controle ($p=0,97$) e enriquecimento-controle ($p=0,46$). Em todas as outras medidas, os grupos controles mantiveram suas preferências próximas ao nível basal. Adicionalmente, na semana 5 o grupo controle-UCMS apresentou preferência significativamente diferente do grupo controle-controle ($p=0,002$), efeito não observado para os grupos estresse ($p=0,58$) e enriquecimento ($p=0,71$).

Para as semanas 2 e 4, nenhum dos grupos teve preferência significativamente diferente do basal.

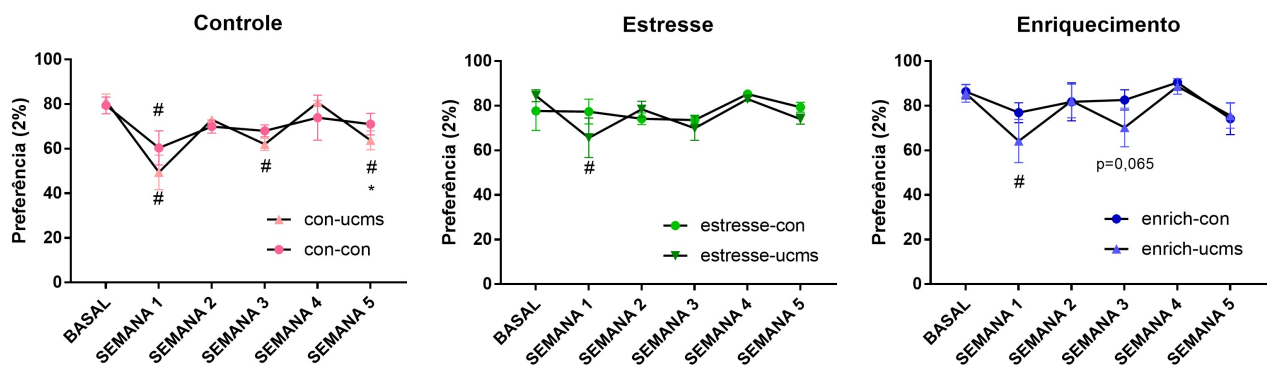


Figura 11. Efeitos do protocolo de UCMS sobre a preferência por sacarose dos grupos controle (A), estresse (B) e enriquecimento (C). As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Dados analisado por ANOVA de medidas repetidas seguida do *post hoc* de Fisher LSD. O símbolo “#” indica diferença significativa em comparação com o basal do próprio grupo, enquanto “*” indica diferença significativa com o controle na mesma semana. * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$. n(con-con)=8; n(con-ucms)=10; n(estresse-con)=7; n(estresse-ucms)=7; n(enriq-con)=9; n(enriq-ucms)=9.

4.2.2 Peso

Houve um efeito da infância ($F_{(2,44)}=6,62$; $p=0,003$) e do UCMS ($F_{(1,44)}=12,33$; $p=0,001$) sobre o ganho de peso durante o protocolo de UCMS (FIGURA 12). Não houve interação entre os fatores ($F_{(2,44)}=2,57$; $p=0,09$). O *post hoc* detectou uma diferença significativa entre o grupo controle-UCMS e estresse-controle ($p=0,005$) e estresse-UCMS ($p=0,007$), bem como entre o grupo enriquecimento-UCMS e estresse-controle ($p=0,002$) e estresse-UCMS ($p=0,005$). Além disso, houve diferença significativa entre o grupo do enriquecimento submetido ao UCMS e o seu controle ($p=0,005$).

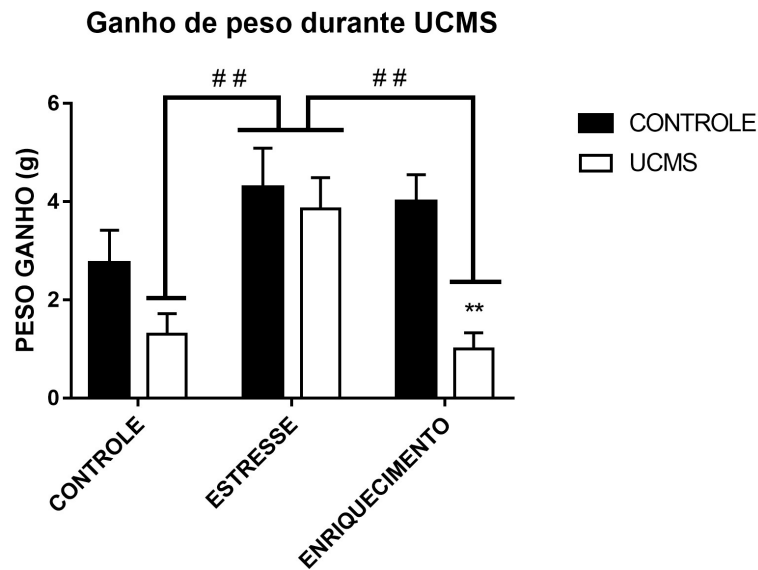


Figura 12. Ganho de peso durante o protocolo de UCMS. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. ** $p \leq 0,01$ em comparação com grupo enriquecimento-controle; ## $p \leq 0,01$. $n(\text{con-con})=8$; $n(\text{con-ucms})=10$; $n(\text{estresse-con})=7$; $n(\text{estresse-ucms})=7$; $n(\text{enriq-con})=9$; $n(\text{enriq-ucms})=9$.

A ANOVA de medidas repetidas detectou um efeito do fator infância ($F_{(2,44)}=4,34$; $p=0,02$) sobre o peso dos animais, provavelmente devido ao baixo peso dos dois grupos estresse na semana 2 (FIGURA 13). Nesta semana, o grupo estresse-controle apresentou peso estatisticamente diferente dos grupos controle-controle ($p=0,01$) e enriquecimento-controle ($p=0,005$) bem como o grupo estresse-UCMS dos grupos

controle-UCMS ($p=0,003$) e enriquecimento-UCMS ($p=0,001$). No entanto, na semana 4 não houve diferença estatística entre estresse-controle e controle-controle ($p=0,37$) e enriquecimento-controle ($p=0,68$) nem entre estresse-UCMS e controle-UCMS ($p=0,44$) e enriquecimento-UCMS ($p=0,36$).

Não foi detectado efeito do UCMS ($F_{(1,44)}=0,85$; $p=0,36$) nem interação entre os fatores infância e UCMS ($F_{(2,44)}=2,57$; $p=0,09$). Houve um efeito do fator semana ($F_{(4,176)}=1296,75$; $p\leq 0,0001$) e interação entre os fatores semana e infância ($F_{(8,176)}=9,124$; $p\leq 0,0001$). Não houve interação entre os fatores semana e UCMS ($F_{(4,176)}=1,61$; $p=0,17$) nem entre os fatores semana, infância e UCMS ($F_{(8,176)}=1,06$; $p=0,39$).

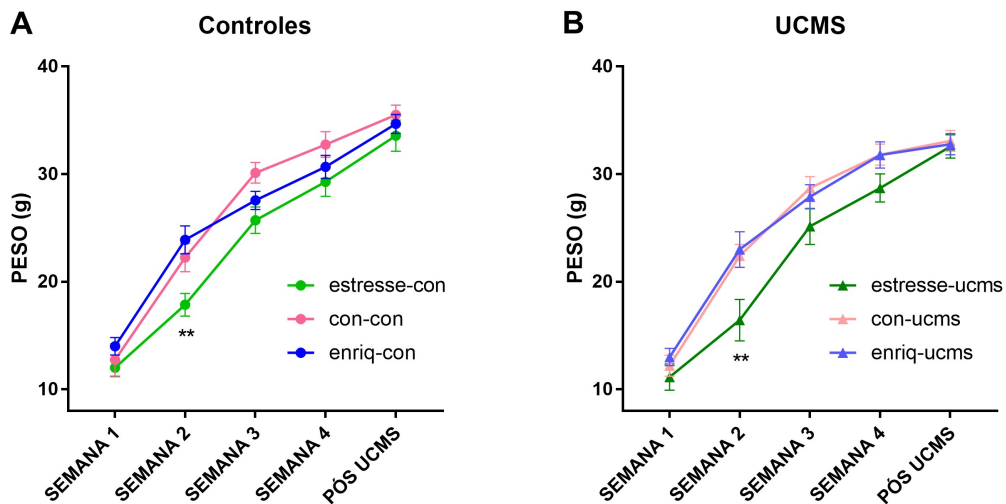


Figura 13. Pesos dos animais dos grupos controle (A) e UCMS (B) durante as 4 semanas de estresse predatório e enriquecimento a após o protocolo de UCMS. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Dados analisado por ANOVA de medidas repetidas seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. $**p\leq 0,01$ em comparação com ambos os grupos na mesma semana. $n(\text{con-con})=8$; $n(\text{con-ucms})=10$; $n(\text{estresse-con})=7$; $n(\text{estresse-ucms})=7$; $n(\text{enriq-con})=9$; $n(\text{enriq-ucms})=9$.

4.2.3 Campo aberto

No campo aberto realizado após o protocolo de UCMS, não houve efeito da infância ($F_{(2,44)}=2,18$; $p=0,12$), do UCMS ($F_{(1,44)}=2,97$; $p=0,09$) nem interação entre os fatores ($F_{(2,44)}=1,31$; $p=0,28$) para a distância total percorrida entre os grupos (FIGURA 14A). Foi encontrado um efeito significativo do UCMS para a distância percorrida na periferia ($F_{(1,44)}=4,35$; $p=0,04$), mas sem efeito da infância ($F_{(2,44)}=1,93$; $p=0,16$) ou

interação entre os fatores ($F_{(2,44)}=1,58$; $p=0,22$) (FIGURA 14B). Para distância percorrida no centro não houve efeito da infância ($F_{(2,44)}=1,37$; $p=0,26$), do UCMS ($F_{(1,44)}=0,04$; $p=0,84$) ou interação entre fatores ($F_{(2,44)}=0,18$; $p=0,83$) (FIGURA 14C). Já para o tempo passado no centro houve efeito do UCMS ($F_{(1,44)}=7,94$; $p=0,007$), mas sem efeito da infância ($F_{(2,44)}=1,18$; $p=0,32$) nem interação ($F_{(2,44)}=0,37$; $p=0,69$) (FIGURA 14E). Houve diferença significativa na latência para sair do centro e entrar na periferia, com um efeito significativo do fator UCMS ($F_{(1,44)}=14,98$; $p\leq 0,001$), mas sem efeito da infância ($F_{(2,44)}=1,01$; $p=0,37$) ou interação ($F_{(2,44)}=1,00$; $p=0,37$) (FIGURA 14D). O *post hoc* detectou diferença significativa apenas entre os grupos controle-controle e controle-UCMS ($p=0,03$), não havendo diferença no grupo estresse, provavelmente pela grande variabilidade no grupo controle evidenciada pelo tamanho da barra de erro, nem no grupo enriquecimento, por uma tendência para o grupo controle apresentar latência mais baixa.

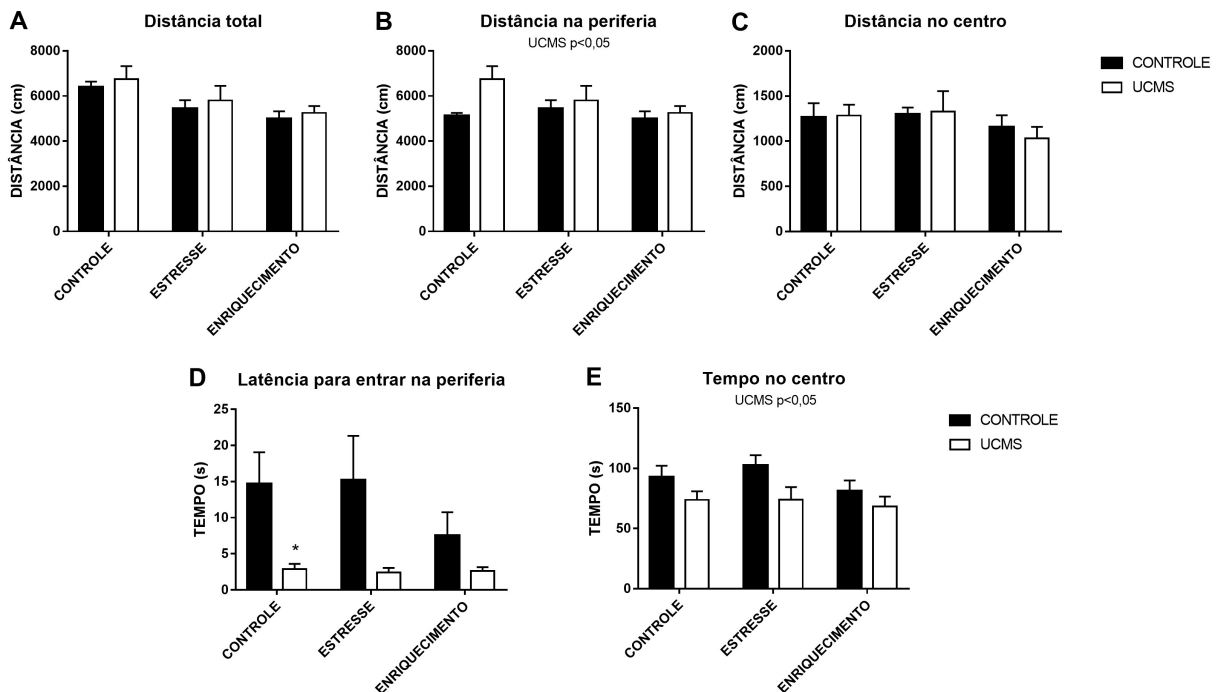


Figura 14. Efeitos do protocolo de UCMS sobre a distância total percorrida (A), distância percorrida na periferia (B), distância percorrida no centro (C), latência para passar do centro para a periferia (D) e tempo passado no centro (E) no teste de campo aberto. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. * $p\leq 0,05$ em comparação com grupo controle-controle. $n(\text{con-con})=8$; $n(\text{con-ucms})=10$; $n(\text{estresse-con})=7$; $n(\text{estresse-ucms})=7$; $n(\text{enriq-con})=9$; $n(\text{enriq-ucms})=9$.

4.2.4 Suspensão pela cauda

No teste de suspensão pela cauda não houve efeito da infância ($F_{(2,44)}=0,46$; $p=0,64$), do UCMS ($F_{(1,44)}=1,89$; $p=0,17$), nem interação entre os fatores ($F_{(2,44)}=0,48$; $p=0,62$) para a latência para imobilidade (FIGURA 15A). Também não foi observado efeito da infância ($F_{(2,44)}=1,31$; $p=0,28$), do UCMS ($F_{(1,44)}=0,21$; $p=0,64$) ou interação entre os fatores ($F_{(2,44)}=0,003$; $p=0,99$) para imobilidade total (FIGURA 15B) nem efeito da infância ($F_{(2,44)}=1,31$; $p=0,28$), do UCMS ($F_{(1,44)}=0,38$; $p=0,54$) ou interação entre os fatores ($F_{(2,44)}=0,05$; $p=0,95$) para imobilidade nos últimos 4 minutos (FIGURA 15C).

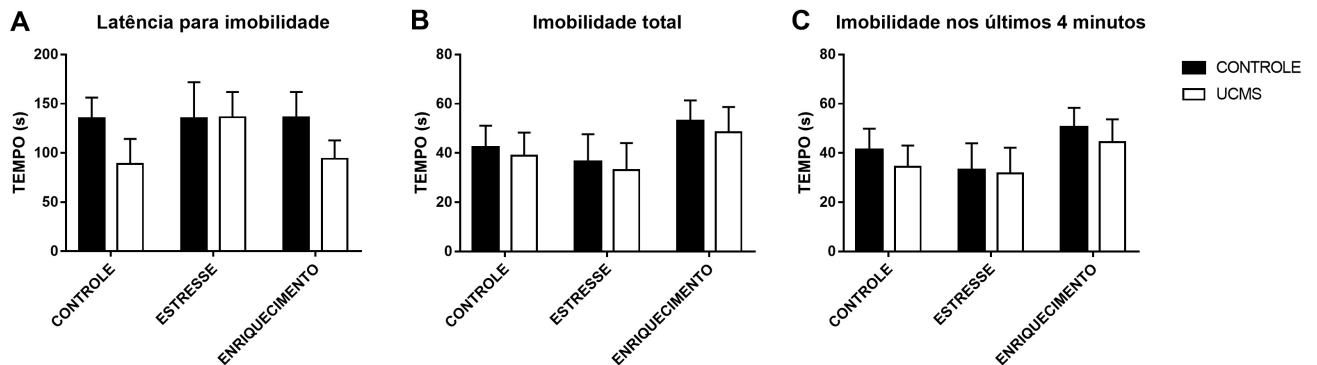


Figura 15. Efeitos do protocolo de UCMS sobre a latência para imobilidade (A), imobilidade total (B) e imobilidade nos últimos 4 minutos (C) do teste de suspensão pela cauda. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. $n(\text{con-con})=8$; $n(\text{con-ucms})=10$; $n(\text{estresse-con})=7$; $n(\text{estresse-ucms})=7$; $n(\text{enriq-con})=9$; $n(\text{enriq-ucms})=9$.

4.2.5 Splash test

No *splash test* foi detectado um efeito do UCMS tanto para latência ($F_{(1,44)}=5,11$; $p=0,03$) (FIGURA 16A) como para duração de *grooming* ($F_{(1,44)}=8,02$; $p=0,007$) (FIGURA 16B). Não foi observado efeito da infância para latência ($F_{(2,44)}=0,44$; $p=0,65$) nem para duração de *grooming* ($F_{(2,44)}=2,20$; $p=0,12$). Também não houve interação entre os fatores para latência ($F_{(2,44)}=0,04$; $p=0,96$) ou duração ($F_{(2,44)}=0,77$; $p=0,47$).

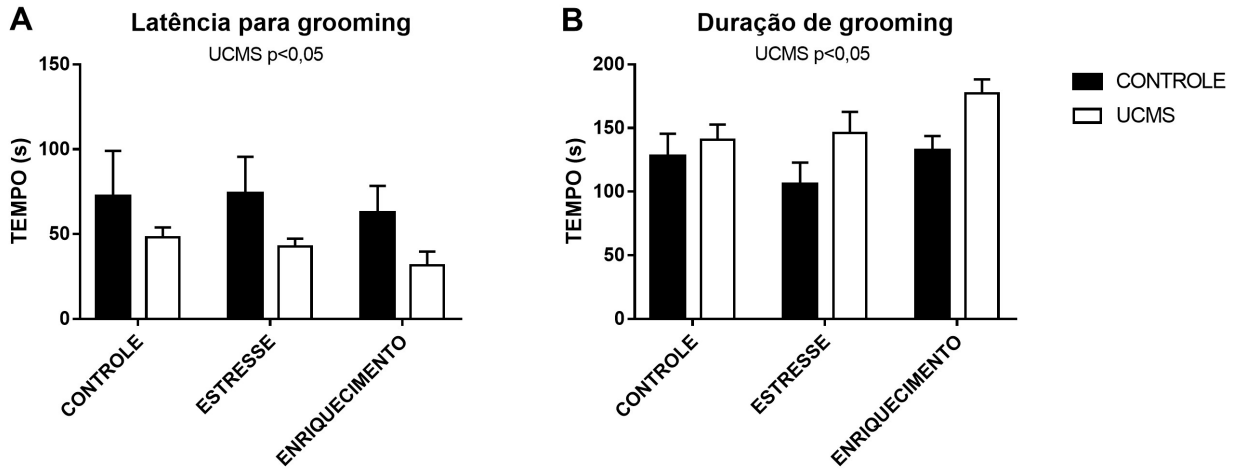


Figura 16. Efeitos do protocolo de UCMS sobre a latência para início de comportamento de *grooming* (A) e duração total de *grooming* (B) no *splash test*. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. $n(\text{con-con})=8$; $n(\text{con-ucms})=10$; $n(\text{estresse-con})=7$; $n(\text{estresse-ucms})=7$; $n(\text{enriq-con})=9$; $n(\text{enriq-ucms})=9$.

4.2.6 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado detectou um efeito do fator infância na porcentagem de tempo no braço aberto ($F_{(2,43)}=4,97$; $p=0,01$) (FIGURA 17A), na porcentagem de entradas no braço aberto ($F_{(2,43)}=4,74$; $p=0,01$) (FIGURA 17B), na frequência de avaliação de risco ($F_{(2,43)}=3,20$; $p=0,05$) (FIGURA 17C) e ainda uma tendência para efeito na frequência de mergulho de cabeça ($F_{(2,43)}=2,88$; $p=0,067$) (FIGURA 17D). Houve efeito significativo do UCMS na frequência de mergulho de cabeça ($F_{(1,43)}=4,10$; $p=0,05$), mas não na porcentagem de tempo no braço aberto ($F_{(1,43)}=0,21$; $p=0,65$), na porcentagem de entradas no braço aberto ($F_{(1,43)}=0,08$; $p=0,78$) nem na frequência de avaliação de risco ($F_{(1,43)}=2,35$; $p=0,1$). Não houve interação entre os fatores para porcentagem de tempo no braço aberto ($F_{(2,43)}=0,74$; $p=0,93$), porcentagem de entradas no braço aberto ($F_{(2,43)}=0,48$; $p=0,62$), frequência de avaliação de risco ($F_{(2,43)}=0,06$; $p=0,93$) ou frequência de mergulho de cabeça ($F_{(2,43)}=0,02$; $p=0,98$).

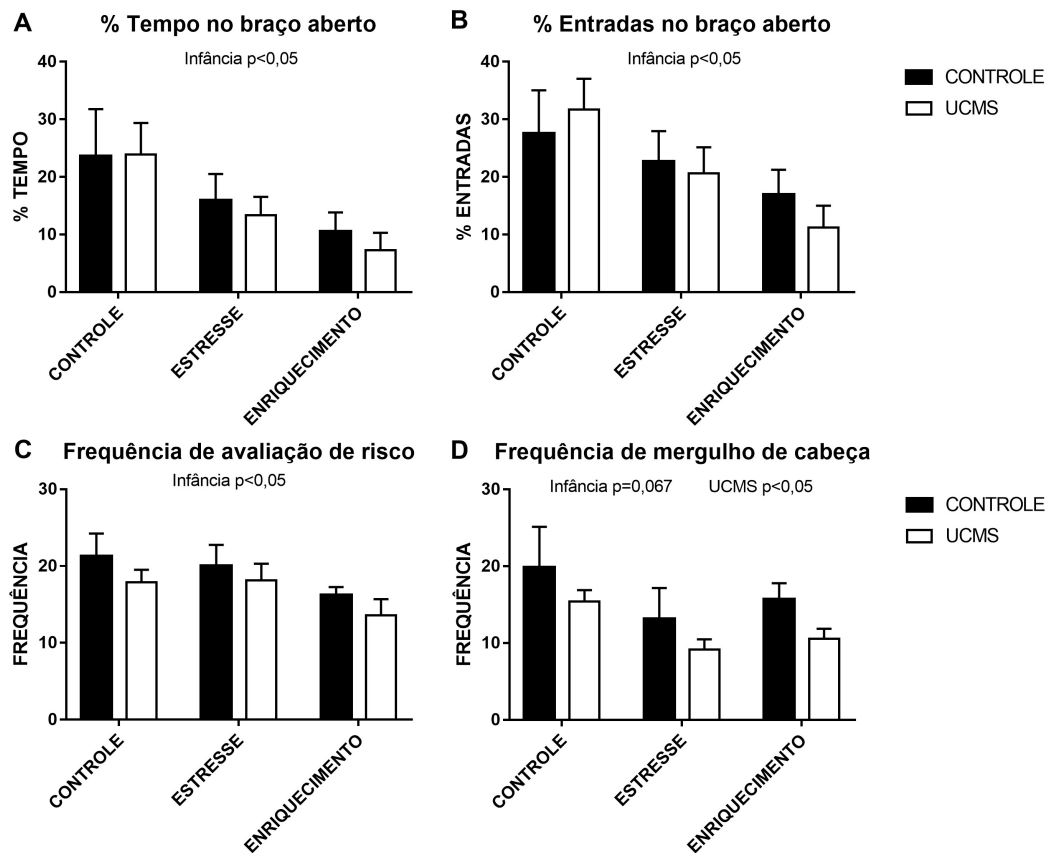


Figura 17. Efeitos do protocolo de UCMS sobre a porcentagem de tempo nos braços abertos sobre a soma do tempo nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado (A), porcentagem de entradas nos braços abertos sobre total de entradas (B), frequência de avaliação de risco (C) e frequência de mergulho de cabeça (D). As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. $n(\text{con-con})=7$; $n(\text{con-ucms})=10$; $n(\text{estresse-con})=7$; $n(\text{estresse-ucms})=7$; $n(\text{enriq-con})=9$; $n(\text{enriq-ucms})=9$. $n(\text{controle})=10$; $n(\text{stress})=9$; $n(\text{enriquecimento})=10$.

4.2.7 Caixa claro/escuro

No teste da caixa claro escuro houve efeito da infância ($F_{(2,44)}=3,23$; $p=0,05$) e do UCMS ($F_{(1,44)}=4,08$; $p=0,05$), sobre o tempo passado no claro (FIGURA 18A), mas não houve interação entre os fatores ($F_{(2,44)}=1,52$; $p=0,23$). Não houve diferença significativa na latência para passar da arena clara para a escura para o fator infância ($F_{(2,44)}=1,40$; $p=0,25$), UCMS ($F_{(1,44)}=0,63$; $p=0,43$), nem interação ($F_{(2,44)}=2,17$; $p=0,13$) (FIGURA 18B). Adicionalmente, ao contrário do experimento 1, não houve efeito da infância ($F_{(1,44)}=1,21$; $p=0,31$) no número de trocas entre arenas, também havendo ausência de efeito do fator UCMS ($F_{(2,44)}=0,05$; $p=0,83$) e interação entre os fatores ($F_{(2,44)}=1,45$;

$p=0,25$) (FIGURA 18C).

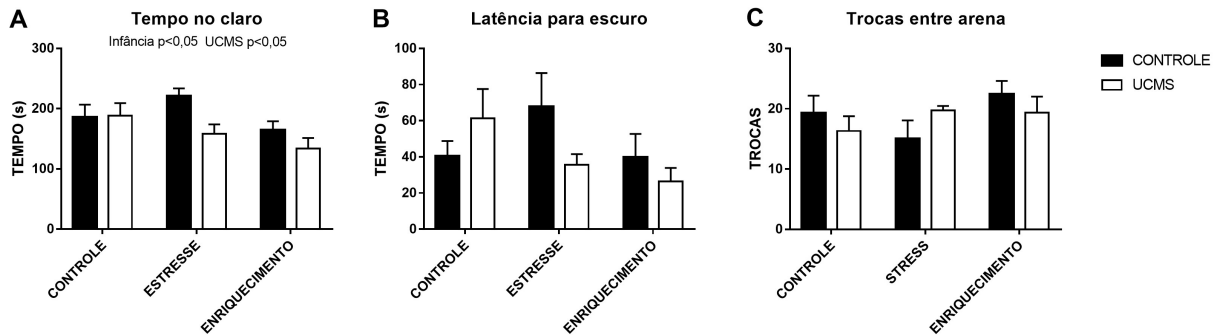


Figura 18. Efeitos do protocolo de UCMS sobre o tempo gasto na arena clara da caixa (A), latência para passar para arena escura (B) e número de trocas entre arenas (C) no teste da caixa claro escuro. As barras representam as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Newman-Keuls. $n(\text{con-con})=8$; $n(\text{con-ucms})=10$; $n(\text{estresse-con})=7$; $n(\text{estresse-ucms})=7$; $n(\text{enriq-con})=9$; $n(\text{enriq-ucms})=9$.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos do enriquecimento ambiental e de um estresse leve na infância sobre medidas comportamentais antes e após um protocolo de estresse crônico e sobre a secreção de corticosterona após um estresse agudo. A nossa hipótese foi que o enriquecimento age como um inoculador de estresse, preparando os animais para lidar com estresses mais intensos no futuro.

O presente estudo mostrou que o estresse predatório e o enriquecimento ambiental realizados na infância foram capazes de proteger contra a queda da preferência por sacarose em decorrência do estresse crônico brando e imprevisível. Nas três semanas do protocolo em que houve redução da preferência por sacarose no grupo controle-UCMS houve redução dos outros dois grupos em apenas uma delas, sugerindo que o estresse predatório e o enriquecimento são capazes de proteger contra os efeitos do UCMS até um certo ponto. Aparentemente, a primeira semana do protocolo foi a mais intensa. Porém, observamos também que na primeira semana de estresse a redução da preferência foi significativa inclusive no grupo controle não submetido ao UCMS, o que não era esperado. É possível que os animais tenham sido expostos a eventos estressantes fora do controle do experimentador. Em concordância com essa suposição, a redução ocorreu apenas no grupo controle-controle e não afetou os grupos estresse-controle e enriquecimento-controle, indicando que os animais

desses dois grupos estavam protegidos contra o fator desconhecido que levou à redução da preferência no grupo controle. Também observamos uma recuperação espontânea em todos os grupos nas semanas 2 e 4, que, apesar de não ser esperado, está de acordo com o estudo de Pothion et al. (2004), que observou ausência de diferença na preferência por sacarose entre os grupos controle e UCMS em algumas semanas para algumas linhagens de camundongos.

Vários estudos que utilizam o estresse crônico brando e imprevisível observam redução de peso ou de ganho de peso nos animais estressados (DEVALLANCE et al., 2017; LI et al., 2017; LIN et al., 2016; POTHION et al., 2004; ZHU et al., 2014). Em conformidade com esses estudos, observamos menor ganho de peso nos grupos controle e enriquecimento submetidos ao UCMS. No entanto, o grupo estresse submetido ao UCMS ganhou mais peso durante o protocolo em comparação com o grupo controle e enriquecimento e, além disso, não foi diferente do ganho de peso dos grupos controles, sugerindo que o estresse predatório preveniu contra o efeito do estresse crônico sobre o peso corporal. Os pesos dos grupos não foram estatisticamente diferentes na semana 4, logo antes do início do UCMS, mas apesar disso o peso do grupo estresse era um pouco menor, o que pode ser um viés para o ganho de peso neste grupo ter sido maior durante o UCMS. Assim, existem duas possibilidades: 1) os animais do grupo enriquecimento e controle já estavam com o peso mais estável, já tendo se aproximado de um platô de ganho de peso, evidenciado pela pequena diferença de peso dos animais antes do início do UCMS (grupo estresse com menor peso); 2) o estresse predatório realmente protegeu contra a diminuição de ganho de peso causada pelo estresse crônico, considerando que o grupo enriquecimento-controle ganhou uma quantidade significativa de peso, prevenida pelo UCMS e que o grupo estresse-controle não ganhou mais peso do que o grupo estresse-UCMS, o que seria observado caso o UCMS estivesse evitando o aumento de peso nesse grupo. Dessa forma, é possível que o estresse realmente tenha um efeito mais pronunciado de proteção sobre a redução do ganho de peso do que o enriquecimento.

Apesar do enriquecimento ter protegido contra a redução na preferência por sacarose, observamos um efeito ansiogênico dessa manipulação. Após os 28 dias de protocolo na infância, o grupo enriquecimento teve uma menor porcentagem de tempo

e de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, menor frequência de mergulho de cabeça bem como menor número de trocas entre arenas na caixa claro/escuro. Um número aumentado de trocas entre arenas está associado com efeito ansiolítico de benzodiazepínicos, como observado por Crawley e Goodwin (1980), assim, uma redução nesse número em comparação com o controle pode ser considerada como ansiedade aumentada. Apesar de vários estudos envolvendo enriquecimento ambiental observarem uma redução de ansiedade em animais enriquecidos (FRISKE; GAMMIE, 2005; GOES et al., 2015; LEAL-GALÍCIA et al., 2007; SAMPEDFRO-PIQUERO et al., 2014), Kentner et al. (2017), Paez-Martinez et al., (2013) e Workman et al. (2011) observaram medidas aumentadas de ansiedade em animais enriquecidos na caixa claro/escuro, labirinto em cruz elevado e no teste de enterrar objetos, respectivamente. As medidas de ansiedade também foram encontradas aumentadas nos animais submetidos ao enriquecimento após as 5 semanas do estresse crônico, indicando um efeito ansiogênico duradouro.

Exceto pelas medidas de ansiedade e por um leve aumento da locomoção no campo aberto apresentada pelo grupo estresse predatório, não houveram alterações causadas pelas manipulações na infância em nenhum dos outros testes comportamentais. Apesar de vários estudos terem encontrado diferenças causadas pelo enriquecimento (BRENES et al., 2008; BRENES SÁENZ et al., 2006; MILEVA; BIELAJEW, 2015), o estudo de Lehmann e Herkenham (2011) não observou efeitos basais nas medidas de ansiedade na caixa claro/escuro, labirinto em zero elevado, e de depressão no nado forçado e suspensão pela cauda. Já foram observados efeitos negativos de um estresse predatório agudo em medidas de ansiedade (BELZUNG et al., 2001) e memória (EL HAGE et al., 2006). Calvo-Torrent et al. (1999) reportaram diminuição da preferência por sacarose e do tempo passado nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em camundongos expostos a estresse predatório crônico. Portanto, a metodologia escolhida nesse trabalho foi adequada para que o estresse predatório tivesse um efeito de inoculação sem causar impactos comportamentais basais.

Nosso estudo não identificou menor secreção de corticosterona após um estresse agudo de imobilização nos grupos estresse e enriquecimento, como era

esperado. É possível que a duração da imobilização tenha sido muito curta para levar ao aumento detectável da corticosterona ou a coleta de sangue foi feita antes que os níveis tenham se elevado suficientemente. Mannironi et al. (2013) e Nohara et al. (2016) encontraram níveis basais de corticosterona plasmática em camundongos de 100-150 ng/ml, sendo elevados a 400 ng/ml após uma restrição de movimento de 120 e 60 minutos, respectivamente. Semelhantemente, Brockhurst e colaboradores (2015) encontraram níveis basais de menos de 100 ng/ml, com a coleta realizada entre as 9 e 10h30 da manhã. Os níveis que encontramos nos animais após a imobilização se assemelham aos níveis encontrados nos animais não imobilizados desses estudos, sugerindo que o tempo de imobilização não foi suficiente para elevar os níveis de corticosterona circulante. Uma das nossas limitações foi a ausência de um controle não imobilizado. Optamos por não realizar esse controle pois isso reduziria o n a 5 animais por grupo, que poderia não ser suficiente para detectar diferenças estatísticas entre os grupos. Outra limitação é a utilização de apenas um ponto de medida. É possível que as alterações na curva de secreção de corticosterona não sejam detectadas quando a medida ocorre em apenas um ponto. No entanto, não é possível realizar mais de uma coleta já que o método é por decapitação.

Também mostramos ausência de diferença nos níveis de corticosterona em fezes coletadas um dia após o último dia de estresse predatório e troca de objetos do enriquecimento. Existem dados conflitantes na literatura sobre níveis basais de corticosterona em animais em ambiente enriquecido, ora encontram-se níveis mais altos (HUTHINSON et al., 2012; MONCEK et al., 2004; WORKMAN et al., 2011) ora mais baixos (BELZ et al., 2003; GURFEIN et al., 2017) e ora sem diferença (KENTNER et al., 2017; MCQUAID et al., 2012). Essa variabilidade pode explicar porque não houve diferença no primeiro dia após a troca de objetos, mas sim no segundo, apesar de que o esperado seria observar diferença no primeiro dia, já que a troca de caixa e objetos é um fator que costuma levar ao aumento dos níveis de corticosterona (MCQUAID et al., 2012). Por outro lado, as caixas eram sempre trocadas às sextas-feiras, portanto no dia 1 o estresse de troca de caixas era previsível. No entanto, como as caixas foram trocadas novamente no sábado, num dia em que os animais não estavam acostumados, é possível que a troca tenha sido mais estressante. Como observado por

McQuaid e colaboradores (2012), um aumento na corticosterona plasmática após exposição a uma nova caixa ocorreu apenas em animais enriquecidos.

Em conformidade com nossos dados, efeitos ansiogênicos do UCMS já foram observados anteriormente (ANDRADE et al., 2013; MINEUR et al., 2006; ZHANG et al., 2017). O protocolo de UCMS levou ao aumento de algumas medidas de ansiedade, como diminuição da frequência de mergulho de cabeça no labirinto em cruz elevado, aumento da distância percorrida na periferia do campo aberto, diminuição do tempo passado no centro, diminuição da latência para passar para a periferia e diminuição do tempo passado na arena clara da caixa claro/escuro. No entanto esses efeitos ocorreram para os três grupos, sem efeitos de interação, sugerindo que as manipulações na infância não foram capazes de proteger contra os efeitos ansiogênicos do UCMS.

UCMS não teve efeito sobre o teste de suspensão pela cauda. Apesar de ser comum encontrar dados na literatura reportando aumento do tempo de imobilidade no teste (CHEN et al., 2012; SANNA et al., 2017; ZHANG et al., 2017; ZHU et al., 2014), um estudo por Mineur et al. (2006) mostra que existe variabilidade entre linhagens nos efeitos do UCMS sobre a suspensão pela cauda, sendo que nem todas apresentam aumento da imobilidade. Além disso, a maioria dos estudos realiza o teste logo após o término do UCMS ou mesmo mantém a aplicação de estressores durante os dias de testes comportamentais, enquanto nós realizamos o teste 4 dias após o fim do protocolo, podendo ter levado a uma recuperação durante esse período.

Para o *splash test*, o UCMS levou a uma diminuição da latência para início de *grooming* e aumento da duração total. Esse dado não era esperado pois o UCMS está associado com uma diminuição da motivação para autocuidado e conseqüentemente redução do tempo de *grooming* (FRISBEE et al., 2015; PIATO et al., 2008). Apesar disso, também se conhece que o *grooming* tem uma associação com estresse, sendo que animais submetidos a um estresse agudo costumam apresentar mais *grooming* em comparação com controles não estressados (KALUEFF et al., 2016; PIRES et al., 2013). Além disso, Pires e colaboradores (2013) observaram alterações nas transições e nas frequências de cada estágio de *grooming* de ratos privados de sono, que estariam associadas a um comportamento de ansiedade. A baixa qualidade dos nossos

vídeos não permite avaliar o *grooming* em detalhes, mas é possível que o UCMS tenha causado alterações na sua microestrutura.

A hipótese levantada por Crofton et al (2015) de que o enriquecimento funciona como uma forma de inoculação de estresse não foi totalmente suportada pelos resultados deste trabalho. Houve efeitos semelhantes sobre a preferência por sacarose, indicando efeito protetor das duas manipulações, mas os resultados não foram idênticos. O estresse foi ainda mais efetivo em proteger contra a redução no peso ganho durante o UCMS. Por outro lado, as manipulações não protegeram contra os efeitos ansiogênicos do UCMS. O presente estudo sugere ainda que podem haver efeitos negativos do enriquecimento ambiental sobre a ansiedade, que inclusive podem perdurar por até 5 semanas após a retirada do enriquecimento. Não foram observados efeitos das manipulações sobre o comportamento tipo-depressivo no *splash test* e suspensão pela cauda. Além disso, o efeito sobre a secreção de corticosterona após o estresse agudo de imobilização foi inconclusivo e é necessário repeti-lo com um tempo maior de imobilização e com a presença de controles não imobilizados.

Em conclusão, a inoculação de estresse através do estresse predatório parece ser a forma mais eficaz em se conferir resiliência em um modelo animal de depressão em comparação com o enriquecimento ambiental.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, J. S. DE; CÉSPEDES, I. C.; ABRÃO, R. O.; et al. Chronic unpredictable mild stress alters an anxiety-related defensive response , Fos immunoreactivity and hippocampal adult neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, v. 250, p. 81–90, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.031>>. .

ASHOKAN, A.; SIVASUBRAMANIAN, M.; MITRA, R. Seeding Stress Resilience through Inoculation. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/np/2016/4928081/>>. .

BAILEY, K. R.; CRAWLEY, J. N. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: J. Buccafusco (Org.); **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2º ed, 2009.

BARNUM, C. J.; BLANDINO, P.; DEAK, T. Adaptation in the corticosterone and hyperthermic responses to stress following repeated stressor exposure. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 19, n. 8, p. 632–642, 2007.

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. , v. 76, p. 481–486, 2003.

BELZUNG, C.; EL HAGE, W.; MOINDROT, N.; GRIEBEL, G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 3, p. 400–408, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390801000727>>. .

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 55–65, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299903012743>>. .

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**, v. 89, n. 1, p. 85–93, 2008.

BRENES SÁENZ, J. C.; VILLAGRA, O. R.; FORNAGUERA TRÍAS, J. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. **Behavioural Brain Research**, v. 169, n. 1, p. 57–65, 2006.

BROCKHURST, J.; CHELEUITTE-NIEVES, C.; BUCKMASTER, C. L.; SCHATZBERG, A. F.; LYONS, D. M. Stress inoculation modeled in mice. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 3, p. e537, 2015. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/tp.2015.34>>. .

BURGADO, J.; HARRELL, C. S.; EACRET, D.; et al. Two weeks of predatory stress induces anxiety-like behavior with co-morbid depressive-like behavior in adult male

- mice. **Behavioural Brain Research**, v. 275, p. 120–125, 2014. Elsevier B.V. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.060>>. .
- CALVO-TORRENT, A.; BRAIN, P. F.; MARTINEZ, M. Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. **Physiology and Behavior**, v. 67, n. 2, p. 189–196, 1999.
- CAN, A.; DAO, D. T.; TERRILLION, C. E.; et al. The Tail Suspension Test. **Journal of Visualized Experiments**, , n. 58, p. 4–8, 2011. Disponible em: <<http://www.jove.com/details.php?id=3638>>. .
- CASAROTTO, P. C.; ANDREATINI, R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 11, p. 735–42, 2007. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7462866>>. .
- CHEN, L.; CHEN, M.; WANG, F.; et al. Antidepressant-Like Effects of Shuyusan in Rats Exposed to Chronic Stress: Effects on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function. **EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE**, 2012. 410 PARK AVENUE, 15TH FLOOR, #287 PMB, NEW YORK, NY 10022 USA: HINDAWI PUBLISHING CORPORATION.
- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167–170, 1980.
- CROFTON, E. J.; ZHANG, Y.; GREEN, T. A. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 49, p. 19–31, 2015. Elsevier Ltd. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.017>>. .
- CULIG, L.; SURGET, A.; BOURDEY, M.; et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis in mice after exposure to unpredictable chronic mild stress may counteract some of the effects of stress. **Neuropharmacology**, v. 126, p. 179–189, 2017. Elsevier Ltd. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.009>>. .
- D'AQUILA, P. S.; BRAIN, P.; WILLNER, P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. **Physiology and Behavior**, v. 56, n. 5, p. 861–867, 1994.
- DEVALLANCE, E.; RIGGS, D.; JACKSON, B.; et al. Effect of chronic stress on running wheel activity in mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–14, 2017.
- EAGLE, A.; MAZEI-ROBISON, M.; ROBISON, A. Sucrose Preference Test to Measure Stress-induced Anhedonia. **BIO-PROTOCOL**, v. 6, n. 11, 2016. Disponible em: <<http://www.bio-protocol.org/e1822>>. .

EDGE, M. D.; RAMEL, W.; DRABANT, E. M.; et al. For better or worse? Stress inoculation effects for implicit but not explicit anxiety. **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 9, p. 831–837, 2009.

FRISBEE, J. C.; BROOKS, S. D.; STANLEY, S. C.; D'AUDIFFRET, A. C. An Unpredictable Chronic Mild Stress Protocol for Instigating Depressive Symptoms, Behavioral Changes and Negative Health Outcomes in Rodents. **J Vis Exp**, , n. 106, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26650668>>. .

FRISKE, J. E.; GAMMIE, S. C. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. **Physiology and Behavior**, v. 85, n. 2, p. 187–194, 2005.

GADEK-MICHALSKA, A.; BUGAJSKI, J. Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, n. 3, p. 449–459, 2003.

GOES, T. C.; ANTUNES, F. D.; TEIXEIRA-SILVA, F. Environmental enrichment for adult rats: Effects on trait and state anxiety. **Neuroscience Letters**, v. 584, p. 93–96, 2015. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.004>>. .

GOGAS, K. R.; LECHNER, S. M.; MARKISON, S.; et al. Anxiety. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. p.85–115, 2007. Elsevier. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B008045044X001644>>. .

GURFEIN, B. T.; HASDEMIR, B.; MILUSH, J. M.; et al. Enriched environment and stress exposure influence splenic B lymphocyte composition. (T. Akiyama, Org.) **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0180771, 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0180771>>. .

EL HAGE, W.; GRIEBEL, G.; BELZUNG, C. Long-term impaired memory following predatory stress in mice. **Physiology and Behavior**, v. 87, n. 1, p. 45–50, 2006.

HAJHEIDARI, S.; MILADI-GORJI, H.; BIGDELI, I. Effect of the environmental enrichment on the severity of psychological dependence and voluntary methamphetamine consumption in methamphetamine withdrawn rats. **Neuroscience Letters**, v. 584, p. 151–155, 2015. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.017>>. .

HARRIS, R. B. S.; GU, H.; MITCHELL, T. D.; et al. Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. **Physiology and Behavior**, v. 81, n. 4, p. 557–568, 2004.

HUTCHINSON, K. M.; MCLAUGHLIN, K. J.; WRIGHT, R. L.; et al. Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n. 2, p. 250–260, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2012.01.003>>. .

- KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; SONG, C.; et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59, 2016.
- KATZ, M.; LIU, C.; SCHAER, M.; et al. Prefrontal plasticity and stress inoculation-induced resilience. **Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 4, p. 293–299, 2009.
- KENTNER, A. C.; LIMA, E.; MIGLIORE, M. M.; SHIN, J.; SCALIA, S. Complex Environmental Rearing Enhances Social Salience and Affects Hippocampal Corticotropin Releasing Hormone Receptor (CRHR) 1 / CRHR2 Expression in a Sex-Specific Manner. **Neuroscience**, , n. November, 2017. IBRO. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29183827>%0A<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452217308291>>. .
- KVETNANSKY, R.; SABBAN, E. L.; PALKOVITS, M. Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 535–606, 2009. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00042.2006>>. .
- LEAL-GALICIA, P.; SALDÍVAR-GONZÁLEZ, A.; MORIMOTO, S.; ARIAS, C. Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: role of individual responsiveness to anxiety. **Developmental neurobiology**, v. 67, n. 4, p. 395–405, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17443796>>. .
- LEE, A. G.; BUCKMASTER, C. L.; YI, E.; SCHATZBERG, A. F.; LYONS, D. M. Coping and glucocorticoid receptor regulation by stress inoculation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 49, n. 1, p. 272–279, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.07.020>>. .
- LEE, A. G.; NECHVATAL, J. M.; SHEN, B.; et al. Striatal dopamine D2/3 receptor regulation by stress inoculation in squirrel monkeys. **Neurobiology of Stress**, v. 3, p. 68–73, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352289515300357>>. .
- LEHMANN, M. L.; HERKENHAM, M. Environmental Enrichment Confers Stress Resiliency to Social Defeat through an Infralimbic Cortex-Dependent Neuroanatomical Pathway. , v. 31, n. 16, p. 6159–6173, 2011.
- LEVINE, S. Infantile experience and resistance to physiological stress. **Science (New York, N.Y.)**, v. 126, n. 3270, p. 405, 1957. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13467220>>. .
- LEVINE, S.; HALTMEYER, G. C.; KARAS, G. G.; DENENBERG, V. H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology & Behavior**, v. 2, n. 1, p. 55–59, 1967. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.126.3270.405>>. .
- LI, H. Y.; ZHAO, Y. H.; ZENG, M. J.; et al. Saikosaponin D relieves unpredictable

chronic mild stress induced depressive-like behavior in rats: involvement of HPA axis and hippocampal neurogenesis. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 22, p. 3385–3394, 2017.

LIN, Y. E.; LIN, S. H.; CHEN, W. C.; et al. Antidepressant-like effects of water extract of *Gastrodia elata* Blume in rats exposed to unpredictable chronic mild stress via modulation of monoamine regulatory pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 57–65, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.032>>. .

LISTER, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 0–5, 1987. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00177912>>. .

LYONS, D. Developmental cascades linking stress inoculation, arousal regulation, and resilience. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, n. September, p. 1–6, 2009. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/neuro.08.032.2009/abstract>>. .

LYONS, D. M.; MARTEL, F. L.; LEVINE, S.; RISCH, N. J.; SCHATZBERG, A. F. Postnatal Experiences and Genetic Effects on Squirrel Monkey Social Affinities and Emotional Distress. **Hormones and Behavior**, v. 36, n. 3, p. 266–275, 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018506X99915477>>. .

LYONS, D. M.; PARKER, K. J. Stress inoculation-induced indications of resilience in monkeys. **Journal of Traumatic Stress**, v. 20, n. 4, p. 423–433, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jts.20265>>. .

LYONS, D. M.; PARKER, K. J.; SCHATZBERG, A. F. Animal models of early life stress: Implications for understanding resilience. **Developmental psychobiology**, v. 52, n. 5, p. 402–10, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20175105>>. .

MAGARIÑOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 83–8, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637635>>. .

MANNIRONI, C.; CAMON, J.; VITO, F. DE; et al. Acute Stress Alters Amygdala microRNA miR-135a and miR-124 Expression : Inferences for Corticosteroid Dependent Stress Response. , v. 8, n. 9, p. 1–11, 2013.

MCNALLY, R. J. Mechanisms of exposure therapy: how neuroscience can improve psychological treatments for anxiety disorders. **Clinical psychology review**, v. 27, n. 6, p. 750–9, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17292521>>. .

MCQUAID, R. J.; AUDET, M.-C.; ANISMAN, H. Environmental enrichment in male CD-1 mice promotes aggressive behaviors and elevated corticosterone and brain norepinephrine activity in response to a mild stressor. **Stress**, v. 15, n. 3, p. 354–360, 2012. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10253890.2011.623249>>. .

MILEVA, G. R.; BIELAJEW, C. Environmental manipulation affects depressive-like behaviours in female Wistar-Kyoto rats. **Behavioural Brain Research**, v. 293, p. 208–216, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.035>>. .

MINEUR, Y. S.; BELZUNG, C.; CRUSIO, W. E. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 43–50, 2006.

MONCEK, F.; DUNCKO, R.; JOHANSSON, B. B.; JEZOVA, D. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. **Journal of neuroendocrinology**, v. 16, n. 5, p. 423–431, 2004.

NASSAR, N. N.; SCHAALAN, M. F.; ZAKI, H. F.; ABDALLAH, D. M. Octreotide ameliorates gastric lesions in chronically mild stressed rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 9, p. 1135–1142, 2011.

NATELSON, B. H.; OTTENWELLER, J. E.; COOK, J. A.; et al. Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. **Physiology and Behavior**, v. 43, n. 1, p. 41–46, 1988.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13–25, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11931738>>. .

NOHARA, M.; TOHEI, A.; SATO, T.; AMAO, H. Evaluation of response to restraint stress by salivary corticosterone levels in adult male mice. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 5, p. 775–780, 2016. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/78/5/78_15-0610/_article>. .

PAEZ-MARTINEZ, N.; FLORES-SERRANO, Z.; ORTIZ-LOPEZ, L.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, G. Environmental enrichment increases doublecortin-associated new neurons and decreases neuronal death without modifying anxiety-like behavior in mice chronically exposed to toluene. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 432–440, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.007>>. .

PAN, Y.; HONG, Y.; ZHANG, Q. Y.; KONG, L. D. Impaired hypothalamic insulin signaling in CUMS rats: Restored by icariin and fluoxetine through inhibiting CRF system. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 1, p. 122–134, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.05.007>>. .

PARKER, K. J.; BUCKMASTER, C. L.; SCHATZBERG, A. F.; LYONS, D. M. Prospective investigation of stress inoculation in young monkeys. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, n. 9, p. 933–941, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15351772>>. .

PARKER, K. J.; BUCKMASTER, C. L.; SUNDLASS, K.; SCHATZBERG, A. F.; LYONS,

D. M. Maternal mediation, stress inoculation, and the development of neuroendocrine stress resistance in primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 3000–3005, 2006.

PEÑA, Y.; PRUNELL, M.; ROTLLANT, D.; ARMARIO, A.; ESCORIHUELA, R. M. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 9, p. 1390–1404, 2009.

PIATO, Â. L.; DETANICO, B. C.; JESUS, J. F.; et al. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: Further indication of antidepressant properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 2, p. 300–304, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874108002225>>. .

PIRES, G. N.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L. Grooming analysis algorithm: Use in the relationship between sleep deprivation and anxiety-like behavior. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 41, p. 6–10, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584612002886>>. .

POTHION, S.; BIZOT, J. C.; TROVERO, F.; BELZUNG, C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. **Behavioural Brain Research**, v. 155, n. 1, p. 135–146, 2004.

VAN PRAAG, H. M. Can stress cause depression? **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 5, p. 891–907, 2004.

RUSSO, S. J.; MURROUGH, J. W.; HAN, M.-H.; CHARNEY, D. S.; NESTLER, E. J. Neurobiology of resilience. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 1475–1484, 2012. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.3234>>. .

SAMPEDRO-PIQUERO, P.; BEGEGA, A.; ARIAS, J. L. Increase of glucocorticoid receptor expression after environmental enrichment: Relations to spatial memory, exploration and anxiety-related behaviors. **Physiology and Behavior**, v. 129, p. 118–129, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.048>>. .

SANNA, M. D.; GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N. Effect of amitriptyline treatment on neurofilament-H protein in an experimental model of depression. **Brain Research Bulletin**, v. 128, p. 1–6, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.11.001>>. .

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C. T.; et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–9, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907793>>. .

SAUNDERS, T.; DRISKELL, J. E.; JOHNSTON, J. H.; SALAS, E. The Effect of Stress Inoculation Training on Anxiety and Performance. , v. 1, n. 2, p. 170–186, 1996.

SHIMIZU, E.; HASHIMOTO, K.; OKAMURA, N.; et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 70–75, 2003.

SKWARA, A. J.; KARWOSKI, T. E.; CZAMBEL, R. K.; RUBIN, R. T.; RHODES, M. E. Influence of environmental enrichment on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) responses to single-dose nicotine, continuous nicotine by osmotic mini-pumps, and nicotine withdrawal by mecamylamine in male and female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 234, n. 1, p. 1–10, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.06.003>> . .

SMITH, B. L.; LYONS, C. E.; CORREA, F. G.; et al. Behavioral and physiological consequences of enrichment loss in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 77, p. 37–46, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.11.040>> .

SONG, L.; CHE, W.; MIN-WEI, W.; MURAKAMI, Y.; MATSUMOTO, K. Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 2, p. 186–193, 2006.

STERN, J. M.; WEINBERG, J.; HENNESSY, M. B. From freud to a modern understanding of behavioral, physiological, and brain development. **Developmental Psychobiology**, v. 52, n. 7, p. 609–615, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/dev.20496>> . .

SURGET, A.; SAXE, M.; LEMAN, S.; et al. Drug-Dependent Requirement of Hippocampal Neurogenesis in a Model of Depression and of Antidepressant Reversal. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 4, p. 293–301, 2008.

VEGA-RIVERA, N. M.; ORTIZ-LÓPEZ, L.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, A.; et al. The neurogenic effects of an enriched environment and its protection against the behavioral consequences of chronic mild stress persistent after enrichment cessation in six-month-old female Balb/C mice. **Behavioural brain research**, v. 301, p. 72–83, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26721469>> . .

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 16, n. 4, p. 525–534, 1992. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763405801940>> . .

WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S.; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358–364, 1987.

WORKMAN, J. L.; FONKEN, L. K.; GUSFA, J.; KASSOUF, K. M.; NELSON, R. J. Post-weaning environmental enrichment alters affective responses and interacts with behavioral testing to alter nNOS immunoreactivity. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 1, p. 25–32, 2011. Elsevier Inc. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2011.07.008>>. .

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, p. 1–24, 2017.

ZANCA, R. M.; BRAREN, S. H.; MALONEY, B.; et al. Environmental Enrichment Increases Glucocorticoid Receptors and Decreases GluA2 and Protein Kinase M Zeta (PKM ζ) Trafficking During Chronic Stress: A Protective Mechanism? **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, n. November, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnbeh.2015.00303/abstract>>. .

ZHANG, Y.; FAN, K.; LIU, Y.; et al. Cathepsin C Aggravates Neuroinflammation Involved in Disturbances of Behaviour and Neurochemistry in Acute and Chronic Stress-Induced Murine Model of Depression. **Neurochemical Research**, v. 0, n. 0, p. 0, 2017. Springer US.

ZHU, S.; WANG, J.; ZHANG, Y.; et al. Unpredictable chronic mild stress induces anxiety and depression-like behaviors and inactivates AMP-activated protein kinase in mice. **Brain Research**, v. 1576, p. 81–90, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.06.002>>. .