LUCAS BARBOSA HOFFMANN

**Avaliação dos efeitos da exposição ambiental paterna no
fenótipo da prole de camundongos *Swiss***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

LUCAS BARBOSA HOFFMANN

**Avaliação dos efeitos da exposição ambiental paterna no
fenótipo da prole de camundongos *Swiss***

Dissertação apresentada ao Programa de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Rosana Camarini

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o programa de Pós-Graduação.

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Barbosa Hoffmann, Lucas
Avaliação dos efeitos da exposição ambiental
paterna no fenótipo da prole de camundongos Swiss /
Lucas Barbosa Hoffmann; orientadora Rosana
Camarini. -- São Paulo, 2018.
67 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Plasticidade do desenvolvimento. 2. Privação
materna. 3. Enriquecimento ambiental. 4. Efeito
paterno. 5. Neurociência comportamental. I.
Camarini, Rosana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Lucas Barbosa Hoffmann

Titulo da **Dissertação**: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AMBIENTAL
PATERNA NO FENÓTIPO DA PROLE DE CAMUNDONGOS *SWISS*

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Camarini

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em
sessão publica realizada a/...../....., considerou o candidato:

() **Aprovado** () **Reprovado**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*A incorporação dos ácidos nucleicos de epididimossomos pelo encéfalo de camundongos neonatos e a consequente alteração de seu perfil comportamental: efeito dependente da exposição ambiental paterna*", registrado sob o protocolo nº **133/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **08/01/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Rosana Camarini**

- Departamento: *Farmacologia*

- Membros da Equipe: *Alice Cristina Rodrigues (Pesquisador colaborador), Lucas Barbosa Hoffmann (Pós-graduando), Sônia Maria Rodrigues Leite (Técnico de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Epididymosomal nucleic acids uptake by the neonate mice brain and the consequent modification of their late behavioural profile: an effect dependent on the paternal environmental exposure*", protocol nº **133/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **1/8/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Rosana Camarini**

- Team members: *Alice Cristina Rodrigues (Collaborator Researcher), Lucas Barbosa Hoffmann (Graduate Student), Sônia Maria Rodrigues Leite (Laboratory Technician)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Swiss-Webster</i>	<i>Macho/male</i>	<i>50 dias/days</i>	70
	<i>Swiss-Webster</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>50 dias/days</i>	70
	<i>Swiss-Webster</i>	<i>Macho/male</i>	<i>Filhotes/puppy</i>	315

São Paulo, 01 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da Herança Epigenética Transgeracional em camundongos Swiss expostos ao Enriquecimento Ambiental e do envolvimento de epididimossomos", protocolada sob o CEUA nº 2589301117, sob a responsabilidade de **Rosana Camarini e equipe; Lucas Barbosa Hoffmann** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 19/03/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the Transgenerational Epigenetic Inheritance in Swiss mice subjected to the Environmental Enrichment and the involvement of epididymosomes", utilizing 258 Heterogenics mice (158 males and 100 females), protocol number CEUA 2589301117, under the responsibility of **Rosana Camarini and team; Lucas Barbosa Hoffmann** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 03/19/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: [24 meses](#)

Depto/Setor: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério do Departamento de Farmacologia ICB - Unidade II](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [0 a 90 dias](#)

Linhagem: [Swiss](#)

N amostral: [158](#)

Origem: [Biotério do Departamento de Farmacologia ICB - Unidade II](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

Idade ou peso: [0 a 90 dias](#)

Linhagem: [Swiss](#)

N amostral: [100](#)

São Paulo, 18 de setembro de 2018

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Nildo e Gê. Não imagino como teriam sido esses últimos anos sem todo o amor, amizade e carinho que vocês dedicaram a mim. A decisão pela área acadêmica me trouxe algumas perdas, mas vê-los torcendo e acreditando em mim – muitas vezes mais do que eu mesmo poderia – foi sempre reconfortante e necessário para me fazer confiar que há sempre uma saída. “Apesar do mundo torto, a vida ainda é bela”, certo? Hoje felizmente consigo ver isso. Compartilho mais uma conquista com vocês, com muita alegria. Estamos juntos.

Agradeço aos meus irmãos, Tiago e Karina. A distância entre nós não é maior que o carinho que temos uns pelos outros.

Agradeço aos meus grandes amigos, Mariana, André, Priscila, Catherine, Silnei, Karina, Letícia e Helena. Prezo muito pela atmosfera livre de julgamentos que a amizade que tenho com cada um de vocês nos proporciona. Nesses últimos anos compartilhamos tantos momentos, experiências e sentimentos, e sempre aprendi um pouco a cada encontro. Agradecimento especial à Mari, André e Pri pela adorável companhia no laboratório e ajuda com experimentos, além das valorosas discussões científicas, sempre de forma leve e que me ajudam a formar o cientista que almejo ser.

Agradeço à Profa. Rosana Camarini, que me recebeu desde o início em seu laboratório com braços abertos e sempre disposta a me dar preciosas dicas e suporte a minha carreira.

Agradeço ao Prof. Anthony Hannan e ao Terence Pang por me receberem em seu laboratório e me apoiarem. Agradeço imensamente à amizade e companhia do Tim e da Kath, assim como à companhia do Tim G., Marko, Daniel e Marcus pelos ótimos momentos juntos na Austrália, e aos meus amigos da Florey: Megan, Geraldine, Carlos, Volkan, Shan, Carol, Larissa, Vanessa, Pedro, Amy, Rebekah, Vicki, Nick, Sophie, Isaline, Adam e Céline.

Agradeço à Profa. Vanessa Freitas e sua ajuda com a validação dos exossomos. À Profa. Carolina Munhoz e seus alunos, Nilton e Leonardo, pela disposição em tirar minhas dúvidas e a discutir ciência. Ao Prof. Cristóforo Scavone e à Larissa e Diana, por me ajudarem com a ultracentrífuga. À Profa. Luciana, pela ajuda com o Zetasizer. Ao Prof. Roberto de Pasquale e ao Frans, que me

ofereceram a oportunidade de frequentar o laboratório para aprender eletrofisiologia, sempre de braços abertos e com interessantes discussões.

Também agradeço aos outros alunos do laboratório da Profa. Rosana Camarini, especialmente ao Marcos.

Em especial, agradeço às agências de fomento: CNPq (projeto 830591/1999-0), FAPESP (projetos 2015/02397-0 e 2017/11987-1), 2018 *Endeavour Research Fellowship*, *the Australian Department of Education and Training* e a *Scope Global*.

“Preto e patético, fica entre as coisas. Que cada coisa seja uma coisa bela.
Uma coisa bela! Uma coisa justa!”.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Hoffmann. Avaliação dos efeitos da exposição ambiental paterna no fenótipo da prole de camundongos *Swiss*. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

É crescente o interesse nos efeitos que o ambiente parental exerce sobre o fenótipo da prole, a chamada herança epigenética. Tem sido mostrado que essa herança ocorre especialmente para efeitos de plasticidade do desenvolvimento, os quais derivam de alteração ambiental durante o desenvolvimento parental. Dentre os estudos realizados em camundongos, várias estratégias ambientais foram abordadas, como o estresse durante a infância e o enriquecimento ambiental, com a avaliação da prole em relação a parâmetros comportamentais, fisiológicos e moleculares. De modo a estudar o fenômeno, o presente trabalho investigou, em camundongos *Swiss* machos, os efeitos de um estresse durante a infância, a Privação Materna em PND 9, com avaliação de comportamentos exploratório (Campo Aberto), do tipo ansioso (Labirinto em Cruz Elevado), depressivo (Nado Forçado) e relacionados ao álcool (Condicionamento Condicionado por Lugar e Sensibilização Comportamental), e, numa outra abordagem, do Enriquecimento Ambiental do desmame (PND 21) à idade adulta (PND 70), com avaliação de parâmetros fisiológicos diversos (peso corporal, de depósito de gordura, de baço e glândulas adrenais) e comportamentos exploratório (Campo Aberto), memória espacial (Labirinto de Barnes), dominância social (Tubo de Dominância Social), atratividade (Teste de Escolha de Parceiro), além de avaliação de corticosterona plasmática e BDNF hipocampal. A privação materna não promoveu diferenças para os parâmetros comportamentais avaliados. Optou-se pela utilização do paradigma do Enriquecimento Ambiental para investigação dos efeitos sobre o fenótipo da prole (machos e fêmeas). Foram observados nos filhotes machos resultados comportamentais opostos aos apresentados pela geração paterna. Porém, quando os filhos foram expostos a um período breve de enriquecimento durante a idade adulta, essas diferenças não foram mais encontradas. Portanto, conclui-se que o enriquecimento ambiental paterno foi capaz de gerar efeitos na prole, tornando os filhotes machos menos adaptados ao ambiente não enriquecido.

Palavras-chave: Plasticidade do desenvolvimento. Privação materna. Enriquecimento ambiental. Efeito paterno. Neurociência comportamental.

ABSTRACT

Hoffmann. Avaliação dos efeitos da exposição ambiental paterna no fenótipo da prole de camundongos Swiss. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

There is a growing interest in the effects of the parental environment on the offspring phenotype, the so-called epigenetic inheritance. It has been shown that this inheritance occurs especially for developmental plasticity effects, which stem from environmental changes during parental development. Studies carried out in mice have adopted several environmental strategies, such as early life stress and environmental enrichment, and the offspring have been assessed for behavioural, physiological and molecular parameters. In order to study the phenomenon, the present work investigated, in Swiss male mice, the effects of an early-life stress protocol, the Maternal Deprivation on PND 9, assessing behaviours such as exploratory (Open Field), anxiety-like (Elevated-Plus Maze), depressive-like (Forced Swim) and alcohol-related behaviours (Conditioned Place Preference and Behavioural Sensitisation) and, through a different approach, the environmental enrichment, from weaning (PND 21) to adulthood (PND 70), assessing diverse physiological parameters (body weight, fat pad weight, spleen and adrenal glands weights) and behaviours such as exploratory (Open Field), spatial memory (Barnes Maze), social dominance (Social Dominance Tube Test), attractiveness (Mate Choice Teste) as well as plasmatic corticosterone and hippocampal BDNF. The maternal deprivation did not yield any differences in the behavioural parameters assessed. The Environmental Enrichment paradigm was adopted for studying its effects on the offspring phenotype (males and females). Behavioural results were observed in the male offspring, which were the opposite of those found in the paternal generation. However, when the male offspring was exposed to a brief period of enrichment during adulthood, these differences were no longer found. Therefore, paternal environmental enrichment was able to induce effects on the offspring, turning male offspring less adapted to the non-enriched environment.

Keywords: Developmental Plasticity. Maternal deprivation. Environmental enrichment. Paternal effect. Behavioural neuroscience.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
PARTE A – Privação Materna	18
A.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
A.3.1 Animais e criação	19
<i>A.3.1.1 Privação Materna em PND 9.....</i>	<i>20</i>
<i>A.3.1.2 Eutanásia.....</i>	<i>20</i>
A.3.2 Testes comportamentais	20
<i>A.3.2.1 Campo Aberto.....</i>	<i>20</i>
<i>A.3.2.2 Labirinto em Cruz Elevado</i>	<i>21</i>
<i>A.3.2.3 Nado Forçado.....</i>	<i>21</i>
<i>A.3.2.4 Preferência Condicionada por Lugar</i>	<i>21</i>
<i>A.3.2.5 Sensibilização comportamental.....</i>	<i>22</i>
A.3.3 Análise estatística	22
A.4 RESULTADOS	23
A.4.1 A Privação Materna (PM) promoveu diminuição duradoura de peso corporal	23
A.4.2 A PM não promoveu diferenças de comportamento ansioso ou deprimido avaliado no labirinto em cruz elevado e no nado forçado, respectivamente	24
A.4.3 A PM não promoveu alterações na atividade locomotora e exploratória medida em Campo Aberto	25
A.4.4 A PM não promoveu diferenças nos comportamentos relacionados ao álcool.....	25
A.5 DISCUSSÃO.....	26
A.6 CONCLUSÃO.....	29
PARTE B – Enriquecimento Ambiental	29
B.3 MATERIAL E MÉTODOS	30
B.3.1 Animais.....	30
<i>B.3.1.1 Criação e eutanásia</i>	<i>30</i>
<i>B.3.1.2 Enriquecimento Ambiental.....</i>	<i>31</i>
<i>B.3.1.3 Esfregaço vaginal</i>	<i>31</i>
B.3.2 Testes comportamentais	31
<i>B.3.2.1 Campo Aberto.....</i>	<i>31</i>
<i>B.3.2.2 Labirinto de Barnes</i>	<i>32</i>
<i>B.3.2.3 Tubo de Dominância Social</i>	<i>32</i>
<i>B.3.2.4 Teste de Escolha de Parceiro</i>	<i>33</i>
B.3.3 Ensaios de ELISA	33
<i>B.3.3.1 Dosagem de BDNF.....</i>	<i>33</i>
<i>B.3.3.2 Dosagem de corticosterona.....</i>	<i>34</i>

B.3.4 Análise estatística	34
B.4 RESULTADOS	34
B.4.1 Fisiológicos.....	34
<i>B.4.1.1 O EA promoveu efeitos fisiológicos em camundongos machos F_0</i>	35
<i>B.4.1.2 Camundongos F_1-Machos de pais EA não apresentam alterações em parâmetros fisiológicos</i>	35
<i>B.4.1.3 Camundongos F_1-Fêmeas de pais EA possuem menor peso relativo das glândulas adrenais</i>	36
B.4.2 Comportamentais	40
<i>B.4.2.1 O EA promoveu efeitos comportamentais em camundongos machos F_0</i>	41
<i>B.4.2.2 Camundongos F_1-Machos de pais EA apresentam déficits comportamentais</i>	41
<i>B.4.2.3 Camundongos F_1-Fêmeas de pais EA não apresentam alterações em parâmetros comportamentais</i>	42
B.4.3 Um período curto de EA durante a idade adulta é capaz de reverter os déficits comportamentais observados nos camundongos F_1 -Machos-EA	46
<i>B.4.3.1 Fisiológicos</i>	46
<i>B.4.3.2 Comportamentais</i>	47
B.5 DISCUSSÃO.....	50
B.6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS*	58

1 INTRODUÇÃO

É crescente o interesse sobre os efeitos que o ambiente parental exerce sobre o fenótipo comportamental e fisiológico da prole. Esse tipo de herança já foi descrito em estudos ecológicos, como no caso do grilo do campo (*Gryllus pennsylvanicus*), em que a prole de mães grávidas expostas a um certo predador é mais eficiente em escapar das pistas do predador (Nettle; Bateson, 2015), e o gafanhoto-do-deserto (*Schistocerca gregaria*), que adota um comportamento mais exploratório quando as gerações anteriores viveram em condições de alta densidade (Pener; Yerushalmi, 1998). Estudos epidemiológicos também tratam do fenômeno, em que a exposição paterna a baixa disponibilidade de alimento durante a infância reduz, nos filhos, a mortalidade a doenças cardiovasculares (Kaati; Bygren; Edvinsson, 2002), e que o início de consumo paterno de tabaco antes dos 11 anos de idade é associado a maior índice de massa corporal nos filhos (Pembrey et al., 2006). Ambos os estudos em humanos também relatam efeitos na segunda geração.

Esse tipo de herança tem sido comparado a uma forma de “lamarquismo” (Richards, 2006), e foi incorporado à Síntese Evolutiva Estendida, proposta como uma teoria da evolução contemporânea, que engloba fatores que gerem um viés de desenvolvimento como contribuintes para a direção e taxa de evolução (Laland et al., 2015), ou seja, alterando a aptidão (*fitness*) no ambiente natural. No laboratório, tem se mostrado que esse tipo de herança envolve mecanismos epigenéticos, podendo ser nomeada de herança epigenética. Ela pode ocorrer intergeracionalmente, quando células germinativas são expostas à alteração ambiental, ou transgeracionalmente, quando não há exposição das células germinativas à alteração ambiental.

Um estudo essencial para o desenvolvimento e avanço dos estudos de herança epigenética foi o conduzido por Weaver et al. (2004). Essa foi a primeira demonstração de que diferenças no cuidado materno são capazes de induzir diferentes marcações epigenéticas no DNA da prole, as quais regulam a sua sensibilidade ao estresse durante a idade adulta; ou seja, a capacidade do ambiente de alterar o padrão de metilação do DNA. Uma vez demonstrado o potencial da “reprogramação materna” (*maternal reprogramming*), a primeira descrição em roedores de um tipo de herança não-mendeliana, mediada por RNAs, foi feita por

Rassoulzadegan et al. (2006), em que camundongos heterozigotos para uma mutação no gene Kit ($\text{Kit}^{\text{tm1Alf}}$), induzida pela inserção de lacZ, transmitem o fenótipo para seus filhos homozigotos *wild-type* de modo transgeracional. O isolamento de RNAs do esperma e transferência em zigotos *wild-type* induz os mesmos fenótipos. A partir da observação desse fenômeno, chamado pelo grupo de paramutação, outros modelos foram descritos, como o induzido pela exposição ao agrotóxico vinclozolin, um modulador do sistema hormonal, o qual promove perturbações no sistema endócrino de ratos, também de maneira transgeracional, inclusive alterando a atratividade dos machos para com as fêmeas, o que poderia interferir na chance de reprodução desses animais (Crews et al., 2007).

Em se tratando dos mecanismos da herança epigenética, foram propostas, até então, alterações do padrão de metilação de DNA, modificações pós-translacionais de histonas ou do perfil de miRNAs (Chen; Yan; Duan, 2016). miRNAs têm sido os alvos mais estudados até agora, tendo sido mostrado que a injeção de miRNAs purificados do esperma em zigotos *naïve* promove reprodução do fenótipo herdado (Gapp et al., 2014a, Rodgers et al., 2015, Benito et al., 2018).

Outros modelos de herança epigenética também foram descritos, os quais dependem unicamente da exposição parental a uma alteração do ambiente. Foco tem sido dado na exposição paterna, uma vez que, a princípio, é anulada uma possível transmissão de fenótipo por aprendizado de comportamento, além de reduzir o número de gerações em que as células germinativas são afetadas. Dentre os paradigmas mais utilizados, estão a dieta hiperlipídica (Chen et al., 2016), estresse durante a infância (Franklin et al., 2010; Gapp et al., 2014a), tratamento com corticosterona (Short et al., 2016) e enriquecimento ambiental (Yeshurun et al., 2017, Benito et al., 2018). Vários efeitos foram descritos, como aumento de comportamento dirigido (*goal-directed*) e flexibilidade comportamental, (Gapp et al., 2014b), alterações em comportamento relacionado à ansiedade (Franklin et al., 2010; Short et al., 2016), alteração no eixo HPA (Rodgers et al., 2013) e sensibilidade comportamental a sertralina (Rawat et al., 2018). Foram descritos efeitos tanto intergeracionais quanto transgeracionais.

Embora a herança epigenética tenha sido observada a partir de todos esses protocolos, é provável que seus efeitos sejam mais robustos quando a exposição paterna à alteração ambiental ocorra nos momentos iniciais da vida (Boersma et al., 2014). Os períodos críticos de neurodesenvolvimento – ou seja, pré-natal, infância e

puberdade – representam momentos de maior sensibilidade ao ambiente, cujos efeitos podem se tornar duradouros (Bale, 2015), devido ao fenômeno da plasticidade do desenvolvimento. Esse processo é descrito como alterações no fenótipo que ocorrem na tentativa de direcionar o animal a uma maior adaptação ao ambiente vivenciado durante esses períodos (Bateson et al., 2004).

No geral, a maioria dos paradigmas de herança epigenética baseiam-se na exposição paterna ao estresse, principalmente durante a infância desses animais. Modelos de estresse durante a infância, como o aplicado nos trabalhos de Gapp et al. (2014a,b), produzem respostas comportamentais marcantes nos camundongos estressados, observáveis também em idade adulta (Ladd et al., 2000). A maioria dos protocolos de estresse durante a infância consiste na separação materna, a qual se baseia na separação repetida da ninhada de sua mãe, por algumas horas por dia, durante as primeiras semanas de vida da prole. Uma variante é a privação materna, que se baseia na privação única da ninhada de sua mãe por 24h. Esse modelo apresenta resultados mais consistentes na literatura, além da vantagem de possibilitar estudos de ontogenia. A Privação Materna em PND 9 foi inicialmente desenvolvida como um modelo de esquizofrenia (Ellenbroek; van den Kroonenberg; Cools, 1998) e também é capaz de promover alterações em comportamentos do tipo ansioso e deprimido (Marco et al., 2015). Apesar da alta comorbidade de esquizofrenia, depressão e ansiedade com o uso de drogas, em humanos, inclusive com o alcoolismo (Preuss et al., 2018), o uso do modelo de Privação Materna para o estudo de comportamentos relacionados ao álcool, em camundongos, é pouco relatado (Nylander; Roman, 2013).

O álcool é uma droga de distribuição lícita amplamente consumida. Possui efeito depressor do sistema nervoso central, com atividade agonista gabaérgica e antagonista glutamatérgica (Camarini; Pautassi, 2016), promovendo aumento da atividade dopaminérgica na via mesolímbica. O uso prolongado pode estar associado ao desenvolvimento de adição em indivíduos vulneráveis, o qual envolve três estágios diferentes: *binge*/intoxicação, abstinência/afeto negativo e preocupação/antecipação. Relata-se que cerca de 11,2% dos brasileiros preocupam-se com seu padrão de consumo de álcool (Galduróz; Carlini, 2007), e sabe-se que o estresse modula a progressão desses estágios, alterando a função de estruturas cerebrais responsáveis por eles, como gânglio basal, amígdala e córtex pré-frontal (Koob; Schulkin, 2018). Portanto, a exposição ao estresse pode estar

associada à vulnerabilidade apresentada pelos indivíduos que transitam do consumo casual à adição ao álcool.

Como a demonstração de comportamentos do tipo adição em roedores é raramente descrita no contexto experimental e, quando o é, envolve protocolos complexos (Vanderschuren; Everitt, 2004), o estudo dos efeitos do álcool em roedores baseia-se em modelos que avaliam indiretamente as propriedades farmacológicas da droga. Mais especificamente, pode-se avaliar a capacidade recompensadora do álcool por meio do paradigma da Preferência Condicionada por Lugar (Bormann; Cunningham, 1997), e a indução de alterações neuroplásticas induzida pelo álcool por meio do paradigma de Sensibilização Comportamental (Robinson; Berridge, 2000).

Além da exposição ao estresse, outras alterações ambientais têm sido utilizadas para o estudo da herança epigenética, como o modelo de Enriquecimento Ambiental (EA), que é uma intervenção ambiental bastante explorada para induzir efeitos benéficos em camundongos (van Praag; Kempermann; Gage, 2000). Ele se baseia no alojamento dos animais em uma gaiola maior com brinquedos de diferentes materiais e texturas e rodinha de exercício, aumentando a estimulação sensorial, atividade física voluntária e interação entre os pares e que, fisiologicamente, resulta em maior desenvolvimento dos córtices somatossensorial, visual, motor e cognitivo (Nithianantharajah; Hannan, 2006). São demonstradas alterações de parâmetros fisiológicos (Tsai et al., 2002), benefícios na função reprodutiva (Mitra; Sapolsky, 2012), melhora de memória no teste de Reconhecimento de Objetos (Mesa-Gresa; Pérez-Martinez; Redolat, 2013; Melani et al., 2017) e de localização espacial no Labirinto de Barnes (Moritz et al., 2014), além de aumento de dominância no Tubo de Dominância Social (Rae, não publicado). Alguns desses efeitos comportamentais, principalmente os relacionados à memória, são associados a aumento dos níveis de BDNF no hipocampo.

Como introduzido acima, a exposição paterna a ambientes diversos é capaz de promover efeitos na prole desses animais. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo geral definir um paradigma de alteração ambiental paterna para estudo dos efeitos na prole de camundongos *Swiss*, tendo sido conduzido inicialmente pela parte A) avaliação dos efeitos comportamentais da Privação Materna em PND 9, e parte B) avaliação de efeitos do Enriquecimento Ambiental, aplicado logo após o desmame, em camundongos machos adultos.

Os parâmetros fisiológicos e comportamentais avaliados em cada uma das partes foram determinados de acordo com o paradigma adotado, de modo a replicar resultados comumente descritos na literatura (como comportamento do tipo ansioso em modelos de estresse durante a infância e memória espacial no Enriquecimento Ambiental), além da investigação pontual de outros parâmetros. Não foi o escopo do presente trabalho comparar os resultados obtidos entre as partes A e B.

O estudo sobre a prole só foi conduzido quando encontradas alterações significativas em alguns dos parâmetros estudados nos machos expostos às distintas modificações ambientais (privação materna ou enriquecimento ambiental).

2 OBJETIVOS

Geral: Definir um paradigma de alteração ambiental paterna para estudo dos efeitos na prole de camundongos *Swiss*.

As duas partes são independentes uma da outra e objetivos específicos distintos foram estabelecidos para cada uma delas:

Específicos:

Parte A – Privação Materna:

1) Validar o modelo de estresse por Privação Materna em PND 9 (PM-PND 9), por meio da avaliação de comportamentos do tipo ansioso (Labirinto em Cruz Elevado) e deprimido (Nado Forçado) em camundongos *Swiss* machos adultos (PND 70) e jovens (PND 35).

2) Avaliar os efeitos da PM-PND 9 no desempenho desses animais no Campo Aberto e em comportamentos relacionados ao álcool (Preferência Condicionada por Lugar e Sensibilização Comportamental) em camundongos machos adultos.

Parte B – Enriquecimento Ambiental:

1) Investigar os efeitos do EA, aplicado logo após o desmame (PND 21) até a idade adulta (PND 70), sobre parâmetros fisiológicos (peso corporal, peso de gordura visceral, do baço e de glândulas adrenais, níveis plasmáticos de corticosterona, peso do hipocampo e níveis hipocâmpais de BDNF);

2) Avaliar os efeitos desse protocolo de EA sobre parâmetros comportamentais: comportamento exploratório (Campo Aberto), memória espacial (Labirinto de Barnes) e comportamentos sociais (Tubo de Dominância Social e Teste de Escolha de Parceiro).

3) O paradigma de EA foi adotado e utilizado para observação dos efeitos na prole, cujos objetivos foram investigar se as alterações promovidas pelo EA paterno também são observadas na prole (filhotes machos e fêmeas), por meio das mesmas análises feitas na geração F_0 .

4) Adicionalmente, devido aos resultados observados nos filhos dos pais enriquecidos, foi também avaliada se a exposição de filhotes machos a um breve período de EA seria capaz de alterar o fenótipo comportamental observado nesses animais no Labirinto de Barnes e no Teste de Escolha de Parceiro.

Esse tipo de estudo é importante porque a herança epigenética ainda é pouco entendida e potencialmente tem papel na geração de vulnerabilidades ou resistências para o desenvolvimento de, por exemplo, doenças psiquiátricas em humanos (herdabilidade perdida – *missing heritability*) e alterações comportamentais em animais de experimentação.

PARTE A – Privação Materna

Abaixo a sessão relativa ao experimento da Privação Materna.

A.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1 – Desenho experimental e coortes utilizadas.

MD: Privação Materna; CT: controle.

A.3.1 Animais e criação

Camundongos Swiss machos e fêmeas foram obtidos do Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas – Unidade II, e mantidos em biotério próprio, em ciclo de 12h claro/escuro (luzes acesas às 7h30). Os casais foram formados quando os camundongos atingiram idade de PND 50. Cada casal foi alojado em uma caixa de camundongos padrão de 27,5 cm comprimento x 16,5 cm largura x 13 cm altura em estante ventilada da Alesco®. A troca das caixas foi feita semanalmente. Duas semanas após a formação de casal, o macho foi retirado da caixa e eutanasiado (Martini e Valverde, 2012). O dia de nascimento foi considerado como PND 0. Em PND 1, as ninhadas foram reduzidas para 8 animais. As ninhadas foram desmamadas em PND 21 e os filhotes foram separados em caixas com 3 a 5 animais. Os testes comportamentais foram realizados apenas em camundongos machos, quando atingiram a idade adulta (PND 70). Uma segunda coorte de animais machos jovens (PND 35) (Martini e Valverde, 2012), submetida à PM, foi avaliada no Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado. Foi utilizado um número de 10 animais por grupo, com exceção da Sensibilização Comportamental, em que foram utilizados 15 animais por grupo. Todos os procedimentos descritos estão de acordo com as normas de experimentação em animais estabelecidas pelo CONCEA e foram aprovados pelo Comitê de Ética em

Uso de Animais do ICB (CEUA ICB – número de protocolo 133/2016). O peso corporal dos animais foi medido antes da realização dos experimentos comportamentais, para acompanhamento.

A.3.1.1 Privação Materna em PND 9

Em PND 9, as ninhadas do grupo Privação Materna foram separadas de suas mães por 24h. Primeiramente a mãe foi retirada da caixa original, seguida pelos filhotes. A ninhada inteira foi transferida para outra caixa, com maravalha limpa, sem aquecimento, a qual foi mantida distante da caixa com a mãe por 24h. A mãe foi mantida na caixa original durante esse período. Após as 24h a ninhada foi retornada à caixa original, com a mãe. Todas as separações foram feitas por volta de 17h00. Os grupos controle foram manipulados apenas para as trocas de caixa.

A.3.1.2 Eutanásia

Os filhotes excedentes de cada ninhada primeiramente foram crioanestesiados e, quando não mais respondiam a pressão na pata traseira, foram decapitados com uma tesoura cirúrgica. Camundongos adultos foram eutanasiados por deslocamento cervical.

A.3.2 Testes comportamentais

Abaixo os testes comportamentais realizados.

A.3.2.1 Campo Aberto

O teste foi utilizado para analisar o comportamento exploratório. Cada camundongo foi colocado individualmente em aparato cilíndrico de 40 cm de diâmetro, de acrílico azul, para explorá-lo livremente por 15 minutos. O comportamento foi gravado por uma câmera localizada no teto da sala. Os vídeos foram analisados com EthoVision® XT 14 (Noldus). Foram analisados os parâmetros de locomoção total e tempo de permanência nas zonas central e periférica.

A.3.2.2 Labirinto em Cruz Elevado

O teste foi utilizado para avaliar o comportamento do tipo ansioso. Os camundongos foram colocados, individualmente, no centro de um aparato em formato de cruz, com cada eixo dispondo de 2 braços abertos ou 2 braços fechados, elevado cerca de 75 cm do chão, em que puderam explorá-lo por 5 min. O comportamento foi gravado por uma câmera localizada no teto da sala. Os vídeos foram analisados manualmente, com auxílio do *software* PlusMZ. Foi avaliada a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, em relação ao total de tempo nos braços abertos e fechados.

A.3.2.3 Nado Forçado

O teste foi utilizado para avaliar o comportamento do tipo deprimido. Cada camundongo foi colocado em um cilindro transparente de 3L preenchido com água a temperatura ambiente, por 6 minutos, enquanto uma câmera localizada no mesmo plano horizontal gravava seu comportamento. Os vídeos foram analisados manualmente, de modo cego. Os dois primeiros minutos de gravação foram descartados, tendo sido analisados apenas os 4 minutos seguintes. Foi avaliado o parâmetro de tempo de imobilidade, que consiste na ausência de movimentos das patas dianteiras e traseiras ou movimento mínimo, suficiente para possibilitar que o animal respire.

A.3.2.4 Preferência Condicionada por Lugar

Esse teste foi utilizado para analisar a Preferência Condicionada por Lugar (CPP), uma medida do efeito recompensador ao etanol (Cunningham; Gremel; Groblewski, 2006). O aparato consiste de duas câmaras distintas, separadas por uma terceira câmara, menor, desprovida de característica que a destaque das demais. As duas câmaras são diferenciadas pelas qualidades ambientais que as caracterizam, no caso deste trabalho, por listras em preto e branco de disposição horizontal ou vertical e chão de metal em rede ou em listras. Sensores de infravermelho localizados na entrada de cada câmara, associados a um contador, mediram o tempo que o animal ficou em cada câmara. O protocolo de condicionamento consistiu de 8 dias. No primeiro (pré-teste), cada camundongo foi

colocado no aparato por 15 minutos, podendo explorá-lo livremente. Do segundo ao nono dia o animal foi tratado diária e alternadamente com etanol 20%, a uma dose de 2 g/kg, ou salina, por via intraperitoneal, pareando os efeitos farmacológicos do etanol à câmara a que se pretendeu condicionar o camundongo e pareando a salina à que não se pretendeu condicioná-lo, restringindo-o à câmara de interesse por 5 minutos. No décimo dia (Teste 1) o camundongo foi colocado no aparato, sem tratamento algum, e pôde explorá-lo livremente por 15 minutos, em que foi avaliada a preferência pela câmara pareada com etanol (câmara CS⁺). Outros 3 retestes, distantes 48 horas entre si, foram feitos para avaliar a extinção da CPP. O condicionamento foi avaliado pela comparação dos dias Teste 1 a pré-teste, enquanto a extinção foi determinada pela comparação dos Testes 1 a 4.

A.3.2.5 Sensibilização comportamental

A sensibilização comportamental ao etanol foi determinada por meio da avaliação do aumento da atividade locomotora após exposição repetida aos efeitos do etanol. No campo aberto, cada camundongo foi colocado para explorar o aparato livremente por 5 minutos, ao longo de vários dias, logo após exposição ao etanol, em que sua atividade locomotora foi gravada em dias específicos. Neste trabalho, o protocolo foi de 17 dias. Nos 2 primeiros dias (Habituação 1 e 2) administrou-se salina por via intraperitoneal, enquanto etanol 20%, a uma dose de 2 g/kg, foi administrado do terceiro (Tratamento 1) ao décimo sétimo dia (Tratamento 15), por via intraperitoneal, esperando-se 5 minutos para colocar o animal no campo após a injeção. A atividade locomotora foi gravada nos dias de habituação 1 e 2 e nos dias de tratamento 1, 8 e 15 e analisada com o programa EthoVision® XT 14 (Noldus). O parâmetro avaliado foi a distância total percorrida pelos animais ao longo de cada um desses dias. A habituação ao aparato foi determinada pela comparação das habituações 1 e 2. A sensibilização comportamental, por sua vez, foi determinada pela comparação dos dias de tratamento 1, 8 e 15.

A.3.3 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade com o teste de Levene. Todas as distribuições são normais.

Testes t-Student e ANOVA de medidas repetidas foram adotados quando aplicável. ANOVA de medidas repetidas foi seguida de teste *post-hoc* Newman-Keuls. As análises foram feitas no software Statistica (Versão 11) e SPSS 25. Os gráficos foram feitos em *GraphPad Prism* 7.0d. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

A.4 RESULTADOS

Abaixo os resultados obtidos com a Privação Materna.

A.4.1 A Privação Materna (PM) promoveu diminuição duradoura de peso corporal

A medição de peso corporal da primeira coorte de animais, quando adultos (PND 70), mostrou redução do peso nos animais PM (Figura 2, $t_{(69)}=2,025$, $p=0,047$). Numa segunda coorte de animais, também foi possível observar redução de peso no grupo PM em camundongos jovens (PND 35) (Figura 2, $t_{(38)}=2,522$, $p=0,016$).

Figura 2 – A PM promoveu diminuição de peso em camundongos jovens e adultos.

Peso corporal de camundongos jovens ($n=20/\text{grupo}$) e adultos ($n=35/36$). $*p \leq 0,05$. Valores representados como média $\pm$ erro padrão.

A.4.2 A PM não promoveu diferenças de comportamento ansioso ou deprimido avaliado no labirinto em cruz elevado e no nado forçado, respectivamente

Na primeira coorte de animais adultos não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no tempo de permanência no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado (Figura 3A, $t_{(18)}=-1,031$, $p=0,316$) e nem no tempo de imobilidade no teste de Nado Forçado (Figura 3B, $t_{(18)}=-0,707$, $p=0,488$). Demais parâmetros foram avaliados e não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

Uma segunda coorte de animais foi testada quando jovem (PND 35), na tentativa de observar algum efeito que possa ter ocorrido durante a adolescência e que tenha sido revertido na vida adulta. Entretanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na porcentagem de tempo de permanência no braço aberto (Figura 3A, $t_{(18)}=-0,567$, $p=0,578$) nem no tempo de imobilidade no Nado Forçado (Figura 3B, $t_{(18)}=0,384$, $p=0,705$). Os dados sugerem que os camundongos do grupo PM não apresentam comportamento do tipo ansioso ou depressivo.

Figura 3 – A PM não teve efeito no comportamento do tipo ansioso e depressivo em camundongos jovens e adultos.

A) Porcentagem de tempo de permanência no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado ($n=10$ /grupo). B) Tempo de imobilidade no teste de Nado Forçado ($n=10$ /grupo). Valores representados como média $\pm$ erro padrão.

A.4.3 A PM não promoveu alterações na atividade locomotora e exploratória medida em Campo Aberto

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na distância total percorrida (Figura 4A, $t_{(18)}=-1,257$, $p=0,225$), no tempo de permanência na zona central (Figura 4B, $t_{(18)}=-0,746$, $p=0,465$) e na zona periférica (Figura 4C, $t_{(18)}=1,043$, $p=0,311$), sugerindo que não há diferenças do comportamento locomotor e exploratório entre os animais controle e PM.

Figura 4 – A PM não induziu diferença de comportamento exploratório.

A) Distância percorrida no Campo Aberto. B) Tempo de permanência na região central. C) Tempo de permanência na região periférica. $n=10$ /grupo. Valores representados como média $\pm$ erro padrão.

A.4.4 A PM não promoveu diferenças nos comportamentos relacionados ao álcool

A Preferência Condicionada por Lugar (CPP) foi calculada como a porcentagem de tempo de permanência na câmara pareada com álcool (câmara CS⁺) sobre o total (excluindo o tempo na câmara central). O protocolo de condicionamento adotado produziu aumento do tempo na câmara CS⁺ no dia do teste (Figura 5A-Condicionamento, Tempo: $F_{(1,18)}=7,913$, $p=0,012$), porém não houve diferença entre os grupos (Tratamento: $F_{(1,18)}=0,219$, $p=0,645$; Tempo*Tratamento: $F_{(1,18)}=0,354$, $p=0,559$), sugerindo que os grupos condicionaram indiscriminadamente. O protocolo de extinção adotado (por meio da reexposição ao aparato na ausência de álcool) não foi capaz de produzir extinção da CPP (Figura

5A-Extinção, Tempo: $F_{(3,54)}=2,207$, $p=0,098$), além de não revelar diferenças entre os grupos (Tratamento: $F_{(1,18)}=0,428$, $p=0,521$; Tempo*Tratamento: $F_{(3,54)}=0,320$, $p=0,811$).

A Sensibilização Locomotora foi avaliada como o aumento da atividade locomotora no campo aberto após exposição repetida ao álcool. Foi possível observar habituação dos animais ao aparato (Figura 5B-Habituação, Tempo: $F_{(1,29)}=32,809$, $p\leq 0,001$), sem diferenças entre os grupos (Tratamento: $F_{(1,29)}=0,994$, $p=0,327$; Tempo*Tratamento: $F_{(1,29)}=0,514$, $p=0,479$). Após exposição repetida ao álcool, foi possível observar sensibilização locomotora (Figura 5B-Sensibilização, Tempo: $F_{(2,54)}=83,826$, $p=0,000$; seguido de teste *post-hoc* Newman-Keuls, $p\leq 0,001$ entre D1 x D8 e D1 x D15), porém sem diferenças entre os grupos (Tratamento: $F_{(1,27)}=0,912$, $p=0,348$; Tempo*Tratamento: $F_{(2,54)}=0,828$, $p=0,442$).

Figura 5 – A PM não promoveu diferenças em comportamentos relacionados ao álcool.

A) Tempo de permanência na câmara CS⁺ da CPP. Os testes foram feitos 1, 3, 5 e 7 dias após o último dia de condicionamento (Testes 1, 2, 3 e 4, respectivamente; $n=10$ /grupo). * $p\leq 0,05$ em relação ao Pré-teste. B) Atividade locomotora no Campo Aberto durante a sensibilização comportamental ($n=15$ /grupo). *** $p\leq 0,001$, em relação a Hab 1; *** $p\leq 0,001$, em relação a D1. Valores representados como média $\pm$ erro padrão.

A.5 DISCUSSÃO

Com o objetivo de se validar um protocolo de estresse durante a infância, para observação dos efeitos na prole, investigou-se o protocolo de Privação Materna em PND 9 em camundongos Swiss. Para sua validação, foram avaliados comportamentos do tipo ansioso e depressivo e, adicionalmente, avaliados comportamentos relacionados ao álcool (preferência condicionada por lugar e

sensibilização locomotora). Entretanto, não foi possível observar diferenças entre os grupos, impossibilitando a validação do protocolo e, portanto, sua utilização para avaliação dos efeitos na prole.

Trabalhos de separação ou privação materna apresentam grande variabilidade de protocolos e de resultados (Nylander; Roman, 2013), sendo que os resultados da privação materna são mais consistentes, porém com um número mais limitado de artigos publicados. Alguns autores que utilizaram esses modelos para investigar comportamentos relacionados a drogas também encontraram grande variabilidade. Como exemplo: separação materna de 3h por dia, em camundongos *Swiss* do PND 2 ao 14, promoveu sensibilização comportamental ao álcool mais rapidamente em camundongos fêmeas, mas não em machos (Kawakami et al., 2007); entretanto, um segundo trabalho do mesmo grupo não observou efeito do mesmo protocolo de separação materna sobre a sensibilização comportamental ao álcool (Kawakami; Quadros; Suchecki, 2016); separação materna de 1h, do PND 1 ao 13, aumentou a sensibilização locomotora à cocaína 10 mg/kg em camundongos CFW (Kikusui; Faccidomo; Miczek, 2005); separação materna de 3h, do PND 2 ao 15, aumentou a CPP à cocaína em camundongos BALB (Viola et al., 2016), enquanto a privação materna em PND 12, em camundongos CD1, diminuiu a motivação para a autoadministração de cocaína (Martini; Valverde, 2012). Apesar das discrepâncias de resultados, alguns autores defendem que, no geral, distúrbios na relação mãe-filhote estão relacionados a aumento de consumo de etanol em roedores adultos e, portanto, discutem o uso de protocolos de separação ou privação materna para avaliar esse parâmetro, desde que o protocolo de separação escolhido seja adequado (Nylander; Roman, 2013).

O modelo da separação materna baseia-se na desestabilização do Período de Hiporresponsividade do eixo HPA, apresentado por filhotes de roedores entre PND 4 até 14 (Sapolsky; Meaney, 1986). Durante esse período, a administração de ACTH promove baixa secreção de corticosterona, tornando a prole menos sensível ao efeito de estresses leves ou moderados (Schmidt et al., 2006). Entretanto, um estresse intenso, como o da separação materna, é capaz de desestabilizar esse sistema e sensibilizar as glândulas adrenais, promovendo alterações duradouras de corticosterona e outros parâmetros comportamentais (Levine et al., 1991). Durante a separação materna, podem ser considerados dois fatores principais desencadeadores do estresse: a privação de alimento e a falta de cuidado materno.

Trabalhos mostram que esses fatores possivelmente se entrelaçam, uma vez que há integração das vias de estresse com as da manutenção do balanço energético (Harris, 2015). Especificamente em relação ao modelo da privação materna, foi observado que a amamentação parece regular a sensibilidade adrenal, enquanto as lambidas anogenitais que a mãe dedica aos seus filhotes regulam a resposta ao ACTH, um componente mais central do eixo do estresse (Suchecki; Rosenfeld; Levine, 1993). Adicionalmente, injeções de antagonista de grelina, um hormônio envolvido no balanço energético, revertem o efeito da Privação Materna sobre o eixo HPA (Schmidt et al., 2008).

Em relação à privação de alimento, foi demonstrado que alterações de parâmetros endócrinos, como a glicemia, acompanham ou precedem a alteração dos níveis de corticosterona na separação materna de 8h (Schmidt et al., 2006). Em outro trabalho, o mesmo grupo demonstrou que o desbalanço inicial do eixo HPA é sinalizado por NPY, um peptídeo relacionado a aumento da ingesta de alimento, entre outros efeitos (Schmidt et al., 2008). Ratos adolescentes têm NPY reduzido no hipotálamo após a Privação Materna em PND 3 ou 11, assim como menor massa corporal (Westheimer et al., 2016).

Por sua vez, em relação ao cuidado materno, sabe-se que camundongos *Swiss* exibem alta taxa de cuidado com a sua prole, como mostrado pela rápida recuperação dos filhotes para o ninho e adoção de postura de cuidado pela mãe (Champagne et al., 2007). Sabe-se, também, que no modelo de Separação Materna há compensação do cuidado materno após o período de separação (Stamatakis et al., 2015; Own; Patel, 2012; Wei et al., 2010). Como a Privação Materna depende de um único momento de privação, é possível que as mães aumentem o cuidado após esse período e compensem os efeitos induzidos pelo estresse, reestabelecendo o eixo HPA ao normal.

No presente trabalho, embora tenha sido observada diminuição de massa corporal nos animais submetidos à Privação Materna, resultados que vão ao encontro da literatura (Wertheimer et al., 2016), não foram observadas diferenças entre os grupos para os testes comportamentais comumente avaliados para validar os efeitos da Privação Materna, como o labirinto em cruz elevado e o nado forçado (Marco et al., 2015), além de não terem sido observadas diferenças entre os grupos para os comportamentos relacionados ao álcool.

Como o desempenho nos testes de labirinto em cruz elevado, nado forçado (Maccari et al., 2014), sensibilização comportamental e (Cole et al., 1990) e, possivelmente, preferência condicionada por lugar (Contarino et al., 2017) é influenciado por alterações do eixo HPA, além de que o peso corporal está relacionado a mudanças no balanço energético, é possível que nos camundongos que passaram pela PM houve alteração da regulação do balanço energético, induzido pela fome, mas não houve a desestabilização do período de hiporresponsividade do eixo HPA porque as mães compensaram o cuidado materno. Isso poderia explicar o fato de não haver diferenças significantes entre os grupos para os parâmetros estudados nesse projeto.

A.6 CONCLUSÃO

O modelo de estresse por Privação Materna no PND 9 não induziu alterações de comportamento do tipo ansioso ou depressivo, ao contrário do esperado para esse tipo de estresse. Além disso, também não foram observadas diferenças para os comportamentos relacionados ao álcool. Contudo, foi observada diferença de peso entre os grupos, um resultado interessante a ser explorado.

PARTE B – Enriquecimento Ambiental

Na segunda parte do projeto, utilizou-se o modelo de Enriquecimento Ambiental. De modo a também cobrir períodos de desenvolvimento, assim como na Privação Materna, os animais permaneceram no ambiente enriquecido do desmame até a idade adulta. Abaixo a sessão relativa ao experimento do Enriquecimento Ambiental.

B.3 MATERIAL E MÉTODOS

Figura 6 – Desenho experimental e coortes utilizadas, cada qual com os respectivos testes que foram feitos.

B.3.1 Animais

Abaixo os métodos relativos ao uso de animais.

B.3.1.1 Criação e eutanásia

Os procedimentos são os mesmos aos descritos na parte A. Após eutanásia alguns órgãos foram dissecados para pesagem (baço, glândulas adrenais e depósito de gordura perigonadal). Encéfalos foram coletados e congelados em isopentano para ensaio de BDNF. Todos os procedimentos descritos estão de acordo com as normas de experimentação em animais estabelecidas pelo CONCEA e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do ICB (CEUA ICB – número de protocolo 2589301117). Camundongos CT ou EA foram pareados individualmente com fêmeas *naïve* para dar origem à geração F₁. A prole foi alojada em gaiolas padrão durante toda a vida.

B.3.1.2 Enriquecimento Ambiental

Os animais do grupo experimental foram colocados no Enriquecimento Ambiental (EA) logo após o desmame (PND 21), permanecendo nesse ambiente até a idade adulta (PND 70), com duração ininterrupta ao longo dos experimentos comportamentais. As caixas de enriquecimento eram maiores que as caixas padrão para camundongos (42 cm comprimento x 28 cm largura x 21,5 cm altura) e tinham rodinha de exercício, casinha, brinquedos e objetos feitos de diferentes materiais, para estimular o comportamento exploratório e aumentar a interação entre os animais. A posição desses itens foi trocada semanalmente, enquanto as caixas e todos os itens foram trocados e renovados duas vezes por semana. Num outro experimento (Figura 6, experimento F₁-Machos - Breve EA), uma segunda coorte de filhos de pais controle ou enriquecido foram colocados no EA por um curto período de tempo (de PND 77 a 85). Todas as análises fisiológicas, comportamentais e moleculares foram obtidas de animais adultos (com PND 70 a 85).

B.3.1.3 Esfregaço vaginal

O esfregaço vaginal foi realizado para avaliação do ciclo estral antes ou depois dos testes comportamentais, de modo que apenas as fêmeas em diestro foram consideradas. Para o Teste de Escolha de Parceiro foram utilizadas fêmeas em estro. Resumidamente, 40 µL de salina foram introduzidos no canal vaginal e o material foi analisado em microscópio óptico a 40x (Byers et al., 2012).

B.3.2 Testes comportamentais

Abaixo os testes comportamentais utilizados.

B.3.2.1 Campo Aberto

Esse teste foi utilizado com a mesma finalidade que o descrito na parte A. Entretanto, neste experimento os animais foram submetidos ao Campo Aberto por 10 minutos, de modo a se analisar a locomoção minuto a minuto.

B.3.2.2 Labirinto de Barnes

Esse teste foi utilizado para avaliar a memória espacial. O aparato consiste em uma arena circular de 92 cm de diâmetro, elevada 105 cm acima do chão e dotada de 20 buracos, de 5 cm de diâmetro e equidistantes entre si, dispostos perto de sua borda. Conectado a um desses buracos encontra-se uma gaiola escura, em que o animal pode se esconder dos estímulos aversivos apresentados no labirinto (luz – 112.000 lux no centro e cerca de 650 nas bordas - e ruído proveniente de um metrônomo eletrônico – 72 dB). Na sala, próximas ao labirinto, encontram-se pistas visuais que servem para a orientação espacial do camundongo. Foi adotado o protocolo de 4 dias, espaçados 24h entre eles. Em todos os dias o camundongo foi colocado no centro do aparato e mantido dentro de uma câmara escura por 10 s. Passado esse período, o ruído foi ligado e o animal pode explorar o aparato. No primeiro dia (habituação), o camundongo foi guiado até o buraco conectado à caixa de escape. Assim que ele entrou, o som foi desligado e ele pode permanecer no abrigo por 1 min. No segundo e terceiro dias (fase de treinamento), o camundongo teve 3 minutos para explorar o aparato e o experimento foi encerrado quando o animal entrasse no buraco certo, permanecendo no abrigo por 1 min, ou após os 3 minutos de teste. Foram adotadas 4 sessões de treinamento por dia, espaçadas cerca de 1 hora entre si. No quarto dia (dia do teste), o camundongo pode explorar o aparato livremente por 90 s. Foram medidos o número de erros e a latência para encontrar o buraco correto.

B.3.2.3 Tubo de Dominância Social

Esse teste foi utilizado para avaliar a dominância social. O aparato consiste de um tubo de 30 cm de comprimento, de acrílico transparente. Em cada abertura do tubo foi colocado um macho de cada grupo (CT ou EA), de modo que eles se encontrassem no centro do tubo e tivessem que empurrar um ao outro para passar por ele. O camundongo perdedor foi considerado aquele que foi empurrado pelo oponente ou que deliberadamente abandonou o tubo. Todos os camundongos foram confrontados entre si de modo pareado. A porcentagem de vitória foi calculada dividindo-se as vitórias apresentadas por cada animal pelo total de confrontos realizados, excluindo-se os empates.

B.3.2.4 Teste de Escolha de Parceiro

Esse teste foi adotado para avaliar a atratividade dos machos de cada grupo. O teste foi feito de acordo com o paradigma previamente descrito por Mitra e Sapolsky (2012). Um aparato de 42 x 28 x 21,5 cm, dividido por uma parede com abertura no centro, foi usado para o teste. Uma fêmea *naïve* em estro foi colocada para explorar o aparato livremente por 10 minutos, enquanto sua atividade foi gravada por uma câmera localizada no teto da sala. Após a sessão de habituação, camundongos machos de cada grupo (CT ou EE) foram colocados dentro de pequenas gaiolas, com maravalha de suas caixas originais, nos lados opostos de cada câmara e a mesma fêmea foi colocada para explorar o aparato novamente por 10 minutos. Os vídeos foram analisados em EthoVision® XT 14 (Noldus) para o tempo de permanência em cada câmara.

B.3.3 Ensaios de ELISA

Abaixo os métodos para os ensaios de ELISA.

B.3.3.1 Dosagem de BDNF

Os cérebros foram coletados, congelados em isopentano e armazenados em -80 °C. Os hipocampus então foram dissecados, pesados e passaram por extração proteica como descrito em Rueda et al. (2012). Brevemente, cada amostra foi mergulhada em 1 mL de tampão de lise (100 mM PIPES pH 7,0, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2% BSA, 0,20% Triton X-100 e 1% coquetel inibidor de protease, Sigma-Aldrich, Cat# P8340) e sonicado por 15 s. Outros 3 mL de tampão de lise foram adicionados e as amostras foram sonicadas novamente a 15 s, depois da qual foram centrifugadas a 16.000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, diluído e analisado com kit de ELISA para BDNF (BDNF E_{max}® ImmunoAssay System, Promega, Cat# G7610), de acordo com as instruções do fabricante.

B.3.3.2 Dosagem de corticosterona

Os animais foram realojados em caixas padrão limpas, apenas para realização do procedimento, e ambientados à sala de coleta de sangue por 30 minutos. O sangue da cauda foi coletado em tubos heparinizados 3 h após as luzes terem sido desligadas. O plasma foi obtido por centrifugação (2.000 g por 10 min a 4 °C) e analisado com kit de ELISA para corticosterona (Enzo® Life Sciences, Cat# ADI-901-097), de acordo com as instruções do fabricante.

B.3.4 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto a homogeneidade pelo teste de Levene. Dados não paramétricos foram analisados com teste de Mann-Whitney U. Dados paramétricos e não homogêneos foram analisados com teste t-Student com correção de Welch. Testes t-Student e ANOVA de medidas repetidas foram adotados quando aplicável. Os gráficos de sobrevivência foram analisados com teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon em GraphPad Prism 7.0d. ANOVA de medidas repetidas foi seguida de teste *post-hoc* Sidak-Newman-Keuls. As análises foram feitas no software SPSS 25. Os gráficos foram feitos em *GraphPad Prism 7.0d*. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

B.4 RESULTADOS

Abaixo a descrição dos resultados do experimento de Enriquecimento Ambiental.

B.4.1 Fisiológicos

Descrição dos resultados de parâmetros fisiológicos.

B.4.1.1 O EA promoveu efeitos fisiológicos em camundongos machos F_0

Camundongos machos expostos ao EA da infância à idade adulta apresentaram menor peso corporal (Figura 7A, $t_{(37)}=4,41$; $p\leq 0,001$) e menor peso relativo de gordura perigonadal, um indicativo de gordura visceral (Figura 7C, $U=0$; $p\leq 0,001$), que sugere que esses camundongos eram menos sedentários que os camundongos controle. Os camundongos EA também apresentaram maior peso relativo do baço (Figura 8A, $U=4$; $p\leq 0,001$). As glândulas adrenais dos camundongos EA também apresentaram aumento de peso relativo (Figura 8C, $t_{(34)}=-6,006$; $p\leq 0,000$), sugerindo um efeito no eixo HPA, embora não houvesse diferenças nos níveis de corticosterona (Figura 8E, $U=10$; $p=0,240$). De modo a investigar a dispersão dos dados de corticosterona, fez-se um gráfico dos valores individuais de corticosterona na ordem em que cada camundongo foi retirado da caixa (Figura 9A). Pode-se observar que o segundo animal retirado da caixa EA apresenta um pico de corticosterona e os valores reduzem sequencialmente para cada camundongo, até atingir, no último animal, um valor próximo ao do observado para os animais controle.

A análise do hipocampo mostrou que camundongos EA apresentam maior peso hipocampal (Figura 10A, $t_{(18)}=-4,077$; $p\leq 0,001$) assim como maiores níveis de BDNF (Figura 10C, $t_{(14)}=-2,938$; $p\leq 0,01$).

B.4.1.2 Camundongos F_1 -Machos de pais EA não apresentam alterações em parâmetros fisiológicos

Camundongos machos filhos de pais EA (F_1 -Machos-EA) não apresentaram diferenças no peso corporal (Figura 7B, Condições de Alojamento: $F_{(1,49)}=0,43$; $p=0,514$) ou no peso relativo de gordura perigonadal (Figura 7D, $t_{(34)}=-0,242$; $p=0,810$). Eles não apresentaram diferenças no peso relativo do baço (Figura 8B, $U=108$; $p=0,091$), no peso relativo das glândulas adrenais (Figura 8D, $t_{(32)}=1,197$; $p=0,240$) ou de corticosterona (Figura 8F, $t_{(8)}=-1,304$; $p=0,229$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no peso hipocampal (Figura 10B, $t_{(18)}=-0,858$; $p=0,402$) ou níveis de BDNF (Figura 10D, $t_{(14)}=-1,695$; $p=0,112$).

B.4.1.3 Camundongos F₁-Fêmeas de pais EA possuem menor peso relativo das glândulas adrenais

As fêmeas filhas de pais EA não apresentaram diferenças de peso corporal (Figura 7B, Condições de Alojamento: $F_{(1,50)}=0,150$; $p=0,701$) ou de peso relativo de gordura perigonadal (Figura 7D, $t_{(35)}=1,016$; $p=0,317$). Elas não apresentam diferenças no peso relativo do baço (Figura 8B, $t_{(25,34)}=-0,203$; $p=0,841$). As fêmeas filhas de pais EA apresentam menor peso relativo das glândulas adrenais que o grupo CT (Figura 8D, $t_{(35)}=3,114$; $p\leq 0,01$), mas não houve diferenças nos níveis de corticosterona (Figura 8F, $t_{(9)}=-0,748$; $p=0,473$).

A análise do hipocampo não mostrou diferenças de peso entre os grupos (Figura 10B, $t_{(18)}=-0,696$; $p=0,495$).

Figura 7 – EA paterno reduziu peso corporal e peso relativo de gordura perigonadal em camundongos F_0 .

Peso corporal

Peso relativo da gordura perigonadal

A) Peso corporal terminal ($n=19/20$). B) Peso ganho pela prole em medidas semanais do pós-desmame à idade adulta (Machos: $n=23/28$; Fêmeas: $24/28$; dados representados como média $\pm$ erro padrão). C) Peso relativo de gordura perigonadal ($n=10$ /grupo; dados representados como mediana $\pm$ intervalo interquartil). D) Peso relativo de gordura perigonadal na prole (Machos: $n=18$ /grupo; Fêmeas: $19/18$). *** $p \leq 0.001$. Dados representados como média $\pm$ erro padrão, exceto quando indicado o contrário.

Figura 8 – EA paterno aumento o peso relativo do baço e das glândulas adrenais em camundongos F_0 e diminuiu o peso das glândulas adrenais em F_1 -Fêmeas.

Peso relativo do baço

Peso relativo das glândulas adrenais

Corticosterona plasmática

A) Peso relativo terminal do baço (n=19/20; dados representados como mediana $\pm$ intervalo interquartil). B) Peso relativo do baço da prole (Machos: n=18/grupo; dados representados como

mediana $\pm$ intervalo interquartil; Fêmeas: $n=24/28$; dados representados como média $\pm$ erro padrão). C) Peso relativo terminal das glândulas adrenais em camundongos F_0 ($n=16/20$). D) Peso relativo das glândulas adrenais da prole (Machos: $n=17$ /grupo; Fêmeas: $n=19/18$). E) Corticosterona plasmática basal paterna ($n=6$ /grupo; dados representados como mediana $\pm$ intervalo interquartil). F) Corticosterona plasmática basal da prole (Machos: $n=4/6$; Fêmeas: $n=5/6$). ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. Dados representados como média $\pm$ erro padrão, a menos que especificado o contrário.

Figura 9 – Valores individuais de corticosterona plasmática basal, na ordem em que os animais foram retirados da gaiola.

Coleta de sangue para ensaio de corticosterona

Figura 10 – EA paterno aumentou peso hipocampal e expressão de BDNF em camundongos F_0 .

Peso do hipocampo

BDNF no hipocampo

A) Peso hipocampal paterno ($n=10$ /grupo). B) Peso hipocampal da prole (Machos e Fêmeas: $n=10$ /grupo). C) Expressão paterna de BDNF hipocampal ($n=8$ /grupo). D) Expressão hipocampal de BDNF em F_1 -Machos ($n=8$ /grupo). ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. Dados representados como média $\pm$ erro padrão.

B.4.2 Comportamentais

Descrição dos resultados de parâmetros comportamentais.

B.4.2.1 O EA promoveu efeitos comportamentais em camundongos machos F_0

Os camundongos EA apresentaram menor locomoção total no teste do Campo Aberto (Figura 11A, Condições de Alojamento: Grupo $F_{(1,18)}=36,549$; $p\leq 0,001$), com queda acentuada da locomoção a partir do segundo minuto (Tempo*Condições de Alojamento: $F_{(9,162)}=3,007$; $p\leq 0,01$; teste *post-hoc* de Sidak-Newman-Keuls CT em Min1 vs Min2: $p=0,752$; EA em Min1 vs Min2: $p\leq 0,001$), que pode ser interpretado como indicativo de melhor processamento de novidade. No Campo Aberto eles também apresentaram discreta redução no tempo de permanência na periferia, embora não seja estatisticamente significativa (Figura 11C, $U=25$, $p=0,063$). No Labirinto de Barnes, os camundongos EA apresentaram melhor desempenho durante as sessões de treinamento, cometendo menos erros que o grupo CT (Figura 12A, Condições de Alojamento: $F_{(1,18)}=7,230$; $p\leq 0,05$), um indicativo de melhor memória espacial. As diferenças observadas no peso hipocampal e BDNF corroboram com essa observação. Na sessão de teste não houve diferenças entre os grupos no número de erros (Figura 12C, $U=34$; $p=0,247$) ou na latência para entrar na caixa de escape (Figura 12E, $\chi^2=0,002$; $p=0,966$), provavelmente porque o grupo CT aprendeu a tarefa eficientemente durante as sessões de treinamento. Os camundongos EA também apresentaram maior porcentagem de vitórias no Tubo de Dominância Social (Figura 13A, $t_{(18)}=-4,598$; $p\leq 0,001$), sugerindo que os camundongos EA são mais socialmente dominantes que os CT.

Também houve forte correlação entre o tamanho das adrenais e dominância (Figura 14A, $p\leq 0,001$, $R=0,764$) e correlação moderada entre tamanho do baço e dominância (Figura 14B, $p\leq 0,01$, $R=0,576$).

B.4.2.2 Camundongos F_1 -Machos de pais EA apresentam déficits comportamentais

Não foram observadas diferenças entre os camundongos machos na locomoção do Campo Aberto (Figura 11B, Condições de Alojamento: $F_{(1,14)}=0,580$; $p=0,459$) ou do tempo de permanência na periferia do aparato (Figura 11D, $t_{(14)}=-0,533$; $p=0,603$). Camundongos machos filhos de pais EA não apresentaram diferenças nas sessões de treinamento do Labirinto de Barnes (Figura 12B;

Condições de Alojamento: $F_{(1,18)}=0,772$; $p=0,391$), mas cometeram mais erros durante a sessão de teste que o grupo CT (Figura 12D, $U=21,5$; $p\leq 0,05$), assim como apresentaram maior latência para entrar na caixa de escape durante a sessão de teste (Figura 12F, $\chi^2=3,838$; $p\leq 0,050$), sugerindo redução da memória espacial. No Tubo de Dominância Social eles apresentaram menor porcentagem de vitórias quando comparado ao grupo CT (Figura 13B, $U=8,5$; $p\leq 0,01$) e no Teste de Escolha de Parceiro eles foram menos preferidos por fêmeas férteis receptivas (Figura 13C, Condições de Alojamento: $F_{(1,12)}=6,093$; $p\leq 0,05$; Tempo*Condições de Alojamento: $F_{(1,12)}=7,916$; $p\leq 0,05$, seguido de teste *post-hoc* Sidak-Newman-Keuls entre CT-Teste e EA-Teste: $p\leq 0,01$).

Houve correlação moderada entre dominância e atratividade (Figura 14C, $p\leq 0,05$, $R=0,548$), peso das adrenais e atratividade (Figura 14D, $p\leq 0,05$, $R=0,573$) e níveis de BDNF hipocâmpais e número de erros na sessão de teste do Labirinto de Barnes (Figura 14E, $p\leq 0,05$, $R=0,601$).

Surpreendentemente, os resultados comportamentais são opostos aos observados nos pais EA (Tabela 2).

B.4.2.3 Camundongos F_1 -Fêmeas de pais EA não apresentam alterações em parâmetros comportamentais

As fêmeas filhas de pais EA não apresentam diferenças de locomoção no teste do Campo Aberto (Figura 11B, Condições de Alojamento: $F_{(1,15)}=1,384$; $p=0,258$) ou no tempo de permanência na periferia (Figura 11D, $t_{(11,74)}=0,251$; $p=0,806$). Não foram encontradas diferenças no número de erros cometidos no Labirinto de Barnes nas sessões de treinamento (Figura 12B, Condições de Alojamento: $F_{(1,16)}=0,166$; $p=0,689$), nos erros cometidos na sessão de teste (Figura 12D, $U=31$; $p=0,959$) ou na latência para entrar na caixa de escape durante a sessão de teste (Figura 12F, $\chi^2=0,272$; $p=0,602$).

Figura 11 – EA paterno melhorou processamento de novidade em camundongos F_0 .

Campo Aberto

Distância percorrida

Tempo na periferia

A) Distância percorrida, minuto a minuto, no Campo Aberto por camundongos F_0 ($n=10$ /grupo). Camundongos EA apresentam diminuição estatisticamente significativa a partir do Min2. B) Distância percorrida, minuto a minuto, no Campo Aberto pela prole (Machos: $n=8$ /grupo; Fêmeas: $n=9/8$). C) Tempo de permanência na periferia do Campo Aberto por camundongos F_0 ($n=10$ /grupo; dados representados como mediana $\pm$ intervalo interquartil). D) Tempo de permanência na periferia do Campo Aberto pela prole (Machos: $n=8$ /grupo; Fêmeas: $n=9/8$). *** $p \leq 0.001$. Dados representados como média $\pm$ erro padrão exceto quando especificado o oposto.

Figura 12 – EA paterno aumentou a memória espacial em camundongos F_0 e diminuiu em camundongos F_1 -Machos.

Labirinto de Barnes

Erros nas sessões de treinamento

Erros no teste

Latência no teste

A) Erros ponderados cometidos por camundongos F_0 durante as sessões de treinamento ($n=10$ /grupo; dados representados como média $\pm$ erro padrão). De modo geral, os camundongos EA

cometeram menos erros. B) Erros ponderados cometidos pela prole durante as sessões de treinamento (Machos: $n=10/\text{grupo}$; Fêmeas: $n=10/9$; dados representados como média $\pm$ erro padrão). C) Erros ponderados cometidos por camundongos F_0 durante a sessão de teste ($n=10/\text{grupo}$; dados representados como mediana $\pm$ intervalo interquartil). D) Erros ponderados cometidos pela prole durante a sessão de teste (Machos: $n=10/\text{grupo}$; Fêmeas: $n=8/\text{grupo}$; dados representados como mediana $\pm$ intervalo interquartil). E) Latência para entrar na caixa de escape durante a sessão de teste por camundongos F_0 ($n=10/\text{grupo}$). F) Latência para entrar na caixa de escape durante a sessão de teste pela prole (Machos: $n=10/\text{grupo}$; Fêmeas: $n=8/\text{grupo}$). $*p \leq 0.05$.

Figura 13 – EA paterno aumentou dominância em camundongos F_0 e diminuiu a dominância e atratividade em camundongos F_1 -Machos.

Teste do Tubo de Dominância Social

Teste de Escolha de Parceiro

A) Porcentagem de vitórias em camundongos F_0 ($n=10/\text{grupo}$; dados representados como média $\pm$ erro padrão). B) Porcentagem de vitórias em F_1 -Machos ($n=8/\text{grupo}$; dados representados como

mediana $\pm$ intervalo interquartil). C) Tempo de permanência da fêmea em estro na câmara pareada com o camundongo F₁-Macho (n=8/grupo; dados representados como média $\pm$ erro padrão). Há diferença estatisticamente significativa entre os grupos na sessão de teste. **p $\leq$ 0.01; ***p $\leq$ 0.001.

Figura 14 – Correlações com intensidade moderada a alta entre os parâmetros observados em camundongos F₀ e F₁-Machos.

A) Porcentagem de vitórias e peso terminal das glândulas adrenais em camundongos F₀. B) Porcentagem de vitórias e peso terminal do baço em camundongos F₀. C) Tempo de permanência da fêmea em estro na câmara pareada com o camundongo F₁-Macho e porcentagem de vitórias em camundongos F₁-Machos. D) Tempo de permanência da fêmea em estro na câmara pareada com o camundongo F₁-Macho e peso terminal das glândulas adrenais em camundongos F₁-Machos. E) Erros ponderados durante o teste e concentração de BDNF hipocampal em camundongos F₁-Machos. SDTT=Tubo de Dominância Social.

B.4.3 Um período curto de EA durante a idade adulta é capaz de reverter os *déficits* comportamentais observados nos camundongos F₁-Machos-EA

Abaixo a descrição dos resultados da exposição dos filhotes machos a um breve período de EA.

B.4.3.1 Fisiológicos

De modo a avaliar a possibilidade de que os *déficits* comportamentais observados em camundongos F₁-Machos-EA possam ser explicados por uma incompatibilidade (*mismatch*) entre o ambiente paterno e o deles próprios, uma outra

coorte de camundongos F₁-Machos (filhos de camundongos CT e EA) foi exposta a um breve período de EA (8 dias), começando pelo PND 77, para observar se os déficits comportamentais apresentados por F₁-Machos-EA poderiam ser revertidos.

Não foram encontradas diferenças de peso corporal entre os grupos ($t_{(12,84)}=-2,006$; $p=0,066$) ou de peso relativo da gordura perigonadal ($t_{(13,12)}=-0,005$; $p=0,996$). Eles não apresentaram diferenças no peso relativo do baço ($t_{(15)}=-0,263$; $p=0,796$) ou das glândulas adrenais ($t_{(14)}=-0,012$; $p=0,990$). Gráficos não mostrados.

B.4.3.2 Comportamentais

Confirmando a hipótese proposta, não foram mais encontradas diferenças entre os grupos no Labirinto de Barnes, no número de erros cometido durante as sessões de treinamento (Figura 15A, Condições de Alojamento: $F_{(1,15)}=2,880$; $p=0,110$) e nem nos erros cometidos durante o teste (Figura 15B, $U=29,5$; $p=0,571$) ou latência para escapar durante o teste (Figura 15C, $\chi^2=0,847$; $p=0,357$). Os camundongos F₁-Machos-EA expostos a um curto período de EA não apresentaram diferenças estatisticamente significativas do grupo CT no Teste de Escolha de Parceiro (Figura 16, Condições de Alojamento: $F_{(1,10)}=0,784$; $p=0,397$ e Tempo*Condições de Alojamento: $F_{(1,10)}=0,015$; $p=0,906$).

Figura 15 – Um breve período de EA reverteu os déficits de memória espacial previamente observados em camundongos F₁-Machos.

Labirinto de Barnes - F₁-Machos-EA

A) Erros ponderados cometidos durante as sessões de treinamento por camundongos F₁-Machos expostos a um breve EA ($n=7/10$; dados representados como média $\pm$ erro padrão). B) Erros ponderados cometidos durante a sessão de teste por camundongos F₁-Machos expostos a um breve EA ($n=7/10$; dados representados como mediana $\pm$ intervalo interquartil). C) Latência para entrar na

caixa de escape durante a sessão de teste por camundongos F₁-Machos expostos a um breve EA (n=7/10).

Figura 16 – Um breve período de EA reverteu a baixa atratividade previamente apresentada por camundongos F₁-Machos.

Teste de Escolha de Parceiro

Tempo de permanência da fêmea em estro na câmara pareada com os camundongos F₁-Machos expostos a um breve EA (n=7/grupo; dados representados como média $\pm$ erro padrão).

As Tabelas 1 e 2 resumem os resultados estatísticos e diferenças fisiológicas e comportamentais encontradas.

Tabela 1 – Resumo dos resultados de testes estatísticos.

	F ₀		F ₁ -Machos		F ₁ -Fêmeas		F ₁ -Machos –EA	
	t/F/U	p	t/F/U	p	t/F/U	p	t/F/U	p
Peso corporal	t ₍₃₇₎ =4,407	0,000	Grupo: F _(1,49) =0,43	0,514	Grupo: F _(1,50) =0,15	0,701	t _(12,844) =-2,006	0,066
			Tempo: F _(7,343) =2717,81	0,000	Tempo: F _(7,350) =1035,80	0,000		
			Interação: F _(7,343) =4,98	0,000	Interação: F _(7,350) =0,19	0,987		
Peso relativo de gordura	U=0	0,000	t ₍₃₄₎ =-0,242	0,810	t ₍₃₅₎ =1,016	0,317	t _(13,123) =-0,005	0,996
Peso relativo do baço	U=4	0,000	U=108	0,091	t _(25,336) =-0,203	0,841	t ₍₁₅₎ =-0,263	0,796
Peso relativo das adrenais	t ₍₃₄₎ =-6,006	0,000	t ₍₃₂₎ =1,197	0,240	t ₍₃₅₎ =3,114	0,004	t ₍₁₄₎ =-0,012	0,990
Corticosterona	U=10	0,240	t ₍₈₎ =-1,304	0,229	t ₍₉₎ =-0,748	0,473	-----	-----
Hipocampo	t ₍₁₈₎ =-4,077	0,001	t ₍₁₈₎ =-0,858	0,402	t ₍₁₈₎ =-0,696	0,495	-----	-----
BDNF	t ₍₁₄₎ =-2,938	0,011	t ₍₁₄₎ =-1,695	0,112	-----	-----	-----	-----
Campo Aberto – Distância	Grupo: F _(1,18) =36,549	0,000	Grupo: F _(1,14) =0,580	0,459	Grupo: F _(1,15) =1,384	0,258	-----	-----
	Tempo: F _(9,162) =12,762	0,000	Tempo: F _(9,126) =10,536	0,000	Tempo: F _(9,135) =1,718	0,091		
	Interação: F _(9,162) =3,007	0,002	Interação: F _(9,126) =0,359	0,952	Interação: F _(9,135) =0,792	0,624		
Campo Aberto – Tempo na periferia	U=25	0,063	t ₍₁₄₎ =-0,533	0,603	t _(11,739) =0,251	0,806	-----	-----
Barnes – Erros durante treinamento	Grupo: F _(1,18) =7,230	0,015	Grupo: F _(1,18) =0,772	0,391	Grupo: F _(1,16) =0,166	0,689	Grupo: F _(1,15) =2,121	0,166
	Tempo: F _(7,126) =6,198	0,000	Tempo: F _(7,126) =10,630	0,000	Tempo: F _(7,112) =7,594	0,000	Tempo: F _(7,105) =8,526	0,000
	Interação: F _(7,126) =1,345	0,235	Interação: F _(7,126) =0,741	0,638	Interação: F _(7,112) =0,518	0,819	Interação: F _(7,105) =1,065	0,391
Barnes – Erros durante teste	U=34	0,247	U=21,5	0,029	U=31	0,959	U=29,5	0,571
Barnes – Latência no teste	X ² =0,002	0,966	X ² =3,838	0,050	X ² =0,2717	0,602	X ² =0,8474	0,357
SDTT – Dominância	t ₍₁₈₎ =-4,598	0,000	U=8,5	0,010	-----	-----	-----	-----
Teste de Escolha de Parceiro – Tempo na câmara	-----	-----	Grupo: F _(1,12) =6,093	0,030	-----	-----	Grupo: F _(1,10) =0,784	0,397
			Tempo: F _(1,12) =0,011	0,920			Tempo: F _(1,10) =0,0031	0,956
			Interação: F _(1,12) =7,916	0,016			Interação: F _(1,10) =0,015	0,906

Tabela 2 – Resumo dos resultados. Grupos experimentais comparados aos respectivos controles.

Medidas	F ₀	F ₁ -M	F ₁ -F	F ₁ -M-EA
Peso corporal	<	=	=	=
Peso gordura perigonadal	<	=	=	=
Peso baço	>	=	=	=
Peso adrenais	>	=	<	=
Corticosterona	=	=	=	
Peso hipocampo	>	=	=	
Concentração BDNF	>	=		
Processamento de novidade	>	=	=	
Memória espacial	>	<	=	=
Dominância	>	<		
Atratividade		<		=

B.5 DISCUSSÃO

Neste experimento, os camundongos Swiss machos foram alojados em ambiente enriquecido logo após o desmame (PND 21) de modo a cobrir períodos de neurodesenvolvimento, assim como o modelo de PM, uma vez que é proposto que a exposição ambiental durante esses períodos aumenta a possibilidade de serem observados efeitos na prole (Bale, 2015). Foram analisados parâmetros fisiológicos e comportamentais, com efeitos diversos na geração F_0 , como diminuição de peso corporal e de depósito de gordura visceral, aumento das glândulas adrenais e do baço, aumento da massa hipocampal, além de melhor processamento de novidade (Campo Aberto), memória espacial (Labirinto de Barnes), dominância social (Tubo de Dominância Social) e, por fim, aumento de expressão de BDNF total no hipocampo. Há forte correlação entre dominância e tamanho das adrenais e moderada correlação entre dominância e tamanho do baço.

O enriquecimento ambiental é conhecido por promover efeitos fisiológicos e comportamentais, geralmente positivos, em camundongos. O modelo baseia-se na apresentação de brinquedos e roda de exercício na caixa moradia, o que também favorece a interação social entre os pares. Em nosso laboratório, ele tem sido utilizado de modo eficaz para modular comportamentos relacionados ao álcool, como o consumo voluntário de álcool (Marianno; Abrahao; Camarini, 2017), a preferência condicionada por lugar (Rae et al., 2018) e a sensibilização comportamental (Rueda et al., 2012), com a ressalva de que nesses trabalhos o EA tem sido aplicado durante a idade adulta dos camundongos. No presente trabalho, alguns dos efeitos positivos do EA foram replicados, como melhora de memória espacial (van Praag; Kempermann; Gage, 2000; Mesa-Gresa; Pérez-Martinez; Redolat, 2013), aumento de dominância, aumento de hipocampo e expressão de BDNF hipocampal. Entretanto, outros efeitos menos descritos também foram observados nesse trabalho, como alteração do tamanho das adrenais (Huzard et al., 2015), que indicam alteração do eixo HPA, e aumento do peso do baço, que pode estar associado a alterações imunes.

Essas diferenças podem ser atribuídas a duas peculiaridades do paradigma de EA utilizado nesse trabalho: o período de exposição e a linhagem de camundongo utilizados. As janelas de desenvolvimento – e consequente maior vulnerabilidade a fatores ambientais – não se restringem aos períodos pré-natal ou pós-natal

imediatos, já que a adolescência também é caracterizada por um período de importantes alterações hormonais e de estruturas cerebrais em desenvolvimento, como o córtex pré-frontal e regiões mesolímbicas (Spear, 2000). Dessa forma, é provável que a exposição ao EA durante as fases tardias de desenvolvimento tenha promovido efeitos de plasticidade do desenvolvimento, os quais são descritos como alterações no fenótipo que ocorrem na tentativa de aumentar a adaptação ao ambiente vivenciado durante esses períodos (Bateson et al., 2004).

Outra peculiaridade deste trabalho foi a linhagem de camundongos utilizada. Sabe-se que a linhagem *Swiss* expressa alta territorialidade, inclusive sendo usada para o modelo de residente-intruso (Miczek; Thompson; Shuster, 1982). Como o EA baseia-se na introdução de novidade pela apresentação de brinquedos para estimulação sensorial e roda de exercício para exercício voluntário, ele pode induzir aumento de comportamento territorial (Mesa-Gresa; Pérez-Martinez; Redolat, 2013). No presente trabalho, a constante apresentação de novidade – que ocorreu por volta de 3 vezes por semana com a troca das caixas e/ou mudança na posição dos brinquedos –, pode ter aumentado o comportamento territorial e disputa por dominância, o que se refletiu no aumento da porcentagem de vitórias no Tubo de Dominância Social. A forte correlação observada entre o peso das glândulas adrenais e a dominância sugere que os machos mais dominantes apresentam alteração do eixo HPA – como indicado pelo aumento do tamanho das adrenais –, portanto, denunciando instabilidade da hierarquia social nos camundongos EA, já que os dominantes estariam constantemente disputando a hierarquia (Sapolsky, 2005), e a mudança da dinâmica social na gaiola moradia pode ter contribuído para alguns dos efeitos observados nesse estudo. Como houve correlação média entre o peso do baço e dominância, é possível que alguns dos animais dominantes apresentaram alteração do funcionamento do sistema imune. A avaliação da dominância entre os pares e níveis de agressão poderia fornecer mais dados sobre a dinâmica social dos animais.

Os dados de corticosterona plasmática dos animais EA, embora não tenham apresentado diferença com o grupo CT, mostram uma grande dispersão. Considerando que os animais foram alojados em uma gaiola nova para o procedimento de coleta de sangue, além de que o procedimento é potencialmente estressor e que possivelmente induz uma resposta nos animais da gaiola moradia que esperam para serem submetidos ao procedimento, a análise de corticosterona

plasmática individual, na ordem em que o animal foi retirado da gaiola moradia para coleta, sugere que o grupo EA apresenta uma resposta mais rápida ao estresse, com aumento e diminuição rápidos dos níveis de corticosterona plasmática, o que se contrapõe ao perfil apresentado pelo grupo CT, que consiste em uma resposta mais morosa.

Em relação aos resultados de processamento de novidade, avaliado no Campo Aberto, e de memória espacial, no Labirinto de Barnes, é possível observar que o erro da média apresentado pelo grupo EA é relativamente igual, ou mesmo ligeiramente menor, que o do grupo CT. Isso sugere que 1) caso a disputa por dominância tenha gerado diferentes coortes no grupo EA (exemplo, dominantes e submissos), esse efeito não se reflete nos resultados de processamento de novidade e memória espacial; ou 2) apesar das disputas por território, todos os animais tiveram acesso aos brinquedos de forma similar, o que resultou em melhora, de forma homogênea, do processamento de novidade e memória espacial.

Por fim, embora tanto a Privação Materna quanto o Enriquecimento Ambiental tenham promovido redução de peso corporal, é importante ressaltar que os camundongos expostos ao enriquecimento tiveram acesso a rodas de exercício, sendo, portanto, menos sedentários que os expostos à Privação Materna. É possível que a maior atividade física voluntária dos animais enriquecidos se reflita na diminuição de tecido adiposo visceral. Novamente, a baixa variabilidade dos dados de gordura perigonadal no grupo EA indica que, apesar das disputas por dominância, todos os camundongos tiveram acesso à roda de exercício de maneira similar, enfraquecendo a hipótese de que as disputas por dominância criaram diferentes coortes.

Concluindo, o paradigma de EA utilizado nesse trabalho apresenta um importante componente social decorrente do comportamento territorial entre os camundongos. Embora essa dinâmica possa ter sido importante para alguns dos efeitos observados com o paradigma utilizado (por exemplo, a maior dominância, maiores adrenais e baço), não há evidências de que ela tenha adicionado maior variabilidade aos dados. Como o estresse é uma reação fisiológica a perturbações, que podem ser tanto positivas (eustresse) quanto negativas (distresse), o componente de territorialidade do modelo pode não ter representado uma condição negativa (Selye, 1956). Adicionalmente, alguns trabalhos sugerem que o EA age como um inoculador de estresse, portanto, preparando os animais para lidarem

melhor com ambientes desafiadores, que outrora poderiam ser prejudiciais (Konkle et al, 2010; Crofton; Zhang; Green, 2015).

Como exposto acima, o protocolo de EA adotado foi eficaz em promover efeitos na geração F_0 . Portanto, camundongos machos adultos CT e EA foram utilizados para dar origem à geração F_1 , de modo a se investigar os efeitos na prole.

Como esperado, foram observados efeitos na prole, principalmente nos machos. Nos machos, não foram observadas diferenças anatômicas entre os grupos, mas os filhos de pais enriquecidos apresentaram pior memória espacial, menor dominância e também são menos preferidos por fêmeas férteis. Embora não houvesse diferença de BDNF hipocampal entre os grupos, há correlação moderada entre a performance no dia do teste do Labirinto de Barnes e BDNF, além de correlação moderada entre a atratividade e a dominância e a atratividade e o tamanho das adrenais, sugerindo que os animais mais dominantes, do grupo CT, teriam também mais chances de gerar prole. Em contrapartida, não foi possível observar correlação entre o tamanho das adrenais e o a dominância no Tubo de Dominância Social (assim como observado em F_0), o que sugere que os mecanismos por trás da correlação entre dominância e tamanho das adrenais, presentes em F_0 , não são relevantes nos camundongos machos de F_1 .

Nas fêmeas filhas de camundongos EA, em contrapartida, foi observada apenas diminuição das glândulas adrenais, sem alterações comportamentais avaliadas pelo Campo Aberto ou Labirinto de Barnes. A diferença nas adrenais sugere alteração no eixo HPA, e que portanto, elas possam responder de maneira diferente ao estresse. A diferença entre machos e fêmeas é comumente relatada nos estudos de herança epigenética, ora havendo maior penetrância dos efeitos ambientais paternos nos machos (Franklin et al., 2010), ora nas fêmeas (Short et al., 2016).

Os resultados comportamentais dos camundongos machos cujos pais foram expostos ao EA são, surpreendentemente, contrários aos apresentados pelos seus pais (Tabela 2). Essa diferença marcante entre pais e filhos não foi relatada em nenhum outro trabalho com exposição paterna ao enriquecimento (Arai et al., 2009; Yeshurun et al., 2017; Benito et al., 2018), uma vez que esses trabalhos mostraram aumento de LTP hipocampal em ambas as gerações, ou alteração de corticosterona e ACTH plasmáticos após estresse, apenas duas gerações seguintes (Yeshurun et al., 2017). Nos estudos citados, o EA foi aplicado apenas durante a idade adulta.

Mitra e Sapolsky (2012) propuseram uma análise etológica para o contexto laboratorial, sugerindo que manipulações ambientais podem alterar comportamentos inatos no sentido de gerar respostas adaptativas. Adotando a mesma abordagem, seria possível inferir que os camundongos machos filhos de pais EA seriam menos adaptados ao ambiente da gaiola padrão e, portanto, teriam menores chances de reprodução – o oposto do apresentado pelos seus pais. Os estímulos ambientais vivenciados durante o desenvolvimento podem ser preditivos do ambiente a ser encontrado durante a idade adulta, os quais consequentemente promovem efeitos de plasticidade do desenvolvimento, que preparariam o animal para aquele ambiente, no sentido de aumentar a aptidão (Nettle; Bateson, 2015). Esses efeitos poderiam também ser expressos na prole (Bateson et al., 2004), portanto aumentando a sua adaptação ao mesmo ambiente vivenciado pelos pais. Entretanto, caso haja um desencontro entre o ambiente previsto e o vivenciado, haveria um *mismatch* e diminuição de adaptação.

O efeito do *mismatch* já foi relatado em exemplos ecológicos. O mais conhecido é o da *Daphnia* sp., em que a exposição parental a pistas de um predador induz o desenvolvimento de uma estrutura de defesa na prole, a qual reduz a aptidão caso ela cresça em um ambiente livre de predador (Harvell, 1990). No contexto humano, o *mismatch* foi proposto como uma explicação para o surgimento de doenças: alterações epigenéticas acumuladas ao longo da vida, principalmente durante os estágios iniciais, preparam o indivíduo para viver no mesmo ambiente; caso ocorra um *mismatch*, haveria a possibilidade de desenvolvimento de doenças psiquiátricas (Schmidt, 2011). Essa proposição é interessante porque reduz o julgamento estritamente dual de um ambiente como “positivo” ou “negativo”, priorizando, em contrapartida, o histórico do desenvolvimento.

No contexto da herança de efeitos ambientais paternos, como eles são sinalizados por marcações epigenéticas no esperma (Gapp et al., 2014b, Rodgers et al., 2015), sugere-se que as alterações epigenéticas induzidas pelo ambiente, acumuladas pela geração parental, induzam plasticidade do desenvolvimento na prole. As consequências desse desenvolvimento enviesado poderiam ser adaptativas ou não, dependendo se as pistas ambientais herdadas fossem “restritivas” ou “preditivas”, codificando, respectivamente, “sacrifícios” a funções fisiológicas necessários à sobrevivência em um ambiente desfavorável ou adaptação

– e aumento de aptidão – ao ambiente previsto, similar ao parental (Nettle; Bateson, 2015; Lea et al., 2018).

Sugere-se que, no presente trabalho, a prole dos animais enriquecidos tenha herdado marcações epigenéticas como “pistas” do ambiente paterno, as quais teriam induzido plasticidade do desenvolvimento na prole dentro do modelo “preditivo”, aumentando a adaptação ao ambiente paterno, enriquecido. Admitindo que no contexto natural não haja grandes variações ambientais entre gerações subsequentes, a herança das experiências parentais de aptidão ofereceria a vantagem evolutiva de facilitar a adaptação da prole ao mesmo ambiente. O exemplo mais surpreendente desse fenômeno em contexto laboratorial foi descrito no trabalho de Dias e Ressler (2014), que observaram que quando pais são sujeitos ao medo condicionado por um odor característico, previamente neutro, a prole apresenta a mesma resposta, a qual deriva de um aumento da representação neuroanatômica para aquele odor. Esse efeito também se aplica ao caso da exposição a fomes generalizadas durante a gravidez e infância e aumento de prevalência de obesidade na idade adulta, quando a disponibilidade de alimento é recuperada, a qual é observada inclusive em humanos (Yang et al., 2008).

Dessa forma, levantou-se a hipótese de que a exposição dos filhotes machos de pais EA a um enriquecimento curto seria capaz de reverter os déficits comportamentais observados. Uma segunda coorte de camundongos machos foi exposta ao ambiente enriquecido por apenas 8 dias e avaliados no Labirinto de Barnes e no teste de Escolha de Parceiro. Importante considerar que o efeito sobre o desempenho em testes de memória baseados em estímulos aversivos é observado apenas após 3 semanas de exposição ao EA (Leger et al., 2015), enquanto o aumento de atratividade no teste de escolha de parceiro é relatado em protocolo de 14 dias (Mitra; Sapolsy, 2012).

Dando suporte à hipótese proposta, nos animais expostos ao breve período de EA não houve mais diferenças entre os grupos, eliminando os déficits observados nos camundongos machos filhos de pais EA. Adicionalmente, é possível que, devido ao *n* baixo utilizado para o grupo CT exposto ao curto EA (*n*=7), não foi possível observar um aumento estatisticamente significativo do desempenho dos camundongos filhos de pais EA expostos ao curto EA, embora a média dos dados desse grupo seja maior (Figuras 15 e 16). Embora não tenha sido realizado no

presente trabalho, seria interessante investigar se outros desafios, além do EA, levariam aos mesmos resultados observados.

Por último, os efeitos observados da herança epigenética podem ser influenciados pela alocação diferencial (*differential allocation*), que ocorre quando o investimento reprodutivo é influenciado pela atratividade do parceiro (Sheldon, 2000). Exemplos desse efeito foram descritos no marreco (*Anas platyrhynchos*) (Cunningham; Russel, 2000), cujas fêmeas botam ovos maiores e geram prole com melhores condições corporais quando acasalam com machos por elas escolhidos. Esse efeito também foi descrito em camundongos (Drickamer et al., 2000), em que a escolha das fêmeas pelos parceiros mais atraentes influencia na viabilidade e desempenho da prole. No contexto da herança epigenética, como alterações ambientais são capazes de modificar a atratividade de machos, é possível que esse efeito seja relevante. O exemplo dos marrecos sugere que os efeitos da alocação diferencial podem ocorrer não apenas no grau de cuidado materno, mas também durante a embriogênese. Portanto, esse pode ter sido um fator de confusão presente na maioria dos experimentos de herança epigenética, e mesmo a adoção interespecífica (*cross-fostering*) potencialmente não o excluiria. A fertilização in vitro, por sua vez, possivelmente exclui fatores naturais para a fecundação. Portanto, uma forma de corrigir esse problema seria transferir os embriões a uma mãe de aluguel (assumindo que a preferência ao macho não influenciaria o embrião, porque há uma breve escala temporal entre o acasalamento e fecundação). De fato, alguns trabalhos apontam que o efeito da exposição ambiental paterna pode ser regulado pelo cuidado materno (Mashoodh et al., 2018). Portanto, esse pode ter sido um fator de confusão na maioria dos trabalhos descritos, inclusive no presente estudo.

B.6 CONCLUSÃO

Os camundongos machos alojados em gaiolas enriquecidas apresentaram diversas respostas fisiológicas e comportamentais diferentes dos controles, e sua prole também apresentou alterações fenotípicas, de maneira sexo-dependente. Os machos apresentaram resultados comportamentais contrários aos dos pais, indicando uma diminuição da adaptação ao ambiente da gaiola padrão. Quando alojados por um curto período de tempo em ambiente enriquecido, os déficits

comportamentais não são mais observados. Apesar de uma análise mecanística não ter sido possível, estudos anteriores sugerem um mecanismo epigenético. Trabalhos futuros devem avaliar o *mismatch*, as consequências para o fenômeno de “*missing heritability*” e os mecanismos epigenéticos envolvidos.

REFERÊNCIAS*

- Arai JA, Li S, Hartley DM, Feig LA. Transgenerational rescue of a genetic defect in long-term potentiation and memory formation by juvenile enrichment. *J Neurosci*. 2009 Feb 4;29(5):1496-502. [10.1523/JNEUROSCI.5057-08.2009]
- Bale TL. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci*. 2015 Jun;16(6):332-44. [10.1038/nrn3818]
- Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE. Developmental plasticity and human health. *Nature*. 2004 Jul 22;430(6998):419-21.
- Benito E, Kerimoglu C, Ramachandran B, Pena-Centeno T, Jain G, Stilling RM, Islam MR, Capece V, Zhou Q, Edbauer D, Dean C, Fischer A. RNA-Dependent Intergenerational Inheritance of Enhanced Synaptic Plasticity after Environmental Enrichment. *Cell Rep*. 2018 Apr 10;23(2):546-554. [10.1016/j.celrep.2018.03.059]
- Boersma GJ, Bale TL, Casanello P, Lara HE, Lucion AB, Suchecki D, Tamashiro KL. Long-term impact of early life events on physiology and behaviour. *J Neuroendocrinol*. 2014 Sep;26(9):587-602. [10.1111/jne.12153]
- Bormann NM, Cunningham CL. The effects of naloxone on expression and acquisition of ethanol place conditioning in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997 Dec;58(4):975-82.
- Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*. 2012;7(4):e35538. [10.1371/journal.pone.0035538]
- Camarini R, Pautassi RM. Behavioral sensitization to ethanol: Neural basis and factors that influence its acquisition and expression. *Brain Res Bull*. 2016 Jul;125:53-78. [10.1016/j.brainresbull.2016.04.006]
- Champagne FA, Curley JP, Keverne EB, Bateson PP. Natural variations in postpartum maternal care in inbred and outbred mice. *Physiol Behav*. 2007 Jun 8;91(2-3):325-34.
- Chen Q, Yan M, Cao Z, Li X, Zhang Y, Shi J, Feng GH, Peng H, Zhang X, Zhang Y, Qian J, Duan E, Zhai Q, Zhou Q. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*. 2016 Jan 22;351(6271):397-400. [10.1126/science.aad7977]

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from: www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Chen Q, Yan W, Duan E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nat Rev Genet.* 2016 Dec;17(12):733-743. [10.1038/nrg.2016.106]
- Cole BJ, Cador M, Stinus L, Rivier C, Rivier J, Vale W, Le Moal M, Koob GF. Critical role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in amphetamine-induced sensitization of behavior. *Life Sci.* 1990;47(19):1715-20.
- Contarino A, Kitchener P, Vallée M, Papaleo F, Piazza PV. CRF1 receptor-deficiency increases cocaine reward. *Neuropharmacology.* 2017 May 1;117:41-48. [10.1016/j.neuropharm.2017.01.024]
- Crews D, Gore AC, Hsu TS, Dangleben NL, Spinetta M, Schallert T, Anway MD, Skinner MK. Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 3;104(14):5942-6.
- Crofton EJ, Zhang Y, Green TA. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015 Feb;49:19-31. [10.1016/j.neubiorev.2014.11.017]
- Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc.* 2006;1(4):1662-70.
- Cunningham EJ, Russell AF. Egg investment is influenced by male attractiveness in the mallard. *Nature.* 2000 Mar 2;404(6773):74-7.
- Dias BG, Ressler KJ. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci.* 2014 Jan;17(1):89-96. [10.1038/nn.3594]
- Drickamer LC, Gowaty PA, Holmes CM. Free female mate choice in house mice affects reproductive success and offspring viability and performance. *Anim Behav.* 2000 Feb;59(2):371-378.
- Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PT, Cools AR. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res.* 1998 Apr 10;30(3):251-60.
- Franklin TB, Russig H, Weiss IC, Gräff J, Linder N, Michalon A, Vizi S, Mansuy IM. Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol Psychiatry.* 2010 Sep 1;68(5):408-15. [10.1016/j.biopsych.2010.05.036]
- Galduróz JC, Carlini EA. Use of alcohol among the inhabitants of the 107 largest cities in Brazil--2001. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Mar;40(3):367-75.
- Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, Farinelli L, Miska E, Mansuy IM. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci.* 2014 May;17(5):667-9. [10.1038/nn.3695]

- Gapp K, Soldado-Magraner S, Alvarez-Sánchez M, Bohacek J, Vernaz G, Shu H, Franklin TB, Wolfer D, Mansuy IM. Early life stress in fathers improves behavioural flexibility in their offspring. *Nat Commun*. 2014 Nov 18;5:5466. [10.1038/ncomms6466]
- Harris RB. Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015 Feb 15;308(4):R250-65. [10.1152/ajpregu.00361.2014]
- Harvell CD. The ecology and evolution of inducible defenses. *Q Rev Biol*. 1990 Sep;65(3):323-40.
- Huzard D, Mumby DG, Sandi C, Poirier GL, van der Kooij MA. The effects of extrinsic stress on somatic markers and behavior are dependent on animal housing conditions. *Physiol Behav*. 2015 Nov 1;151:238-45. [10.1016/j.physbeh.2015.07.018]
- Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet*. 2002 Nov;10(11):682-8.
- Kawakami SE, Quadros IM, Suchecki D. Naltrexone Prevents in Males and Attenuates in Females the Expression of Behavioral Sensitization to Ethanol Regardless of Maternal Separation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016 Oct 18;7:135.
- Kawakami SE, Quadros IM, Takahashi S, Suchecki D. Long maternal separation accelerates behavioural sensitization to ethanol in female, but not in male mice. *Behav Brain Res*. 2007 Dec 3;184(2):109-16.
- Kikusui T, Faccidomo S, Miczek KA. Repeated maternal separation: differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Mar;178(2-3):202-10.
- Konkle AT, Kentner AC, Baker SL, Stewart A, Bielajew C. Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010 Jul;49(4):427-36.
- Koob GF, Schulkin J. Addiction and stress: An allostatic view. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018 Sep 15.[10.1016/j.neubiorev.2018.09.008]
- Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res*. 2000;122:81-103.
- Laland KN, Uller T, Feldman MW, Sterelny K, Müller GB, Moczek A, Jablonka E, Odling-Smee J. The extended evolutionary synthesis: its structure, assumptions and predictions. *Proc Biol Sci*. 2015 Aug 22;282(1813):20151019. [10.1098/rspb.2015.1019]

- Lea AJ, Tung J, Archie EA, Alberts SC. Developmental plasticity: Bridging research in evolution and human health. *Evol Med Public Health*. 2018 Feb 5;2017(1):162-175. [10.1093/emph/eox019]
- Leger M, Paizanis E, Dzahini K, Quiedeville A, Bouet V, Cassel JC, Freret T, Schumann-Bard P, Boulouard M. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cereb Cortex*. 2015 Nov;25(11):4048-61. [10.1093/cercor/bhu119]
- Levine S, Huchton DM, Wiener SG, Rosenfeld P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol*. 1991 Dec;24(8):547-58.
- Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J Neuroendocrinol*. 2014 Oct;26(10):707-23. [10.1111/jne.12175]
- Marco EM, Llorente R, López-Gallardo M, Mela V, Llorente-Berzal Á, Prada C, Viveros MP. The maternal deprivation animal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 Apr;51:151-63. [10.1016/j.neubiorev.2015.01.015]
- Marianno P, Abrahao KP, Camarini R. Environmental Enrichment Blunts Ethanol Consumption after Restraint Stress in C57BL/6 Mice. *PLoS One*. 2017 Jan 20;12(1):e0170317. [10.1371/journal.pone.0170317]
- Martini M, Valverde O. A single episode of maternal deprivation impairs the motivation for cocaine in adolescent mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Jan;219(1):149-58. [10.1007/s00213-011-2385-2]
- Mashoodh R, Habrylo IB, Gudsruk KM, Pelle G, Champagne FA. Maternal modulation of paternal effects on offspring development. *Proc Biol Sci*. 2018 Mar 14;285(1874).
- Melani R, Chelini G, Cenni MC, Berardi N. Enriched environment effects on remote object recognition memory. *Neuroscience*. 2017 Jun 3;352:296-305. [10.1016/j.neuroscience.2017.04.006]
- Mesa-Gresa P, Pérez-Martínez A, Redolat R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. *Aggress Behav*. 2013 Jul-Aug;39(4):269-79. [10.1002/ab.21481]
- Miczek KA, Thompson ML, Shuster L. Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science*. 1982 Mar 19;215(4539):1520-2.
- Mitra R, Sapolsky RM. Short-term enrichment makes male rats more attractive, more defensive and alters hypothalamic neurons. *PLoS One*. 2012;7(5):e36092. [10.1371/journal.pone.0036092]

- Moritz KE, Geeck K, Underly RG, Searles M, Smith JS. Post-operative environmental enrichment improves spatial and motor deficits but may not ameliorate anxiety- or depression-like symptoms in rats following traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci*. 2014;32(5):701-16. [10.3233/RNN-140414]
- Nettle D, Bateson M. Adaptive developmental plasticity: what is it, how can we recognize it and when can it evolve? *Proc Biol Sci*. 2015 Aug 7;282(1812):20151005. [10.1098/rspb.2015.1005]
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Sep;7(9):697-709.
- Nylander I, Roman E. Is the rodent maternal separation model a valid and effective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption? *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Oct;229(4):555-69. [10.1007/s00213-013-3217-3]
- Own LS, Patel PD. Maternal behavior and offspring resiliency to maternal separation in C57Bl/6 mice. *Horm Behav*. 2013 Mar;63(3):411-7. [10.1016/j.yhbeh.2012.11.010]
- Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J; ALSPAC Study Team. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet*. 2006 Feb;14(2):159-66.
- Pener MP, Yerushalmi Y. The physiology of locust phase polymorphism: an update. *J Insect Physiol*. 1998 May;44(5-6):365-377.
- Preuss UW, Gouzoulis-Mayfrank E, Havemann-Reinecke U, Schäfer I, Beutel M, Hoch E, Mann KF. Psychiatric comorbidity in alcohol use disorders: results from the German S3 guidelines. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2018 Apr;268(3):219-229. [10.1007/s00406-017-0801-2]
- Rae M, Zanos P, Georgiou P, Chivers P, Bailey A, Camarini R. Environmental enrichment enhances conditioned place preference to ethanol via an oxytocinergic-dependent mechanism in male mice. *Neuropharmacology*. 2018 Aug;138:267-274. [10.1016/j.neuropharm.2018.06.013]
- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):469-74.
- Rawat A, Guo J, Renoir T, Pang TY, Hannan AJ. Hypersensitivity to sertraline in the absence of hippocampal 5-HT1AR and 5-HTT gene expression changes following paternal corticosterone treatment. *Environ Epigenet*. 2018 Jul 19;4(2):dvy015. [10.1093/eep/dvy015]

- Richards EJ. Inherited epigenetic variation-revisiting soft inheritance. *Nat Rev Genet.* 2006 May;7(5):395-401.
- Robinson TE, Berridge KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction.* 2000 Aug;95 Suppl 2:S91-117.
- Rodgers AB, Morgan CP, Bronson SL, Revello S, Bale TL. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *J Neurosci.* 2013 May 22;33(21):9003-12. [10.1523/JNEUROSCI.0914-13.2013]
- Rodgers AB, Morgan CP, Leu NA, Bale TL. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 3;112(44):13699-704. [10.1073/pnas.1508347112]
- Rueda AV, Teixeira AM, Yonamine M, Camarini R. Environmental enrichment blocks ethanol-induced locomotor sensitization and decreases BDNF levels in the prefrontal cortex in mice. *Addict Biol.* 2012 Jul;17(4):736-45. [10.1111/j.1369-1600.2011.00408.x]
- Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 1986 Mar;396(1):64-76.
- Sapolsky RM. The influence of social hierarchy on primate health. *Science.* 2005 Apr 29;308(5722):648-52.
- Schmidt MV, Levine S, Alam S, Harbich D, Sterlemann V, Ganea K, de Kloet ER, Holsboer F, Müller MB. Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *J Neuroendocrinol.* 2006 Nov;18(11):865-74.
- Schmidt MV, Liebl C, Sterlemann V, Ganea K, Hartmann J, Harbich D, Alam S, Müller MB. Neuropeptide Y mediates the initial hypothalamic-pituitary-adrenal response to maternal separation in the neonatal mouse. *J Endocrinol.* 2008 May;197(2):421-7. [10.1677/JOE-07-0634]
- Schmidt MV. Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. *Psychoneuroendocrinology.* 2011 Apr;36(3):330-8. [10.1016/j.psyneuen.2010.07.001]
- Selye, H., 1976. Stress without distress. In: Serban, G. (Ed.), *Psychopathology of Human Adaptation*. Springer, New York, pp. 137–146.
- Sheldon BC. Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends Ecol Evol.* 2000 Oct 1;15(10):397-402.
- Short AK, Fennell KA, Perreau VM, Fox A, O'Bryan MK, Kim JH, Bredy TW, Pang TY, Hannan AJ. Elevated paternal glucocorticoid exposure alters the small noncoding RNA

profile in sperm and modifies anxiety and depressive phenotypes in the offspring. *Transl Psychiatry*. 2016 Jun 14;6(6):e837. [10.1038/tp.2016.109]

Spear L. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol Res Health*. 2000;24(2):115-23.

Stamatakis A, Kalpachidou T, Raftogianni A, Zografou E, Tzanou A, Pondiki S, Stylianopoulou F. Rat dams exposed repeatedly to a daily brief separation from the pups exhibit increased maternal behavior, decreased anxiety and altered levels of receptors for estrogens (ER α , ER β), oxytocin and serotonin (5-HT1A) in their brain. *Psychoneuroendocrinology*. 2015 Feb;52:212-28. [10.1016/j.psyneuen.2014.11.016]

Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res*. 1993 Oct 15;75(2):185-92.

Tsai PP, Pachowsky U, Stelzer HD, Hackbarth H. Impact of environmental enrichment in mice. 1: effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Lab Anim*. 2002 Oct;36(4):411-9.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*. 2000 Dec;1(3):191-8.

Vanderschuren LJ, Everitt BJ. Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science*. 2004 Aug 13;305(5686):1017-9.

Viola TW, Wearick-Silva LE, De Azeredo LA, Centeno-Silva A, Murphy C, Marshall P, Li X, Singewald N, Garcia F, Bredy TW, Grassi-Oliveira R. Increased cocaine-induced conditioned place preference during periadolescence in maternally separated male BALB/c mice: the role of cortical BDNF, microRNA-212, and MeCP2. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016 Sep;233(17):3279-88. [10.1007/s00213-016-4373-z]

Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*. 2004 Aug;7(8):847-54. Epub 2004 Jun 27.

Wei L, David A, Duman RS, Anisman H, Kaffman A. Early life stress increases anxiety-like behavior in Balb c mice despite a compensatory increase in levels of postnatal maternal care. *Horm Behav*. 2010 Apr;57(4-5):396-404. [10.1016/j.yhbeh.2010.01.007]

Wertheimer GS, Girardi CE, de Oliveira AS, Monteiro Longo B, Suchecki D. Maternal deprivation alters growth, food intake, and neuropeptide Y in the hypothalamus of adolescent male and female rats. *Dev Psychobiol*. 2016 Dec;58(8):1066-1075. [10.1002/dev.21440]

Yang Z, Zhao W, Zhang X, Mu R, Zhai Y, Kong L, Chen C. Impact of famine during pregnancy and infancy on health in adulthood. *Obes Rev.* 2008 Mar;9 Suppl 1:95-9. [10.1111/j.1467-789X.2007.00447.x]

Yeshurun S, Short AK, Bredy TW, Pang TY, Hannan AJ. Paternal environmental enrichment transgenerationally alters affective behavioral and neuroendocrine phenotypes. *Psychoneuroendocrinology.* 2017 Mar;77:225-235. [10.1016/j.psyneuen.2016.11.013]