



RAFAELA COSTA

**Ação modulatória da estimulação tátil e do enriquecimento ambiental
sobre respostas hormonais e comportamentais induzidas por estresse
crônico, em ratos.**

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



RAFAELA COSTA

Ação modulatória da estimulação tátil e do enriquecimento ambiental sobre respostas hormonais e comportamentais induzidas por estresse crônico, em ratos.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Rafaela Costa, e orientada pela Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Rafaela Costa

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C823a Costa, Rafaela, 1984-
Ação modulatória da estimulação tátil e do enriquecimento ambiental sobre as respostas hormonais e comportamentais induzidas por estresse crônico, em ratos / Rafaela Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Fernanda Klein Marcondes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Estresse. 2. Aprendizagem. 3. Memória. 4. Depressão. 5. Sistema renina-angiotensina. 6. Modelos animais. I. Marcondes, Fernanda Klein, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The modulatory effects of tactile stimulation and environmental enrichment on hormonal and behavioral responses induced by chronic stress in rats

Palavras-chave em inglês:

Stress

Learning

Memory

Depression

Renin-angiotensin system

Models, animal

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Fernanda Klein Marcondes [Orientador]

Juliana Trindade Clemente Napimoga

Maria Esméria Corezola do Amaral

Regina Célia Spadari

Christie Ramos Andrade Leite Panissi

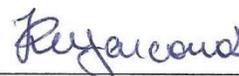
Data de defesa: 15-12-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 15 de dezembro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes
(Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga



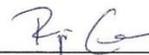
Assinatura

Profa. Dra. Maria Esméria Corezola do Amaral



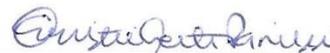
Assinatura

Profa. Dra. Regina Célia Spadari



Assinatura

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi



Assinatura

Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

Assinatura

Prof. Dr. Antônio Bento Alves de Moraes

Assinatura

Profa. Dra. Tatiana de Sousa da Cunha Uchiyama

Assinatura

RESUMO

Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que atualmente a depressão atinge 121 milhões de pessoas e deverá ser a doença mais comum no mundo em 2020. Evidências científicas mostram sua associação com o estresse crônico e alterações neuronais relacionadas à depressão, ansiedade, prejuízo no aprendizado e memória. A qualidade do ambiente em que o indivíduo está inserido e o suporte social de que dispõe representam os principais fatores na regulação dessas alterações. Com relação aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos efeitos do estresse crônico, há estudos que demonstram uma importante associação entre estresse e hiperatividade do sistema renina-angiotensina (SRA). Porém, os mecanismos envolvidos na associação entre estresse e depressão e nos efeitos protetores de condições ambientais favoráveis ainda não estão esclarecidos. Em modelo animal, a intervenção ambiental por meio da estimulação tátil ou enriquecimento ambiental tem sido proposta como um fator que poderia diminuir o estresse e promover o bem-estar. No experimento 1, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da intervenção ambiental, por meio da estimulação tátil (manipulação) ou enriquecimento ambiental, sobre as respostas hormonais e comportamentais induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) em ratos Sprague-Dawley jovens. Nesse estudo foi evidenciado que o ECMI aumentou as concentrações séricas de corticosterona e plasmáticas de noradrenalina e adrenalina; induziu comportamentos análogos à depressão; prejudicou o aprendizado e memória e aumentou a concentração tecidual de angiotensina I, II e IV no hipotálamo. Tanto a manipulação quanto o enriquecimento ambiental atenuaram a secreção hormonal, os comportamentos análogos à depressão e o aumento de angiotensina II no hipotálamo; e cancelaram o prejuízo cognitivo induzido pelo ECMI. Com o objetivo de estudar se os efeitos da angiotensina II, mediados pelo receptor tipo 1 de angiotensina II (AT1), estão envolvidos nas respostas hormonais e no prejuízo cognitivo induzido pelo ECMI, no experimento 2, ratos machos Sprague-Dawley controles e estressados, tratados ou não com losartan (antagonista de receptor AT1) foram avaliados. Nesse experimento, a administração do losartan cancelou o aumento na secreção dos hormônios do estresse, atenuou o desamparo aprendido e o prejuízo cognitivo em animais estressados. Os resultados obtidos mostraram que a manipulação ou o enriquecimento ambiental produzem efeitos hormonais e comportamentais positivos capazes de melhorar o bem-estar animal e podem diminuir os efeitos deletérios induzidos por estresse crônico em ratos jovens. Além disso, sugerem que a atividade do sistema renina-angiotensina pode estar envolvida nos efeitos negativos desencadeados pelo estresse crônico.

Palavras-chave: estresse, aprendizado, memória, depressão, sistema renina-angiotensina, modelo animal.

ABSTRACT

Data from the World Health Organization show that depression currently affects 121 million people and will probably be the most common disease in the world in 2020. Scientific evidences show that it is associated with chronic stress, neuronal changes depression-related, anxiety and impairment in learning and memory. There are also a significant association between stress and hyperactivity of the renin angiotensin system on behavioral changes and cardiovascular effects. It is also noteworthy that the quality of the environment in which the individual belongs and the social support represent the main factors that may regulated these effects. In addition, the pathophysiological mechanisms involved in the association between stress and depression, and the protective effects of favorable environmental conditions remain unclear. In animal models, environmental intervention through tactile stimulation (handling) or environmental enrichment have been proposed as factors that may reduce stress and promote well-being. In the experiment 1, the objective of this study was to evaluate the effects of environmental intervention, through tactile stimulation (handling) or environmental enrichment on behavioral and hormonal responses induced by chronic mild unpredictable stress (CMS) in young Sprague-Dawley rats. The results of this study showed that the CMS increased serum corticosterone, plasma norepinephrine and epinephrine concentrations; induced depression-like behaviors; impaired learning and memory and increased hypothalamus angiotensin I, II and IV. Handling and environmental enrichment attenuated stress hormones secretion, depression-like behaviors and increased hypothalamic angiotensin II levels; and cancelled impairment of learning and memory induced by CMS. Considering that the aim of study 1 was evaluate if the effects of angiotensin II, mediated by angiotensin II type 1 receptor (AT1), are involved in hormone responses and cognitive impairment induced by CMS, the experiment 2 were performed. In the second study, male Sprague-Dawley rats controls and stressed, treated or not with losartan (AT1 receptor antagonist) were evaluated. Results from the second study showed that the losartan administration cancelled the increase in stress hormones secretion, attenuated depression-like behaviors and reduced the impairment of learning and memory in stressed animals. The data obtained indicated that the handling or environmental enrichment produced positive hormonal and behavioral effects capable of improving the animal's welfare, diminishing the deleterious effects induced by chronic stress in adult rats. The results also suggest that renin-angiotensin system over activity seems to be involved in negative effects of CMS.

Keywords: stress, learning, memory, depression, renin-angiotensin system, animal model.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivos Gerais.....	9
2.2. Objetivos Específicos.....	9
3. METODOLOGIA.....	10
3.1. Animais.....	10
3.2. Delineamento experimental.....	10
3.3. Protocolo de Estresse.....	13
3.4. Sessão de Estimulação Tátil.....	14
3.5. Enriquecimento Ambiental.....	15
3.6. Teste de preferência à solução de sacarose 1%.....	16
3.7. Análises comportamentais - programa Etho Vision® XT 4.1.....	16
3.8. Teste do labirinto em cruz elevado.....	16
3.9. Avaliação do aprendizado e memória no labirinto em Y.....	17
3.10. Teste da natação forçada.....	19
3.11. Obtenção das amostras.....	20
3.12. Dosagem de corticosterona.....	20
3.13. Quantificação plasmática de catecolaminas.....	20
3.14. Quantificação das angiotensinas no hipotálamo.....	21
3.15. Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXOS	
Certificado de aprovação pelo comitê de ética na experimentação animal	
Experimento 1.....	52

Certificado de aprovação pelo comitê de ética na experimentação animal	
Experimento 2.....	53
Artigo publicado: <i>Handling of Adolescent Rats Improves Learning and Memory and Decreases Anxiety</i>	54
Confirmação de envio do artigo para publicação: <i>Tactile stimulation of adult rats modulates the hormonal responses, depression-like behaviors and memory impairment induced by chronic mild stress</i>	55

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

*Ao meu querido e falecido pai **Fernando** e a minha querida mãe **Nádia** pelo amor incondicional, dedicação e por sempre me apoiar.*

*Ao meu companheiro **Maurício** por sempre estar ao meu lado apoiando e estimulando a realização dos meus sonhos; por toda cumplicidade, sinceridade, amizade, carinho, respeito e paciência.*

*À minha Avó **Nair** pelos ensinamentos de vida e por sempre rezar por mim.*

Agradecimentos

Meu eterno agradecimento à minha orientadora Profa. Fernanda Klein Marcondes, pela dedicação a esse trabalho, ensinamentos, confiança e respeito.

Aos meus irmãos Luís Fernando e Gabriela e sobrinhos Ana Beatriz, Luís Felipe e Felipe pelo amor e carinho.

Aos meus amigos “MANIPULADORES” – Daniel; Erica e George; Renata Rufino e Eduardo; Renata Fernandes, Luiz e baby, pela amizade, companheirismo e cumplicidade.

Às minhas criaturinhas Estrela, Pérola, Luna, Pandora, Penélope, Senninha, Floco, Fofão, Fofinha, Branquinha, Pituca, Chico, Cléo e Preta pela companhia e por encherem a minha vida e minha casa de ternura e alegria.

Às colegas de trabalho do Laboratório de Estresse e acima de tudo grandes amigas Andrea e Patrícia, pela cumplicidade, amizade, paciência, compreensão e por estarem comigo desde o começo desta jornada.

As alunas de Iniciação Científica do Laboratório de Estresse e amigas Maria Fernanda, Maeline e Talita pela ajuda e amizade.

Aos amigos da Fisiologia Cristina, Fabiana, Gizele, Henrique, Livia, Luiz, Monaliza, Nádia, Ricardo pela amizade e pelos bons momentos de descontração.

Aos Professores Dra. Adriana Franco Paes Leme, Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga, Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite, Dra. Cíntia Maria Saia Cereda e Dra. Regina Célia Spadari pelo aceite e colaborações como componentes da banca de qualificação desse trabalho.

Aos Professores Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga, Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite, Dra. Regina Célia Spadari, Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi, Dra. Maria Esméria Corezola do Amaral, Dr. Antônio Bento Alves de Moraes e Dra. Tatiana de Sousa da Cunha Uchiyama pelo aceite e colaborações como componentes da banca de defesa desse trabalho.

À professora Dra. Dulce Elena Casarini, coordenadora do Laboratório de Rim e Hormônios e suas alunas Marie, Juliana, Larissa e Roseli pela colaboração e grande ajuda na realização desse trabalho.

Ao técnico Carlos Alberto Feliciano, pelo suporte técnico no laboratório da Fisiologia.

As secretárias Andréia e Eliete sempre prestativas e atenciosas.

À Universidade Estadual de Campinas pelas condições oferecidas para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de 1 ano de Bolsa de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de 3 anos de Bolsa de Doutorado e apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Fundação de Desenvolvimento da Unicamp - FUNCAMP e Fundo de Apoio ao ensino, à pesquisa, e à extensão - FAPEX aos auxílios concedidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa na concessão de auxílios.

Listra de Figuras

Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental – Experimento 1.....	10
Figura 2. Fluxograma do delineamento experimental – Experimento 2.....	12
Figura 3. Sessão de estimulação tátil.....	14
Figura 4. Sessão de enriquecimento ambiental.....	14
Figura 5. Labirinto em cruz elevado.....	17
Figura 6. Labirinto em Y.....	17
Figura 7. Tanque de natação utilizado no teste de natação forçada.....	19
Figura 8. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre as concentrações séricas de corticosterona (A) e plasmática de adrenalina (B), noradrenalina (C) e dopamina (D).....	22
Figura 9. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre as respostas comportamentais ao teste de preferência pela sacarose.....	23
Figura 10. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre o tempo de imobilidade de ratos durante o TNF.....	24
Figura 11. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre as respostas comportamentais ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado: número de entradas – braços fechados (A), número total de entradas (B), distância percorrida (C), % de tempo – braços abertos (D) e % de entradas – braços abertos (E) N=12. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si (Anova bifatorial seguido de Tukey; $p < 0,05$).....	25
Figura 12. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre as respostas comportamentais ao Teste de Labirinto em Y: % de entrada (A), preferência de entrada (% entrada no braço novo - % entrada no braço conhecido) (B), % de tempo (C), preferência em tempo (% tempo no braço novo - % tempo no braço	

conhecido) (D).....	26
Figura 13. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre as concentrações hipotalâmicas de Ang I (A), Ang II (B), Ang 1-7 (C) e Ang IV (D).....	28
Figura 14. Concentrações séricas de corticosterona de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível, tratados ou não com losartan...	29
Figura 15. Tempo de imobilidade durante o TNF de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível, tratados ou não com losartan...	29
Figura 16. Repostas comportamentais ao Teste de Labirinto em Y: % de entrada (A), preferência de entrada (% entrada no braço novo - % entrada no braço conhecido) (B), % de tempo (C), preferência em tempo (% tempo no braço novo - % tempo no braço conhecido) (D) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível, tratados ou não com losartan.....	30

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACTH	- Hormônio corticotrófico
Ang I	- Angiotensina I
Ang II	- Angiotensina II
Ang III	- Angiotensina III
Ang IV	- Angiotensina IV
Ang 1-7	- Angiotensina 1-7
AP-1	- Proteína ativadora-1 (AP-1)
AT1	- Receptor tipo 1 de angiotensina II
AT2	- Receptor tipo 2 de angiotensina II
AT4	- Receptor de angiotensina IV
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRH	- Hormônio liberador de corticotrofina
ECA	- Enzima conversora da angiotensina
ECMI	- Estresse crônico moderado e imprevisível
GR	- Receptor de glicocorticoides
HHA	- Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
LCE	- Labirinto em cruz elevado
IL-1β	- Interleucina 1 beta
IL-6	- Interleucina 6
LTP	- Potenciação de longa duração (<i>long-term potentiation</i>)
MR	- Receptor de mineralocorticoides
NF-κB	- Fator nuclear kappa B
PPARs	- Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
SNS	- Sistema nervoso simpático
SRA	- Sistema renina-angiotensina
TNF	- Teste de natação forçada
TNFα	- Fator de necrose tumoral alfa

1. INTRODUÇÃO

O estresse é um fator de risco para várias doenças cuja incidência é alta na sociedade atual, tais como doenças cardiovasculares, metabólicas e emocionais (Purdy, 2013). Quando um estímulo é percebido como desagradável, aversivo ou ameaçador, uma série de sistemas e processos são ativados em resposta a esse estímulo, representando uma parte integrante de qualquer sistema biológico adaptativo que tem sido conservada ao longo da evolução (Lucassen *et al.*, 2014). Originalmente o termo estresse foi empregado em Física, com o objetivo de identificar o grau de deformidade sofrido por um material quando submetido a um esforço ou tensão (Goldstein e Kopin, 2007). Na área Biológica, a aplicação da definição da palavra estresse encontra-se embasada em antigas concepções que reconheciam a saúde como um estado de harmonia e a doença como um estado de desarmonia. Com base nesses princípios, no século XIX os fisiologistas Claude Bernard, Cannon e Selye publicaram estudos onde passaram a correlacionar a perda da homeostasia ao surgimento de doenças (Chrousos e Gold, 1992).

Em 1936, Selye observou em ratos, respostas semelhantes desencadeadas após a aplicação de uma droga específica ou de solução salina através da injeção e atribuiu tais respostas ao estímulo causado pela aplicação recorrente das injeções e não pelo líquido injetado (Selye, 1936). Selye concluiu que essas respostas pareciam ser respostas adaptativas do organismo daqueles animais, na tentativa de manter a homeostasia e enfrentar a situação percebida como ameaçadora à vida e ao equilíbrio interno (Selye, 1936). Nesse contexto Selye foi considerado o precursor da utilização e popularização do termo estresse do ponto de vista fisiológico, e denominou inicialmente a reação de estresse de Síndrome Geral da Adaptação, que é caracterizada por três fases: alarme ou excitação, resistência e exaustão (Tanno e Marcondes, 2002). Na fase de alarme ocorre ativação do sistema nervoso simpático e do sistema adrenocortical, por meio do sistema límbico, resultando na liberação de catecolaminas (pela medula da adrenal) e de glicocorticoides (pelo córtex da adrenal), com o objetivo de manter ou restaurar a homeostase. Essa restauração leva à segunda fase, de resistência, na qual a capacidade de reação diminui e o organismo desenvolve mecanismos adaptativos, frente ao estímulo estressor. Porém há

situações em que o organismo não é capaz fugir do estressor ou de adaptar-se a ele, seja por fatores genéticos, pela alta intensidade do estímulo estressor e/ou pela presença de doenças de base. Nesta situação, ocorre a terceira fase da reação de estresse, a exaustão, responsável pelos efeitos deletérios desencadeados pelo estresse (Tanno e Marcondes, 2002).

Atualmente, as terminologias alostase e carga alostática têm sido empregadas para designar a resposta biológica frente a um estímulo aversivo, considerando que mediadores da reação de estresse podem ter tanto efeitos protetores quanto prejudiciais ao organismo, dependendo do tempo e da intensidade desses estímulos (McEwen, 2005; McEwen *et al.*, 2015). Segundo McEwen (2005, 2015), esses dois termos permitem uma definição mais precisa e restrita da palavra estresse, podendo a alostase ser utilizada para se referir aos processos adaptativos utilizados para manter a estabilidade de um organismo. Os principais mediadores da alostase incluem os hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), as catecolaminas e as citocinas (McEwen *et al.*, 2015). Quando essas respostas começam a se acumular na tentativa de adaptação, podemos usar o termo carga alostática, onde ocorre um desequilíbrio dos mediadores primários, acarretando na produção excessiva e/ou inadequada desses mediadores, e esta desordem seria a responsável pela instalação e desenvolvimento de diversas doenças relacionadas ao estresse (McEwen, 2005).

Na sociedade atual, o estresse parece ser um dos principais fatores que predisõem um indivíduo à depressão. Na maioria dos casos, os episódios de depressão são atribuídos à ocorrência de eventos estressantes, principalmente de origem psicossociais (Post, 1992). Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que atualmente a depressão atinge 121 milhões de pessoas, e segundo o estudo de Carga Global de Doença, uma colaboração entre a Escola de Saúde Pública de Harvard, a Organização Mundial da Saúde e o Banco Mundial, estima-se que, em 2020, a depressão se tornará a segunda doença de maior ocorrência na população (Lopez e Murray, 1998). No Brasil, dados do Ministério da Saúde, coletados em 2011, mostram que aproximadamente 10 milhões de brasileiros sofrem de depressão (Ministério da Saúde, 2011). Outros estudos brasileiros anteriores demonstraram uma estimativa de prevalência de transtorno depressivo de 2,8% em Brasília, 0,9% em São Paulo e 10,2% em Porto Alegre (Almeida-Filho *et al.*, 1997). Em termos de saúde pública a depressão representa um problema grave, com grande impacto social que

inclui tanto a incapacidade individual, como problemas familiares associados à doença (Lima, 1999). Apesar disso, o diagnóstico da depressão ainda é deficiente sendo que 50% a 60% dos casos não são detectados e não recebem informação específica e nem tratamento adequado (Lima e Fleck, 2011).

A depressão é caracterizada por diminuição da sensibilidade à recompensa (anedonia), maior atividade do sistema nervoso simpático (SNS), aumento da frequência cardíaca, e diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (Grippe e Johnson, 2009). Além disso, pacientes depressivos também apresentam dificuldade para dormir, mudança no apetite, fadiga (Grippe *et al.*, 2003) e prejuízo cognitivo (Conrad, 2010). Além disso, como a ativação do SNS pelo estresse crônico e alterações neuroendócrinas decorrentes da disfunção do eixo HHA também estão associados à ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) (Grippe e Johnson, 2009), na literatura tem sido proposto que o aumento na concentração plasmática de aldosterona e renina poderiam ser um potencial marcador bioquímico de depressão (Murck *et al.*, 2003; Emanuele *et al.*, 2005).

O SRA clássico é descrito como um sistema hormonal que tem um importante papel na regulação da pressão arterial, do equilíbrio hidro-salino, do volume extracelular e da resistência vascular (Wright e Harding, 2013). A renina é secretada pelas células justaglomerulares dos rins em resposta à diminuição da pressão sanguínea arterial, a diminuição das concentrações de sódio no ultrafiltrado da mácula densa, e ao aumento da atividade do SNS (Ferrão *et al.*, 2014). A renina é uma enzima que cataliza a reação transformando o substrato angiotensinogênio no decapeptídeo angiotensina I (Ang I), caracterizada como um fraco vasoconstritor (Ferrão *et al.*, 2014). A Ang I sofre a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) formando o octapeptídeo angiotensina II (Ang II), potente agente vasoconstritor (Ferrão *et al.*, 2014). A Ang I é biologicamente inativa, enquanto que a Ang II é agonista de receptores de Ang II do tipo 1 (AT1) promovendo vasoconstrição, secreção de aldosterona e de hormônio antidiurético. Por outro lado, ao ativar os receptores de Ang II do tipo 2 (AT2) promove vasodilatação (Wright e Harding, 2013).

Adicionalmente, nos últimos anos, novos componentes do SRA foram identificados: a angiotensina 1-7 (Ang 1-7) é formada a partir da Ang I pela ação de peptidases como a

peptidase neutra 24.11 [NEP] e prolil endopeptidase [PEP] ou a partir da Ang II pela mono-peptidase ECA2; a angiotensina III (Ang III) é sintetizada a partir da Ang II pela ação da aminopeptidase A; e a angiotensina IV (Ang IV) é produzida a partir da Ang III pela ação da aminopeptidase N (Wright e Harding, 2013).

A Ang 1-7 é um peptídeo vasodilatador e alguns estudos mostram que ela tem efeitos protetores no coração e vasos sanguíneos podendo ser usada terapêuticamente em pacientes com doenças cardiovasculares (Jiang *et.al.*, 2014). Entretanto, sua importância fisiológica e patológica no sistema cardiovascular ainda não é completamente compreendida e por esse motivo vem sendo amplamente estudada. A Ang III também é agonista de receptores AT1 e AT2 e pode estar envolvida no controle do apetite pelo sódio (Wright e Harding, 2013). A Ang IV tem sido estudada no cérebro, sendo relacionada com funções cognitivas. Esta angiotensina tem elevada afinidade e seletividade pelo receptor de Ang IV (AT4) presente em regiões cerebrais, e baixa sua afinidade pelos receptores AT1 e AT2 (Wright e Harding, 2013).

Durante o estresse, o SRA também é estimulado, sendo que quanto maior a ativação de receptores adrenérgicos e de fibras simpáticas que inervam as células justaglomerulares presentes nos rins, maior será a liberação da renina (Saavedra e Benicky, 2007; Harrison-Bernard, 2009; Chung *et al.*, 2010). Ocorre então aumento da atividade plasmática da renina (Yang *et al.*, 1996), dos níveis circulante de Ang II, e aumento da expressão do receptor AT1 (Phillips e Oliveira, 2008). Além disso, muitos órgãos são capazes de produzir a Ang II e a maioria dos tecidos expressam seus receptores para esse peptídeo. Portanto a Ang II pode ser considerado um peptídeo envolvido em várias funções regulatórias no organismo incluindo a reação de estresse (Saavedra e Benicky, 2007).

Considerando o SRA tecidual no encéfalo, componentes funcionais do SRA (angiotensinogênio, peptidases, angiotensinas, e proteínas receptoras específicas) foram descritos e têm sido cada vez mais estudados expandindo o elenco das possíveis funções desse sistema, onde a Ang II também pode ser considerada como um neurotransmissor ou neuromodulador ativando receptores AT1 e receptores AT2 em várias regiões do encéfalo (Wright e Harding, 2013).

Nesse contexto, estudos clínicos têm evidenciado o envolvimento do SRA nas doenças relacionadas ao estresse (Yang *et al.*, 1996). Em estudos clínicos têm sido observado que a inibição ou bloqueio do receptor AT1, além de prevenir o desenvolvimento da aterosclerose e danos vasculares decorrentes da hipertensão (Brosnan *et al.*, 2002; Schulman *et al.*, 2006), aumenta o bem estar e a qualidade de vida de pacientes hipertensos (Weber, 2005), e diminui a depressão e ansiedade em pacientes diabéticos (Pavlatou *et al.*, 2008). Ainda, antagonistas de receptor AT1 e inibidores da ECA melhoram o humor promovendo bem estar (Dahlöf *et al.*, 1997), aumentam a eficácia dos antidepressivos (Hertzman *et al.*, 2005), e diminuem a ansiedade e depressão em pacientes normotensos (Braszko *et al.*, 2003).

Além disso, alterações do aprendizado e memória induzidas pelo também parecem envolver ações do SRA. O uso de medicamentos inibidores da ECA promoveu melhora no aprendizado e memória (Amenta *et al.*, 2002; Wyss *et al.*, 2003), e esses efeitos parecem não estar associados aos efeitos vasculares na região cerebral, uma vez que pacientes tratados com β bloqueadores não apresentaram melhora cognitiva, sugerindo que o SRA central poderia modular a função cognitiva (Amenta *et al.*, 2002).

Contudo os organismos podem expressar diferentes respostas adaptativas de acordo com o ambiente em que vivem, e cientistas têm reconhecido uma importante associação entre a intervenção ambiental (suporte emocional/social e/ou toque), saúde e bem estar, mostrando que ações não farmacológicas tornam-se importantes para melhorar a qualidade de vida do indivíduo. O suporte social é definido como assistência e proteção atribuída ao próximo, o qual envolve cuidado, amor e confiança (Langford *et al.*, 1997), e pode representar um importante fator efetivo que auxilia o indivíduo a enfrentar situações estressantes (Sherman *et al.*, 2009). Nos seres humanos, a interpretação de cada pessoa ao toque, massagem e contexto social pode ser diferente, resultando em diferentes respostas. A percepção pessoal do toque, em promover o bem-estar, e da qualidade do ambiente, em que o indivíduo está inserido, pode ser influenciada por experiências prévias, emoção, gênero, idade, cultura, espiritualidade e costumes religiosos (Gomes *et al.*, 2008). Neste contexto, estudos em animais podem ajudar a esclarecer os mecanismos fisiológicos envolvidos nos

efeitos protetores do suporte social, pois em modelos animais é possível controlar esses outros fatores.

Diversos modelos animais têm sido utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos deletérios desencadeados pelo estresse crônico, e nos efeitos positivos desencadeados pelo tipo de ambiente em que esse animal está inserido, complementando os estudos clínicos e epidemiológicos.

Para o estudo do estresse, o protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) tem sido aplicado a ratos e camundongos. Esse modelo é caracterizado pela exposição alternada a diferentes estressores, o que impede a adaptação do animal aos estímulos estressores, resultando na elevação mantida da concentração de corticosterona e estado de anedonia, evidenciado pela diminuição da preferência por solução doce (Moreau, 1997; Willner, 2005). Como estes efeitos são cancelados por antidepressivos tricíclicos e agonistas de receptores 5HT_{1c}, a indução de anedonia por ECMI constitui um modelo com validade preditiva para estudos de mecanismos envolvidos na depressão (Moreau, 1997; Willner, 2005).

Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa mostraram que o ECMI induziu supersensibilidade ao efeito vasoconstritor da fenilefrina em anéis aórticos com endotélio intacto, hipertrofia da camada aórtica média e íntima, aumento da concentração sanguínea de triglicérides e colesterol total e do índice aterogênico, quando comparado ao grupo controle, indicando que a aplicação do ECMI induziu disfunção endotelial e mudanças fisiológicas e morfológicas associadas ao desenvolvimento de aterosclerose (Neves *et al.*, 2009; 2012). Além disso, o protocolo de ECMI aumentou a atividade da renina e da ECA circulantes, da ECA na aorta torácica e as concentrações plasmáticas de Ang II e Ang 1-7 (Sanches, 2011).

Com relação à intervenção ambiental por meio da estimulação tátil, em que o animal é manipulado, tocado cuidadosamente e acariciado, pode influenciar o comportamento exploratório (Rebouças e Schmidek, 1997), diminuir a ansiedade (Aulich *et al.*, 1974; Schmitt e Hiemke, 1998; Costa *et al.*, 2012) e melhorar o aprendizado e memória (Bohacek and Daniel, 2007; Costa, 2012) de roedores. O enriquecimento ambiental, modelo experimental em que os animais são mantidos em gaiolas que permitem interação

social e com objetos que proporcionam a estimulação sensorial e motora (Rosenzweig e Bennett, 1996; Segovia *et al.*, 2009), também pode promover alterações plásticas em diferentes áreas do cérebro resultando em alterações comportamentais e cognitivas (Widman e Rosellini, 1990; Gaulke *et al.*, 2005), além de diminuir a ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado (Fernandez-Teruel *et al.*, 1997; Chapillon *et al.*, 1999, Leal-Galicia *et al.* 2007) e no teste do campo aberto (Brenes Sáenz *et al.*, 2006).

A exposição ao ambiente enriquecido foi capaz de prevenir déficit na memória de reconhecimento causado pelo envelhecimento e reduzir a ansiedade em novo ambiente em ratos Wistar (Leal-Galicia *et al.*, 2008). Ao mesmo tempo foi capaz de aumentar a neurogênese e a expressão de marcadores sinápticos no hipocampo sugerindo um efeito favorável na memória e emocionalidade relacionados à elevação da taxa de produção de neurônios e aumento na plasticidade sináptica que pode contribuir com o aumento da função neuronal no hipocampo (Leal-Galicia *et al.*, 2008).

Frente ao estímulo estressor, ratos expostos ao ambiente enriquecido apresentam menor resposta de medo e ansiedade e menor resposta neuroendócrina em relação aos animais controles (Fernández-Teruel *et al.*, 2002). Esses dados sugerem que animais alojados em ambiente enriquecido possuem melhor habilidade de adaptação a situações estressoras (Moncek *et al.*, 2004). O enriquecimento ambiental pode tornar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) mais adaptativo e eficiente (Mohammed *et al.*, 1993; Larsoon *et al.*, 2002) diminuindo o nível de corticosterona liberado em resposta ao estresse (Francis *et al.*, 2002; Welberg *et al.*, 2006). Nesse contexto, Chen *et al.* (2010) demonstraram que enriquecimento ambiental preveniu o déficit de memória espacial causado pelo estresse crônico por restrição em camundongos avaliados no teste do labirinto em Y.

Considerando as evidências de que o estresse crônico pode estar associado a alterações comportamentais, que a qualidade do ambiente pode interferir nessas alterações e que o SRA pode estar envolvido em alterações comportamentais, torna-se importante estudar os efeitos da intervenção ambiental (estimulação tátil e enriquecimento ambiental) sobre as respostas desencadeadas pelo estresse crônico moderado e imprevisível, bem como esclarecer possíveis mecanismos fisiológicos envolvidos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da intervenção ambiental, por meio da estimulação tátil (manipulação) ou enriquecimento ambiental, sobre as respostas hormonais e comportamentais de ratos jovens, induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) e a participação do sistema renina-angiotensina (SRA) hipotalâmico.

2.2. Objetivos Específicos

Experimento 1: Estudar os efeitos da manipulação e do enriquecimento ambiental, em ratos submetidos ou não ao ECMI, avaliando:

- a. as concentrações séricas de corticosterona e plasmáticas de catecolaminas;
- b. o desenvolvimento de anedonia e desamparo aprendido, sintomas análogos à depressão humana, pela análise das respostas comportamentais ao teste do consumo de sacarose e teste de natação forçada, respectivamente;
- c. o nível de ansiedade e atividade locomotora pela análise das respostas comportamentais ao teste do labirinto em cruz elevado;
- d. o aprendizado e memória pela análise das respostas comportamentais ao teste do labirinto em Y;
- e. as concentrações hipotalâmicas da angiotensinas I, II, 1-7 e IV.

Experimento 2: Estudar se os efeitos da Ang II, mediados pelo receptor AT1, estão envolvidos nas respostas hormonais e no prejuízo cognitivo induzido pelo ECMI, avaliando em ratos controles e estressados, tratados ou não com um antagonista do receptor AT1, losartan:

- a. as concentrações séricas de corticosterona;
- b. o desenvolvimento de desamparo aprendido, sintoma análogo à depressão humana, por análise das respostas comportamentais ao teste de natação forçada;
- c. o aprendizado e memória por meio das respostas comportamentais ao teste do labirinto em Y;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Nesse estudo foram realizados dois experimentos, nos quais foram utilizados 108 ratos machos Sprague-Dawley SPF ("specific pathogen free"), com dois meses de idade no início do período experimental, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciências em Animais de Laboratório - UNICAMP (CEMIB). Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, alojados em gaiolas individuais com maravalha autoclavada, em estante ventilada para ratos Alesco®, em sala climatizada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), e com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 06h00min). A entrada no biotério foi rigorosamente controlada, permitida apenas para o experimentador responsável pelo projeto, vestido adequadamente com avental, luvas, máscara e proteção para os pés.

3.2. Delineamento experimental

3.2.1. Experimento 1

No experimento 1, os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n=12):

1. controle (sem intervenção; sem estresse) = C
2. estresse (sem intervenção) = E
3. manipulação (sem estresse) = M
4. manipulação + estresse = M + E
5. enriquecimento ambiental (sem estresse) = EA
6. enriquecimento ambiental + estresse = EA + E

Após uma semana de adaptação ao biotério, os animais foram analisados durante 7 semanas e receberam ração e água *ad libitum* (Figura 1). Os estressores foram aplicados nas semanas 3, 4 e 5, segundo o modelo de ECMI (Tabela 1). Nesse estudo a intervenção ambiental foi realizada através da estimulação tátil (manipulação) ou enriquecimento ambiental da gaiola. A manipulação foi realizada 5 dias/semana durante 7 semanas, com exceção dos dias em que foram realizados os testes comportamentais na 6ª semana, e

consistia em manipular o animal por 5 min, através do toque com movimentos suaves na região dorsal. Animais do grupo enriquecido foram colocados na gaiola com enriquecimento ambiental 2 horas/dia, 5 dias/semana durante 7 semanas, com exceção dos dias em que foram realizados os testes comportamentais na 6ª semana. Vinte e quatro horas após o final do protocolo de ECMI, na 6ª semana, iniciou-se os testes comportamentais na seguinte ordem: teste preferência a sacarose 1%, teste do labirinto em cruz elevado (LCE), teste do labirinto em Y e teste de natação forçada (TNF) com um intervalo de 24 horas entre cada teste. Os testes comportamentais foram analisados pelo software Etho Vision® XT 4.1. Quinze dias após o final do protocolo de ECMI, os animais foram mortos por decapitação para coleta de sangue e tecido. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA nº 2384-1) e estão de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (ANEXO 1).

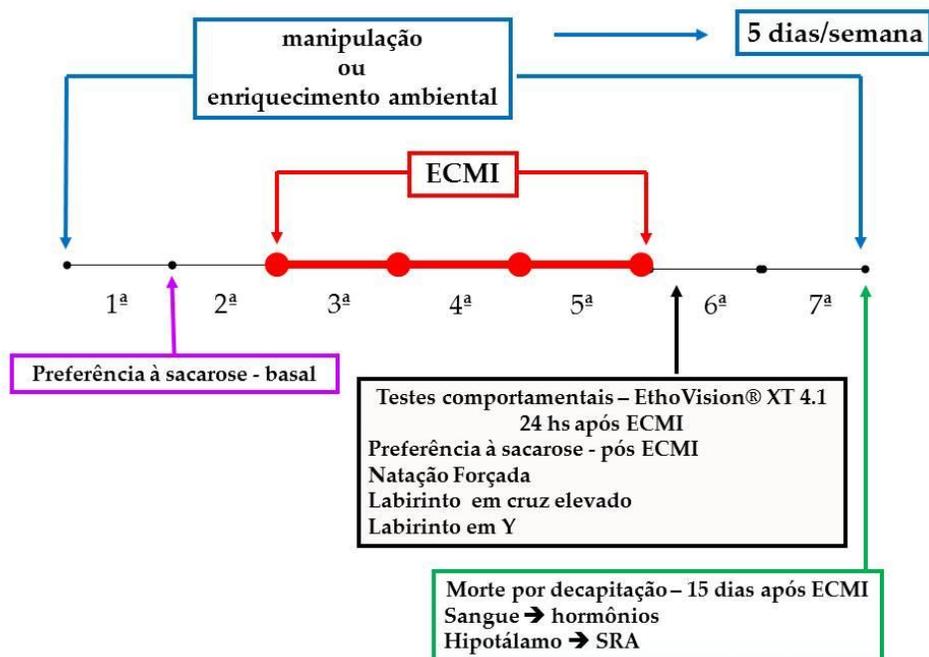


Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental – Experimento 1
Fonte: autoria própria

3.2.2. Experimento 2

No experimento 2, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=9):

1. controle = C
2. losartan na água de beber = L
3. estresse = E
4. estresse + losartan na água de beber = E + L

Após uma semana de adaptação ao biotério, os animais foram analisados durante 7 semanas e receberam ração e água *ad libitum* (Figura 2). Nos grupos tratados com losartan, esse antagonista de receptor AT 1 foi administrado na água de beber (50mg/Kg/dia), em volume aproximado ao consumo hídrico diário determinado em estudo realizado anteriormente, bem como solução de NaCl 1%, para inibir a secreção de renina sem alterar a pressão arterial (Ronchi, 2006). Os estressores foram aplicados nas semanas 3, 4 e 5, segundo o modelo de ECMI (Tabela 1). Vinte e quatro horas após o final do protocolo de ECMI, na 6ª semana, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em Y e ao TNF. Quinze dias após o final do estresse, os animais foram mortos por decapitação para coleta de sangue. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (Protocolo CEEA nº 1973-1) e estão de acordo com as normas do CONCEA (ANEXO 2).

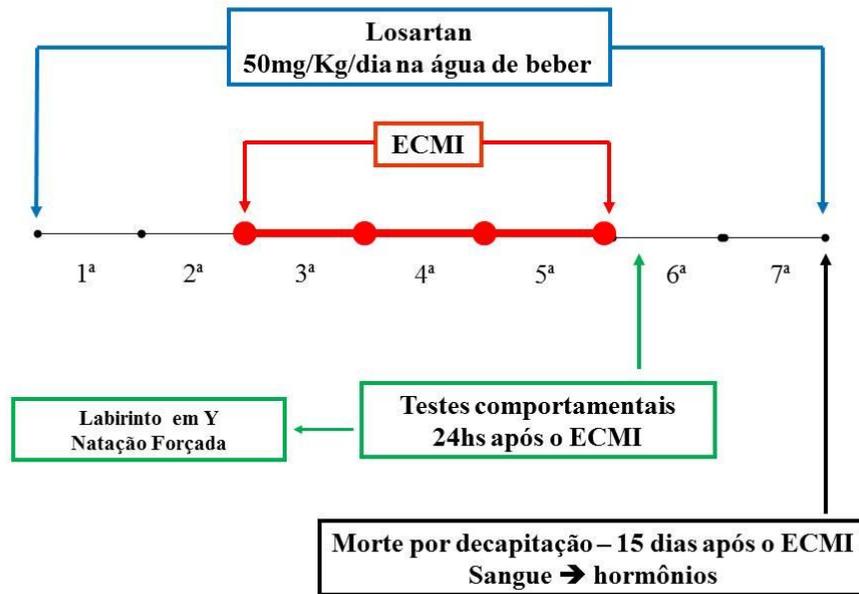


Figura 2. Fluxograma do delineamento experimental – Experimento 2
 Fonte: autoria própria

3.3. Protocolo de Estresse

Nas semanas 3, 4, e 5 do período experimental, os animais foram submetidos ao protocolo de ECMI, modificado de acordo com (Neves *et al.*, 2009) a partir da metodologia descrita por (Moreau, 1997). O protocolo de ECMI consistiu na aplicação de diferentes estímulos estressores ao longo de 7 dias, repetindo-se os procedimentos por 3 semanas consecutivas (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível.

	Manhã	Tarde
Segunda-feira	8:00 - 9:00 h: Imobilização	13:00 - 14:00 h: Imobilização 18:00 h: Iluminação contínua durante a noite
Terça-feira	8:00 - 9:00 h: Imobilização	14:00 - 15:00 h: Imobilização seguida de privação de água e comida durante 17 horas.
Quarta-feira	8:00 - 10:00 h: Acesso restrito a comida por 2 horas.	13:00 - 14:00 h: Imobilização seguida de privação de água durante 18 horas.
Quinta-feira	8:00 - 10:00 h: Exposição a garrafas de água vazias. 11:00 - 12:00 h: Imobilização	14:00 - 15:00 h: Imobilização seguida de alojamento em gaiola com maravalha úmida.
Sexta-feira	8:00 - 9:00 h: Imobilização	18:00 h: Ciclo claro/escuro invertido até segunda-feira

Os animais foram imobilizados por um período de 1 hora, durante o qual os mesmos foram privados de água, alimento e impedidos de se movimentarem (Neves *et al.*, 2009). O procedimento foi realizado utilizando-se tubos de polietileno permitindo a imobilização pelo ajuste do tubo ao corpo do animal.

3.4. Sessão de estimulação tátil (manipulação)

Durante todo o protocolo experimental, os animais foram submetidos, de segunda a sexta-feira, entre 16 e 18 horas à sessão de estimulação tátil a qual foi denominada de manipulação. A experimentadora manipulou cada animal durante 5 minutos. A manipulação consiste em tocar no animal cuidadosamente, onde a experimentadora acaricia e interage com o animal fazendo movimentos suaves e delicados na região do pescoço e das costas (Costa *et al.*, 2012). A experimentadora, com o polegar, realizou movimentos no sentido da cabeça a cauda na região dorsal do animal, acariciando-os lenta e suavemente (Weininger, 1954) com luvas nitrílicas, para evitar influência dos odores de outros materiais, (p. ex. látex), no comportamento do animal (Figura 3). A sessão de manipulação

não foi realizada nos dias em que os animais foram submetidos aos testes comportamentais, durante a 6ª semana.



Figura 3. Sessão de estimulação tátil
Fonte: autoria própria

3.5. Enriquecimento ambiental

A exposição ao ambiente enriquecido foi realizada durante 7 semanas, 5 dias por semana, 2 horas por dia, em grupos de 6-8 animais (Figura 4) (Pereira *et al.*, 2009). O ambiente enriquecido foi constituído de uma gaiola medindo (40 cm de largura × 60 cm de comprimento × 90 cm de altura), com três pisos, rampas, rodas e vários objetos com diferentes formas e texturas (Widman e Rosellini, 1990; Pereira *et al.*, 2009). Os objetos no interior da gaiola foram alterados uma vez por semana. A sessão de enriquecimento ambiental não foi realizada nos dias em que os animais foram submetidos aos testes comportamentais, durante a 6ª semana.



Figura 4. Gaiola onde os animais foram expostos ao ambiente enriquecido
Fonte: autoria própria

3.6. Teste de preferência à sacarose

A preferência à sacarose em ratos foi testada com o objetivo de avaliar se houve o desenvolvimento de anedonia. Foram realizadas duas medidas, uma medida basal (antes do protocolo de ECMI) e uma medida na sexta semana (após o protocolo de ECMI). No dia do teste todos os animais ficaram privados de água e comida durante 20 horas. Cada rato recebeu duas garrafas de água, uma contendo solução de sacarose a 1% e outra contendo água filtrada. A posição das garrafas foi determinada aleatoriamente. Após 1 hora de exposição, a quantidade consumida de cada líquido foi determinada por meio da pesagem das garrafas e a preferência pela sacarose foi calculada ($100 \times \text{consumo de sacarose} / \text{consumo total de líquido}$) (Grippe *et al.*, 2005).

3.7. Análises comportamentais - programa Etho Vision® XT 4.1

Para fazer as análises dos testes comportamentais dos itens a seguir 3.7, 3.8 e 3.9, foi utilizado o programa EthoVision® XT 4.1 Software Leesburg, VA - EUA desenvolvido por Noldus, Netherlands – licença número EV041-05033. O EthoVision XT é um software de monitoramento que, por meio da imagem de uma câmera de vídeo, monitora e analisa o movimento e a atividade de cada animal (Figura 5B).

3.8. Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do LCE foi realizado para avaliar comportamento relacionado à ansiedade em animais de laboratório. O LCE foi construído em madeira e encapado com papel “contact” preto e consistiu de dois braços abertos (50 cm de comprimento x 10 cm de largura) e dois braços fechados (50 cm de comprimento x 10 cm de largura, com paredes de 40 cm de altura) que se estendiam de uma plataforma central elevada a 50 cm acima do chão (Figura 5A) (Pellow *et al.*, 1985; Marcondes *et al.*, 2001). Nos braços abertos não havia paredes, apenas uma borda circundante (1 mm de largura x 5 mm de altura) para evitar que os ratos caíssem. Cada animal foi submetido somente uma vez a este teste comportamental e foi observado durante 5 minutos. O labirinto foi limpo com álcool 70% entre cada animal avaliado.

O comportamento de cada animal foi analisado pelo programa Etho Vision® XT 4.1, o qual registrou o movimento de cada animal e quantificou o número de entradas e tempo de permanência em cada um dos braços do labirinto. Posteriormente, as seguintes medidas foram calculadas e/ ou avaliadas: porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos ($100 \times \text{tempo (s) nos braços abertos} / \text{tempo total (s) de observação}$), porcentagem de entradas nos braços abertos ($100 \times \text{n}^\circ \text{ de entradas nos braços abertos} / \text{n}^\circ \text{ total de entradas}$), n° de entradas feitas nos braços fechados, n° total de entradas e distância percorrida. No teste do LCE, a porcentagem de tempo nos braços abertos foi interpretada como um índice de medo e ansiedade, enquanto que o número de entradas nos braços fechados e distância percorrida corresponderam a índices de atividade locomotora (Pellow *et al.*, 1985; Cruz *et al.*, 1994; Burghardt e Wilson, 2006). A porcentagem de entradas nos braços abertos e total de entradas foi relacionada tanto com a atividade locomotora quanto à ansiedade (Cruz *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 2012).

A



B

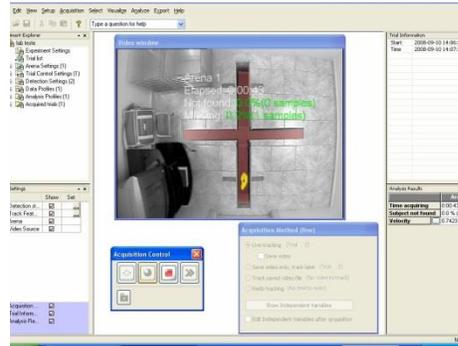


Figura 5. Labirinto em cruz elevado (A), imagem da captada pelo Etho Vision® XT 4.1 (B)
Fonte: autoria própria

3.9. Avaliação do aprendizado e memória no labirinto em Y

Para avaliação de aprendizado e memória, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em Y (Conrad *et al.*, 1996). O labirinto em Y foi constituído de madeira com três braços idênticos (50 cm de comprimento x 16 cm de largura x 32 cm de altura) (Figura 6). Os três braços foram designados como: “início”, “novo” e “conhecido”. Para realizar o teste foram utilizadas sinalizações visuais extra-labirinto (cartazes na parede), os quais foram colocados ao redor do labirinto e acima do topo das laterais de madeira permitindo a orientação espacial, não foram utilizados sinais visuais no interior do labirinto (Conrad *et al.*, 1996).



Figura 6. Labirinto em Y
Fonte: autoria própria

O teste foi realizado em duas sessões, na primeira sessão um dos braços foi bloqueado (“novo”) e o animal explorou os outros dois braços durante 15 minutos. Quatro horas depois foi realizada a segunda sessão, o braço bloqueado se tornou acessível e o animal explorou durante 5 minutos. Em ambas as sessões o animal foi colocado no braço início virado para a parede para iniciar o teste. Para evitar que os ratos utilizassem sinais localizados no interior do labirinto, o aparato foi limpo com álcool a 70% entre cada rato avaliado e o labirinto foi rotacionado de forma que as denominações de cada braço referiram-se à localização do braço em relação à sua localização na sala e não ao braço real (Conrad *et al.*, 1996; Conrad, 2006).

O comportamento de cada animal foi analisado pelo programa Etho Vision® XT, o qual registrou o movimento de cada animal e quantificou o número de entradas e tempo de permanência em cada um dos braços do labirinto. Em seguida foi calculado o total de entrada, % de entrada nos braços “novo” e “conhecido”, % de tempo nos braços “novo” e “conhecido” onde a memória espacial intacta foi interpretada quando o animal teve preferência pelo braço “novo” uma vez que os ratos têm tendência inata de explorar novidade (Conrad, 2006). Posteriormente, analisada a preferência pelo braço novo em relação ao braço conhecido calculando a preferência de entrada ($\% \text{ de entradas no braço novo} - \% \text{ entradas no braço conhecido}$) e a preferência em tempo ($\% \text{ de tempo no braço novo} - \% \text{ tempo no braço conhecido}$) (Kleen *et al.*, 2006; Baran *et al.*, 2010).

Neste teste, os ratos que reconheceram e escolheram o braço novo mais do que o braço conhecido foram definidos como tendo memória espacial intacta, enquanto que os ratos que entraram nos braços novo e conhecido de forma semelhante foram considerados como tendo a memória espacial prejudicada (Conrad *et al.*, 1996; Conrad, 2006).

3.10. Teste da natação forçada

Para o TNF, os animais foram submetidos, individualmente, à natação em um tanque de acrílico (20 cm de comprimento x 20 cm de largura x 50 cm altura) com uma coluna de 30 cm de água a 25 °C (Figura 7).



Figura 7. Tanque utilizado para TNF
Fonte: autoria própria

O TNF foi realizado em duas sessões, na primeira sessão os animais foram submetidos a 15 minutos de natação. Vinte e quatro horas após, os animais foram novamente submetidos à natação nas mesmas condições, durante 5 min. Imediatamente após cada sessão de natação, os animais foram retirados da água, secos com uma toalha e mantidos próximos a um aquecedor de ambiente e somente retornaram ao biotério após estarem completamente secos. O comportamento de cada animal foi analisado pelo programa Etho Vision® XT 4.1, o qual analisou o tempo de imobilidade durante a segunda sessão – definido pelo software como alteração de área do objeto abaixo de 11% (Porsolt *et al.*, 1977; Detke *et al.*, 1995 ; Calil e Marcondes, 2006). Nesse teste, o tempo de imobilidade foi interpretado como desamparo aprendido sendo análogo ao estado de depressão humana (Porsolt *et al.*, 1977).

3.11. Obtenção das amostras

Quinze dias após o final do protocolo de ECMI, os animais foram mortos por decapitação (Holson, 1992) sem anestesia prévia para evitar o aumento da corticosterona devido à anestesia (Vahl *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2012). O sangue foi coletado em tubos com anticoagulante para obtenção do plasma e sem anticoagulante para obtenção do soro. O cérebro foi isolado e imediatamente congelado em gelo seco. As amostras de plasma, soro e cérebro ficaram armazenadas em freezer $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem analisadas.

3.12. Dosagem de corticosterona

A determinação da concentração sérica de corticosterona foi realizada por ensaio enzimático colorimétrico, utilizando-se o kit comercial Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (Assay Designs[®], Ann Arbor, MI, USA); com sensibilidade de 0.027 ng/mL, com coeficiente de variação intra-ensaio de 7.7% e inter-ensaio 9.7%.

3.13. Quantificação plasmática de catecolaminas

A análise das angiotensinas foi realizada em colaboração com a Dra. Dulce Elena Casarini no Laboratório de Rim e Hormônios da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). O sangue foi imediatamente centrifugado após a coleta, o plasma foi separado e armazenado em freezer -70° até o dia da análise. O plasma foi submetido à purificação, em seguida a análise da amostra purificada foi realizada em HPLC de acordo com método validado anteriormente por Di Marco *et al.* (2003). Resumidamente, a separação isocrática foi obtida utilizando uma coluna de fase reversa Spheri-5 ODS (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), fluido com a seguinte fase móvel: fosfato dibásico de sódio (20 mmol/L), ácido cítrico (20 mmol/L), pH 2.64, contendo 10% de metanol, Tris-EDTA (0,12 mmol/L) e ácido heptano (566 mg/L). A taxa de fluxo foi de 0,8 mL/minuto durante 25 minutos. A quantificação de aminas foram realizadas comparando as áreas dos picos de amostras com a área do padrão, usando a dihydroxybenzylamine como um padrão interno. A concentração de monoamina foi expressa em pg/mL. (Di Marco *et al.*, 2003).

3.14. Quantificação das angiotensinas no hipotálamo

A análise das angiotensinas foi realizada em colaboração com a Dra. Dulce Elena Casarini no Laboratório de Rim e Hormônios da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). A região hipotalâmica foi isolada rapidamente isolada e congelada em gelo-seco, posteriormente, as amostras foram armazenadas em freezer -70° até o dia da análise. Os níveis de Ang I, Ang II, Ang 1-7 e Ang IV foram determinados por HPLC de acordo com método validado anteriormente por Ronchi *et al.* (2007). O hipotálamo isolado foi pesado e homogeneizado em tampão fosfato (100 mM, pH 7.2) contendo um coquetel de inibidores

de proteases (miniComplete, Roche, USA). Os homogenatos foram preparados para serem analisados por HPLC de acordo com Gouveia *et al.* (2012). Resumidamente, a separação isocrática foi realizada em uma coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250mm x 4,6 mm x 7µm), fluido com a seguinte fase móvel: 95% acetonitrila em ácido trifluoroacético 0,1%. A taxa de fluxo foi de 1,5 mL/minuto durante 40 minutos. As angiotensinas foram quantificadas comparando as áreas de picos de amostras com a área do padrão, utilizando a xx como padrão interno. Os resultados foram expressos em ng/mL e corrigida pelo peso do tecido. (Ronchi *et al.*, 2007; Gouveia *et al.*, 2012).

3.15. Análise estatística

Para análise estatística foi utilizada Análise de Variância Bifatorial (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas de média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Para avaliar se houve diferença na exploração entre o braço novo comparado ao braço conhecido durante o teste do labirinto em Y foi utilizado o teste de Wilcoxon não paramétrico com nível de significância 5%. Os resultados foram apresentados como médias \pm erros-padrão das médias.

4. RESULTADOS

O ECMI induziu aumento significativo da concentração plasmática de corticosterona, adrenalina e noradrenalina em relação aos grupos não estressados, porém este aumento foi menor nos grupos submetidos à manipulação e ao enriquecimento ambiental ($p < 0,05$; Figura 8A, 8B e 8C). A concentração plasmática de dopamina foi maior no grupo submetido a estresse, comparado aos animais sem estresse ($p < 0,05$; Figura 8D). Este efeito do estresse não foi observado nos grupos submetidos à manipulação e ao enriquecimento ambiental ($p > 0,05$; Figura 8D).

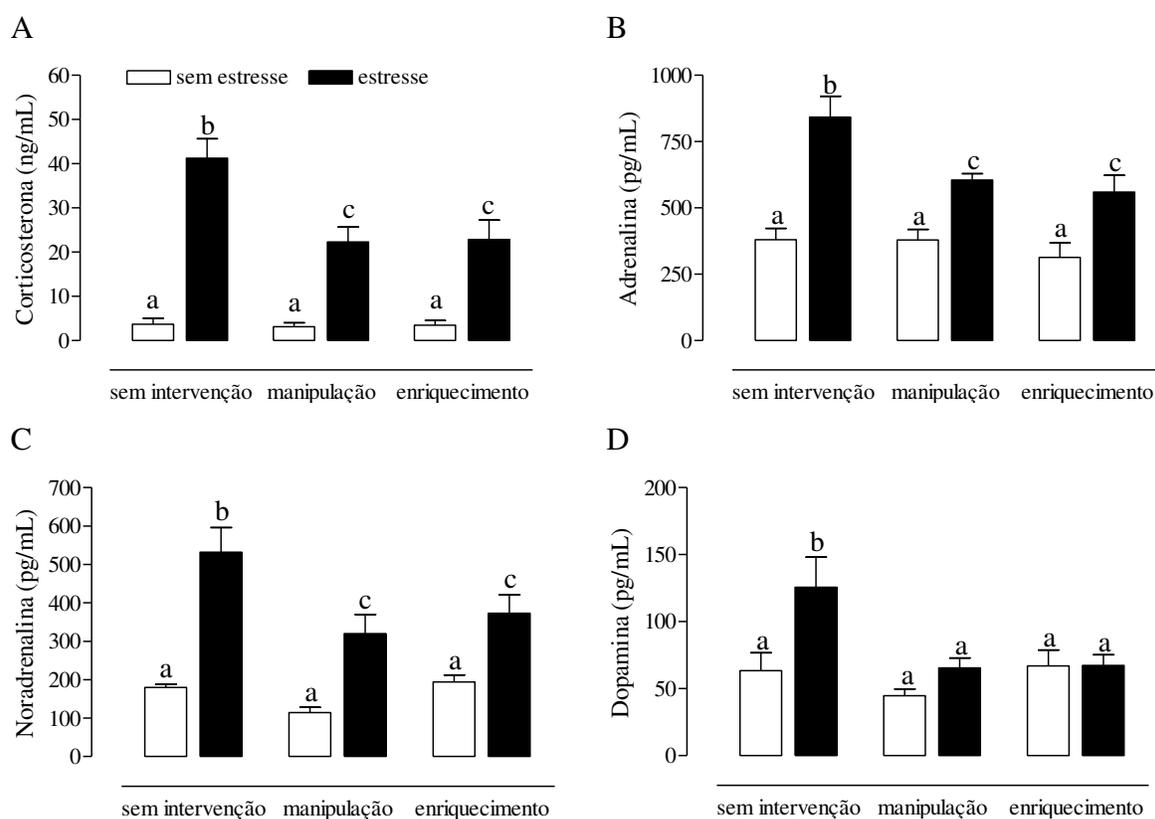


Figura 8. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre as concentrações séricas de corticosterona (A) e plasmática de adrenalina (B), noradrenalina (C) e dopamina (D). N=10. Os valores estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam grupos diferentes entre si (ANOVA bifatorial seguido de Tukey; $p < 0,05$).

No teste de preferência à sacarose, não houve diferença entre os valores basais entre os grupos estudados ($p > 0,05$; Figura 9). Na 6ª semana, o grupo estresse sem intervenção apresentou menor preferência pela sacarose em relação aos animais sem estresse e em relação ao seu valor basal ($p < 0,05$; Figura 9). Nos grupos submetidos à manipulação e ao enriquecimento ambiental, o estresse não promoveu redução significativa da preferência pela sacarose, em relação aos grupos não estressados e em relação aos seus valores basais ($p > 0,05$; Figura 9).

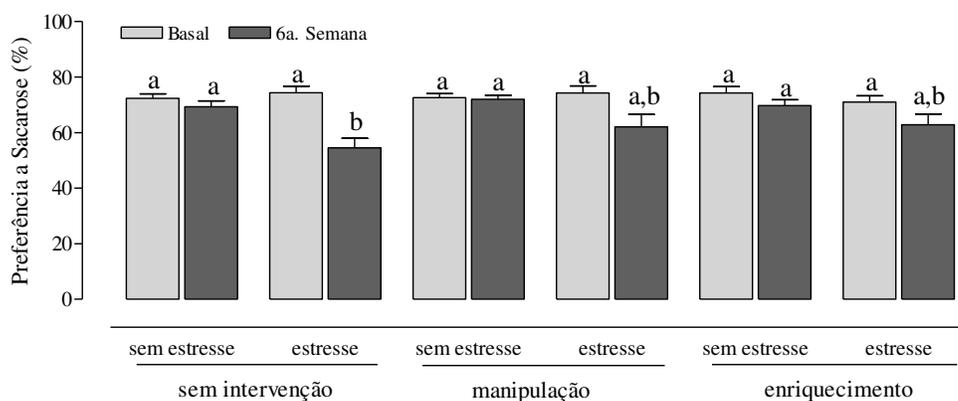


Figura 9. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre as respostas comportamentais ao teste de preferência pela sacarose. N=12. Os valores estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam grupos diferentes entre si (ANOVA bifatorial seguido de Tukey; $p < 0,05$).

No teste da natação forçada (TNF), os animais do grupo submetido a estresse apresentaram aumento no tempo de imobilidade em relação ao grupo sem estresse, nos grupo sem intervenção ambiental ($p < 0,05$; Figura 10). Em animais submetidos à manipulação, o grupo submetido ao ECMI apresentou maior tempo de imobilidade comparado ao grupo sem estresse, porém este tempo foi significativamente menor em relação ao grupo submetido a estresse sem intervenção ($p < 0,05$; Figura 10). Em animais submetidos ao enriquecimento ambiental, o ECMI não alterou o tempo de imobilidade no TNF, em relação ao grupo sem estresse ($p < 0,05$; Figura 10). Não houve efeito significativo do tratamento em animais sem estresse. Em animais estressados não houve

diferença entre os grupos submetidos à manipulação comparado ao enriquecimento ambiental ($p > 0,05$; Figura 10).

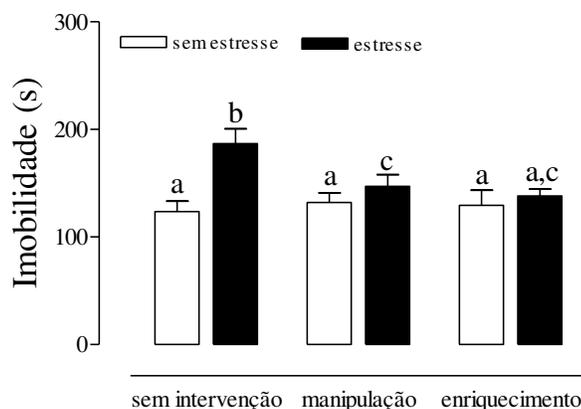


Figura 10. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre o tempo de imobilidade de ratos durante o TNF. N=12. Os valores estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam grupos diferentes entre si (ANOVA bifatorial seguido de Tukey; $p < 0,05$).

No teste do labirinto em cruz elevado (LCE), animais submetidos ao ECMI apresentaram aumento no número de entradas nos braços fechados, no número total de entradas e na distância percorrida ($p < 0,05$; Figura 11A, 11 B e 11C), sem apresentar efeito da manipulação ou enriquecimento nesses parâmetros ($p > 0,05$; 11A, 11 B e 11C). Tanto em animais sem estresse como em animais estressados, a manipulação e o enriquecimento ambiental aumentaram a porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e a porcentagem de entradas nos braços abertos ($p < 0,05$; Figura 11D e 11 E), sem alterar o número de entradas nos braços fechados, número total de entradas e distância movida ($p > 0,05$; 11A, 11 B e 11C).

No teste do labirinto em Y, em animais sem intervenção ambiental, o grupo não submetido a estresse apresentou maior porcentagem de entrada e de tempo no braço novo em comparação com os valores observados no braço conhecido. Por outro lado, no grupo submetido ao ECMI, não houve diferença entre a exploração do braço novo e do braço conhecido ($p > 0,05$; Fig. 12A e 12C). Em animais submetidos à manipulação e ao enriquecimento ambiental, tanto animais estressados como animais sem estresse, entraram

mais vezes e exploraram por mais tempo o braço novo comparado ao braço conhecido ($p < 0,05$; Figura 12A e 12C).

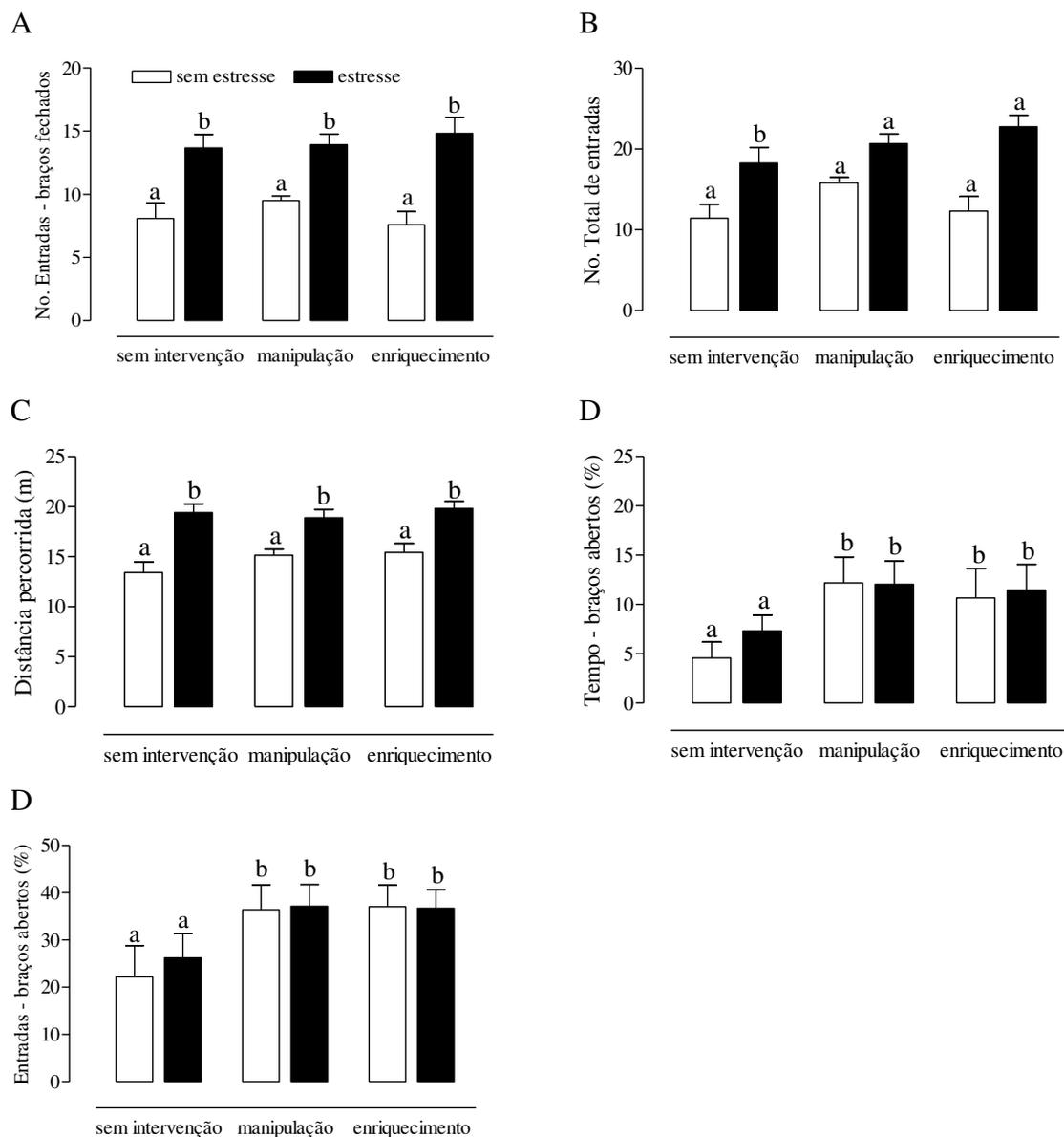


Figura 11. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre as respostas comportamentais ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado: número de entradas – braços fechados (A), número total de entradas (B), distância percorrida (C), % de tempo – braços abertos (D) e % de entradas – braços abertos (E) N=12. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si (Anova bifatorial seguido de Tukey; $p < 0,05$).

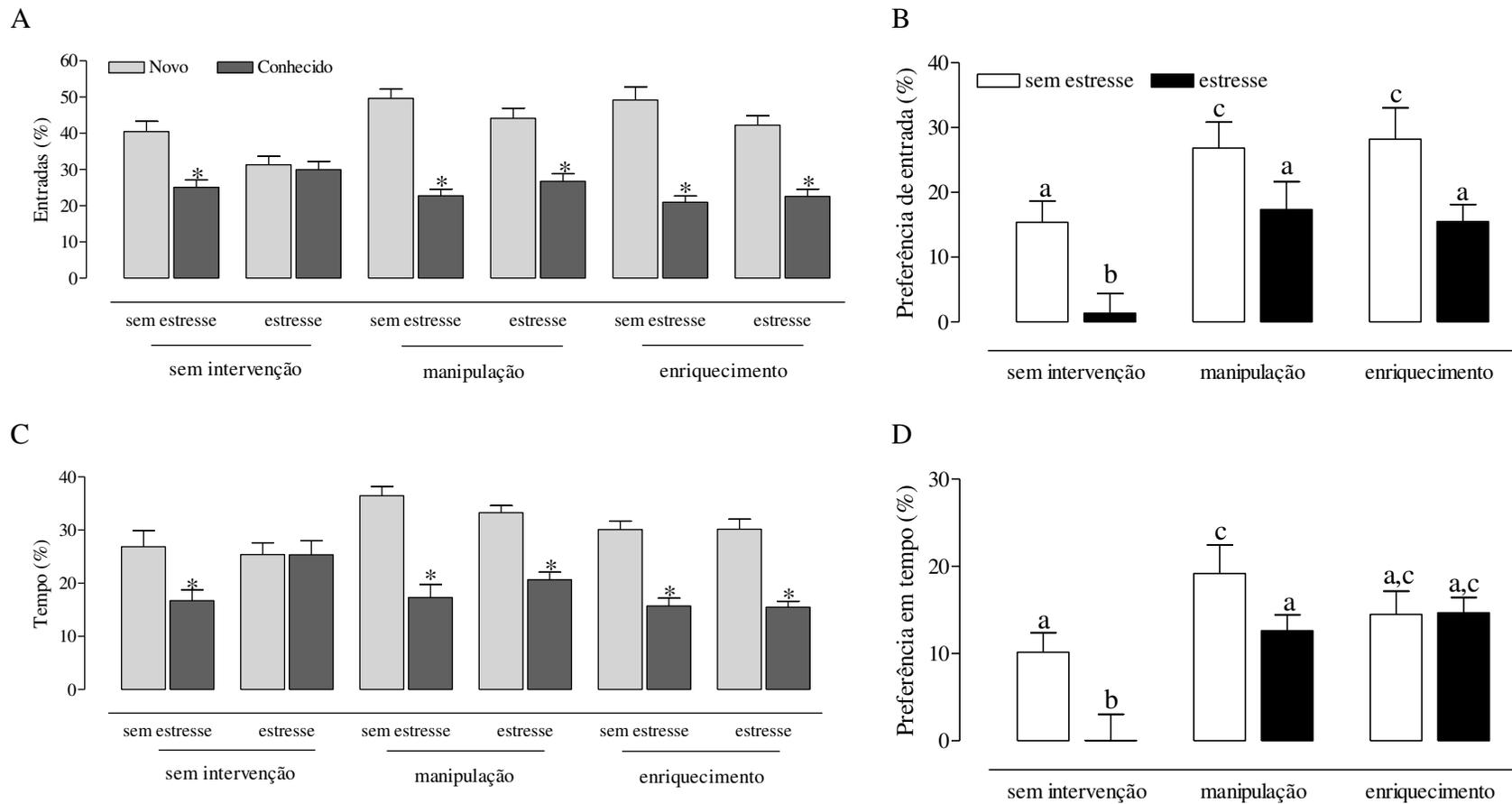


Figura 12. Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre as respostas comportamentais ao Teste de Labirinto em Y: % de entrada (A), preferência de entrada (% entrada no braço novo - % entrada no braço conhecido) (B), % de tempo (C), preferência em tempo (% tempo no braço novo - % tempo no braço conhecido) (D). N=12. *Diferença estatística em relação ao braço novo (teste de Wilcoxon não paramétrico; $p < 0,05$). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si (Anova bifatorial seguido de Tukey; $p < 0,05$).

Com relação à porcentagem de preferência de entradas (% entrada no braço novo - % entrada no braço conhecido), animais submetidos à manipulação e ao enriquecimento ambiental, a diferença entre os grupos estresse e sem estresse, foi menor em comparação com animais sem intervenção ($p < 0,05$; Figura 12B). Quanto à porcentagem de preferência em tempo (% tempo no braço novo - % tempo no braço conhecido), na manipulação a diferença entre os grupos estresse e não estresse foi menor em comparação com o grupo sem intervenção ($p < 0,05$; Figura 12D). Nos grupos submetidos ao enriquecimento ambiental, o ECMI não alterou este parâmetro ($p > 0,05$; Figura 12D).

Os animais estressados apresentaram aumento nas concentrações hipotalâmicas de Ang I e Ang IV em relação aos animais não estressados, sem efeito da intervenção ambiental ($p < 0,05$; Figura 13A e 13D). No grupo sem intervenção, animais submetidos a estresse apresentaram maior concentração hipotalâmica de Ang II em relação ao grupo sem estresse ($p < 0,05$; Figura 13B). Em animais manipulados, o grupo estressado também apresentou maior concentração de Ang II comparado ao grupo sem estresse, porém esta concentração foi significativamente menor em relação ao grupo estressado não submetido à intervenção ambiental (tratamento controle) ($p < 0,05$; Figura 13B). Em animais submetidos ao enriquecimento ambiental, não houve diferença entre o grupo estressado e o grupo não submetido a estresse ($p < 0,05$; Figura 13B). Não houve efeito da manipulação nem do enriquecimento ambiental nas concentrações hipotalâmicas de Ang I, Ang II e Ang IV em animais sem estresse ($p > 0,05$; Figura 13A, 13B e 13D). Não houve diferença das concentrações de Ang 1-7 no hipotálamo entre os grupos estudados ($p > 0,05$; Figura 13C).

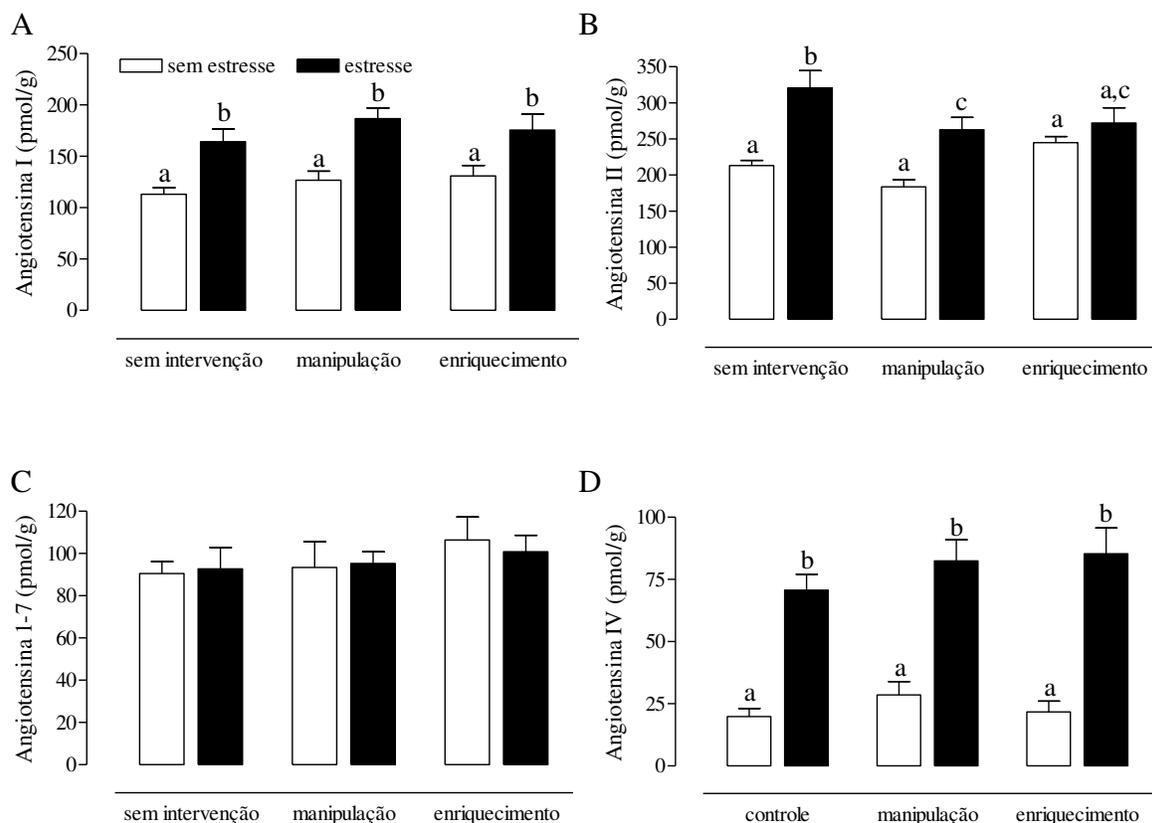


Figura 13: Efeito da manipulação e do enriquecimento ambiental em animais submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível sobre as concentrações hipotalâmicas de Ang I (A), Ang II (B), Ang 1-7 (C) e Ang IV (D). N=10. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si (Anova bifatorial seguido de Tukey; $p < 0,05$).

No experimento 2, houve aumento na concentração de corticosterona apenas no grupo submetido estresse (E), comparado aos grupos não estressado (controle – C), não estressado tratado com losartan (L) e estressado tratado com losartan (E + L) ($p > 0,05$; Figura 14).

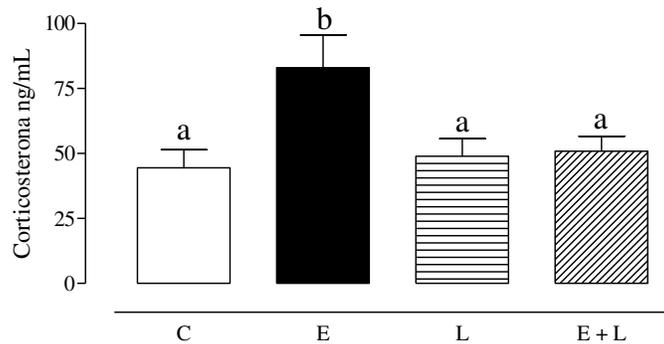


Figura 14. Concentrações séricas de corticosterona de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível, tratados ou não com losartan. N=9. Os valores estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam grupos diferentes entre si (ANOVA bifatorial seguido de Tukey; $p < 0,05$).

Houve um aumento no tempo de imobilidade no grupo E comparado aos demais grupos ($p > 0,05$; Figura 15).

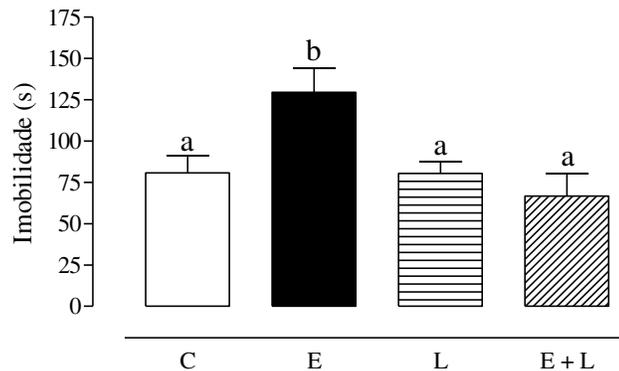


Figura 15. Tempo de imobilidade durante o TNF de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível, tratados ou não com losartan. N=9. Os valores estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam grupos diferentes entre si (ANOVA bifatorial seguido de Tukey; $p < 0,05$).

No teste do labirinto em Y, os animais dos grupos C, L e E + L entraram mais vezes e exploraram por mais tempo o braço novo comparado ao braço conhecido ($p < 0,05$; Figura 16A e 16C). No grupo E o número de entradas e o tempo de exploração foram similares entre o braço novo e o braço conhecido ($p > 0,05$; Figura 16A e 16C).

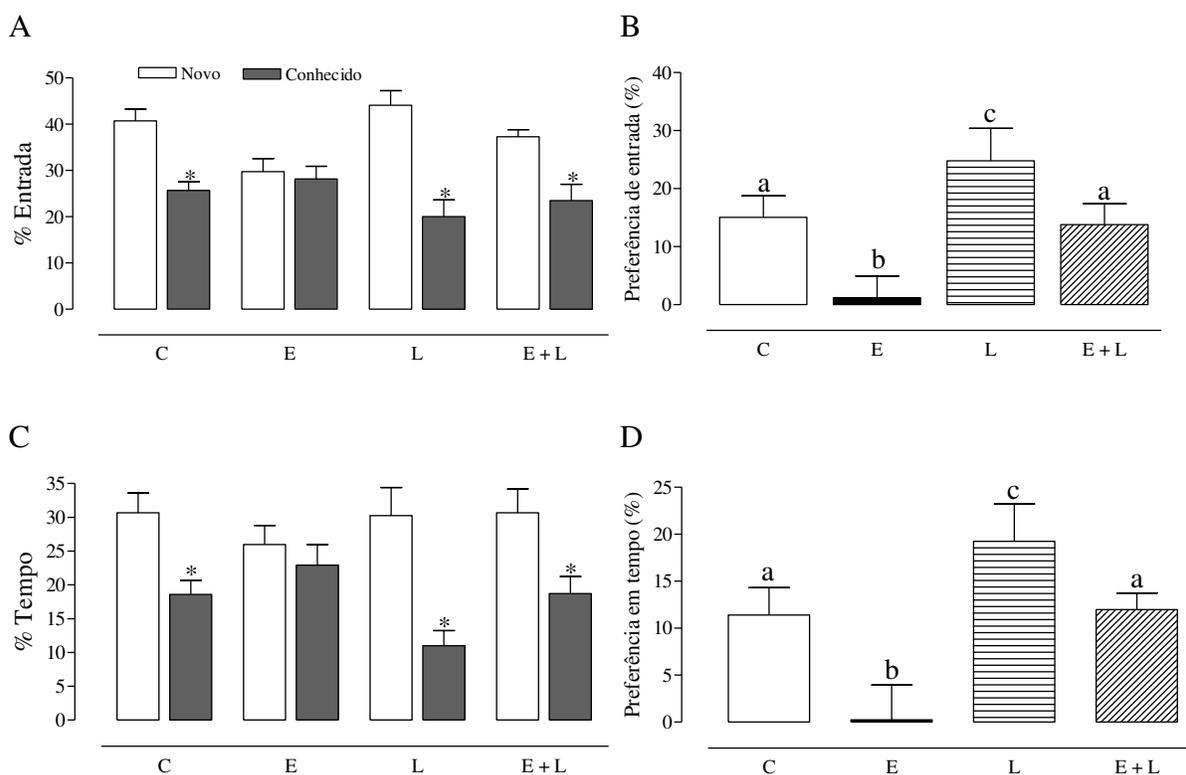


Figura 16. Repostas comportamentais ao Teste de Labirinto em Y: % de entrada (A), preferência de entrada (% entrada no braço novo - % entrada no braço conhecido) (B), % de tempo (C), preferência em tempo (% tempo no braço novo - % tempo no braço conhecido) (D) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível, tratados ou não com losartan. N=9. *Diferença estatística em relação ao braço novo (teste de Wilcoxon não paramétrico; $p < 0,05$). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si (Anova bifatorial seguido de Tukey; $p < 0,05$).

Na preferência de entrada (% entrada no braço novo - % entrada no braço conhecido), houve diminuição no grupo E em relação ao grupo C e no grupo E + L em relação ao grupo L ($p < 0,05$; Figura 16B). Além disso, no grupo L e E + L, a preferência de entrada foi maior comparado aos grupos C e L respectivamente ($p < 0,05$; Figura 16B). O mesmo ocorreu na preferência em tempo (% tempo no braço novo - % tempo no braço conhecido), houve uma diminuição no grupo E em relação ao grupo C e no grupo E + L em relação ao grupo L ($p < 0,05$; Figura 16D). Também, no grupo L e E + L a preferência em tempo foi maior comparado aos grupos C e L respectivamente ($p < 0,05$; Figura 16D).

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo a intervenção ambiental (manipulação ou enriquecimento ambiental) reduziu as respostas hormonais e respostas comportamentais associadas à depressão, e cancelou o prejuízo do aprendizado e memória induzidos pelo modelo de ECMI, em ratos adultos.

Os principais mediadores da resposta de estresse são os hormônios do eixo HHA e as catecolaminas, os quais são considerados como marcador biológico de estresse (McCarty *et al.*, 1988). Em estudos anteriores, observamos que, 15 dias após o final do protocolo de ECMI, a concentração de corticosterona permanecem aumentados em ratos (Neves *et al.*, 2009; Neves *et al.*, 2012). No presente estudo, 15 dias após o final do protocolo de ECMI, novamente foi demonstrado o aumento da concentração sanguínea de corticosterona, e mostramos que as concentrações sanguíneas de catecolaminas também estavam aumentadas, confirmando a efetividade do protocolo de estresse utilizado e evidenciando a não adaptação dos animais aos estímulos estressores.

Além disso, observamos que a manipulação e o enriquecimento ambiental reduziram a magnitude dessa resposta sugerindo que a intervenção ambiental pode modular o eixo HHA e a ativação simpática, reduzindo a resposta da adrenal frente ao estímulo estressor e diminuindo a ativação basal do SNS (Costa *et al.*, 2012), o que está de acordo com estudos de outros autores. Em animais submetidos à intervenção ambiental, por meio da exposição à gaiola de maiores dimensões, contendo pisos, rampas, rodas e vários objetos com diferentes formas e texturas, foi observada redução da concentração plasmática basal de corticosterona (Belz *et al.*, 2003; Grégoire *et al.*, 2014). E, após estresse agudo por restrição, as concentrações sanguíneas de corticosterona retornaram mais rapidamente ao basal (Konkle *et al.*, 2010), em comparação aos animais alojados em gaiola padrão.

Esta modulação das respostas hormonais pela intervenção ambiental poderia contrabalancear os efeitos negativos desencadeados pela elevação mantida dos níveis circulantes de glicocorticóides e catecolaminas decorrentes do estresse crônico (Marin *et al.*, 2007; Adameova *et al.*, 2009; Reul *et al.*, 2015), considerando que outros estudos mostraram que animais expostos ao enriquecimento ambiental apresentaram aumento na população de receptores de mineralocorticóides (MR) e receptores de glicocorticóides (GR)

no hipocampo (Fares *et al.*, 2013), e aumento da expressão de GR no córtex pré-frontal (Garrido *et al.*, 2013). Estes efeitos poderiam contribuir para aumentar a sensibilidade da retroalimentação negativa do eixo HHA resultando em um retorno mais rápido dos níveis hormonais ao basal após a exposição ao estímulo estressor.

A intervenção ambiental por meio da manipulação pode ser categorizada como enriquecimento ambiental por contato social. Nesse contexto, ratos adultos que foram submetidos à manipulação neonatal, do 1º ao 21º dias de vida também apresentaram alteração na atividade do eixo HHA, com menor liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio corticotrófico (ACTH) e corticosterona frente a estímulos estressores (Meaney *et al.*, 1991; Plotsky e Meaney, 1993; Bhatnagar e Meaney, 1995). Essa alteração no eixo HHA parece estar relacionada ao aumento da população de GR tipo II no hipocampo e cortex pré-frontal aumentando a efetividade da retroalimentação negativa (Meaney *et al.*, 1996). Além disso, a manipulação diminuiu a expressão do gene CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo e no núcleo central da amígdala (Francis e Meaney, 1999; Collister e Hendel, 2003).

O efeito da manipulação de ratos adultos, com idade entre 21 e 180 dias de vida, também foi evidenciado em testes comportamentais. No teste do campo aberto, animais manipulados tiveram melhor desempenho e, no teste exploratório de ambientes complexos, apresentaram maior comportamento exploratório deixando o compartimento seguro mais rapidamente, explorando o ambiente por mais tempo e percorrendo maior distância quando comparados a animais não manipulados (Rebouças e Schmidek, 1997).

Além disso, em animais adultos, um estudo avaliou a influência do ambiente social em coelhos alimentados com dieta para indução de aterosclerose (Nerem *et al.*, 1980). Como forma de enriquecimento ambiental esses autores utilizaram interação entre o animal e o pesquisador onde os animais foram manipulados (acariciados) diariamente e observaram uma redução na área com lesões indicativas de aterosclerose nesses animais em relação ao controle, sugerindo que a estimulação tátil de animais adultos pode diminuir os efeitos negativos causados pelo estresse. Em outro estudo, foi observado em ratos adultos, que a estimulação mecânica da pele aumentou a liberação de dopamina no núcleo accumbens sugerindo que a terapia através do toque pode ser utilizada para reduzir (ou

aliviar) a ansiedade e depressão, uma vez que a dopamina nessa região cerebral tem um importante papel na patofisiologia dessas doenças (Maruyama *et al.*, 2012).

Portanto nossos dados sugerem que a manipulação ou enriquecimento ambiental, em animais adultos, também podem resultar em alterações no eixo HHA, contribuindo para diminuir a magnitude das respostas hormonais ao estresse.

Com relação aos efeitos comportamentais do estresse crônico, no presente estudo foi observado que o ECMI induziu comportamentos análogos à depressão humana, evidenciados pelo aumento no tempo de imobilidade no TNF e redução do consumo de solução doce no teste de preferência pela sacarose. Desde que foi descrito por Porsolt *et al.* (1977), o TNF tem sido usado como um modelo experimental para o estudo da depressão. Um estudo realizado por Porsolt (1978) demonstrou que animais forçados a nadar param de tentar escapar e passam a fazer somente os movimentos necessários para manter a cabeça fora da água. Uma vez que a maioria dos antidepressivos utilizados na clínica para o tratamento da depressão reduz o tempo de imobilidade, esse comportamento é considerado um estado de desamparo aprendido que é análogo à depressão humana (Porsolt *et al.*, 1977; Porsolt, Anton, *et al.*, 1978; Porsolt, Bertin, *et al.*, 1978).

A anedonia também é um sintoma da depressão em humanos caracterizado pela diminuição pela recompensa e estímulos prazerosos (Treadway e Zald, 2011). Em modelos animais, a ocorrência de anedonia pode ser avaliada por meio do teste de preferência pela sacarose, em que o animal pode escolher a água ou a solução doce de sacarose para beber. A redução do consumo e da preferência pela solução doce é interpretada como anedonia, sendo um comportamento análogo ao sintoma depressivo em humanos. Vários estudos na literaturam demonstram que o ECMI induz desamparo aprendido e anedonia (Kompagne *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2014). Os resultados do presente estudo confirmam essa hipótese, já que os animais submetidos ao ECMI apresentaram aumento do tempo de imobilidade e redução do consumo de solução doce nos testes comportamentais.

Além disso, no presente estudo também foi demonstrado que a intervenção ambiental reduziu o tempo de imobilidade no TNF e a anedonia induzidos pelo ECMI. Estes dados estão de acordo com outros estudos, que demonstraram que a exposição ao enriquecimento ambiental poderia produzir efeitos terapêuticos benéficos e antidepressivos em animais com

sintomas análogos à depressão induzido pelo estresse (Veena, Srikumar, Raju, *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). O enriquecimento ambiental realizado após o estresse reduziu as respostas comportamentais indicativas de depressão em dois testes diferentes (Veena, Srikumar, Raju, *et al.*, 2009). No teste de preferência pela sacarose, o enriquecimento ambiental reverteu a redução da ingestão e preferência pela solução doce induzida pelo estresse, e no TNF melhorou o aumento da imobilidade induzida por estresse (Veena, Srikumar, Raju, *et al.*, 2009). Além disso, a manipulação também reduziu a imobilidade no TNF sugerindo que ratos manipulados apresentam uma melhor capacidade para enfrentar situações estressoras (Hilakivi-Clarke *et al.*, 1991).

Os efeitos do estresse em estruturas cerebrais desencadeando sintomas relacionados à depressão, também pode estar associado com a função cognitiva, que pode ser avaliada pelo teste do labirinto em Y. Neste teste, na segunda exposição do animal ao labirinto, o rato é capaz de lembrar que anteriormente havia entrado no braço conhecido, e, portanto espera-se que o animal explore por mais tempo e entre mais vezes no braço novo, movido por sua nata curiosidade e comportamento exploratório. Quando isso ocorre, conclui-se que a aprendizagem e a memória estão intactas (Conrad, 1996, 2006). No presente estudo, no teste do labirinto em Y, animais não estressados reconheceram e escolheram mais o braço novo em relação ao braço conhecido, enquanto que os ratos submetidos ao estresse entraram no braço novo e conhecido de forma semelhante, indicando prejuízo na memória espacial. Portanto, os dados do presente estudo mostraram que o aprendizado e a memória foram prejudicados pelo ECMI e este prejuízo foi amenizado ou revertido pela intervenção ambiental.

As ações dos glicocorticóides envolvem tanto mecanismos genômicos como não genômicos os quais estão associados aos receptores de MR, aos GR e a translocação desses receptores para a mitocôndria e para os núcleos celulares (McEwen *et al.*, 2015). Além disso, achados têm demonstrado que alterações na transcrição celular em resposta ao estresse envolvem múltiplas vias celulares, além da resposta celular desencadeada pela ação da corticosterona via GR (McEwen *et al.*, 2015). O estresse crônico aumenta o tônus inflamatório e a liberação de citocinas que podem ativar outras vias de sinalização, como a transcrição do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que em conjunto com a ativação de GR

resultam em uma via única de expressão genica, a qual é diferente da soma de cada via ativada separadamente (McEwen *et al.*, 2015). Ainda, estudos têm demonstrado que traços genéticos, como por exemplo, polimorfismos do nucleotídeo NR3C1 no GR, em combinação com traumas sofridos na infância pode aumentar a probabilidade do indivíduo desenvolver doenças psiquiátricas (Klengel e Binder, 2013a; 2013b). Entretanto, existem mecanismos que podem manter ou aumentar a resistência do organismo ao estresse e prevenir o desenvolvimento de respostas inadaptadas e doença.

Ao contrário dos efeitos negativos desencadeados pelo estresse, estudos na literatura mostram que o enriquecimento ambiental aumenta a neurogênese (Veena, Srikumar, Mahati, *et al.*, 2009; Tanti *et al.*, 2013), e promove um melhor desenvolvimento das estruturas cerebrais (Beaver, 1989) e alterações plásticas e adaptativas positivas no hipocampo de ratos, promovendo melhora na memória, aumento do comportamento exploratório e atenua respostas hormonais e comportamentais negativas induzidas pelo estresse (Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2006).

Além da modulação da sensibilidade da retroalimentação negativa do eixo HHA, citada anteriormente, foi demonstrado que níveis elevados de glicocorticoides podem causar alterações plásticas no hipocampo, área cerebral importante para funções cognitivas como aprendizado e memória, as quais incluem o remodelamento dos dendritos (retração e simplificação) na região CA3 do hipocampo (McEwen, 1999; Sousa *et al.*, 2000), inibição da neurogênese no giro denteado (Gould *et al.*, 1997) e inibição da LTP (Sousa *et al.*, 2008). Portanto, os dados obtidos no presente estudo sugerem que a intervenção ambiental, por meio da manipulação ou o enriquecimento ambiental podem aumentar a resiliência ao estresse.

Nesse contexto, na literatura são abordados os mecanismos que regulam a disponibilidade biológica dos hormônios glicocorticoides, o papel que desempenham e os mecanismos epigenéticos associadas à transcrição gênica envolvidos nas respostas comportamentais ao estresse e mecanismos que aumentam a resiliência ao estresse (Reul *et al.*, 2015). A resiliência é definida como a capacidade de um indivíduo para se adaptar de forma eficaz ao estresse e adversidade, resultando na prevenção de doença física e/ou psicológica (Reul *et al.*, 2015).

Também é possível que estes mecanismos envolvam a atividade do SRA. Alguns estudos mostram que a Ang II está aumentada em eventos estressantes podendo participar na regulação da resposta ao estresse (Saavedra e Benicky, 2007; Chung *et al.*, 2010). Nesse contexto, estudo realizado anteriormente em nosso laboratório mostrou que ratos submetidos ao modelo de ECMI apresentaram maior atividade da renina e ECA circulantes e maiores concentrações plasmáticas de Ang I, II e 1-7 em relação a animais controle (Sanches, 2011). E no presente trabalho, demonstramos que o ECMI aumentou a concentração tecidual de Ang I, Ang II e Ang IV no hipotálamo de ratos e que esse aumento da Ang II foi reduzido ou cancelado em ratos submetidos à intervenção ambiental (manipulação ou enriquecimento ambiental).

O SRA tecidual e circulante pode ser ativado durante a reação de estresse podendo atuar de forma sinérgica com o eixo HHA e o SNS para manter a homeostase. Desta forma, o SRA no cérebro pode estimular o SNS, que induz aumento da secreção renal de renina (Baltatu e Bader, 2007). No cérebro, o estresse aumenta a expressão do receptor AT1 no núcleo paraventricular do hipotálamo e na pituitária anterior (Leong *et al.*, 2002), o que contribui para a síntese e liberação de CRH, que conseqüentemente aumenta a liberação de ACTH, e aumenta a síntese e liberação de glicocorticoides e aldosterona pela supra-renal, e também contribui para o aumento de catecolaminas a partir da medula supra-renal e dos nervos simpáticos (Yang *et al.*, 1996).

Nesse estudo, a manipulação reduziu o aumento da concentração de Ang II no hipotálamo induzida pelo ECMI, sugerindo um possível mecanismo neural associado com os efeitos negativos do estresse. Para melhor investigar esta hipótese, avaliamos o efeito do antagonista de receptor AT1, o losartan, sobre o desamparo aprendido, aprendizado e memória de ratos submetidos ao ECMI. O losartan reduziu o aumento da corticosterona, atenuou o desamparo aprendido e atenuou o prejuízo cognitivo induzidos pelo ECMI sugerindo que o aumento da atividade do SRA induzida pelo ECMI, via receptor AT1, parece contribuir para esses efeitos.

Nesse contexto, foi demonstrado que a administração de antagonistas de receptor AT1 atenua a ativação simpática central e periférica induzida pelo estresse (Müller *et al.*, 2010). Além disso, o uso de candesartan, antagonista de receptor AT1, preveniu o aumento de

desse receptor na pituitária anterior, adrenal e núcleo paraventricular, e reduziu a elevação do ACTH na pituitária e da corticosterona na adrenal de ratos Wistar Kyoto (Nishimura *et al.*, 2000). Assim podemos sugerir que no presente estudo, o bloqueio do receptor AT1 pelo losartan pode ter prevenido o aumento de receptores AT1 induzidos pelo estresse, e consequentemente pode ter reduzido a liberação de corticosterona diminuindo os efeitos negativos das altas concentrações de glicocorticóides em diversas áreas cerebrais.

Além disso, considerando a ação da Ang II no vaso, ela aumenta diretamente a ativação o estresse oxidativo celular e mitocondrial, aumenta fatores de transcrição nuclear como o NF- κ B, promove o aumento da produção de citocinas inflamatórias como a interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina 6 (IL-6); e causa uma diminuição de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) (Saavedra *et al.*, 2011). Como resultado desses efeitos, ocorre uma reação inflamatória aumentando a apoptose das células vasculares periféricas do SNC (Saavedra *et al.*, 2011).

A ação da Ang II apontam uma relação entre os antidepressivos utilizados na clínica e medicamentos inibidores do SRA. Antidepressivos como desipramina e fluoxetina podem agir bloqueando a ação da Ang II e inibidores da enzima ECA também podem ter efeitos antidepressivos (Gard, 2002). Os efeitos antidepressivos causados pelo bloqueio do SRA foram evidenciados em pacientes hipertensos que também sofriam de depressão. Esses pacientes quando foram tratados com inibidores da ECA relataram que também apresentaram melhora no estado mental e no humor (Etienne e Zubensko, 1987; Germain e Chouinard, 1988). A relação entre SRA e comportamentos depressivos também foi relatada em animais de laboratório. Ratos e camundongos tratados com captopril (inibidor da ECA) apresentaram redução da imobilidade no TNF (Giardina e Ebert, 1990). Gard *et al.* (2002) sugerem que os efeitos antidepressivos do captopril podem estar relacionados com a redução das ações da Ang II, uma vez que o losartan (bloqueador do receptor AT1) também promove efeitos antidepressivo.

Além dos efeitos antidepressivos, estudos em humanos demonstraram que o uso de medicamentos inibidores da ECA pode promover melhora no aprendizado e memória (Amenta *et al.*, 2002; Wyss *et al.*, 2003). Ratos idosos normotensos ou hipertensos, cronicamente tratados com inibidor da ECA, apresentaram melhora na função cognitiva

(Hirawa *et al.*, 1999; Pelisch *et al.*, 2013). Esse efeito pode estar relacionado à inibição da ação vasoconstritora da Ang II, a qual conseqüentemente melhora a perfusão da barreira hemato-encefálica resultando na preservação dos capilares e das células neuronais na região do hipocampo em animais normotensos (Hirawa *et al.*, 1999). E em animais hipertensos, a diminuição da concentração tecidual de Ang II pode reduzir a lesão na barreira hemato-encefálica causada pelo excesso da Ang II (Pelisch *et al.*, 2013).

No entanto outros estudos sugerem que esses efeitos parecem não estar apenas associados aos efeitos vasculares no encéfalo, uma vez que pacientes tratados com β bloqueadores não apresentaram melhora cognitiva (Amenta *et al.*, 2002), e animais tratados com hidralazina também não apresentaram essa alteração (Wyss *et al.*, 2003), sugerindo que o SRA central poderia modular a função cognitiva (Amenta *et al.*, 2002), ou seja, atuam diretamente sobre os processos de transdução de sinal pós-receptor da Ang II (Gard, 2002).

Os mecanismos de transdução de sinais resultantes da estimulação do receptor AT1 em células endoteliais vasculares cerebrais, neurónios, astrócitos e micróglia incluem a ativação de fatores de transcrição nuclear, como o NF- κ B e a proteína ativadora-1 (AP-1) (Saavedra, 2011), onde alterações nesses fatores estão associadas com alterações na plasticidade sináptica (Pfau e Russo, 2015). Além disso, vem sendo proposto que o uso de bloqueadores de Ang II (antagonistas de receptor AT1) tem efeitos neuroprotetores, não só por evitar os efeitos neurotóxicos provocados pela Ang II, mas também pela sua interação com os seus receptores de membrana e os mecanismos de transdução de sinal (Saavedra, 2011).

O papel da Ang II no aprendizado e memória também tem sido investigado. Alguns autores mostraram que a Ang II melhora a cognição (Belcheva *et al.*, 2000; Braszko, 2002) enquanto que outros pesquisadores mostraram que pode ter efeitos amnésicos possivelmente associados à inibição da potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo (Denny *et al.*, 1991) via receptor AT1 (Wayner *et al.*, 1993). No entanto, o efeito primeiramente atribuído à Ang II, em melhorar a memória, ocorreria devido a sua metabolização e conversão em Ang IV (Braszko *et al.*, 2006) já que a ativação de receptores AT4, no hipocampo, aumentam a transmissão sináptica e a LTP (Kramár *et al.*,

2001). Além disso, a angiotensina II ativa neurônios vasopressinérgicos, que estão associados com a síntese de dopamina e noradrenalina, e a processos comportamentais incluindo cognição (Gard, 2002).

Em estudos clínicos também tem sido evidenciado que os bloqueadores dos receptores da angiotensina podem melhorar a cognição. O uso do losartan (50 mg) em voluntários jovens saudáveis causou melhora no desempenho em testes de memória quando administrado sozinho e reverteu os efeitos amnésicos (temporário) da escopolamina (Mechaeil *et al.*, 2011). Entretanto, estudos continuam a ser realizados para saber se o bloqueio dos receptores AT1 resulta na conversão do excesso de Ang II endógena em Ang IV que ativaria os receptores AT4 no hipocampo (Wright e Harding, 2013).

Com relação ao comportamento associado à ansiedade, o modelo de estresse crônico utilizado neste trabalho aumentou a atividade locomotora, mas não afetou os níveis de ansiedade de ratos, uma vez que não houve diferença, tanto no número de entradas no braço aberto como no tempo de exploração dos braços abertos no LCE, parâmetros interpretados como ansiedade. Outros estudos na literatura também não observaram efeito do estresse sobre o comportamento de ansiedade usando o LCE. Nesse contexto, ratos submetidos ao modelo de estresse crônico imprevisível durante 10 dias não apresentaram comportamento de ansiedade avaliado no teste de LCE e no teste de caixa claro/escuro (Matuszewich *et al.*, 2007). Outro estudo avaliou o modelo de estresse por imobilização por 10 dias e o modelo de estresse crônico imprevisível por 10 dias e também evidenciaram alterações comportamentais em ratas avaliadas no teste do LCE (Mitra *et al.*, 2005).

No presente estudo, foi avaliada a resposta de ansiedade, um dia após o final do protocolo de estresse, e é possível que seja necessário um período mais longo entre a exposição aos estressores e a realização do teste para sensibilizar e ser evidenciado o comportamento de ansiedade. Outra possibilidade é que um estímulo estressor agudo imediatamente antes da realização do teste pode ser necessário para desencadear o comportamento de ansiedade e ser evidenciado pelo teste do LCE. No entanto, estas hipóteses não foram testadas nesse trabalho. Além disso, o aumento da atividade locomotora dos animais estressados pode indicar um possível aumento da resposta à novidade quando expostos ao LCE. Portanto, futuros estudos são importantes para entender

como o modelo de estresse crônico pode ou não alterar regiões cerebrais e a produção dos neurotransmissores que estão envolvidos no comportamento de ansiedade.

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a intervenção ambiental, por meio da manipulação e do enriquecimento ambiental, tem ação protetora contra os efeitos negativos induzidos pelo estresse crônico sobre o comportamento, aprendizado e memória, e mostram que a angiotensina II está envolvida nos efeitos do ECMI. O presente estudo também confirma a importância dos estudos em animais de laboratório para o conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na relação entre estresse crônico, depressão e alterações no aprendizado e memória.

E, a partir dos resultados observados, evidencia-se a necessidade de futuros estudos para esclarecer se o SRA apenas atua de forma sinérgica com o eixo HHA aumentando os níveis circulantes de glicocorticoides os quais irão por si só promover efeitos deletérios no SNC, ou se existe uma ação direta da Ang II via receptores AT1 nas regiões do encéfalo envolvidas no comportamento depressivo e nas alterações de memória desencadeadas pelo estresse crônico. Além disso, será igualmente importante elucidar os mecanismos envolvidos na ação modulatória da intervenção ambiental sobre os efeitos deletérios do estresse crônico.

6. CONCLUSÕES

O ECMI induziu comportamentos análogos à depressão, prejuízo no aprendizado e memória, e aumento da atividade do SRA circulante e hipotalâmico, em ratos.

A intervenção ambiental, por meio de estimulação tátil ou enriquecimento ambiental, reduziu as respostas hormonais induzidas pelo ECMI.

A intervenção ambiental, por meio de estimulação tátil ou enriquecimento ambiental, reduziram os efeitos negativos do ECMI sobre o aprendizado e memória.

A Ang II está envolvida nos efeitos hormonais e comportamentais induzidos pelo ECMI.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS*

- ADAMEOVA, A.; ABDELLATIF, Y.; DHALLA, N. S. Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 7, p. 493-514, 2009.
- ALMEIDA-FILHO, N. et al. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. Methodological features and prevalence estimates. **The British Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 6, p. 524-9, 1997.
- AMENTA, F.; DI TULLIO, M. A.; TOMASSONI, D. The cholinergic approach for the treatment of vascular dementia: evidence from pre-clinical and clinical studies. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 24, n. 7-8, p. 697-713, 2002.
- AULICH, D.; SPIELHOFEN, J.; RAAIJMAKERS, G. M. The influence of adult handling and social isolation on dark preference in albino rats. **Anim. Behav**, v. 22, p. 987-990, 1974.
- BAI, M. et al. Anhedonia was associated with the dysregulation of hippocampal HTR4 and microRNA Let-7a in rats. **Physiology & Behavior**, v. 129, n. 0, p. 135-141, 2014.
- BALTATU, O.; BADER, M. **Angiotensin. In: Fink G ed. Encyclopedia of Stress.** San Diego, CA - USA. : ELSEVIER, 2007.
- BARAN, S. E. et al. Prefrontal cortex lesions and sex differences in fear extinction and perseveration. **Learn Mem**, v. 17, n. 5, p. 267-278, 2010.
- BEAVER, B. V. Environmental enrichment for laboratory animals. **ILAR News**, v. 31, p. 5- 11, 1989.
- BELCHEVA, I.; TERNIANOV, A.; GEORGIEV, V. Lateralized learning and memory effects of angiotensin II microinjected into the rat CA1 hippocampal area. **Peptides**, v. 21, n. 3, p. 407-411, 2000.
- BELZ, E. E. et al. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 76, p. 481-486, 2003.
- BHATNAGAR, S.; MEANEY, M. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. **J Neuroendocrinol**, v. 7, n. 2, p. 97-108, 1995.
- BRASZKO, J. J. AT2 but not AT1 receptor antagonism abolishes angiotensin II increase of the acquisition of conditioned avoidance responses in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 131, n. 1-2, p. 79-86, 2002.
- BRASZKO, J. J. et al. Captopril and enalapril improve cognition and depressed mood in hypertensive patients. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 14, n. 4, p. 323-43, 2003.

*De acordo com Normas da ABNT para a elaboração de referências: ABNT_NBR 6023/2002 – Referências.

- BRASZKO, J. J.; WALESIU, A.; WIELGAT, P. Cognitive Effects Attributed to Angiotensin II may Result from its Conversion to Angiotensin IV. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 7, n. 3, p. 168-174, September 1, 2006.
- 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.
- BROSNAN, M. J. et al. Irbesartan lowers superoxide levels and increases nitric oxide bioavailability in blood vessels from spontaneously hypertensive stroke-prone rats. **Journal of Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 281-286, 2002.
- BURGHARDT, P. R.; WILSON, M. A. Microinjection of naltrexone into the central, but not the basolateral, amygdala blocks the anxiolytic effects of diazepam in the plus maze. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 1227-1240, 2006.
- CALIL, C. M.; MARCONDES, F. K. The comparison of immobility time in experimental rat swimming models. **Life Sciences**, v. 79, n. 18, p. 1712-1719, 2006.
- CHAPILLON, P. et al. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. **Behav Genet**, v. 29, n. 1, p. 41-46, 1999.
- CHEN, Y. et al. Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: Effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 212, n. 1, p. 49-55, 2010.
- CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, n. 9, p. 1244-1252, 1992.
- CHUNG, I.-M. et al. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/its type I receptor pathway. **Atherosclerosis**, v. 213, n. 1, p. 109-114, 2010.
- COLLISTER, J. P.; HENDEL, M. D. The role of Ang (1-7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst** v. 4, n. 3, p. 176-9, 2003.
- CONRAD, C. D. What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? . **Behav Cogn Neurosci Rev**, v. 5, n. 1, p. 41-60, 2006.
- CONRAD, C. D. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 742-55, 2010.
- CONRAD, C. D. et al. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. **Behav Neurosci**, v. 110, n. 6, p. 1321-1334, 1996.

- COSTA, R. et al. Handling of adolescent rats improves learning and memory and decreases anxiety. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 51, n. 5, p. 548-553, 2012.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 49, p. 171-176, 1994.
- DAHLÖF, B. et al. Main results of the losartan versus amlodipine (LOA) study on drug tolerability and psychological general well-being. **Journal of Hypertension**, v. 15, n. 11, p. 1327-1335, 1997.
- DENNY, J. B. et al. Angiotensin II blocks hippocampal long-term potentiation. **Brain Research**, v. 567, n. 2, p. 321-324, 1991.
- DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 121, n. 1, p. 66-72, 1995
- DI MARCO, G. S. et al. Mesangial cells are able to produce catecholamines in vivo. **J Cell Biochem**, v. 89, p. 144-151, 2003.
- EMANUELE, E. et al. Increased Plasma Aldosterone in Patients with Clinical Depression. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 5, p. 544-548, 2005.
- ETIENNE, P. E.; ZUBENSKO, G. S. Does captopril elevate mood? **TIPS**, v. 8, p. 329-330, 1987.
- FARES, R. P. et al. Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53888, 2013.
- FERNÁNDEZ-TERUEL, A. et al. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. **Behav Genet**, v. 27, n. 6, p. 513-526, 1997.
- FERNÁNDEZ-TERUEL, A. et al. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? **Pharmacol Biochem Behav**, v. 73, n. 1, p. 233-245, 2002.
- FERRÃO, F. M.; LARA, L. S.; LOWE, J. Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? **World J Nephrol**, v. 3, n. 3, p. 64-76, 2014.
- FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behav Brain Res**, v. 175, p. 1-8, 2006.
- FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care and the development of stress responses. **Curr Opin Neurobiol**, v. 9, n. 1, p. 128-134, 1999.
- FRANCIS, D. D. et al. Environmental Enrichment Reverses the Effects of Maternal Separation on Stress Reactivity. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 18, p. 7840-7843, 2002.

- GARD, P. R. The role of angiotensin II in cognition and behaviour. **European Journal of Pharmacology**, v. 438, n. 1–2, p. 1-14, 2002.
- GARRIDO, P. et al. Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and emotional memories. **J Neural Transm**, v. 120, n. 5, p. 829-43, 2013.
- GAULKE, L. J. et al. Environmental enrichment increases progenitor cell survival in the dentate gyrus following lateral fluid percussion injury. **Molecular Brain Research**, v. 141, n. 2, p. 138-150, 2005.
- GERMAIN, L.; CHOUINARD, G. Treatment of recurrent unipolar major depression with captopril. **Biological Psychiatry**, v. 23, n. 6, p. 637-641, 1988.
- GIARDINA, W. J.; EBERT, D. M. Positive effects of captopril in the behavioral despair swim test. **Biological Psychiatry**, v. 25, n. 6, p. 697-702, 1989.
- GOLDSTEIN, D. S.; KOPIN, I. J. Evolution of concepts of stress. **Stress**, v. 10, n. 2, p. 109-120, 2007.
- GOMES, V. M.; Silva, M. J. P.; Araújo, E. A. C. Efeitos gradativos do toque terapêutico na redução da ansiedade de estudantes universitários. **Rev Bras Enferm**, v. 61, n. 6, p. 841-6, 2008.
- GOULD, E. et al. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **J Neurosci Meth**, v. 17, n. 7, p. 2492-2498, 1997.
- GOUVEIA, T. L. F. et al. The levels of renin–angiotensin related components are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 1, p. 54-62, 2012.
- GRÉGOIRE, C.-A. et al. Untangling the Influences of Voluntary Running, Environmental Complexity, Social Housing and Stress on Adult Hippocampal Neurogenesis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86237, 2014.
- GRIPPO, A. J.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. **Physiology & Behavior**, v. 78, n. 4–5, p. 703-710, 2003.
- GRIPPO, A. J.; JOHNSON, A. K. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: A review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. **Stress**, v. 12, n. 1, p. 1-21, 2009.
- GRIPPO, A. J. et al. Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling female rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 179, n. 4, p. 769-80, 2005.
- HARRISON-BERNARD, L.M. The renal renin-angiotensin system. **Adv Physiol Educ**, v. 33, n. 4, p. 270-274, 2009.

- HERTZMAN, M. et al. Lisinopril May Augment Antidepressant Response. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 618-620, 2005.
- HILAKIVI-CLARKE, L. A. et al. Effects of early postnatal handling on brain β -adrenoceptors and behavior in tests related to stress. **Brain Research**, v. 542, n. 2, p. 286-292, 3/1/ 1991.
- HIRAWA, N. et al. Long-Term Inhibition of Renin-Angiotensin System Sustains Memory Function in Aged Dahl Rats. **Hypertension**, v. 34, n. 3, p. 496-502, 1999.
- HOLSON, R. R. Euthanasia by decapitation: Evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 14, n. 4, p. 253-257, 1992.
- JIANG, F. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1-7: novel therapeutic targets. **Nat Rev Cardiol**, v. 11, n. 7, p. 413-426, 2014.
- KLEEN, J. K. et al. Chronic stress impairs spatial memory and motivation for reward without disrupting motor ability and motivation to explore. **Behav Neurosci**, v. 120, n. 4, p. 842-51, 2006.
- KOMPAGNE, H. et al. Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. **Behav Brain Res**, v. 193, n. 2, p. 311-314, 2008.
- KONKLE, A. T. et al. Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 49, n. 4, p. 427-36, 2010.
- KRAMÁR, E. A. et al. The effects of angiotensin IV analogs on long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus in vitro. **Brain Research**, v. 897, n. 1-2, p. 114-121, 2001.
- LANGFORD, C. P. et al. Social support: a conceptual analysis. **J Adv Nurs**, v. 25, n. 1, p. 95-100, 1997.
- LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 193-207, 2002.
- LEAL-GALICIA, P. et al. 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.
- LEAL-GALICIA, P. et al. Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. **Neurobiol Learn Mem**, v. 90, n. 3, p. 511-518, 2008.
- LEONG, D. S. et al. Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors. **Neuroendocrinology**, v. 75, n. 4, p. 227-240, 2002.

- LIMA, A. F. B. D. S.; FLECK, M. P. D. A. Quality of life, diagnosis, and treatment of patients with major depression: a prospective cohort study in primary care. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 33, p. 245-251, 2011.
- LIMA, M. S. D. Epidemiologia e impacto social. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 01-05, 1999.
- LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. C. J. L. The global burden of disease, 1990-2020. **Nat Med**, v. 4, n. 11, p. 1241-1243, 1998.
- LUCASSEN, P. et al. Neuropathology of stress. **Acta Neuropathologica**, v. 127, n. 1, p. 109-135, 2014.
- MANSCHOT, S. M. et al. Angiotensin converting enzyme inhibition partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin-diabetic rats. **Brain Research**, v. 966, n. 2, p. 274-282, 2003.
- MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiol Behav**, v. 74, n. 4-5, p. 435-440, 2001.
- MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology & Behavior**, v. 90, n. 1, p. 29-35, 2007.
- MARUYAMA, K. et al. Tactile skin stimulation increases dopamine release in the nucleus accumbens in rats. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 62, n. 3, p. 259-266, 2012.
- MATUSZEWICH, L. et al. The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures. **Physiol Behav**, v. 90, n. 4, p. 674-81, 2007.
- MCCARTY, R.; HORWATT, K.; KONARSKA, M. Chronic stress and sympathetic-adrenal medullary responsiveness. **Soc Sci Med**, v. 26, n. 3, p. 333-341, 1988.
- MCEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annu Rev Neurosci**, v. 22, p. 105-122, 1999.
- MCEWEN, B. S. Stressed or stressed out: what is the difference? **J Psychiatry Neurosci**, v. 30, n. 5, p. 315-8, 2005.
- MCEWEN, B. S.; GRAY, J. D.; NASCA, C. Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. **Neurobiology of Stress**, v. 1, n. 0, p. 1-11, 2015.
- MEANEY, M. J. et al. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. **Neurobiol Aging**, v. 12, n. 1, p. 31-38, 1991.
- MEANEY, M. J. et al. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. **Dev Neurosci**, v. 18, n. 1-2, p. 49-72, 1996.
- MECHAEIL, R. et al. Cognitive enhancement following acute losartan in normotensive young adults. **Psychopharmacology**, v. 217, n. 1, p. 51-60, 2011.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE [www.saude.gov.br]. Depressão é parceira indesejável de 10% dos idosos. [Acesso em jun 2011]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=19108).
- MITRA, R. et al. Chronic stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats. **Neurosc Letters**, v. 383, p. 278-283, 2005.
- MONCEK, F. et al. Effect of Environmental Enrichment on Stress Related Systems in Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 16, n. 5, p. 423-431, 2004.
- MOREAU, J. L. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. **Encephale**, v. 23, n. 4, p. 280-289, 1997.
- MOHAMMED, A.H. et al. Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. **Behav Brain Res**, v. 57, n. 2, p. 183-191, 1993.
- MÜLLER, H. et al. Stress sensitivity is increased in transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Journal of Endocrinology**, v. 204, n. 1, p. 85-92, 2010.
- MURCK, H. et al. The Renin-Angiotensin-Aldosterone system in patients with depression compared to controls - a sleep endocrine study. **BMC Psychiatry**, v. 3, n. 1, p. 15, 2003.
- NEREM, R. M.; LEVESQUE, M. J.; CORNHILL, J. F. Social environment as a factor in diet induced atherosclerosis. **Science**, v. 208, n. 4451, p. 1475-1476, 1980.
- NEVES, V. J. et al. Chronic stress, but not hypercaloric diet, impairs vascular function in rats. **Stress**, v. 15, n. 2, p. 138-48, 2012.
- NEVES, V. J. et al. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. **Stress**, v. 12, n. 4, p. 320-327, 2009.
- NISHIMURA, Y. et al. Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT1 receptor antagonist Candesartan blocks brain AT1 receptors. **Brain Research**, v. 871, n. 1, p. 29-38, 2000.
- PAVLATOU, M. G. et al. Chronic administration of an angiotensin II receptor antagonist resets the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and improves the affect of patients with diabetes mellitus type 2: Preliminary results. **Stress**, v. 11, n. 1, p. 62-72, 2008.
- PELISCH, N. et al. RAS inhibition attenuates cognitive impairment by reducing blood-brain barrier permeability in hypertensive subjects. **Curr Hypertens Rev**, v. 9, n. 2, p. 93-8, 2013.
- PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rats. **J Neurosci Meth**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.
- PEREIRA, L. O. et al. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia–ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. **Brain Research**, v. 1247, n. 0, p. 188-195, 2009.

- PFAU, M. L.; RUSSO, S. J. Peripheral and central mechanisms of stress resilience. **Neurobiology of Stress**, v. 1, n. 0, p. 66-79, 2015.
- PHILLIPS, M. I.; OLIVEIRA, E. Brain renin angiotensin in disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 6, p. 715-722, 2008.
- PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor(CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 18, n. 3, p. 195-200, 1993.
- PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.
- PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. "Behavioural despair" in rats and mice: Strain differences and the effects of imipramine. **European Journal of Pharmacology**, v. 51, n. 3, p. 291-294, 1978.
- PORSOLT, R. D.; LEPICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730-732, 1977.
- POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psychiatry**, v. 149, n. 8, p. 999-1010, 1992.
- PURDY, J. Chronic physical illness: a psychophysiological approach for chronic physical illness. **Yale J Biol Med**, v. 86, n. 1, p. 15-28, 2013.
- REBOUÇAS, R. C. R.; SCHMIDEK, W. R. Handling and Isolation in Three Strains of Rats Affect Open Field, Exploration, Hoarding and Predation. **Physiology & Behavior**, v. 62, n. 5, p. 1159-1164, 1997.
- REUL, J. M. H. M. et al. Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. **Neurobiology of Stress**, v. 1, n. 0, p. 44-59, 2015.
- RONCHI, F.A. Associação das isoformas da enzima conversora de angiotensina I(ECA) a disfunções dos sistemas renal e pancreático no diabetes melito em ratos Wistar e espontaneamente hipertensos (SHR). [Tese de doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Medicina, Área de Nefrologia, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, 2007.
- RONCHI, F. A.; IRIGOYEN, M.-C.; CASARINI, D. E. Association of somatic and N-domain angiotensin-converting enzymes from Wistar rat tissue with renal dysfunction in diabetes mellitus. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 8, n. 1, p. 34-41, March 1, 2007.
- ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 78, n. 1, p. 57-65, 1996.
- SAAVEDRA, J. M.; BENICKY, J. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. **Stress**, v. 10, n. 2, p. 185-193, 2007.

- SAAVEDRA, J. M.; SÁNCHEZ-LEMUS, E.; BENICKY, J. Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 1, p. 1-18, 2011.
- SANCHES, A. Participação do sistema renina-angiotensina nos efeitos metabólicos e cardiovasculares induzidos por estresse crônico em ratos. [Tese de doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Fisiologia Oral, Universidade de Campinas, UNICAMP, 2007.
- SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 59, n. 4, p. 807-811, 1998.
- SCHULMAN, I. H.; ZHOU, M. S.; RAIJ, L. Interaction between nitric oxide and angiotensin II in the endothelium: role in atherosclerosis and hypertension. **J Hypertens Suppl**, v. 24, n. 1, p. S45-50, 2006.
- SEGOVIA, G.; ARCO, A.; MORA, F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n. 8, p. 1007-1016, 2009.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, n. 1, p. 32, 1936.
- SHERMAN, D. K.; KIM, H. S.; TAYLOR, S. E. Culture and social support: neural bases and biological impact. **Prog Brain Res**, v. 178, p. 227-37, 2009.
- SOUSA, N.; CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 561-570, 2008.
- SOUSA, N. et al. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. **Neuroscience**, v. 97, n. 2, p. 253-266, 2000.
- TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. **RBCF: Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 3, p. 273-289, 2002.
- TANTI, A. et al. Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment, and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. **Hippocampus**, v. Epub ahead of print, 2013.
- TREADWAY, M. T.; ZALD, D. H. Reconsidering anhedonia in depression: Lessons from translational neuroscience. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 537-555, 2011.
- VAHL, T. P. et al. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 5, p. E823-E828, 2005.

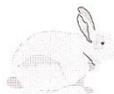
- VEENA, J. et al. Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 4, p. 831-43, 2009.
- VEENA, J. et al. Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. **Neurosci Lett**, v. 455, n. 3, p. 178-82, 2009.
- WAYNER, M. J. et al. Role of angiotensin II and AT1 receptors in hippocampal LTP. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 45, n. 2, p. 455-464, 1993.
- WEBER, M. A. Angiotensin-II receptor blockers for hypertension and heart failure: quality of life and outcomes. **Manag Care Interface**, v. 18, n. 2, p. 47-54, 2005.
- WEININGER, O. Physiological damage under emotional stress as a function of early experience. **Science** v. 119, n. 3087, p. 285-286, 1954.
- WELBERG, L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; PLOTSKY, P. M. Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, n. 5, p. 553-564, 2006.
- WIDMAN, D. R.; ROSELLINI, R. A. Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 1, p. 57-62, 1990.
- WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90-110, 2005.
- WRIGHT, J.; HARDING, J. The brain renin–angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 465, n. 1, p. 133-151, 2013.
- WYSS, J. M.; KADISH, I.; VAN GROEN, T. Age-related decline in spatial learning and memory: attenuation by captopril. **Clin Exp Hypertens**, v. 25, n. 7, p. 455-74, 2003.
- YANG, G.; WAN, Y.; ZHU, Y. Angiotensin II--an important stress hormone. **Biol Signals**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 1996.
- ZHANG, L. et al. Exposure to enriched environment restores the mRNA expression of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the hippocampus and ameliorates depressive-like symptoms in chronically stressed rats. **Curr Neurovasc Res**, v. 8, n. 4, p. 286-93, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1 - Certificado de aprovação pelo comitê de ética na experimentação animal Experimento 1



UNICAMP



CEUA/Unicamp

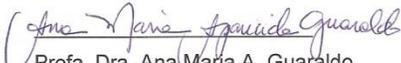
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

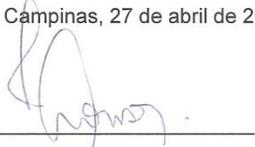
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeitos da estimulação tátil e do enriquecimento ambiental sobre as respostas comportamentais induzidas por estresse crônico, em ratos: mecanismos neurais envolvidos" (protocolo nº 2384-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes / Rafaela Costa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 27 de abril de 2011.

Campinas, 27 de abril de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ANEXOS

ANEXO 2 - Certificado de aprovação pelo comitê de ética na experimentação animal Experimento 2



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1973-1, sobre "Mecanismos envolvidos nas alterações vasculares, metabólicas e comportamentais induzidas por estresse crônico, em ratos - efeitos da manipulação, participação do sistema-renina-angiotensina e renalase", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes / Rafaela Costa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 05 de outubro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1973-1, entitled "Mechanisms of vascular, metabolic and behavioral changes induced by chronic stress in rats – influence of handling and role of the renin-angiotensin system and renalase", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 5, 2009.

Campinas, 11 de junho de 2010.

2ª. VIA

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alopiso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ANEXOS

ANEXO 3 - Artigo publicado: "Handling of Adolescent Rats Improves Learning and Memory and Decreases Anxiety", de autoria de Rafaela Costa, Mariana Leite Tamascia, Marie Doki Nogueira, Dulce Elena Casarini e Fernanda Klein Marcondes publicado no periódico JAALAS: Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, volume 51, paginas 548-553, Setembro, 2012.

Journal of the American Association for Laboratory Animal Science
Copyright 2012
by the American Association for Laboratory Animal Science

Vol 51, No 5
September 2012
Pages 1-6

Handling of Adolescent Rats Improves Learning and Memory and Decreases Anxiety

Rafaela Costa,¹ Mariana L. Tamascia,¹ Marie D. Nogueira,² Dulce E. Casarini,² and Fernanda K. Marcondes^{1,2*}

Some environmental interventions can result in physiologic and behavioral changes in laboratory animals. In this context, the handling of adolescent or adult rodents has been reported to influence exploratory behavior and emotionality. Here we examined the effects of handling on memory and anxiety levels of adolescent rats. Male Sprague-Dawley rats (age, 60 d) were divided into a control group and a handled group, which were handled for 5 min daily, 5 d per week, for 5 wk. During handling bouts, the rat was removed from its cage, placed in the experimenter's lap or on the top of a table, and had its neck and back gently stroked by the experimenter's fingers. During week 6, each rat's anxiety level was evaluated in the elevated plus-maze (EPM) test. Learning and memory were evaluated 48 h later, by measuring escape latency in the elevated plus-maze test. Plasma corticosterone and catecholamine levels were measured also. Norepinephrine levels were lower in the handled rats compared with control animals, with no differences in epinephrine and corticosterone. As compared with the control rats, the handled rats showed increases in the percentage of time spent in the open arms of the test apparatus, percentage of entries into open arms, and number of visits to the end of the open arms and decreases in the latency of the first open arm entry. Escape latency was lower in the handled rats compared with control rats in both the first and second trials. The data obtained suggest that handling decreases anxiety levels and improves learning skills and memory in rats.

Abbreviation: EPM, elevated plus maze.

The environmental conditions and procedures adopted in an animal facility can influence the physiology and behavior of laboratory animals. Various studies involve the use of rats that are treated for weeks or months in experimental protocols, including repetitive manipulations of the animals by the researchers. Adaptation to handling could change an animal's responses to experimental procedures and influence experimental outcomes.⁷

Handling of rodents during the neonatal period (brief episodes of manipulation during the days 1 through 21 of life) can change the mother-pup interaction⁸ and affect pup development, resulting in physiologic and behavioral changes that continue into adulthood.^{8,30,59} Neonatal handling increased curiosity, decreased emotionality and anxiety in a novel environment,^{36,59} and reduced stress responses^{4,38,56,57} in adulthood. Neonatal handling also affects cognitive behavior and may improve hippocampal-dependent memory in adulthood.^{25,35,53,54} These effects are associated with plastic changes in the CNS, reducing the number of cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus⁶⁰ and in the locus coeruleus.²²

Moreover, neonatal handling produced physiologic and behavioral changes related to anxiety, fear, and cognition that parallel those induced by an environmental enrichment protocol.¹⁴ However, no study has addressed the effect of handling on adolescent or adult animals that show behavioral changes related with hormonal concentration. In one study,⁴⁵ male adult rats (180 d old) that underwent handling during the postweaning period (days 21 through 180 of life) had better performance in the open field test (handled rats crossed more sections and

reared more often) and exploration test (handled rats left the safe compartment sooner, remained in the open space longer, and traveled longer distances), indicating that handled rats showed less fearful and more exploratory behavior. In addition, female rats (128 d old) that underwent daily handling during the postweaning, juvenile, and young adult developmental periods (days 28 through 128 of life) presented decreased emotionality and increased performance in the open-field test, as shown by an increased number of section crossings and rearings.¹⁷ However, neither of these cited studies evaluated hormonal parameters.

Animal models have been used to clarify the neurobiologic and genetic bases of anxiety disorders²⁰ and to understand the influence of environmental factors on behavior. Anxiety-like behavior can occur when a rat is in a novel, unfamiliar, or potentially dangerous situation or has experienced a danger stimulus previously in the same environment.¹⁸ One widely used anxiety paradigm is the elevated plus-maze (EPM) test,⁴¹ which is based on the conflict displayed by rodents between the drive to explore a new environment and the fear of open surroundings. The cognitive process can also be studied by using the EPM test.^{22,23,26} Some authors²² have proposed that transfer latency or one-way escape—that is, the time a rodent takes to move from the open arms to the closed arm by using all 4 legs—in the EPM test can be used as a measure of learning and memory in rodents. The cited authors showed that the impairment in learning and memory that was induced by posttraining administration of scopolamine or electroconvulsive shock can be detected in the EPM test. Moreover, tests in the EPM and water maze apparatuses showed that the administration of scopolamine to rats led to impairment of learning ability and memory, when compared with that of the control group.⁴⁰ In addition, the open arm of the EPM device involves an innately feared situation,^{11,27,58} and the one-way escape to the enclosed arm is motivated by fear and does not involve painful stimuli, such as the electrical shock used in other tests.^{27,58} Therefore,

Received: 03 Oct 2011. Revision requested: 07 Nov 2011. Accepted: 13 Mar 2012.
¹Laboratory of Stress, Physiological Sciences Division, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, and ²Neurology Division, Department of Medicine, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil.
*Corresponding author. Email: fkmr@op.unicamp.br

ANEXOS

ANEXO 4 - Comprovante de submissão do artigo “Tactile stimulation of adult rats modulates the hormonal responses, depression-like behaviors and memory impairment induced by chronic mild stress” de autoria de Rafaela Costa, Mariana Leite Tamascia, Andrea Sanches, Roseli Peres Moreira, Tatiana Sousa Cunha, Marie Doki Nogueira, Dulce Elena Casarini, Fernanda Klein Marcondes, o qual foi submetido para publicação no periódico Hormones and Behavior.

Dear Dr. Rafaela Costa,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Hormones and Behavior

Corresponding Author: Fernanda Marcondes

Co-Authors: Rafaela Costa, Master; Mariana L Tamascia; Andrea Sanches, Master; Roseli P Moreira; Tatiana S Cunha, PhD; Marie D Nogueira, Master; Dulce E Casarini, PhD;

Title: Tactile stimulation of adult rats modulates the hormonal responses, depression-like behaviors and memory impairment induced by chronic mild stress.

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at fkleinmarcondes@yahoo.com.br; ferklein@fop.unicamp.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/hb/l.asp?i=49087&l=S42V0A0B>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Hormones and Behavior