Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

Daniela Mizusaki Iyomasa

**Avaliação dos efeitos do estresse crônico sob a ansiedade e a sensibilidade
nociceptiva em ratos mantidos em ambiente enriquecido**

Ribeirão Preto
2018

DANIELA MIZUSAKI IYOMASA

**Avaliação dos efeitos do estresse crônico sob a ansiedade e a sensibilidade
nociceptiva em ratos mantidos em ambiente enriquecido**

VERSÃO ORIGINAL

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de Doutora em Psicobiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christie Ramos Andrade Leite-
Panissi.

RIBEIRÃO PRETO
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Iyomasa, Daniela Mizusaki

Avaliação dos efeitos do estresse crônico sob a ansiedade e a sensibilidade nociceptiva em ratos mantidos em ambiente enriquecido. Ribeirão Preto, 2018.

135 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Leite-Panissi, Christie Ramos Andrade.

1. Estresse Crônico. 2. Enriquecimento Ambiental. 3. Ansiedade. 4. Nocicepção. 5. nNOS. 6. Amígdala. 7. Hipocampo. 8. Substância Cinzenta Periaquedutal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

IYOMASA, Daniela Mizusaki. **Avaliação dos efeitos do estresse crônico sob a ansiedade e a sensibilidade nociceptiva em ratos mantidos em ambiente enriquecido.** 2018. 135 f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof (a) Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À **Deus** e à **Nossa Senhora Aparecida**, que nem por um momento sequer me faltaram e me mostram que a fé e a perseverança fazem milagres.

Aos meus pais, **Mamie e Masayasu**, que dedicam e doam a vida para que meus sonhos se realizem. Jamais conseguirei expressar em palavras o orgulho, a admiração, o amor que sinto por vocês. Que eu tenha a força para superar todas as dificuldades da vida, com a mesma serenidade e otimismo que vocês enfrentam. Vocês são luz nos meus dias, a razão da minha vida. Meu amor incondicional à vocês.

Às minhas irmãs, **Juliana e Renata**, por serem minhas melhores amigas, meu refúgio e ombro amigo. Por estarem ao meu lado nos momentos bons e ruins. Com quem aprendi que dividir também é soma.

Aos meus sobrinhos, **Felipe e Lara**, que vieram ao mundo tão recentemente, fizeram desabrochar um amor incondicional e já me motivam e inspiram para que eu dê sempre o melhor de mim.

Aos meus avós, **Issadora** (in memoriam) e **Kurao** (in memoriam), que felicidade e honra a minha por tê-los tido por tão longo tempo em minha vida. Quantas histórias, quantos ensinamentos, quantas lembranças ficarão para sempre em mim. Para mim será para sempre um até breve. Aos meus avós, **Mitsuy e Shogo**, espero chegar aos 90 com toda a alegria, energia, vivacidade e sabedoria. Vocês são minha inspiração.

AGRADECIMENTOS

Á Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por olharem tão especialmente por mim, por todas as bênçãos concedidas à mim e a minha família.

À Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi, minha orientadora, meu profundo agradecimento pela confiança no decorrer desta tese, por ser sempre tão compreensiva, paciente, forte e dedicada. Agradeço pelo apoio, carinho, amizade nos momentos de maior fraqueza. Obrigada por me dar a honra de receber sua orientação. Serei sempre grata pelos seus ensinamentos, minha profunda admiração pela sua determinação e coragem.

À Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan, pela colaboração como assessora, por acompanhar o desenvolvimento deste trabalho, visando seu aprimoramento.

À Profa. Dra. Elaine Del Bel, por abrir as portas de seu laboratório para a utilização dos equipamentos, compartilhar os seus conhecimentos e por estar sempre disposta a nos ajudar em nosso crescimento como pesquisadores.

Aos professores da banca, pela disponibilidade e atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Ao meu namorado Renato, pela paciência, por entender minhas ausências, por me apoiar incondicionalmente em todas as minhas decisões, por estar sempre ao meu lado me dando força, tranquilidade e por me fazer enxergar a vida de uma forma mais leve.

Aos amigos que fiz no laboratório Ana Paula, Amanda, Bruna, Eduardo, Glauce, Gleice, Jeanne, Joyce, Laís, Milene, Patrícia, Priscila, Rafael, Richard, Sarai pela amizade, colaboração e por fazerem do laboratório um ambiente tão alegre e unido. Em especial, a Amanda, Bruna, Glauce e Priscila, que se tornaram pessoas tão fundamentais em minha vida, pela amizade dentro e fora do laboratório.

À Mariza Bortolanza, por me incentivar, apoiar, acreditar. Obrigada por dedicar suas noites e fins de semana com paciência e dividir seu conhecimento comigo. Pela amizade verdadeira que floresceu a cada dia.

À Célia Aparecida, pelos abraços de bom dia que me encheram de animo, que foram conforto nos momentos de grande dor, mas também nos de grande alegria.

Às amigas, Yamba, Carolina e Fabíola, que estão tão longe, mas tão perto e que me incentivam e motivam em minha caminhada.

À Patrícia Adriana Basile, pelo apoio técnico prestado.

À Renata B. Vicentini, pela sua competência, prontidão e atenção dispensada aos alunos da pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, na pessoa do atual coordenador Prof. Dr. Cesar Alexis Galera, pelo apoio e suporte oferecidos no desenvolvimento da tese.

Aos funcionários do Biotério 1 da FORP, Aline Ap. Ferraresi Tibali, Antônio Sérgio Mesca e Antônio Massaro, Raphael Martini Vicente pelo cuidado e tratamento constante dos animais experimentais.

À instituição Universidade de São Paulo (USP) e suas Faculdades de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) e de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP), agradeço pelo espaço físico cedido para execução do presente trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida financiando e viabilizando a execução desta tese.

Aos animais utilizados no presente estudo, parte fundamental deste trabalho, obrigada por sua enorme contribuição à ciência.

Aos amigos dos laboratórios que compõem o Departamento de Fisiologia – FORP e a todos que participaram direta ou indiretamente desta etapa, obrigada por me ensinarem que nada é possível sozinha.

EPÍGRAFE

*“Even if I knew that tomorrow the world would go to
pieces, I would still plant my apple tree”*
(Martin Luther King)

RESUMO

IYOMASA, Daniela Mizusaki. **Avaliação dos efeitos do estresse crônico sob a ansiedade e a sensibilidade nociceptiva em ratos mantidos em ambiente enriquecido.** 2018. 135 f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Respostas adaptativas ao estresse podem ser acompanhadas por alterações nos comportamentos emocionais, em particular relacionados com medo e ansiedade, bem como alterações na sensibilidade dolorosa. Ainda, tem sido investigado o papel do óxido nítrico em áreas encefálicas relacionadas ao comportamento defensivo. Embora várias evidências têm demonstrado que o enriquecimento ambiental promove melhora nos processos de memória, no aprendizado e em respostas nociceptivas, a relação entre o estresse crônico e as vantagens da utilização do enriquecimento ambiental ainda são pouco investigadas. O presente estudo teve como objetivo investigar se o enriquecimento ambiental promove alteração do comportamento emocional, da sensibilidade nociceptiva, bem como na imunorreatividade à nNOS no núcleo central da amígdala, na formação hipocampal e na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, em ratos submetidos ao estresse por isolamento social ou estresse crônico variado e mantidos em ambiente enriquecido ou sem enriquecimento. Ratos machos *Wistar* (~70g) foram divididos aleatoriamente em dois grandes grupos experimentais: Ambiente Padrão (Padrão) ou Ambiente Enriquecido (EE), mantidos por 38 dias. Cada grupo foi subdividido dependendo do tipo de estresse crônico: Controle (sem estresse), Isolamento Social (por 38 dias) e Estresse Crônico Variado (do dia 28 ao dia 37). Ao fim do tempo experimental (dia 38) os ratos foram avaliados quanto ao comportamento emocional pelos testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e claro/escuro (TCE) e sensibilidade nociceptiva pelo teste da placa quente (a qual foi realizada em duas etapas, sendo a primeira medida no dia 0 e outra no dia 38). A eutanásia dos ratos ocorreu no dia 39, para coleta do encéfalo para análise da imunorreatividade à óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Levando-se em consideração o comportamento emocional e a sensibilidade nociceptiva, os diferentes tipos de estresse crônico diminuíram a porcentagem de tempo, a frequência de entrada e a exploração da extremidade dos braços abertos e na frequência de mergulho de cabeça no teste do LCE, apesar de não alterar a sensibilidade nociceptiva. Por outro lado, o enriquecimento ambiental aumentou a porcentagem de tempo, a frequência de entrada e a exploração da extremidade dos braços abertos no teste do LCE, apesar de não alterar a sensibilidade nociceptiva. Foi

observado aumento da imunorreatividade à nNOS na formação hipocampal em diferentes tipos de estresse crônico. Em particular, na região de CA3 houve interação significativa entre os fatores estresse por isolamento social e ambiente de manutenção. Deste modo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a formação hipocampal desempenha importante função no efeito ansiogênico exercido pelos diferentes tipos de estressores crônicos (aqui representados pelo isolamento social e pelo estresse crônico variado) provavelmente pela ativação do sistema nitrérgico e sugere-se que o enriquecimento possa prevenir o comportamento do tipo ansioso.

Palavras-chave: Estresse Crônico. Enriquecimento Ambiental. Ansiedade. Nocicepção. nNOS. Amígdala. Hipocampo. Substância Cinzenta Periaquedutal.

ABSTRACT

IYOMASA, Daniela Mizusaki. **Evaluation of the effects of chronic stress under anxiety-like behavior and nociceptive sensitivity in rats reared in enriched environment.** 2018. 135 p. Thesis (PhD) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Adaptive responses to stress may be accompanied by changes in emotional behaviors, in particular related to fear and anxiety, as well as changes in pain sensitivity. Furthermore, the role of nitric oxide in brain areas related to defensive behavior has been investigated. Although several evidences have shown that environmental enrichment improves memory processes, learning and nociceptive responses, the relationship between chronic stress and the advantages of using environmental enrichment is still poorly investigated. The present study aimed to investigate whether environmental enrichment promotes alteration of the emotional behavior, nociceptive sensitivity, as well as immunoreactivity to neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the central nucleus of the amygdala, hippocampal formation and dorsolateral periaqueductal gray matter in rats submitted to social isolation stress or chronic unpredictable stress and reared in enriched environment or standard environment. Male *Wistar* rats (~ 70g) were randomly divided into two major experimental groups: Standard Environment (Standard) or Enriched Environment (EE), maintained for 38 days. Each group was subdivided according to the type of chronic stress: Control (without stress), Social Isolation (for 38 days) and Chronic Unpredictable Stress (from day 28 to day 37). At the end of the experimental time (day 38), the rats were evaluated for emotional behavior by elevated plus maze (EPM) and light/dark box (LDBT) tests and nociceptive sensitivity by the hot plate test (which was performed in two steps, the first being measured on day 0 and the other on day 38). Euthanasia of rats occurred on day 39, to collect the brain for nNOS immunoreactivity analysis. Taking into account emotional behavior and nociceptive sensitivity, the different types of chronic stress decreased the percentage of time, the frequency of entry of the open arms, end-arm exploration and the head dipping frequency in the EPM, despite of not altering the nociceptive sensitivity. On the other hand, environmental enrichment increased the percentage of time, the frequency of entry of the open arms and the end arm-exploration in the EPM test, although it did not alter the nociceptive sensitivity. Increased immunoreactivity to nNOS in hippocampal formation was observed in different types of chronic stress. In particular, in the CA3 region there was a significant interaction

between stress factors due to social isolation and maintenance environment. Thus, the results obtained in this study suggest that hippocampal formation plays an important role in the anxiogenic effect exerted by the different types of chronic stressors (represented here by social isolation and by chronic chronic stress) probably due to the activation of the nitrenergic system and it is suggested that environmental enrichment can prevent of anxiety-like behavior.

Keyword: Chronic Stress. Environmental Enrichment. Anxiety. Nociception. nNOS. Amygdala. Hippocampus. Periaqueductal Gray Matter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo.....	43
Figura 2 - Foto ilustrativa das condições ambientais nas quais foram criados os ratos nos protocolos propostos.....	44
Figura 3 - Indução do estresse crônico variado	46
Figura 4 - Dimensões do Labirinto em Cruz Elevado	47
Figura 5 - Câmara utilizada para o Teste de Claro/Escuro.....	49
Figura 6 - Aparato utilizado para o Teste da Placa Quente.	50
Figura 7 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social no peso corporal de ratos, em gramas (g).	57
Figura 8 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado no peso corporal de ratos, em gramas (g).....	58
Figura 9 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social no comportamento do tipo ansioso analisado por meio das medidas clássicas do LCE	60
Figura 10 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social no comportamento do tipo ansioso analisado por meio das medidas complementares do LCE...	62
Figura 11 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social no comportamento do tipo ansioso analisado pelo TCE	63
Figura 12 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social no comportamento do tipo ansioso analisado por meio das medidas clássicas do LCE	64
Figura 13 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado no comportamento do tipo ansioso analisado por meio das medidas complementares do LCE...	66
Figura 14 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado no comportamento do tipo ansioso analisado pelo TCE	67
Figura 15 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na sensibilidade nociceptiva analisada pelo tempo de latência para emissão de resposta ao estímulo aversivo no teste da placa quente, antes (basal) ou ao fim dos experimentos (38 dias)	68
Figura 16 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na sensibilidade nociceptiva analisada pelo tempo de latência para emissão de resposta ao estímulo aversivo no teste da placa quente, antes (basal) ou ao fim dos experimentos (38 dias)	69
Figura 17 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na CeM	71

Figura 18 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região de CA1	75
Figura 19 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região de CA2	77
Figura 20 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região de CA3	79
Figura 21 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região do giro denteado.....	81
Figura 22 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal	85
Figura 23 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na imunorreatividade à nNOS na CeM.....	89
Figura 24 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na imunorreatividade à nNOS na região de CA1	93
Figura 25 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na imunorreatividade à nNOS na região de CA2	95
Figura 26 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na imunorreatividade à nNOS na região de CA3	97
Figura 27 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na imunorreatividade à nNOS na região do giro denteado.....	99
Figura 28 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolos dos grupos experimentais	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-NI	7-Nitroindazole
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de Variância
CAPON	Domínio PDZ Ligante Carboxiterminal
CeA	Núcleo Central da Amígdala
CeM	Divisão Medial do Núcleo Central da Amígdala
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EE	Enriquecimento Ambiental
EPM	Erro Padrão da Média
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Gramas
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IAPQ	Índice de Antinocicepção da Placa Quente
L-Arg	L-Arginina
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NPLA	N-Propil-L-Arginina
PBX+TX	Tampão Fosfato Salina com Triton X-100
TCE	Teste de Claro/Escuro
USP	Universidade de São Paulo

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	25
2.	OBJETIVOS.....	37
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1.	<i>Animais</i>	41
3.2.	<i>Delineamento experimental</i>	41
3.3.	<i>Condições ambientais e estressoras</i>	43
3.3.1.	<i>Enriquecimento ambiental</i>	43
3.3.2.	<i>Estresse por isolamento social</i>	44
3.3.3.	<i>Estresse crônico variado</i>	45
3.4.	<i>Avaliação do peso corporal dos ratos</i>	46
3.5.	<i>Testes comportamentais e de sensibilidade nociceptiva</i>	46
3.5.1.	<i>Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)</i>	47
3.5.2.	<i>Teste de claro/escuro (TCE)</i>	48
3.5.3.	<i>Teste da placa quente</i>	50
3.6.	<i>Eutanásia dos animais e obtenção das amostras a serem analisadas</i>	50
3.7.	<i>Ensaio de imunistoquímica para determinação dos níveis de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)</i>	51
3.8.	<i>Análise estatística dos resultados</i>	52
4.	RESULTADOS	57
4.1.	<i>Avaliação do peso corporal de ratos mantidos nas diferentes condições ambientais (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse por isolamento social</i>	57
4.2.	<i>Avaliação do peso corporal de ratos mantidos nas diferentes condições ambientais (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse crônico variado</i>	57
4.3.	<i>Avaliação do comportamento do tipo ansioso de ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse por isolamento social: pelo LCE e TCE</i>	58
4.4.	<i>Avaliação do comportamento do tipo ansioso de ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse crônico variado: pelo LCE e TCE</i>	63
4.5.	<i>Avaliação da sensibilidade nociceptiva de ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse por isolamento social: pelo teste da placa quente</i>	67
4.6.	<i>Avaliação da sensibilidade nociceptiva de ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse crônico variado: pelo teste da placa quente</i>	68
4.7.	<i>Avaliação da imunorreatividade à nNOS em áreas encefálicas relacionadas com a ansiedade em ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente</i>	

<i>(ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse por isolamento social</i>	<i>69</i>
<i>4.8. Avaliação da imunorreatividade à nNOS em áreas encefálicas relacionadas com a ansiedade em ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse crônico variado</i>	<i>87</i>
5. DISCUSSÃO	107
6. CONCLUSÃO	119
REFERÊNCIAS	121
ANEXO I	135

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O termo estresse foi primeiramente empregado em termos biológicos por Hans Selye (1936), para descrever o processo de adaptação observado no organismo frente a diferentes condições que ameacem a homeostase, adaptando o indivíduo a novas situações, em um amplo repertório de respostas fisiológicas e comportamentais coordenadas e adequadas a fim de aumentar a probabilidade de sobrevivência (BELDA et al., 2015). Às condições ameaçadoras, i.e., estressores físicos, outrora descritas por Hans Selye (1936), foram incorporados estressores psicológicos como capazes de induzir alterações fisiológicas e comportamentais (MCEWEN, 2000). Assim sendo, os estressores são todas as situações ou estímulos que eliciam o processo de adaptação e a resposta do organismo é a reação ao estresse (MCEWEN, 2000; GRAEFF, 2007).

Diariamente estamos expostos às mais diversas situações desafiadoras, as quais tonificam o corpo, aguçam a mente e habilitam o organismo a lidar com as mudanças ambientais e outros estressores (CUESTA; SINGER, 2012). Em resposta às situações estressoras a ativação de sistemas interligados, altamente conservados e eficientes, visa à manutenção da integridade fisiológica mesmo nas circunstâncias de alta demanda (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Nos mamíferos, as respostas ao estresse envolvem primariamente dois componentes fisiológicos: o sistema nervoso autônomo e o eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) (BELDA et al., 2015). A ativação do sistema nervoso autônomo (por meio da ativação simpática e parassimpática) repercute em alterações, em segundos, nos estados fisiológicos, porém com declínio rápido resultando em respostas de curto prazo (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). A elevação dos glicocorticoides circulantes (cortisol em humanos e corticosterona em outros mamíferos) pela ativação do eixo HPA tem como objetivo: inibir a ativação continuada deste eixo, por meio de mecanismos de feedback negativo (MYERS; MCKLVEEN; HERMAN, 2012), prevenir respostas excessivas frente às situações estressoras (FRANK; WATKINS; MAIER, 2013), além de elaborar estratégias comportamentais, bem como consolidar a memória para lidar com o estresse (DE KLOET; OITZL; JOELS, 1999).

Entretanto, conforme a duração ou intensidade desta resposta ao estressor pode ocorrer desequilíbrio no organismo, e disfunções fisiológicas, bem como psicológicas (HERMAN; CULLINAN, 1997) desencadeando desordens induzidas pelo estresse (CUESTA; SINGER,

2012). Assim, em geral, o termo estresse tem sido frequentemente empregado aos eventos e/ou sucessões de eventos que causam uma resposta negativa, gerando estados crônicos de desequilíbrio frente aos eventos estressores (MCEWEN, 2000), e é neste sentido que tal terminologia será empregada no presente estudo.

Diversos modelos animais utilizam-se de estressores físicos e psicológicos, expostos de maneira aguda ou crônica (dependendo da duração da exposição), têm sido utilizados com o intuito de ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos nos transtornos humanos (CAMPOS et al., 2013; MCCORMICK; GREEN, 2013) e estudar as diferentes alterações moleculares, morfológicas, fisiológicas, comportamentais e nociceptivas induzidas pelo estresse (IDE et al., 2015; MCEWEN; GRAY; NASCA, 2015; GADEK-MICHALSKA et al., 2017; FERNANDEZ et al., 2018).

Dentre estes modelos, estudos envolvendo o estresse crônico demonstram anormalidades comportamentais duradouras e persistentes, como prejuízos cognitivos e transtornos emocionais (como a ansiedade) (VYAS;PILLAI; CHATTARJI, 2004) que podem levar a danos e induzir estados patológicos (JOCA; FERREIRA; GUIMARÃES, 2007). O isolamento social é um modelo de estresse crônico amplamente utilizado na literatura como um modelo de depressão, mas também tem sido utilizado como modelo animal de ansiedade (KOKARE et al., 2010; GRIPPO et al., 2014; AMIRI et al., 2015), considerado um potente estressor emocional crônico, visto que, em espécies sociais (como humanos e ratos) a vida em grupo é essencial para a sobrevivência e sucesso reprodutivo da espécie, necessários para a proteção contra ameaças externas (CRUCES et al., 2014). Outro estressor crônico utilizado é o estresse crônico variado, em que animais são expostos a diferentes tipos de estressores, que podem incluir restrição física, reversão do ciclo de claro-escuro, exposição ao frio, dentre outros, procurando reproduzir de uma maneira mais realista situações enfrentadas no dia a dia dos humanos (CAMPOS et al., 2013; HOLLIS; ISGOR; KABBAJ, 2013). Assim, nestes modelos, o sistema nervoso simpático e eixo HPA são ativados pela novidade ou pistas que sinalizem punição ou frustração (quando há retenção de uma recompensa esperada), desta maneira gerando ansiedade antecipatória (GRAEFF; ZANGROSSI, 2010).

A ansiedade tem sido foco de estudos envolvendo transtornos emocionais decorrentes de estressores crônicos e de fato, experiências estressoras têm sido consideradas como fatores de risco para o desenvolvimento do transtorno de ansiedade (MCCORMICK; GREEN, 2013). É válido ressaltar que a ansiedade é uma reação normal a certas situações quando apresentada como uma resposta adaptativa do organismo, propulsora do desempenho e com componentes psicológicos e fisiológicos (BRAGA et al., 2010). Tal comportamento é evocado por ameaças

potenciais, circunstanciais ou antecipatórias (GRAEFF, 2007; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Entretanto, torna-se patológica quando a intensidade ou frequência da resposta não for condizente com a situação que a desencadeie ou não existir um objeto específico ao qual se direcione, interferindo na maneira de lidar com a situação (BRAGA et al., 2010; MCCORMICK; GREEN, 2013). Recente estudo apresentado pela Organização Mundial de Saúde sobre depressão e outros transtornos mentais comuns mostra que 3,6 % da população mundial é acometida por algum transtorno de ansiedade, o que se estima em números totais, ao equivalente a 264 milhões de pessoas, um aumento, em dez anos, de 14,9 % comparado à 2005 (GBD 2015 DISEASE AND INJURY INCIDENCE AND PREVALENCE COLLABORATORS, 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). O transtorno de ansiedade é a sexta maior causa, não fatal, para a perda da saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). No Brasil, esta estimativa é ainda maior, 9,3 % da população é acometida por algum transtorno de ansiedade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Ainda, a relevância no estudo dos transtornos de ansiedade justifica-se economicamente, visto que as perdas causadas pelos transtornos mentais não apenas resultam na perda da saúde, mas afetam a produção econômica pela diminuição na produtividade, perda de recebimento fiscal e aumento nas despesas com saúde e bem estar (CHISHOLM et al., 2016).

Entretanto, as implicações decorrentes do estresse não apenas incidem no comportamento emocional. É interessante notar que respostas adaptativas ao estresse podem ser acompanhadas por alterações na sensibilidade dolorosa (BOLLES; FANSELOW, 1980) e atualmente, a importância da modulação da dor pelo contexto e pela emoção é amplamente reconhecida (OLANGO; FINN, 2014). Em particular, o estresse e ansiedade exercem potente e complexa influência nesta modulação (ASMUNDSON; KATZ, 2009; BUTLER; FINN, 2009). De fato, em face às demandas comportamentais impostas por exposição às situações estressantes, tais como aquelas envolvendo predação, defesa, dominância, reprodução ou adaptação a estímulos ambientais extremos, as reações fisiológicas do organismo à dor poderiam mostrar-se desvantajosas. Isto porque, a dor normalmente inicia um conjunto de reações comportamentais recuperativas, tais como reflexos de retirada, repouso e cuidados corporais. Em meados da década de 80, Bolles e Fanselow (1980) propuseram um modelo no qual os sistemas motivacionais de dor e de defesa seriam independentes, mas integrados entre si. A resposta mediante o estímulo aversivo, i.e., se o estímulo induzirá analgesia (ausência de dor em resposta a um estímulo normalmente doloroso) ou hiperalgesia (dor aumentada em razão de um estímulo normalmente doloroso) (ASSOCIAÇÃO INTERNACIONAL PARA O

ESTUDO DA DOR, 2011) é determinada pela natureza, duração e intensidade do estressor (JENNINGS et al., 2014; OLANGO; FINN, 2014). Butler e Finn (2009), em análise meticulosa de numerosos trabalhos, demonstraram que a analgesia induzida pelo estresse é observada frente a estressores agudos intensos. Por outro lado, sugere-se que a exposição crônica ou repetida de estressores físicos e psicológicos, por exemplo, de natureza ansiogênica, resultam na hiperalgesia induzida pelo estresse, apesar deste fenômeno ser menos compreendido (GAMEIRO et al., 2006; JENNINGS et al., 2014).

O encéfalo é o órgão chave responsável por perceber e determinar os níveis de ameaça e das respostas frente ao estressor (MCEWEN, 2012). Entretanto, a circuitaria requerida para detectar, avaliar e processar estímulos ansiogênicos é bastante complexa e as áreas encefálicas e sistemas neuromodulatórios que regulam a ansiedade exibem, também, grande sobreposição àqueles envolvidos no comportamento de medo (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Graeff (1981) propôs a existência de um sistema cerebral aversivo, tendo como estruturas chaves o hipotálamo medial, a amígdala, e a região dorsal da substância cinzenta periaquedutal, o qual seria responsável pela emissão de respostas de medo inato. Por outro lado, a organização das respostas condicionadas, ou aprendidas, seria efetuada pelo circuito representado pelo sistema septo-hipocampal, núcleo mediano da rafe e região ventral da substância cinzenta periaquedutal, compondo o sistema de inibição comportamental (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). O complexo amigdalóide atuaria nestes dois sistemas emocionais, agindo como a interface entre o sistema de inibição comportamental e o sistema cerebral aversivo (BRANDAO et al., 2003; MCNAUGHTON; CORR, 2004). Dada à importância da compreensão da neurobiologia da ansiedade, a revisão continuada destes sistemas tem incorporado outras áreas encefálicas como, por exemplo, o córtex pré-frontal ventromedial (CAMPOS et al., 2013; RIGOLI et al., 2016). Mcnaughton e Corr (2004) revisando a teoria de Gray e Mcnaughton (2000) reforçam o envolvimento dessas bases neurais tanto no comportamento de medo quanto no de ansiedade, entretanto, com maior representação das estruturas superiores durante a emissão do comportamento ansioso. Apesar disso, a circuitaria envolvida neste comportamento não está completamente elucidada (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Deste modo, a participação destas áreas encefálicas tem sido amplamente investigada na tentativa de prover maior compreensão sobre o comportamento ansioso.

Além disso, o processamento da dor ocorre por meio da organização altamente complexa de vias ascendentes e descendentes que se sobrepõem às redes neurais envolvidas no comportamento emocional (ROY et al., 2009). Em recente revisão, Vachon-Preseu (2017) demonstrou que níveis basais anormalmente elevados dos hormônios do estresse tem

apresentado relação com pacientes com dor crônica, o que pode ser responsável pela plasticidade observada em áreas como córtex pré-frontal medial, amígdala e hipocampo. Roy et al. (2009) utilizaram métodos psicofisiológicos em combinação com imagens cerebrais funcionais em áreas relacionadas ao comportamento defensivo para avaliar como a emoção durante a visualização de diferentes tipos de figuras (agradáveis e desagradáveis) modula a resposta nociceptiva e a percepção da dor em participantes saudáveis. Os autores encontram modulação emocional ao estímulo elétrico doloroso na ínsula direita, lobo paracentral, giro parahipocampal, tálamo e amígdala, demonstrando a forte relação entre dor e emoção. Das áreas encefálicas estudadas, grande destaque tem sido dado à amígdala, formação hipocampal e substância cinzenta periaquedutal, focos do presente estudo.

A amígdala é uma pequena estrutura em formato amendoado, localizada no lobo temporal medial, identificada primeiramente por Burdach no início do século 19 (SAH et al., 2003). Também chamada de complexo amigdalóide, esta estrutura compreende um vasto grupo de diversos núcleos (aproximadamente 13), classificados em 3 grupos: grupo basolateral, grupo cortical e grupo centromedial, os quais tem despertado contínuo interesse devido ao seu papel central no processamento das emoções (SAH et al., 2003). O grupo basolateral compreende núcleos profundos: núcleo lateral, núcleo basolateral e núcleo basomedial. O grupo cortical, constituído pelos: núcleo do trato olfatório lateral, núcleos profundos do trato olfatório acessório e o núcleo cortical, é um grupo de núcleos corticomedial ou superficial. O terceiro grupo, grupo centromedial, é composto pelo núcleo central da amígdala, núcleo medial da amígdala e a parte amigdalóide do núcleo leito da estria terminal (para revisão, ver SAH et al., 2003). A complexidade no estudo desta estrutura dá-se, dentre outros motivos, pelas vastas conexões aferentes e eferentes com áreas sensoriais e límbicas como hipotálamo, hipocampo, tronco encefálico, estriado, dentre outros (MCDONALD, 1998; JANAK; TYE, 2015; NEUGEBAUER, 2015). Em suma, o grupo basolateral compõe a região de entrada de estímulos sensoriais, onde as informações altamente processadas aí geradas são transmitidas para o núcleo central da amígdala, que serve como centro de integração e projeção, o qual faz interface com outros sistemas como, por exemplo, o sistema motor na resposta ao estímulo aversivo ou o sistema modulador da dor (ALHEID; HEIMER, 1988; MCDONALD, 1998; NEUGEBAUER et al., 2004; MARTINEZ et al., 2011; NEUGEBAUER, 2015). De fato, o complexo amigdalóide está intimamente relacionado com a determinação do significado emocional dos estímulos sensoriais e da produção de medo e ansiedade das respostas defensivas (MARTINEZ et al., 2011). Neste contexto, a modulação das respostas que envolvem o medo e a ansiedade correlaciona-se com

as reações de defesa dos animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência, ao bem estar ou à integridade física das diferentes espécies. Este perigo ou ameaça pode ser representado por predadores ou estímulos ameaçadores, tais como, estímulos ambientais, alterações nos padrões físico-temporais e estímulos nociceptivos (ZANGROSSI; GRAEFF, 1997).

Outra estrutura chave no estudo do estresse crônico, comportamento emocional e dor é o hipocampo. Esta estrutura bilaminar de substância cinzenta localiza-se medialmente no lobo temporal, constituída de duas partes interligadas: o Corno de Amon (subdividido em: CA1, CA2, CA3 e CA4) e o giro denteado (DEKEYZER et al., 2017). Funcionalmente, o hipocampo tem papel importante no aprendizado e memória e tem sido relacionado à regulação de comportamentos motivacionais, estados emocionais (TANTI et al., 2012), no processamento do estímulo doloroso e nocicepção (MCEWEN, 2001; ECHEVERRY; GUIMARÃES; DEL BEL, 2004) e, no contexto do estresse, desempenha papel importante nos mecanismos de feedback negativo modificando as respostas do eixo HPA (KIM; YOON, 1998; TOTTENHAM; SHERIDAN, 2009). Além disso, TANTI et al. (2012) demonstraram que o estressor crônico moderado imprevisível alterou a proliferação celular e a neurogênese na porção ventral do hipocampo de camundongos, área que tem sido relacionada aos comportamentos relacionados à ansiedade e emoções. Diversos trabalhos na literatura tem dado ênfase à alteração na arborização dendrítica de neurônios na região de CA3 (MCEWEN, 2001; CONRAD, 2006; MCEWEN et al., 2012), caracterizada pela diminuição no comprimento e redução no número de ramificações mediante estresse crônico (CONRAD, 2006). Em trabalho envolvendo ressonância magnética funcional por imagem foi demonstrado aumento na ativação de área relacionada à dor no córtex entorrinal pela ansiedade antecipatória induzida por estímulo térmico nocivo (PLOGHAUS et al., 2001). Roy et al. (2009) discutem que tais resultados vão de acordo com a teoria da ansiedade de Gray e Mcnaughton (2000), que em situações de conflito, a representação neural do evento aversivo é amplificada pela formação hipocampal.

A substância cinzenta periaquedutal é uma estrutura mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral, e desempenha papel chave na via descendente inibitória da dor (GEBHART, 2004; JENNINGS et al., 2014), além de ser relacionada como mediadora de diferentes aspectos das respostas defensivas (GUIMARAES et al., 2005; CAMPOS et al., 2013), sendo, portanto, outra estrutura envolvida no controle nociceptivo e na resposta emocional (JIMENEZ-VELAZQUEZ; LOPEZ-MUNOZ; FERNANDEZ-GUASTI, 2010). Anatomicamente, esta estrutura é dividida em quatro colunas longitudinais (dorsomedial,

dorsolateral, lateral e ventrolateral), sendo a região dorsolateral e lateral envolvidas com a modulação dos comportamentos ansiosos (KEAY; BANDLER, 2001) e a região ventrolateral relacionada à regulação do controle nociceptivo descendente (HARRIS; WESTBROOK, 1995) e respostas condicionadas a estímulos aversivos (VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDAO, 2001). Apesar do papel da substância cinzenta periaquedutal ser amplamente estudada para avaliar o comportamento de medo e dor, seu papel no comportamento ansioso foi reforçado no trabalho de Jimenez-Velazquez; Lopez-Munoz; Fernandez-Guasti (2010). Os autores demonstraram que a microinjeção de diazepam na região dorsal da substância cinzenta periaquedutal não só produziu resposta ansiolítica no teste de enterrar, mas também não alterou o número e a reatividade aos choques, sugerindo o envolvimento do sistema gabaérgico desta região na correlação entre o comportamento do tipo ansioso e o efeito antinociceptivo.

Considerando que os avanços do conhecimento científico das desordens afetivas-motivacionais são realizados, em grande parte, com a utilização de modelos experimentais, tem sido crescente os esforços dos órgãos responsáveis por normatizar as pesquisas científicas visando ambiente mais agradável, o qual promova bem estar a estes animais (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA). Para tanto, as pesquisas envolvendo animais de laboratório tem avaliado o uso de diferentes formas de enriquecimento ambiental em diversas situações. Para (ROSENZWEIG; BENNETT, 1996; SIMPSON; KELLY, 2011) o modelo de enriquecimento ambiental proporciona melhor estímulo físico e social quando comparado às condições de acondicionamento dos animais em ambiente sem enriquecimento. Desta forma, o enriquecimento ambiental foi desenvolvido como um modelo para melhorar o ambiente dos animais para encorajar comportamentos naturais (KONKLE et al., 2010) pelo contínuo melhoramento cognitivo, sensório-motor e/ou da atividade física (MATTSON et al., 2001). A metodologia de enriquecimento ambiental pode ser facilmente utilizada em laboratório com a inclusão de materiais de diferentes texturas, túneis, rampas, rodas de exercício, brinquedos, dentre outros, na caixa alojamento dos animais em experimentação (WILLIAMS et al., 2001; SIMPSON; KELLY, 2011). O número de pesquisas nesta área tem crescido uma vez que o enriquecimento ambiental é um modelo livre de drogas e procedimentos cirúrgicos que tem se mostrado útil na avaliação de muitas condições neurológicas e psiquiátricas (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015).

Tem sido demonstrada a efetividade do enriquecimento ambiental na memória, no aprendizado, além de redução de manifestações comportamentais relacionadas a transtornos

afetivos, bem como na resposta nociceptiva inflamatória (WILLIAMS et al., 2001; TALL, 2009; GABRIEL et al., 2010; SIMPSON; KELLY, 2011; RAVENELLE et al., 2014; BHAGYA et al., 2016). Dentro desta perspectiva, Williams et al. (2001) mostraram que o enriquecimento ambiental melhorou o aprendizado de camundongos avaliados no teste do labirinto aquático de Morris, bem como ocorreu significativo aumento da plasticidade neuronal na área hipocampal destes animais quando comparados com camundongos mantidos em ambiente sem enriquecimento. Além disso, Gabriel et al., (2009) demonstraram que ratos Sprague-Dawley portadores de dor inflamatória crônica induzida pela administração de carragenina na articulação da pata posterior, apresentaram melhora da alodinia mecânica mais rapidamente quando mantidos em ambiente enriquecido. Ainda, neste mesmo estudo, a análise histológica das lâminas I, II e III do corno dorsal da medula espinal apontou reorganização astrogliar, o que não foi encontrado em ratos em ambiente sem enriquecimento. Estes resultados sugerem que o enriquecimento ambiental pode facilitar a plasticidade celular, em particular com relação à circuitaria aferente da sensibilidade nociceptiva avaliada (corno dorsal da medula espinhal). Estes achados corroboram estudo clínico onde pacientes submetidos à colecistectomia apresentaram recuperação pós-operatória mais rápida quando permaneceram em quartos com uma vista mais agradável e quando receberam menos informações negativas sobre sua evolução (ULRICH, 1984). Deste modo, levando-se em consideração os benefícios do enriquecimento ambiental na redução da ansiedade induzida pelo estresse, os mecanismos moleculares envolvidos não são completamente claros, mas tem sido sugerido que esta ação envolve a sinalização nuclear do receptor glicocorticoide no núcleo basolateral da amígdala, sendo esta estrutura hiperativada pelo estresse (NOVAES et al., 2017).

Apesar dos achados clínicos e experimentais sugerirem influência positiva do enriquecimento ambiental em diferentes processos biológicos, pouco tem sido descrito na literatura sobre o efeito do enriquecimento ambiental na ansiedade e na nocicepção desencadeados pelo estresse crônico. Ainda, necessita ser elucidado se o enriquecimento ambiental promove alteração morfofuncional nas estruturas encefálicas envolvidas na emissão e modulação das respostas afetivas-motivacionais. Neste contexto, tem sido proposto o envolvimento do óxido nítrico neste sistema emocional uma vez que a presença de neurônios imunoativos à isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (NOS) foram encontrados em diversas áreas encefálicas relacionadas à modulação dos comportamentos defensivos, como núcleo medial da amígdala, núcleos paraventricular e pré-mamilar do hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal (VINCENT; KIMURA, 1992).

O óxido nítrico é um gás com curto tempo de meia vida que teve seu papel biológico evidenciado na década de 80, e atualmente é aceito como uma molécula de sinalização para vários tipos de células e sistemas, servindo como neurotransmissor no encéfalo (BREDT; SNYDER, 1992; KISHIMOTO et al., 1996; GADEK-MICHALSKA et al., 2013). A produção de óxido nítrico dá-se por meio de uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintase (NOS) (BREDT, 1999; DE OLIVEIRA et al., 2000), que o produzem a partir da L-arginina na presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH) e oxigênio, sendo esta reação cálcio dependente (MONCADA; HIGGS, 1993; FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; Arnaiz et al., 2004). A isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (nNOS) é a fonte predominante de óxido nítrico em neurônios (ZHOU; ZHU, 2009). Apesar de importante papel como neurotransmissor mediando a plasticidade sináptica e a sinalização neuronal, a produção excessiva de óxido nítrico pode tornar-se fator neurotóxico (ZHOU E ZHU, 2009). Em situações de estresse agudo, o óxido nítrico desempenha papel significativo na modulação da atividade dos sistemas relacionados ao estresse (GADEK-MICHALSKA et al., 2013), além de induzir aumento em neurônios expressando nNOS em áreas relacionadas ao comportamento defensivo (ECHEVERRY; GUIMARAES; DEL BEL, 2004; CAMPOS et al., 2013). Entretanto, poucos trabalhos investigaram o efeito da nNOS nas áreas encefálicas relacionadas ao comportamento defensivo em ratos submetidos ao estresse crônico. Em recente estudo, à melhora do comportamento do tipo ansioso, em camundongos idosos, foi sugerida como em decorrência da alteração nos níveis de expressão de nNOS em áreas relacionadas às respostas defensivas (TOMIGA et al., 2016). Deste modo o presente projeto tem o propósito de contribuir na compreensão dos mecanismos envolvidos nos distúrbios de ansiedade e dor presentes em portadores de transtornos relacionados ao estresse, assim como no entendimento das alterações na plasticidade cerebral envolvidas com o enriquecimento ambiental.

Assim, as hipóteses iniciais do presente estudo foram: I) os diferentes tipos de estressores crônicos propostos induzem ao aumento do comportamento do tipo ansioso e hiperalgesia térmica; II) o enriquecimento ambiental é capaz de reverter os déficits comportamentais e nociceptivos induzidos por tais estressores; III) a expressão da nNOS está aumentada nas áreas relacionadas ao comportamento defensivo nos ratos submetidos aos estressores crônicos e IV) o enriquecimento ambiental reduz a expressão da óxido nítrico sintase nessas regiões.

2 Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar se diferentes tipos de estressores crônicos: por isolamento social ou estresse crônico variado promovem alteração do peso corporal, do comportamento emocional, da sensibilidade nociceptiva, bem como na imunorreatividade à nNOS no núcleo central da amígdala, na formação hipocampal e na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, em ratos mantidos em ambiente enriquecido.

Para tanto, o estudo apresentou os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar se o estresse crônico por isolamento social promove alteração no peso corporal de ratos mantidos em ambiente enriquecido;
2. Avaliar se o estresse crônico variado promove alteração no peso corporal de ratos mantidos em ambiente enriquecido;
3. Avaliar se o estresse crônico por isolamento social promove alteração no comportamento emocional de ratos mantidos em ambiente enriquecido, por meio do teste do labirinto em cruz elevado e pelo teste de claro/escuro, comparado com ratos mantidos em ambiente sem enriquecimento;
4. Avaliar se o estresse crônico por isolamento social altera a sensibilidade nociceptiva de ratos mantidos em ambiente enriquecido, por meio do teste da placa quente (estímulo térmico fásico);
5. Avaliar se o estresse crônico variado promove alteração no comportamento emocional de ratos mantidos em ambiente enriquecido, por meio do teste do labirinto em cruz elevado e pelo teste de claro/escuro, comparado com ratos mantidos em ambiente sem enriquecimento;
6. Avaliar se o estresse crônico variado altera a sensibilidade nociceptiva de ratos mantidos em ambiente enriquecido, em grupo ou em isolamento, por meio do teste da placa quente (estímulo térmico fásico);
7. Avaliar se o estresse crônico por isolamento social ou o enriquecimento ambiental promovem modificação na imunorreatividade à nNOS no núcleo central da amígdala, na formação hipocampal e região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal;

8. Avaliar se o estresse crônico variado ou o enriquecimento ambiental promovem modificação na imunorreatividade à nNOS no núcleo central da amígdala, na formação hipocampal e região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Animais*

Para o presente estudo, foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, com idade de 22 a 24 dias (~ 70 g no início dos procedimentos), procedente do Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). Durante os experimentos, os ratos foram mantidos no Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP, em salas climatizadas com temperatura controlada entre $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com iluminação controlada para ciclo de 12 horas de claro-escuro (com início às 6 h) e receberam ração e água filtrada *ad libitum*, a menos que especificado pelo protocolo de privação de água e/ou durante a realização do procedimento experimental. As trocas e limpeza das caixas foram realizadas três vezes por semana pelos funcionários do biotério. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Legislação Brasileira para Uso de Animais, foram aprovados junto à Comissão de Ética para Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (processo número 2014.1.380.58.5, aprovado em 15 de julho de 2014, Anexo I) e seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os esforços foram realizados para reduzir o número de animais usados e para minimizar seus sofrimentos.

3.2. *Delineamento experimental*

O projeto inicial previu a utilização de nove ratos por grupo experimental, totalizando 54 ratos (Tabela 1). Entretanto, durante a execução, devido a algumas intercorrências (óbito e/ou problema de saúde nos animais) alguns grupos precisaram ser repostos, justificando o aumento no total de ratos utilizados durante o experimento (n total = 61), bem como a variação no número total de ratos por grupo experimental.

Tabela 1 - Protocolos dos grupos experimentais

	AMBIENTES	
	<i>Padrão</i>	<i>Enriquecido (EE)</i>
	<i>Padrão</i>	<i>Enriquecido (EE)</i>
	<i>Padrão</i>	<i>Enriquecido (EE)</i>
ESTRESSES	<u>Padrão+Controle</u> : n = 3 / caixa	<u>EE+Controle</u> : n = 3 / caixa
	<u>Padrão+Estresse Crônico Variado</u> : n = 3 / caixa	<u>EE+Estresse Crônico Variado</u> : n = 3 / caixa
	<u>Padrão+Isolamento Social</u> : n = 1 / caixa	<u>EE+Isolamento Social</u> : n = 1 / caixa

Estes animais, obtidos do Biotério Central foram, inicialmente, por uma semana, mantidos em grupo, em caixas acrílicas com dimensão de 41 x 34 x 16 cm (cama de maravalha) para habituação (Figura 1).

Após este período (dia 0), às 8 h, os ratos foram numerados, pesados e por meio de sorteio, foram divididos aleatoriamente em um dos seis grupos experimentais, de acordo com a Tabela 1. Neste dia (dia 0), entre 13 h – 15 h, os ratos foram submetidos ao teste da placa quente para índice da analgesia basal destes animais. No vigésimo oitavo dia de estadia (dia 28), entre às 8 h e 16 h, nos grupos submetidos ao estresse crônico variado, foi dado início aos protocolos de estresse que consistiam de um estressor diferente por dia, durante um período total de dez dias. No último dia dos protocolos experimentais, os ratos foram pesados novamente. Vinte e quatro horas após o último estressor (dia 38), os ratos foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE), seguido pelo teste de claro/escuro (TCE). No período da tarde (13 h às 15 h) foi realizado o teste da placa quente para determinar o índice de analgesia após as diversas condições ambientais/estressoras a que foram submetidos. No trigésimo nono dia (dia 39), foi realizada a eutanásia dos ratos por meio da perfusão intracardiaca (após anestesia profunda) e os encéfalos retirados da caixa craniana, pós-fixados, crioprotégidos e armazenados para posterior processamento. Um experimentador adicional auxiliou na realização dos testes comportamentais, de sensibilidade nociceptiva e nos procedimentos de eutanásia dos animais. Além disso, os experimentos foram realizados em três etapas. Cada etapa contava com uma amostra de três representantes de cada um dos grupos experimentais. Optou-se pela divisão do trabalho em etapas visando à viabilidade dos ensaios e a exposição dos ratos às mesmas condições sazonais. Ainda, pensando nesses fatores, a reposição dos ratos ocorreu em uma das três etapas de trabalho propostas.

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo

Fonte: Autoria própria.

3.3. Condições ambientais e estressoras

3.3.1. Enriquecimento ambiental

Nos grupos experimentais propostos, o ambiente considerado como padrão foi aquele no qual a caixa de criação foi forrada com substrato (maravalha), e que foi oferecido aos ratos apenas ração e água *ad libitum*. Os animais mantidos em ambiente padrão foram acondicionados em caixas de polipropileno com dimensões variadas dependendo do número de ratos por caixa: $n = 3$ ratos/caixa (Padrão+Controle e Padrão+Estresse Crônico Variado) 41 x 34 x 16 cm (densidade animal $\sim 7.435 \text{ cm}^3/\text{animal}$) e $n = 1$ rato/caixa (Padrão+Isolamento Social) 30 x 19 x 13 cm (densidade animal $\sim 7.410 \text{ cm}^3/\text{animal}$) (Figura 2A e B, respectivamente).

O ambiente enriquecido foi equipado com objetos que permitiram ao rato brincar, explorar, aninhar e esconder, i.e., brinquedos disponíveis em lojas de animais, cordas penduradas, objetos de madeira, bolas e brinquedos plásticos, tubos de PVC, papel picado, espelho, dentre outros. Uma vez por semana um objeto foi introduzido à caixa em substituição a outro, que era retirado e limpo. Estes objetos foram realocados em um local diferente a cada limpeza e troca de caixa. Todas as caixas de criação foram forradas com substrato (maravalha) e foi oferecido aos ratos ração e água *ad libitum*. Os grupos submetidos ao enriquecimento ambiental foram acondicionados em caixas acrílicas com as seguintes dimensões: EE+Controle e EE + Estresse Crônico Variado ($n = 3/\text{caixa}$) 56 x 17 x 39 cm (densidade animal $\sim 12.376 \text{ cm}^3/\text{animal}$) e EE+Isolamento ($n = 1/\text{caixa}$) 41 x 34 x 16 cm (densidade animal $\sim 22.304 \text{ cm}^3/\text{animal}$) (Figura 2C e 2D, respectivamente).

Figura 2 - Foto ilustrativa das condições ambientais nas quais foram criados os ratos nos protocolos propostos.

A e B: Ratos mantidos agrupados ou em isolamento social no ambiente não enriquecido. **C e D:** Ratos mantidos agrupados ou em isolamento social no enriquecimento ambiental. **E:** Figura ilustrativa da área das caixas utilizadas nos diferentes protocolos e alguns dos objetos utilizados para enriquecer o ambiente. Fonte: Autoria própria.

3.3.2. Estresse por isolamento social

Após o período de habituação, no dia 0, os ratos submetidos ao estresse por isolamento social foram isolados de seus pares e realocados aleatoriamente nas diferentes condições ambientais (ambiente padrão ou enriquecido), permanecendo nesta condição até o fim dos experimentos (dia 39) (Figura 2B e 2D).

3.3.3. Estresse crônico variado

No dia 28, os ratos dos grupos Padrão+Estresse Crônico Variado e EE+Estresse Crônico Variado foram submetidos, por um período de 10 dias, a este protocolo de estresse. Para tanto, foram utilizados cinco estressores distintos. As situações estressoras foram adaptadas de estudo de Ortiz et al. (1996) sendo as seguintes:

Dia 28 e dia 33: Agitação: os ratos foram colocados individualmente em uma caixa plástica sobre uma mesa agitadora durante 15 minutos, com velocidade média de 50 rpm (Figura 3A).

Dia 29 e dia 34: Exposição ao frio: os ratos foram expostos à temperatura de 4°C, estando em caixas plásticas individuais, sem substrato, pelo período de 30 minutos (Figura 3B).

Dia 30 e dia 35: Privação de Água: foi removido o bebedouro por 24 horas (Figura 3C).

Dia 31 e dia 36: Nado Forçado: foi realizado em tanque circular com profundidade de 54 cm e 47 de diâmetro, preenchido com água até a altura de 40 cm, evitando contato do rato com o chão ou com a borda superior quando este permanece em livre movimentação na posição vertical. A temperatura da água foi controlada e mantida à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, trocada para cada animal. O tempo deste procedimento foi de 15 minutos (Figura 3D). Este estresse foi realizado no período da tarde (13 h às 16 h) pela disponibilidade de sala adequada.

Dia 32 e dia 37: Restrição Física: foi realizada em aparato metálico ajustado ao corpo, o qual restringe os movimentos, promove completa imobilização, mas não promove nenhum outro tipo de desconforto e permite ventilação adequada (GAMARO et al., 1998) pelo período de 2 horas (Figura 3E).

Os protocolos foram realizados das 8 h às 16 h, em sala isolada e com temperatura controlada.

Figura 3 - Indução do estresse crônico variado

A: Agitação. **B:** Exposição ao frio. **C:** Privação de água. **D:** Nado forçado. **E:** Restrição física.
Fonte: Autoria própria.

3.4. Avaliação do peso corporal dos ratos

Após o período de habituação, foi realizado o acompanhamento do peso corporal dos animais no início (dia 0) e no último dia dos protocolos experimentais (dia 38). Para isto, os ratos foram individualmente pesados na balança (Marca Toledo do Brasil, modelo 9094C/4, série 10286058), em caixas de polietileno e os dados foram registrados em protocolo.

3.5. Testes comportamentais e de sensibilidade nociceptiva

Antes do início dos procedimentos de testes, os ratos foram acondicionados na sala experimental (que mantinham as mesmas condições de luz e temperatura do biotério) por um período de 30 minutos para habituação.

3.5.1. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Para avaliar o comportamento do tipo ansioso foi utilizado o labirinto em cruz elevado (LCE). Este labirinto consiste em uma plataforma em forma de cruz, elevado 50 cm acima do solo, com 2 braços abertos e 2 braços fechados, com dimensões de 50 x 10 cm, nestes, as paredes são elevadas com altura de 40 cm (PELLOW et al., 1985) (Figura 4).

Figura 4 - Dimensões do Labirinto em Cruz Elevado

Fonte: Bonther Equipamentos para Ensino e Pesquisa (www.bonther.com.br, acesso em 15/02/2018) (modificado)

Antes do início dos testes, o aparelho foi instalado em sala com condições de luminosidade e temperatura controladas. Para o início do teste, os ratos de todos os grupos experimentais foram individualmente posicionados no centro da cruz, com a face voltada para um dos braços fechados. O teste teve duração total de 5 minutos. Neste período, os comportamentos emitidos pelos ratos foram filmados por câmera de vídeo suspensa, posicionada acima do centro do labirinto e gravados utilizando o Geo Vision software. Ao fim do teste, cada rato retornou para sua respectiva caixa. Os testes foram realizados entre as 8 h e 10 h e ao término de cada teste, o labirinto foi limpo com solução de etanol a 70%.

Os seguintes parâmetros clássicos foram utilizados para avaliar a atividade do animal no LCE:

- Percentual de tempo nos braços abertos: foi obtido através da relação entre o tempo gasto nos braços abertos do labirinto pelo tempo total do teste (5 min).

$$\% \text{ Tempo} = \frac{100 \times \text{tempo nos BA}}{\text{tempo total do teste}}$$

Observação: BA indica braços abertos.

- Frequência de entrada nos braços abertos: foi obtida através do número total de entradas nos braços abertos (números de vezes que o animal atravessa com as quatro patas para o interior desses braços).
- Frequência de entrada nos braços fechados: foi obtida através do número total de entradas nos braços fechados (números de vezes que o animal atravessa com as quatro patas para o interior desses braços).

Além das medidas clássicas, as medidas etológicas complementares foram analisadas através das seguintes categorias comportamentais como descritas por Albrechet-Souza; Borelli; Brandao (2008) e Saito; Brandao (2015):

- Exploração na extremidade (*end-arm-exploration*): postura exploratória na extremidade dos braços abertos do labirinto (último terço de um dos braços abertos);
- Mergulho de cabeça (*head-dipping*): movimento exploratório de cabeça/membros anteriores nas laterais ou extremidades do labirinto, em direção ao “precipício”, mergulhando a cabeça abaixo do nível do labirinto;

As seguintes medidas etológicas foram analisadas, agrupadas e receberam a denominação de avaliação de risco (ALBRECHET-SOUZA;BORELLI; BRANDAO, 2008; SAITO; BRANDAO, 2015):

- Rastejamento (*flat-back-approach*): locomoção quando o animal se estica completamente e cuidadosamente move-se para frente;
- Esticamento (*stretched-attend-posture*): uma postura na qual o animal se estica com as patas dianteiras, mantendo as traseiras no mesmo local e em seguida retoma a posição original, sem se locomover para frente;
- Espreitamento (*peeping out*): projeção da cabeça/ombros dos braços fechados para o centro, sendo que as quatro patas permanecem no braço fechado;

3.5.2. Teste de claro/escuro (TCE)

Outro teste para avaliar o comportamento do tipo ansioso utilizado foi o teste de claro/escuro (TCE) Este teste consiste de uma câmara construída de material acrílico dividida em dois compartimentos: uma área clara (em que a parte superior recebe a incidência da luz

da sala experimental) e uma área escura (em que a parte superior impede a penetração da luz da sala experimental para o interior do compartimento).

Os compartimentos possuem as seguintes dimensões: 50 x 80 x 60 cm, e são interconectados por uma abertura (15 x 10 cm) que permite a livre circulação do animal, como pode ser observada na Figura 5.

Para dar início ao teste, cada animal foi isoladamente posicionado no compartimento claro da câmara, com a face voltada para a abertura que liga ao compartimento escuro. Os comportamentos emitidos pelos animais foram filmados e gravados utilizando o Geo Vision software por um período de 5 minutos.

Os parâmetros utilizados para avaliar a atividade exploratória do animal foram o número de transições entre os dois compartimentos e tempo total no compartimento claro (BOUWKNECHT; PAYLOR, 2002; BOURIN; HASCOET, 2003). Para ser considerado dentro de um determinado compartimento, foi necessário que as quatro patas tivessem ultrapassado a abertura comunicante entre as áreas.

Ao final de cada teste, cada rato retornou a sua caixa de origem e a câmara foi limpa com um pano umedecido em solução de álcool 70%. O teste de claro/escuro foi realizado no dia 38, entre 10 h e 12 h.

Figura 5 - Câmara utilizada para o Teste de Claro/Escuro

Fonte: Bonther Equipamentos para Ensino e Pesquisa (www.bonther.com.br, acesso em 15/02/2018) (modificado)

3.5.3. Teste da placa quente

O teste da placa quente foi realizado entre 13 h e 15 h. Os ratos foram submetidos ao teste da placa quente em dois momentos: 1) Após o período de habituação para determinar o valor basal de latência, no dia 0 e 2) No dia 38, para determinação do tempo de latência após o fim dos protocolos experimentais.

Para a realização do teste, o rato foi individualmente posicionado sobre a placa quente e foi avaliada a sensibilidade nociceptiva do animal por meio do tempo em segundos (latência) para a emissão dos comportamentos: de lambidas em um dos membros posteriores ou saltos. A placa quente consiste de uma placa de alumínio com temperatura mantida a $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ cercada por uma cuba de acrílico removível com as dimensões 26 x 18 x 28 cm (Figura 6). Para evitar possíveis danos teciduais, caso não houvesse a emissão de nenhum dos comportamentos avaliados, o tempo de corte estabelecido para a retirada do animal do aparato foi de 30 s. Ao fim do teste, os ratos retornaram às suas respectivas caixas e o aparato foi limpo com um pano umedecido em solução de álcool 70%. O teste só recomeçava quando certificado que a placa atingiu e manteve a temperatura de 50°C .

Figura 6 - Aparato utilizado para o Teste da Placa Quente.

Fonte: Bonther Equipamentos para Ensino e Pesquisa (www.bonther.com.br, acesso em 15/02/2018) (modificado)

3.6. Eutanásia dos animais e obtenção das amostras a serem analisadas

Após o término dos testes comportamentais e nociceptivo, os ratos foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica com associação de cloridrato de xilazina 4% (30 mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (225 mg/kg) seguida de ruptura do diafragma para perfusão

intracardiaca com tampão Krebs-Ringer, seguido de fixação com Somogyi-Takagi. A seguir o encéfalo foi removido e permaneceu por 4 h em solução de Somogyi-Takagi para pós-fixação. Após este período, o encéfalo foi crioprotégido em solução de sacarose 30% e ficou nesta solução até que afundasse completamente, indicando saturação do tecido. Após, foi rapidamente congelado em isopentano resfriado a -40°C em gelo seco e armazenado em freezer -80°C até o momento da realização dos cortes em criostato. Um dia antes da realização dos cortes no micrótomo criostato, os encéfalos foram retirados do freezer -80°C e levados para freezer -20°C . Com a utilização do Atlas de Paxinos e Watson (1998), as áreas anatômica de interesse foram determinadas pelas coordenadas a partir do bregma, isto é, ponto de intersecção entre a sutura sagital e a sutura coronal Paxinos et al. (1985). Cortes coronais na espessura de 25 μm (em mm do bregma) foram realizados por toda a extensão rostrocaudal da amígdala (-2,40 mm), hipocampo (-3,12 mm) e região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (-6,96 mm) e coletadas em eppendorfs de 2 mL identificados contendo solução anticongelante e guardadas no freezer -20°C até a realização dos ensaios imunoistoquímicos.

3.7. Ensaios de imunoistoquímica para determinação dos níveis de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)

A técnica de imunoistoquímica para nNOS visa a marcação específica de neurônios nitrérgicos, por meio da marcação da nNOS (BORTOLANZA et al., 2015). O protocolo utilizado para realização da imunoistoquímica para nNOS foi fundamentada na técnica descrita por Siba et al. (2017).

Foram realizados cortes flutuantes livres de 25 μm de espessura que foram lavados com tampão fosfato salina com Triton X-100 (0,1 M, pH 7,4, PBS+TX) em blocos de 5 minutos. Em seguida foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato de sódio (1 M, pH 6,0) por 30 minutos a 60°C . Os cortes foram deixados para resfriar à temperatura ambiente por 15 min, seguida do bloqueio da peroxidase endógena nos cortes com 2% peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sigma-Aldrich (Merck), Alemanha) em PBS+TX por 30 minutos. A seguir, foi realizado o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas utilizando albumina de soro bovino (BSA, Jackson Immuno Research, EUA) contendo soro normal de coelho a 5% (S-5000, Vector Laboratories, Califórnia, EUA) por 1 hora em temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram incubados *overnight* na diluição de 1:15.000 do anticorpo primário anti-nNOS produzido em ovelha em PBS+TX (anticorpo gentilmente doado pelo

Prof. Dr. Piers C. Emson, Babraham Institute, Cambridge, U.K.). Posteriormente, os cortes foram incubados por 90 min com anticorpo biotilado anti-cabra produzido em coelho, na diluição de 1:400 (BA-6000, Vector Laboratories, Califórnia, EUA). Depois incubados por 2 horas com o complexo avidina-biotina, 1:300 em PBS+TX (ABC Elite kit; Vector Laboratories, Califórnia, EUA). Foi realizada a revelação em 3,3'-diaminobenzidina tetrahydroclorato (D5905, Sigma-Aldrich (Merck), Alemanha) na presença de H_2O_2 (Sigma-Aldrich (Merck), Alemanha) por 6 minutos. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados e cobertos com Entellan.

As áreas analisadas neste estudo foram: divisão medial do núcleo central da amígdala (CeM), hipocampo e região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal. As imagens das regiões de interesse foram capturadas com a objetiva de 20x (microscópio DM6 B, Leica Microsystems, Alemanha) e digitalizada com a câmera microscópica digital (DFC450, Leica Microsystems, Alemanha).

Três cortes de cada região foram capturadas e analisada às cegas com o auxílio do programa *ImageJ*® (Image Processing and Analysis in Java, NIH, MD, EUA).

3.8. Análise estatística dos resultados

O teste de abrangência de normalidade de D'Agostino-Pearson foi empregado para assegurar que os dados satisfaziam os critérios para a execução da análise paramétrica. Dada a normalidade dos dados, os resultados dos grupos experimentais foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) para cada teste realizado.

O peso corporal dos ratos foi determinado pela diferença do peso corporal no início e no fim dos protocolos experimentais, representado pelo Δ do peso corporal dos ratos, expresso em gramas (g).

Para análise estatística do peso corporal, TCE e do LCE foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, onde os fatores considerados foram: o tipo de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) e o tipo de estresse a que foram submetidos (controle, estresse crônico variado ou isolamento social). Quando possível, foi utilizado para comparação o pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Para análise estatística do teste da placa quente foram realizadas as comparações antes (dia 0) e após a realização dos protocolos experimentais (dia 38) utilizando ANOVA de duas vias para medidas repetidas, em que os fatores considerados foram: o tipo de ambiente

(ambiente padrão ou ambiente enriquecido) e o tipo de estresse a que foram submetidos (controle, estresse crônico variado ou isolamento social). Quando possível, foi utilizado para comparação o pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

A análise da imunorreatividade à nNOS foi obtida por meio da contagem do número de células com marcação positiva (densidade neuronal positivamente marcada/ 0,3 mm²) na região determinada e limitada do tecido nervoso. Os dados foram apresentados como média de células imunorreativas $\pm$ EPM para cada área em estudo. Para análise estatística foi utilizada a análise de variância de duas vias, onde os fatores considerados foram: o ambiente de criação (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) e o tipo de estresse a que foram submetidos (controle, estresse crônico variado ou isolamento social). Quando possível, foi utilizado para comparação o pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism® para Windows, versão 7.0 (GraphPad Software, EUA; www.graphpad.com).

4 Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do peso corporal de ratos mantidos nas diferentes condições ambientais (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse por isolamento social

Para determinar o peso corporal dos ratos nas diferentes situações experimentais calculou-se a diferença do peso dos animais entre o início dos protocolos experimentais (dia 0) e o fim dos experimentos (dia 38) (Δ do peso corporal dos ratos). Os dados foram expressos em gramas (g) como representados na Figura 7. A aplicação da ANOVA de duas vias revelou diferença significativa considerando o fator ambiente (ambiente padrão ou enriquecido) ($F_{1,29}=5,14$; $p < 0,05$). O pós-teste de Tukey mostrou ganho significativamente menor de peso corporal dos ratos criados em ambiente enriquecido ($p < 0,05$) quando comparados aos criados em ambiente padrão (não enriquecido).

Figura 7 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social no peso corporal de ratos, em gramas (g).

Padrão+Controle (n = 9), Padrão+Isolamento Social (n = 8), EE+Controle (n = 7) e EE+Isolamento Social (n = 9). #Grupos criados em EE comparados aos criados em ambiente Padrão (sem enriquecimento). Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

4.2. Avaliação do peso corporal de ratos mantidos nas diferentes condições ambientais (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse crônico variado

Para determinar o peso corporal dos ratos nas diferentes situações experimentais calculou-se a diferença do peso dos animais entre o início dos protocolos experimentais (dia 0) e o fim dos experimentos (dia 38) (Δ do peso corporal dos ratos). Os dados foram expressos em gramas (g) como representados na Figura 8. A aplicação da ANOVA de duas vias revelou que não há diferença significativa considerando o fator ambiente (ambiente padrão ou enriquecido) ($F_{1,30}=2,457$; $p > 0,05$) e/ou fator estresse crônico variado (ausência de estresse ou estresse crônico variado) ($F_{1,30}=1,993$; $p > 0,05$).

Figura 8 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado no peso corporal de ratos, em gramas (g)

Padrão+Controle (n = 9), Padrão+Estresse Crônico Variado (n = 8), EE+Controle (n = 7) e EE+Estresse Crônico Variado (n = 10). Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%.

4.3. Avaliação do comportamento do tipo ansioso de ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse por isolamento social: pelo LCE e TCE

A Figura 9 representa os resultados obtidos dos ratos criados nas diferentes condições ambientais e submetidos ao isolamento social, que tiveram seus comportamentos avaliados no teste do LCE.

Os dados referentes às medidas clássicas do LCE mostram alteração do comportamento emocional nos ratos dos grupos submetidos ao estresse por isolamento social. A aplicação da ANOVA de duas vias evidenciou diferença significativa considerando a porcentagem de tempo nos braços abertos ($F_{1,29}=11,47$; $p < 0,01$) e a frequência de entrada nos braços abertos ($F_{1,29}=16,03$; $p < 0,001$) (Figura 9 A e B, respectivamente). O pós-teste de Tukey apontou redução da porcentagem de tempo nos braços abertos ($p < 0,05$) quando

comparados os grupos Padrão+Isolamento Social com os grupos Padrão+Controle e EE+Controle (Figura 9 A). Considerando a frequência de entradas nos braços abertos evidenciou-se redução significativa ($p < 0,05$) entre o grupo Padrão+Isolamento Social quando comparados aos a todos os demais grupos, isto é, Padrão+Controle, EE+Controle e EE+Isolamento Social (Figura 9 B).

Além disso, nos grupos mantidos em ambiente enriquecido, a ANOVA de duas vias evidenciou alteração na porcentagem de tempo ($F_{1,29}=7,053$; $p < 0,05$) e na frequência de entradas nos braços abertos ($F_{1,29}=20,76$; $p < 0,0001$) (Figura 9 A e B, respectivamente). O pós-teste de Tukey apontou aumento na frequência de entradas nos braços abertos ($p < 0,05$) do grupo EE+Controle comparado ao grupo Padrão+Controle (Figura 9 B)

Nos grupos analisados, a função motora avaliada pela frequência de entrada nos braços fechados do labirinto não foi alterada nos grupos realizados ($F_{1,29}=0,81$; $p > 0,05$) (Figura 9 C).

Figura 9 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social no comportamento do tipo ansioso analisado por meio das medidas clássicas do LCE

Padrão+Controle (n = 9), Padrão+Isolamento Social (n = 8), EE+Controle (n = 7) e EE+Isolamento Social (n = 9). **A:** Porcentagem de tempo nos braços abertos. **B:** Frequência de entrada nos braços abertos. **C:** Frequência de entrada nos braços fechados. *Grupos submetidos ao Isolamento Social comparados aos grupos Controle (sem estresse). #Grupos criados em ambiente enriquecido comparados aos criados em ambiente Padrão (sem enriquecimento). ^aPadrão+Isolamento Social comparado aos grupos Padrão+Controle, EE+Controle e EE+Isolamento Social. ^bPadrão+Isolamento Social comparado aos grupos Padrão+Controle e EE+Controle. ^cEE+Controle comparado ao grupo Padrão+Controle. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Adicionalmente, foi realizada a análise das medidas complementares relacionadas ao fator ansiedade no LCE.

Os resultados mostram que o estresse por isolamento social reduziu a exploração da extremidade dos braços abertos e da frequência de mergulhos de cabeça (Figura 10 A e B, respectivamente). A ANOVA de duas vias evidenciou diferença no fator estresse por isolamento social considerando a exploração da extremidade dos braços abertos ($F_{1,29}=12,45$; $p < 0,01$) e da frequência de mergulhos de cabeça ($F_{1,29}=8,81$; $p < 0,01$) (Figura 10 A e B, respectivamente). O pós-teste de Tukey apontou diferença ($p < 0,05$) no número de mergulhos de cabeça quando comparado o grupo Padrão+Isolamento Social ao EE+Controle ($F_{1,29}=3,90$; $p < 0,05$) e apontou tendência comparado ao Padrão+Controle ($F_{1,29}=3,59$; $p=0,07$) (Figura 10 B).

Levando-se em consideração o fator ambiente, os resultados demonstram que o enriquecimento ambiental aumentou a exploração da extremidade dos braços abertos (Figura 10 A). A ANOVA de duas vias evidenciou diferença no fator ambiente considerando a exploração da extremidade dos braços abertos ($F_{1,29}=20,81$; $p < 0,0001$) (Figura 10 A). O pós-teste de Tukey apontou diferença ($p < 0,05$) na exploração da extremidade dos braços abertos quando comparado o grupo EE+Controle ($F_{1,29}=20,81$; $p < 0,0001$) aos demais grupos: Padrão+Controle, Padrão+Isolamento Social e EE+Isolamento Social (Figura 10 A).

Os efeitos dos diferentes fatores também foram analisados sobre o comportamento de avaliação de risco no LCE, que engloba as medidas de rastejar, esticar e espreitar, ilustrados na Figura 10 C, D, E e F.

Na análise dos resultados, na medida de rastejamento, o estresse por isolamento social aumentou a frequência deste comportamento (Figura 10 C). A ANOVA de duas vias evidenciou diferença no fator estresse por isolamento social considerando a medida de rastejamento ($F_{1,29}=4,26$; $p < 0,05$) (Figura 10 C). Entretanto, sendo o comportamento de avaliação de risco a somatória das três medidas acima mencionadas, não houve diferença significativa neste comportamento tanto no fator estresse por isolamento social ($F_{1,29}=0,09$; $p > 0,05$) como no fator ambiente ($F_{1,29}=2,61$; $p > 0,05$) (Figura 10 F).

Figura 10 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social no comportamento do tipo ansioso analisado por meio das medidas complementares do LCE

Padrão+Controle (n = 9), Padrão+Isolamento Social (n = 8), EE+Controle (n = 7) e EE+Isolamento Social (n = 9). **A:** Exploração das extremidades dos braços abertos. **B:** Mergulho de cabeça. **C:** Rastejamento. **D:** Esticamento. **E:** Espreitamento. **F:** Avaliação de Risco. *Grupos submetidos ao Isolamento Social comparados aos grupos Controle (sem estresse). #Grupos criados em ambiente enriquecido comparados aos criados em ambiente Padrão (sem enriquecimento). ^dEE+Controle comparado aos grupos Padrão+Controle, Padrão+Isolamento Social e EE+Isolamento Social. ^ePadrão+Isolamento Social comparado aos grupos EE+Controle. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos no teste de claro/escuro são apresentados na Figura 11. Foram analisados o número total de transição entre os dois compartimentos da caixa, isto é, compartimento claro e compartimento escuro; e o tempo total de permanência no compartimento claro durante o teste. A aplicação do teste estatístico ANOVA de duas vias

não pontuou diferença significativa quanto ao número de cruzamentos nos fatores analisados: ambiente de criação ($F_{1,29}=2,20$; $p > 0,05$) e estresse por isolamento social ($F_{1,29}=0,01$; $p > 0,05$); bem como no tempo total de permanência no compartimento claro nos fatores analisados: ambiente de criação ($F_{1,29}=0,05$; $p > 0,05$) e estresse por isolamento social ($F_{1,29}=0,41$; $p > 0,05$), como demonstrado na Figura 11 A e B, respectivamente.

Figura 11 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social no comportamento do tipo ansioso analisado pelo TCE

Padrão+Controle (n = 9), Padrão+Isolamento Social (n = 8), EE+Controle (n = 7) e EE+Isolamento Social (n = 9). **A:** Frequência de cruzamentos entre os compartimentos. **B:** Tempo total no compartimento claro. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%.

4.4. Avaliação do comportamento do tipo ansioso de ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse crônico variado: pelo LCE e TCE

A Figura 12 representa os resultados obtidos dos ratos criados nas diferentes condições ambientais e submetidos ao estresse crônico variado, que tiveram seus comportamentos avaliados no teste do LCE.

Os dados referentes às medidas clássicas do LCE mostram que o estresse crônico variado reduziu a porcentagem de tempo nos braços abertos (Figura 12 A). A aplicação da ANOVA de duas vias evidenciou diferença significativa considerando a porcentagem de tempo nos braços abertos ($F_{1,30}=11,78$; $p < 0,01$) (Figura 12 A).

Considerando o fator ambiente, os resultados mostram que o enriquecimento ambiental aumentou a frequência de entrada nos braços abertos (Figura 12 B). A ANOVA de

duas vias evidenciou diferença no fator ambiente considerando a frequência de entrada nos braços abertos ($F_{1,30}=10,39$; $p < 0,01$) (Figura 12 B).

O pós-teste de Tukey apontou redução significativa ($p < 0,05$) da porcentagem de tempo nos braços abertos quando comparado o grupo Padrão+Estresse Crônico Variado ao grupo EE+Controle na porcentagem de entrada e na frequência de entrada nos braços abertos (Figura 12 A e B, respectivamente).

Nos grupos analisados, a função motora avaliada pela frequência de entrada nos braços fechados do labirinto mostrou que o enriquecimento ambiental aumentou a locomoção (Figura 12 C). A ANOVA de duas vias evidenciou diferença no fator ambiente ($F_{1,30}=4,417$; $p < 0,05$) (Figura 12 C).

Figura 12 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado no comportamento do tipo ansioso analisado por meio das medidas clássicas do LCE

Padrão+Controle ($n = 9$), Padrão+Estresse Crônico Variado ($n = 8$), EE+Controle ($n = 7$) e EE+Estresse Crônico Variado ($n = 10$). **A:** Porcentagem de tempo nos braços abertos. **B:** Frequência de entrada nos braços abertos. **C:** Frequência de entrada nos braços fechados. *Grupos submetidos ao Estresse Crônico Variado comparados aos grupos Controle (sem estresse). #Grupos criados em ambiente enriquecido comparados aos criados em ambiente Padrão (sem enriquecimento). ^ePadrão+Estresse Crônico Variado comparado ao EE+Controle. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Adicionalmente, foi realizada a análise das medidas complementares relacionadas ao fator ansiedade no LCE.

Levando-se em consideração o fator ambiente, os resultados demonstram que o enriquecimento ambiental aumentou a exploração da extremidade dos braços abertos (Figura 13 A). A ANOVA de duas vias evidenciou diferença no fator ambiente considerando a exploração da extremidade dos braços abertos ($F_{1,30}=7,363; p < 0,05$) (Figura 13 A).

Os resultados mostram que o estresse crônico variado reduziu a frequência de mergulhos de cabeça (Figura 13 B, respectivamente). A ANOVA de duas vias evidenciou diferença no fator estresse crônico variado considerando a frequência de mergulhos de cabeça ($F_{1,30}=4,856; p < 0,05$) (Figura 13 B).

Os efeitos dos diferentes fatores também foram analisados sobre o comportamento de avaliação de risco no LCE, que engloba as medidas de rastejar, esticar e espreitar, ilustrados na Figura 13 C, D, E e F. Entretanto, não houve diferença significativa neste comportamento tanto no fator estresse crônico variado ($F_{1,30}=0,09; p > 0,05$) como no fator ambiente ($F_{1,30}=1,92; p > 0,05$) (Figura 13 F).

Figura 13 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado no comportamento do tipo ansioso analisado por meio das medidas complementares do LCE

Padrão+Controle ($n = 9$), Padrão+Estresse Crônico Variado ($n = 8$), EE+Controle ($n = 7$) e EE+Estresse Crônico Variado ($n = 10$). **A:** Exploração das extremidades dos braços abertos. **B:** Mergulho de cabeça. **C:** Rastejamento. **D:** Esticamento. **E:** Espreitamento. **F:** Avaliação de Risco. *Grupos submetidos ao Estresse Crônico Variado comparados aos grupos Controle (sem estresse). #Grupos criados em ambiente enriquecido comparados aos criados em ambiente Padrão (sem enriquecimento). Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos no teste de claro/escuro são apresentados na Figura 14. Foram analisados: o número total de transição entre os dois compartimentos da caixa, isto é, compartimento claro e compartimento escuro; e o tempo total de permanência no compartimento claro durante o teste. A aplicação do teste estatístico ANOVA de duas vias não pontuou diferença significativa no número de cruzamento entre os fatores analisados: ambiente de criação ($F_{1,30}=0,92$; $p > 0,05$) e estresse crônico variado ($F_{1,30}=1,30$; $p > 0,05$),

bem como no tempo total de permanência no compartimento claro entre os fatores analisados: ambiente de criação ($F_{1,30}=0,41$; $p > 0,05$) e estresse crônico variado ($F_{1,30}=0,53$; $p > 0,05$), como demonstrado na Figura 14 A e B, respectivamente.

Figura 14 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado no comportamento do tipo ansioso analisado pelo TCE

Padrão+Controle ($n = 9$), Padrão+Estresse Crônico Variado ($n = 8$), EE+Controle ($n = 7$) e EE+Estresse Crônico Variado ($n = 10$). **A:** Frequência de cruzamentos entre os compartimentos. **B:** Tempo total no compartimento claro. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%.

4.5. Avaliação da sensibilidade nociceptiva de ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse por isolamento social: pelo teste da placa quente

A Figura 15 representa os resultados obtidos dos ratos criados nas diferentes condições ambientais e submetidos ao estresse por isolamento social, que tiveram a sensibilidade nociceptiva avaliada no teste da placa quente.

A aplicação da ANOVA de duas vias para medidas repetidas não evidenciou diferença significativa no tempo de latência para emissão de resposta frente ao estímulo aversivo no teste da placa quente considerando os diferentes grupos ($F_{3,21}=0,7781$; $p > 0,05$) bem como o tempo em que foram analisados ($F_{1,21}=0,6566$; $p > 0,05$) (Figura 15).

Figura 15 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na sensibilidade nociceptiva analisada pelo tempo de latência para emissão de resposta ao estímulo aversivo no teste da placa quente, antes (basal) ou ao fim dos experimentos (38 dias)

Padrão+Controle (n = 9), Padrão+Isolamento Social (n = 8), EE+Controle (n = 7) e EE+Isolamento Social (n = 9). Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com nível de significância de 5%.

4.6. Avaliação da sensibilidade nociceptiva de ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse crônico variado: pelo teste da placa quente

A Figura 16 representa os resultados obtidos dos ratos criados nas diferentes condições ambientais e submetidos ao estresse crônico variado, que tiveram a sensibilidade nociceptiva avaliada no teste da placa quente.

A aplicação da ANOVA de duas vias para medidas repetidas não evidenciou diferença significativa no tempo de latência para emissão de resposta frente ao estímulo aversivo no teste da placa quente considerando os diferentes grupos ($F_{3,21}=0,987$; $p > 0,05$) bem como o tempo em que foram analisados ($F_{1,21}=0,3022$; $p > 0,05$) (Figura 16).

Figura 16 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na sensibilidade nociceptiva analisada pelo tempo de latência para emissão de resposta ao estímulo aversivo no teste da placa quente, antes (basal) ou ao fim dos experimentos (38 dias)

Padrão+Controle (n = 9), Padrão+Estresse Crônico Variado (n = 8), EE+Controle (n = 7) e EE+Estresse Crônico Variado (n = 9). Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com nível de significância de 5%.

4.7. Avaliação da imunorreatividade à nNOS em áreas encefálicas relacionadas com a ansiedade em ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse por isolamento social

Neste protocolo experimental, foi avaliada a expressão de nNOS na regiões encefálicas: amígdala (divisão medial do núcleo central da amígdala, CeM), hipocampo e região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal. Os dados são apresentados nas Figuras 17 à 22, seguidos de suas fotomicrografias representativas.

Neste sentido, considerando o núcleo central da amígdala, as quantificações dos neurônios imunorreativos foram realizadas na CeM. Foi realizado o teste de ANOVA de duas vias, o qual não evidenciou diferença significativa nos diferentes fatores avaliados: ambiente de criação ($F_{1,26}=0,68$; $p > 0,05$) e estresse por isolamento social ($F_{1,26}=1,23$; $p > 0,05$) como pode ser observado na Figura 17.

Figura 17 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na CeM

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da região da amígdala de ratos com destaque para a CeM. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos na CeM. **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

Para a análise estatística da formação hipocampal, as diferentes áreas do hipocampo (a saber, CA1, CA2, CA3 e giro denteado) foram analisadas separadamente (Figuras 18, 19, 20 e 21, respectivamente).

Os resultados mostram que o estresse por isolamento social aumentou o número de neurônios nNOS imunorreativos na área hipocampal CA2 (Figura 19). A ANOVA de duas vias evidenciou diferença no fator estresse por isolamento social no número de neurônios nNOS imunorreativos na área hipocampal CA2 ($F_{1,26}=4,872$; $p < 0,05$) (Figuras 19). Na área hipocampal CA3, houve interação significativa entre os fatores estresse por isolamento social e ambiente de criação ($F_{1,26}=5,188$; $p < 0,05$) (Figura 20). O pós-teste de Tukey mostrou que houve aumento significativo ($p < 0,05$) no número de neurônios nNOS imunorreativos quando comparados o grupo Padrão+Isolamento Social ao Padrão+Controle. Considerando a interação entre os fatores estresse por isolamento social e ambiente de criação, a aplicação do pós-teste de Tukey evidenciou diferença ($p < 0,05$) no número de neurônios nNOS imunorreativos do grupo Padrão+Isolamento Social quando comparado ao grupo EE+Isolamento Social (Figura 20).

Figura 18 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região de CA1

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da região de hipocampo de ratos com destaque para a região de CA1. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos em CA1. **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

Figura 19 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região de CA2

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da região de hipocampo de ratos com destaque para a região de CA2. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos em CA2. *Grupos submetidos ao Isolamento Social comparados aos grupos Controle (sem estresse). **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

Figura 20 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região de CA3

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da região de hipocampo de ratos com destaque para a região de CA3. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos em CA3. ^{bb}Padrão+Isolamento Social comparado aos grupos Padrão+Controle e EE+Isolamento Social. **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

Figura 21 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região do giro denteado

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da região de hipocampo de ratos com destaque para a região do giro denteado. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos em giro denteado. **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

Na região da região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, o teste de ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa nos diferentes fatores avaliados: ambiente de criação ($F_{1,26}=2,55; p > 0,05$) e estresse por isolamento social ($F_{1,26}=0,23; p > 0,05$) como pode ser observado na Figura 22.

Figura 22 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da substância cinzenta periaquedutal de ratos com destaque para a região dorsolateral. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal. **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

4.8. Avaliação da imunorreatividade à nNOS em áreas encefálicas relacionadas com a ansiedade em ratos mantidos nas diferentes condições de ambiente (ambiente padrão ou ambiente enriquecido) quando submetidos ao estresse crônico variado

Neste protocolo experimental, foi avaliada a expressão de nNOS na regiões encefálicas: amígdala (divisão medial do núcleo central da amígdala, CeM), hipocampo e região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal. Os dados são apresentados nas Figuras 23 à 28, seguidos de suas fotomicrografias representativas.

Neste sentido, considerando o núcleo central da amígdala, as quantificações dos neurônios imunorreativos foram realizadas na divisão medial (CeM). Foi realizado o teste de ANOVA de duas vias, o qual não evidenciou diferença significativa nos diferentes fatores avaliados: ambiente de criação ($F_{1,28}=0,02$; $p > 0,05$) e estresse crônico variado ($F_{1,28}=2,30$; $p > 0,05$) como pode ser observado na Figura 23.

Figura 23 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na imunorreatividade à nNOS na CeM

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da região da amígdala de ratos com destaque para a CeM. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos na CeM. **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

Para a análise estatística da formação hipocampal, as diferentes áreas do hipocampo (a saber, CA1, CA2, CA3 e giro denteado) foram analisadas separadamente (Figuras 24 à 27, respectivamente).

Os resultados mostram que o estresse crônico variado aumentou o número de neurônios nNOS imunorreativos na área hipocampal CA3 (Figura 26). A ANOVA de duas vias evidenciou diferença no fator estresse crônico variado no número de neurônios nNOS imunorreativos na área hipocampal CA3 ($F_{1,28}=4,437$; $p < 0,05$) (Figura 26). Entretanto, nas demais áreas analisadas, i.e., CA1, CA2 e giro denteado, não foram observadas alterações quanto ao número de neurônios nNOS imunorreativos (Figuras 24, 25 e 27, respectivamente).

Figura 24 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na imunorreatividade à nNOS na região de CA1

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da região de hipocampo de ratos com destaque para a região de CA1. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos em CA1. **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

Figura 25 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na imunorreatividade à nNOS na região de CA2

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da região de hipocampo de ratos com destaque para a região de CA2. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos em CA2. **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

Figura 26 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na imunorreatividade à nNOS na região de CA3

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da região de hipocampo de ratos com destaque para a região de CA3. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos em CA3. *Grupos submetidos ao Isolamento Social comparados aos grupos Controle (sem estresse). **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

Figura 27 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse crônico variado na imunorreatividade à nNOS na região do giro denteado

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da região de hipocampo de ratos com destaque para a região do giro denteado. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos em giro denteado. **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

Na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, o teste de ANOVA de duas vias revelou não haver diferença significativa no fator estresse crônico variado ($F_{1,28}=0,005; p > 0,05$) como pode ser observado na Figura 28.

Figura 28 - Efeito do enriquecimento ambiental e/ou estresse por isolamento social na imunorreatividade à nNOS na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal

A. Representação esquemática de secção frontal obtida em planos representativos da substância cinzenta periaquedutal de ratos com destaque para a região dorsolateral. **B.** Quantificação dos neurônios nNOS imunorreativos na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal. **C-F.** Fotomicrografias representativas mostrando neurônios nNOS imunorreativos nos diferentes grupos estudados, no aumento de 20x. Os resultados são expressos em médias $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias, com nível de significância de 5%. Fonte: Autoria Própria.

5 Discussão

5. DISCUSSÃO

O isolamento social é uma condição altamente aversiva (BLANCHARD et al., 1998; MATTHEWS et al., 2016) que tem sido utilizado como modelo para estudo de distúrbios emocionais como depressão e ansiedade em roedores (KOKARE et al., 2010; SHETTY; SADANANDA, 2017). Estudos demonstraram que o isolamento social é capaz de causar alterações nas funções cerebrais e comportamentais (LUKKES et al., 2012) em diferentes momentos do desenvolvimento, tais como, na idade adulta (CUENYA et al., 2012) e senil (CRUCES et al., 2014).

No presente estudo observou-se que ratos criados em ambiente enriquecido, submetidos ou não ao estresse por isolamento social ganharam menos peso corporal (Figura 7), comparados aos grupos de ratos criados em ambiente padrão nas mesmas condições estressoras. Entretanto, tal alteração não foi observada em ratos submetidos ao estresse crônico variado, criados ou não em ambiente enriquecido. Os dados relativos ao peso corporal são conflitantes na literatura. Estudo envolvendo o estresse de isolamento social demonstrou maior ganho de peso corporal em ratos criados em ambiente enriquecido após o desmame, em relação àqueles criados em ambiente padrão, entretanto, não houve variação dos pesos na idade adulta dos diferentes grupos quando realocados para viverem em um ambiente comum (MOSAFERI et al., 2015). Por outro lado, não foi diferente o peso corporal e a ingestão de alimento em ratos mantidos isolados e criados em ambiente padrão ou ambiente enriquecido (BEALE et al., 2011). Por sua vez, os resultados do presente trabalho corroboram estudo de Zaias et al. (2008), o qual evidenciou menor ganho do peso corporal de ratos criados em ambiente enriquecido em relação aos criados isoladamente. Visto que nenhuma alteração física ou dano à saúde foram observados nos ratos (pelos e olhos brilhantes) foram pontuados os fatores: o enriquecimento físico e o consumo alimentar como relevantes para a menor taxa de ganho no peso corporal (ZAIAS et al., 2008). Baseada nas três facetas que ditam o enriquecimento ambiental, i.e., novidade, contato social e exercício (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015), presume-se que a maior diversidade e quantidade de estímulos proporcionados pelo enriquecimento ambiental ativam os hormônios de uma maneira fisiológica (MONCEK et al., 2004) causando menor ganho de peso corporal dos ratos. Além disso, apesar do fornecimento irrestrito de alimento, o consumo alimentar de ratos mantidos em ambiente enriquecido é menor que ratos isolados mantidos em ambiente padrão (ZAIAS et

al., 2008). Os dados conflitantes encontrados na literatura podem ser devido aos variados procedimentos experimentais adotados (ASHOKAN; HEDGE; MITRA, 2016) bem como aos modelos animais empregados (MESA-GRESA; RAMOS-CAMPOS; REDOLAT, 2016) e reforçam a necessidade de maiores pesquisas a cerca do assunto com criterioso controle da ingesta alimentar, peso corporal e relacioná-los ao hormônios envolvidos no metabolismo energético.

O comportamento do tipo ansioso foi avaliado em ratos adultos jovens submetidos ao estresse crônico por isolamento social, por meio do teste do labirinto em cruz elevado. Ficou evidente aumento significativo no comportamento do tipo ansioso em ratos isolados cronicamente comparados àqueles não estressados (Figura 9), dado não corroborado pelo teste de claro-escuro. No entanto, a avaliação sistemática do labirinto em cruz elevado, por meio das medidas clássicas (porcentagem de entrada nos braços abertos, porcentagem de tempo nos braços abertos, frequência de entrada nos braços abertos e frequência de entrada nos braços fechados) e complementares (exploração das extremidades e mergulho de cabeça) (ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDAO, 2008; SAITO e BRANDAO, 2015), fortalecem os resultados encontrados. Diversos trabalhos na literatura tem utilizado o comportamento de exploração das extremidades e de mergulho de cabeça como um dos parâmetros na análise das medidas complementares do LCE (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995; ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDAO, 2008; MUTHURAJU, TALBOT e BRANDAO, 2016). Nestes trabalhos, durante a execução do LCE, a avaliação criteriosa de comportamentos etológicos por meio da análise fatorial revelou que a exploração das extremidades e o mergulho de cabeça recaíam sobre o mesmo fator daqueles índices padrões, que são classicamente interpretados como inversamente relacionados à ansiedade, como, por exemplo, as porcentagens de tempo e de entrada nos braços abertos (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995; ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDAO, et al., 2008). Corroborando com estes achados, (SAITO; BRANDAO, 2015) encontraram que a microinjeção do benzodiazepínico midazolam, um reconhecido fármaco com ação ansiolítica, no cóliculo inferior ventral aumentou significativamente a exploração das extremidades e o número de mergulho de cabeça, relacionando estes comportamentos a uma diminuição no comportamento do tipo ansioso, o que reforça, portanto, a importância da avaliação destas medidas durante a interpretação do labirinto em cruz elevado.

Desta maneira, a análise das medidas complementares pode ajudar na interpretação de resultados conflituosos, como o apresentado por Thorsell et al. (2006) em que ratos adultos

isolados cronicamente passaram mais tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e na área central do campo aberto que ratos mantidos aos pares. Assim, apesar de contraditório, relatam que o isolamento social pode aumentar tanto a tendência exploratória como a ansiedade. Por outro lado, Lukkes et al. (2009) e colaboradores confirmaram um perfil do tipo ansioso na fase adulta em ratos isolados socialmente no início da infância, por um período de três semanas, comparados aos controles, e que este perfil não foi revertido pela ressocialização. É válido ressaltar que a fase do desenvolvimento em que os ratos são submetidos ao estresse crônico por isolamento social é relevante na avaliação do comportamento do tipo ansioso a fim de se evitar achados equivocados (HALL, 1998; ARAKAWA, 2003), uma vez que o estresse durante o início do desenvolvimento provoca mudanças duradouras na anatomia e na plasticidade hipocampal que parecem modular as emoções ao longo da vida (MCEWEN et al., 2012). Apesar dessas controvérsias encontradas na literatura, no presente estudo, este modelo de estresse crônico por isolamento social mostrou-se bastante efetivo na indução do comportamento do tipo ansioso, nas condições experimentais utilizadas.

Diante dos déficits causados pelo isolamento social no comportamento do tipo ansioso, o enriquecimento ambiental foi introduzido como medida alternativa de reversão destes déficits, já que é conhecido que o período entre infância e juventude é crítica para a formação das competências e ajustes sociais na idade adulta (ARAKAWA, 2003; FERDMAN et al., 2007). A associação entre a redução dos efeitos negativos das respostas emocionais e o enriquecimento ambiental na idade adulta, em camundongos criados após o desmame até a idade adulta, foi também observado por Workman et al. (2011) e reforçado em estudo com ratos Long-Evans (PRITCHARD; VAN KEMPEN; ZIMMERBERG, 2013). Assim, neste estudo, ratos criados em ambiente enriquecido mostraram-se menos ansiosos que aqueles criados em ambiente padrão, observado pelos resultados dos parâmetros clássicos (aumento na porcentagem de entrada nos braços abertos, na porcentagem de tempo nos braços abertos e na frequência de entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado) e complementares (aumento na exploração das extremidades). Ainda, o enriquecimento ambiental mostrou-se benéfico em ratos isolados socialmente uma vez que estes se apresentaram menos ansiosos que aqueles apenas isolados (maior porcentagem de entrada nos braços abertos). É importante destacar que no presente trabalho houve a preocupação no estabelecimento de um grupo de ratos que foram isolados socialmente, mas criados em ambiente enriquecido, fato não encontrado em todos os trabalhos discutidos. Desta forma, exclui-se um possível viés do

efeito benéfico do enriquecimento ambiental no comportamento do tipo ansioso ser devido à criação junto de seus co-específicos.

O estresse crônico variado foi outro modelo de estresse utilizado neste trabalho, que envolveu estressores de diferentes tipos e de menor duração. Esse estresse aumentou o comportamento do tipo ansioso revelado por meio da análise dos parâmetros clássicos (porcentagem de entrada nos braços abertos e porcentagem de tempo nos braços abertos, Figura 12) e no parâmetro complementar (mergulho de cabeça, Figura 13B), embora não corroborado pelo teste de claro-escuro. O presente trabalho confirma dados previamente publicados na literatura sobre o aumento do comportamento do tipo ansioso induzido pelo modelo de estresse crônico variado em roedores, usado de forma abrangente na investigação de alterações comportamentais e fisiológicas induzidas pelo estresse (ORTOLANI et al., 2014; CHABY et al., 2015). Ainda que amplamente aceito que os eventos estressantes podem induzir o desenvolvimento de transtornos de humor (WILLNER, 2005; GRAEFF, 2007; MCEWEN, 2008), trabalhos envolvendo o estresse crônico variado por curto período (entre 10 e 14 dias) nem sempre revelam um aumento no comportamento do tipo ansioso (VYAS et al., 2002; MITRA et al., 2005; COX et al., 2011). Contudo, em ratos, foi descrito o efeito ansiogênico induzido pelo estresse crônico variado tardiamente após o fim do último estressor (CHABY et al., 2015); fato previamente mostrado também uma semana após o fim dos estresses (ZURITA et al., 2000) e reforçado por Maslova; Bulygina e Markel (2002) que mostraram o estressor crônico variado, realizado no período de pré-puberdade, como causador do aumento do comportamento do tipo ansioso persistente na juventude até a idade adulta. Apesar das divergências, no presente estudo o aumento do comportamento do tipo ansioso induzido pelo estresse crônico variado foi observado um dia após a realização do último estressor.

Visto que o estresse crônico variado também apresentou prejuízo emocional nestes ratos, o protocolo de enriquecimento ambiental foi utilizado com o objetivo de reverter este déficit. O enriquecimento ambiental apresentou efeito ansiolítico observado pelo aumento na frequência de entrada nos braços abertos e na exploração das extremidades comparado àqueles criados em ambiente padrão, entretanto, diferentemente do isolamento social, não foi capaz de reverter o aumento do comportamento do tipo ansioso. A literatura é escassa quanto aos estudos envolvendo o efeito do enriquecimento ambiental no comportamento ansioso de ratos submetidos ao estresse crônico variado. Dos trabalhos encontrados, TANTI et al. (2012) avaliam este modelo de estresse e o enriquecimento ambiental de maneira não associada, e nele, o enriquecimento ambiental também diminuiu o comportamento do tipo ansioso além de

aumentar a proliferação celular e neurogênese hipocampal comparados ao grupo sem enriquecimento. Em trabalho mais recente, Zeeni et al. (2015) encontraram que o enriquecimento ambiental associado à dieta palatável aumenta a resiliência ao estresse crônico variado avaliado pela redução de hormônios relacionados ao estresse (hormônio adrenocorticotrófico - ACTH e corticosterona). Apesar dos resultados encontrados no presente estudo e dos escassos trabalhos na literatura, o enriquecimento ambiental apresenta resultados positivos no comportamento do tipo ansioso em outros modelos de estresse (FOX; MERALI; HARRISON, 2006) como o estresse agudo (NOVAES et al., 2017) e estresse crônico repetido (ASHOKAN; HEDGE; MITRA, 2016; BHAGYA et al., 2016), mas também em linhagens selecionadas de ratos com alta taxa de comportamento do tipo ansioso (RAVENELLE et al., 2014) e em outros modelos animais de roedores (MESA-GRESA; RAMOS-CAMPOS; REDOLAT, 2016).

Um dado interessante que emergiu no presente estudo, refere-se ao índice da atividade locomotora geral, analisado pelo labirinto em cruz elevado, comumente avaliado pela frequência de entrada dos ratos nos braços fechados (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Nesse estudo, o índice da atividade locomotora dos ratos criados em ambiente enriquecido, submetidos ou não ao estresse crônico variado, caracterizou-se por aumento na frequência de entrada nos braços fechados comparados aos ratos criados em ambiente padrão nas mesmas condições estressoras. Resultado semelhante neste mesmo parâmetro foi encontrado também por Brenes; Padilla e Fornaguera (2009), em ratos criados em ambiente enriquecido após o desmame e avaliados quando adultos jovens, que justificaram o aumento na entrada dos braços fechados, associado ao parâmetro do total de cruzamento (índice relacionado à ansiedade) como decorrência dos procedimentos realizados embora sugerissem aumento do comportamento do tipo ansioso (BRENES; PADILLA E FORNAGUERA, 2009).

A atividade locomotora tem sido avaliada mais comumente por meio do teste de campo aberto e os achados demonstram diminuição desta atividade quando são criados em ambiente enriquecido (ver revisão SIMPSON E KELLY, 2011). É válido ressaltar que o enriquecimento ambiental promove maior estímulo inanimado e social do que normalmente receberia em um ambiente padrão (ROSENZWEIG et al., 1978; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). Desta maneira, a introdução repetida de diferentes tipos de objetos inanimados causa estímulos comparáveis àqueles induzidos pela exposição à estressores repetidos moderados, e assim, a exploração livre tem sido sugerida como mecanismo de inoculação de estresse (LARSSON; WINBLAD e MOHAMMED, 2002; FOX MERALI; HARRISON, 2006; CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015). Diante do exposto,

(FOX; MERALI; HARRISON, 2006), relacionaram o aumento nos níveis basais de corticosterona induzido pelo enriquecimento ambiental com um aumento na atividade física, confirmado por gravações de vídeos em que ratos criados em ambiente enriquecido são mais ativos, manipulam e escalam os objetos com maior habilidade (MONCEK et al., 2004). Ainda, há evidências que ratos criados em ambiente enriquecido exploram mais o ambiente no início do teste do campo aberto (primeiros cinco minutos) e habituem mais rapidamente no decorrer do teste (LARSSON; WINBLAD; MOHAMMED, 2002). Desta maneira, o enriquecimento ambiental pode ter agido como um inoculador de estresse, aumentando a atividade física, interpretada no presente estudo pelo aumento da deambulação observado na frequência de entrada nos braços fechados do labirinto em cruz elevado. É válido ressaltar que a duração total do teste neste estudo foi equivalente ao período de maior exploração observado por Larsson, Winblad e Mohammed (2002) nos ratos criados em ambiente enriquecido. Desta forma, haja visto que outros parâmetros relacionados à ansiedade foram avaliados no teste do labirinto em cruz elevado terem resultado em efeito do tipo ansiolítico causado pelo enriquecimento ambiental, no presente estudo, sugere-se que o aumento da locomoção nestes ratos poderia ser relacionado a um maior perfil exploratório e não relacionado ao aumento do comportamento do tipo ansioso.

A sensibilidade nociceptiva avaliada pelo teste da placa quente não foi alterada mediante os diferentes estressores crônicos e as alterações ambientais propostos neste estudo (Figuras 15 e 16). Nas últimas décadas tem aumentado o interesse em pesquisas que visam compreender os mecanismos da interação entre estresse e dor, e é amplamente documentada em desordens de dor crônica uma exacerbação da dor desencadeada pelo estresse (JENNINGS et al., 2014). Entretanto, poucos estudos avaliam o efeito do estresse crônico por isolamento social (HELLEMANS; BENGE; OLMSTEAD, 2004; MENG et al., 2010) ou estresse crônico variado (PINTO-RIBEIRO et al., 2004; SHI, QI, et al., 2010; SHI, WANG; LUO, 2010; IDE et al., 2015) na ausência de injúria ou inflamação prévias ou no comportamento de dor evocada, como por exemplo, no teste da placa quente. Corroborando o resultado do presente estudo, Hellemans; Bengé e Olmstead (2004) também não encontraram efeito do estresse crônico por isolamento social no limiar de dor quando avaliaram a sensibilidade térmica usando o teste de retirada de cauda. Os achados do presente estudo reforçam as evidências de que o enriquecimento ambiental reverte parcialmente os déficits decorrentes do isolamento social sobre as alterações no comportamento ansioso, mas não na sensibilidade dolorosa (HELLEMANS; BENGE E OLMSTEAD, 2004). Por outro lado, tais achados divergem da hipoalgesia observada frente à dor evocada em ratos adultos isolados

socialmente, a qual perdurou mesmo após a ressocialização destes animais (MENG et al., 2010).

Os estudos envolvendo a alteração da sensibilidade nociceptiva induzida por estresse crônico variado também apresentam resultados conflitantes na literatura. Assim como no presente estudo, o modelo de estresse crônico variado proposto por Ide et al. (2015) não afetou a sensibilidade nociceptiva no teste da placa quente, apesar de outros estudos relatarem influência inibitória do estresse crônico variado na sensibilidade nociceptiva térmica (PINTO-RIBEIRO et al., 2004; SHI, QI, et al., 2010; SHI, WANG; LUO, 2010; WANG et al., 2013). Ainda, reforçando os achados do presente estudo quanto ao ambiente de criação, (KIMURA; MATTARAI, PICOLO, 2017) evidenciaram alteração na sensibilidade nociceptiva mecânica, mas não na térmica modulada pelo enriquecimento ambiental. De maneira interessante, Shi, Wang; Luo et al. (2010) avaliaram o comportamento nociceptivo em ratos submetidos ao estresse crônico variado por meio do teste da placa quente (estímulo térmico fásico) e pelo teste da formalina (estímulo inflamatório) e demonstraram que este estresse crônico variado possui efeitos diferentes dependendo do estímulo nociceptivo avaliado, reforçando que em modelos de estresse crônico a hiperalgesia observada é evidenciada apenas na dor espontânea (teste de formalina), mas não na sensibilidade nociceptiva térmica. É válido ressaltar que nestes estudos as diferenças metodológicas quanto à duração do estressor crônico, bem como os critérios utilizados na avaliação da sensibilidade nociceptiva podem explicar tais discrepâncias. Além disso, no estresse crônico variado, a avaliação da atividade neural, por meio da análise eletrofisiológica das vias medial e lateral da dor, demonstrou que o processamento da dor espontânea (teste da formalina) ou dor evocada (teste da placa quente) foi alterado em direções opostas, indicando a existência de um padrão de resposta neuronal distinto dentro do circuito cerebral relacionado à dor (WANG et al., 2013). Ademais, apesar de trabalhos relacionarem as diferentes isoformas do óxido nítrico como mediadoras de numerosos sintomas de dor crônica (LABUDA et al., 2006; KUBOYAMA et al., 2011), Gou; Leanez, Pol (2014) evidenciaram que na ausência de inflamação ou dano tecidual, o efeito antinociceptivo produzido pela morfina bem como as respostas à nocicepção térmica aguda não são mediadas pela via do óxido nítrico. Desta maneira, os achados referentes ao aumento no número de neurônios nNOS imunorreativos no hipocampo induzido pelos estressores crônicos parecem estar envolvidos com a resposta do comportamento do tipo ansioso e não à resposta nociceptiva.

O teste de labirinto em cruz elevado revelou neste estudo aumento na resposta ansiosa devido ao estresse crônico causado pelo isolamento social (SKELLY et al., 2015; LIN et al.,

2017), assim como pelo estresse crônico variado (ZURITA et al., 2000; MASLOVA; BULYGINA; MARKEL, 2002; ORTOLANI et al., 2014) estando então de acordo com os achados da literatura. Frente à resposta comportamental induzida pelos estressores crônicos apresentada no presente estudo, avaliou-se por meio da imunorreatividade da óxido nítrico sintase neuronal áreas relacionadas à resposta defensiva que revelou aumento no número de neurônios nNOS imunorreativos no hipocampo, mas não no núcleo central da amígdala e na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal.

Em áreas relacionadas ao comportamento defensivo no encéfalo, é possível que o óxido nítrico seja importante regulador da ansiedade (TOMIGA et al., 2016). Apesar das crescentes pesquisas visando compreender o papel do óxido nítrico nestas regiões encefálicas reforçarem o envolvimento desta molécula nas respostas ansiosas desencadeadas pelo estresse (GUIMARAES et al., 2005; VILA-VERDE et al., 2016), há dificuldade em se determinar o papel fisiológico do óxido nítrico, devido a alta solubilidade e curto tempo de meia vida (CAMPOS et al., 2013). Estudos com ratos diabéticos que exibiram resposta ansiogênica pronunciada apresentaram níveis aumentados de nNOS em áreas como amígdala, hipocampo e região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal rostral (SIBA et al., 2017). Esses autores mostraram ainda que o pré-tratamento de ratos diabético com L-Arginina (L-Arg; precursor da síntese de óxido nítrico) e 7-nitroindazole (7-NI; inibidor seletivo da nNOS) induziram comportamento do tipo ansiogênico e ansiolítico, respectivamente, tanto no teste do labirinto em cruz elevado quanto no teste de claro/escuro (SIBA et al., 2017). Também a administração local do outro inibidor seletivo da nNOS (N-propil-L-arginina; NPLA) na porção pré-límbica do córtex pré-frontal ventromedial atenuou o efeito do tipo ansiogênico observado 24 horas após um único episódio de estresse por restrição física (VILA-VERDE et al., 2016). Diante dessas evidências ativação do óxido nítrico nas áreas encefálicas relacionadas às respostas defensivas pressupõe-se que estímulos ameaçadores recrutem a participação de neurônios contendo óxido nítrico sintase (GUIMARAES et al., 2005). Apesar disso, o papel desempenhado pela nNOS na fisiopatologia do comportamento do tipo ansioso sob condições estressoras não é consenso (AMIRI et al., 2015). Para Amiri et al. (2015) a administração de 25 mg/Kg de 7-NI reduziu os níveis de óxido nítrico no hipocampo, mas não alterou o comportamento do tipo ansioso em camundongos isolados cronicamente, entretanto, tal achado pode ser devido à dose utilizada no estudo, uma vez que Volke et al. (1997) demonstraram que as propriedades ansiolíticas deste inibidor são dose dependentes, sendo a dose mínima efetiva para camundongos entre 80-120 mg/Kg. Ainda, corroborado pelo presente estudo, Campos et al. (2013) apresentaram que o modelo de transtorno de estresse

pós traumático, um transtorno severo de ansiedade, não aumentou a expressão de nNOS a longo prazo nos núcleos central da amígdala e região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal, diferentemente dos estudos de De Oliveira et al. (2000); Guimaraes et al. (2005); Gadek-Michalska et al. (2012). Entretanto, alterações no sistema nitrérgico foram reveladas em outras áreas relacionadas ao comportamento defensivo como córtex pré-frontal medial e núcleo basolateral da amígdala que foram associados às mudanças comportamentais induzidas pela exposição ao predador (CAMPOS et al., 2013). Assim, as diferenças metodológicas como intervalo entre teste e análise tecidual, o estressor empregado e a duração da exposição ao estressor podem ser fatores que interferem na presença de NO nessas áreas relacionadas ao comportamento defensivo. Diante do exposto, o aumento de neurônios nNOS imunorreativos no hipocampo, mas não no núcleo central da amígdala e substância cinzenta periaquedutal sugerem diferenças encontradas no controle neural da ansiedade, que podem ser controladas por ativação de diferentes sub-populações de receptores, os quais ativam regiões particulares dentro do sistema límbico, de modo análogo à organização do sistema sensorimotor (MENARD; TREIT, 1999).

Uma vez que o óxido nítrico parece desempenhar um papel importante na regulação do comportamento do tipo ansioso nos modelos estressores crônicos propostos no presente estudo, e que o enriquecimento ambiental mostrou-se benéfico na redução deste comportamento, o presente estudo procurou investigar se o efeito ansiolítico induzido pelo enriquecimento ambiental acarreta em alteração na imunorreatividade do nNOS nas áreas encefálicas estudadas relacionadas ao comportamento defensivo.

Notou-se neste estudo que o enriquecimento ambiental reverteu o número de neurônios nNOS imunorreativos no hipocampo de ratos submetidos ao estresse crônico por isolamento social, mas não naqueles submetidos ao estresse crônico variado. Reforçado o efeito benéfico do enriquecimento ambiental, tal fator é considerado como protetor e terapêutico em diferentes situações estressoras e no comportamento do tipo ansioso (FOX; MERALI; HARRISON, 2006; GRIPPO et al., 2014; NOBRE, 2016; NOVAES et al., 2017). Poucos trabalhos investigaram a participação da nNOS para avaliar o efeito do enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo ansioso. No entanto, microinjeção de inibidores da nNOS ou de um doador de óxido nítrico, em regiões encefálicas relacionadas às reações de defesa, induz respectivamente, comportamento do tipo ansiolítico e a reação de fuga, que suportam a participação do óxido nítrico no comportamento do tipo ansioso (para revisão, ver Guimaraes et al., 2005). Dentre os trabalhos encontrados envolvendo enriquecimento ambiental e nNOS,

(TOMIGA et al., 2016) revelaram melhora do comportamento ansioso em camundongos idosos induzido pelo enriquecimento ambiental e redução da expressão de nNOS no hipocampo (embora não significativa) e cerebelo, reforçando a ideia da participação da nNOS na regulação do comportamento do tipo ansioso e do enriquecimento ambiental como ferramenta terapêutica na prevenção da ansiedade pela atuação da via nNOS/NO. Outro estudo revela que o estresse crônico moderado aumenta a associação entre nNOS-CAPON (domínio PDZ ligante carboxiterminal) e induz comportamento do tipo ansioso, e estas situações são revertidas e prevenidas pela superexpressão de CAPON-125C, mas não altera a expressão de nNOS, sugerindo a importância da ligação do nNOS ao CAPON na indução do comportamento do tipo ansioso, o que pode ser uma possível explicação para os resultados conflitantes a cerca da expressão de nNOS nas áreas encefálicas relacionadas ao comportamento defensivo e comportamento do tipo ansioso avaliados ZHU et al. (2014). A possibilidade da participação da ligação entre nNOS e seu CAPON como alvo para o desenvolvimento de drogas ansiolíticas reforça a importância do estudo da nNOS (ZHU et al., 2014). Entretanto, é válido ressaltar que os mecanismos pelos quais o nNOS regula o comportamento do tipo ansioso permanecem incertos e o envolvimento de outras moléculas de sinalização no comportamento ansiolítico induzido pelo enriquecimento ambiental não podem ser descartados (RAVENELLE et al., 2014; NOVAES et al., 2017).

6 Conclusão

6. CONCLUSÃO

Fundamentado nos resultados obtidos neste estudo podem ser sumarizadas as seguintes conclusões:

1. O enriquecimento ambiental promoveu menor ganho de peso corporal nos grupos de ratos criados nesta condição, independente se submetidos ao estresse crônico por isolamento social ou não, entretanto, nos grupos de ratos submetidos ao estresse crônico variado tal alteração não foi observada.
2. O estresse por isolamento social promoveu efeito do tipo ansiogênico observado pela diminuição na porcentagem de tempo nos braços abertos, na frequência de entrada nos braços abertos, na exploração da extremidade dos braços abertos e na frequência de mergulho de cabeça. O enriquecimento ambiental *per se* promoveu efeito do tipo ansiolítico observado pelo aumento na porcentagem de tempo nos braços abertos e na frequência de entrada nos braços abertos e na exploração da extremidade dos braços abertos, nos ratos em isolamento.
3. O estresse crônico variado promoveu efeito do tipo ansiogênico observado pela diminuição na porcentagem de tempo nos braços abertos e na frequência de mergulho de cabeça. O enriquecimento ambiental promoveu efeito do tipo ansiolítico observado pelo aumento na frequência de entrada nos braços abertos e na exploração da extremidade dos braços abertos. Ainda, o enriquecimento ambiental aumentou a locomoção avaliada pela frequência de entrada nos braços fechados, nos ratos criados neste ambiente, independente se submetido ao estresse crônico variado ou não.
4. O estresse por isolamento social, o estresse crônico variado e o enriquecimento ambiental não alteraram a sensibilidade nociceptiva dos diferentes grupos analisados por meio do teste da placa quente.
5. O estresse por isolamento social aumentou o número de neurônios imunorreativos à nNOS na região de CA2 do hipocampo, independente se criados em ambiente enriquecido e não enriquecido. Ainda, o aumento observado no número de neurônios imunorreativos na área hipocampal CA3 nos ratos isolados socialmente criados em ambiente padrão foi revertido quando os ratos isolados socialmente

são criados em ambiente enriquecido. O estresse por isolamento social e o enriquecimento ambiental não alteraram o número de neurônios imunorreativos à nNOS no núcleo central da amígdala e substância periaquedutal dorsolateral.

6. O estresse crônico variado aumentou o número de neurônios imunorreativos à nNOS na região de CA3 do hipocampo, independente se criados em ambiente enriquecido e não enriquecido. O estresse crônico variado e o enriquecimento ambiental não alteraram o número de neurônios imunorreativos à nNOS no núcleo central da amígdala e substância periaquedutal dorsolateral.

Deste modo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a formação hipocampal desempenha importante função no efeito ansiogênico exercido pelos diferentes tipos de estressores crônicos (aqui representados pelo isolamento social e pelo estresse crônico variado) provavelmente pela ativação do sistema nitrérgico e sugere-se que o enriquecimento possa atuar nesta via na prevenção do comportamento do tipo ansioso.

REFERÊNCIAS

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDAO, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **J Neurosci Methods**, v. 169, n. 1, p. 109-18, Mar 30 2008. ISSN 0165-0270 (Print)0165-0270. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.11.025> >.

ALHEID, G. F.; HEIMER, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. **Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 1-39, Oct 1988. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90217-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90217-5) >.

AMIRI, S. et al. Co-occurrence of anxiety and depressive-like behaviors following adolescent social isolation in male mice; possible role of nitrergic system. **Physiol Behav**, v. 145, p. 38-44, Jun 1 2015. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.03.032> >.

ARAKAWA, H. The effects of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. **Dev Psychobiol**, v. 43, n. 1, p. 11-9, Jul 2003. ISSN 0012-1630 (Print)0012-1630. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/dev.10120> >.

ARNAIZ, S. L. et al. Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition. **Mol Aspects Med**, v. 25, n. 1-2, p. 91-101, Feb-Apr 2004. ISSN 0098-2997 (Print)0098-2997. Disponível em: < >.

ASHOKAN, A.; HEGDE, A.; MITRA, R. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. **Psychoneuroendocrinology**, v. 69, p. 189-96, Jul 2016. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.psneuen.2016.04.009> >.

ASMUNDSON, G. J.; KATZ, J. Understanding the co-occurrence of anxiety disorders and chronic pain: state-of-the-art. **Depress Anxiety**, v. 26, n. 10, p. 888-901, 2009. ISSN 1091-4269. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/da.20600> >.

BEALE, K. E. et al. Accurate measurement of body weight and food intake in environmentally enriched male Wistar rats. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 8, p. 1715-21, Aug 2011. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2010.331> >.

BELDA, X. et al. Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. **Stress**, v. 18, n. 3, p. 269-79, 2015. ISSN 1025-3890. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10253890.2015.1067678> >.

BHAGYA, V. et al. Short-term exposure to enriched environment rescues chronic stress-induced impaired hippocampal synaptic plasticity, anxiety, and memory deficits. **J Neurosci Res**, Nov 16 2016. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.23992> >.

BLANCHARD, R. J. et al. Chronic social stress: Changes in behavioral and physiological indices of emotion. **Aggressive Behavior**, v. 24, n. 4, p. 307-321, 1998. ISSN 1098-2337. Disponível em: < [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2337\(1998\)24:4<307::AID-AB6>3.0.CO](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-2337(1998)24:4<307::AID-AB6>3.0.CO) >

BOLLES, R. C.; FANSELOW, M. S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 3, n. 2, p. 291-301, 1980.

BORTOLANZA, M. et al. Glial activation is associated with l-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 73, p. 377-87, Jan 2015. ISSN 0969-9961. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2014.10.017> >.

BOURIN, M.; HASCOET, M. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 55-65, Feb 28 2003. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999.

BOUWKNECHT, J. A.; PAYLOR, R. Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: a survey in nine mouse strains. **Behav Brain Res**, v. 136, n. 2, p. 489-501, Nov 15 2002. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328.

BRAGA, J. E. F. et al. Pathological anxiety: Neural bases and advances in psychopharmacological approach. **Revista Brasileira de Ciência da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 8, 2010. ISSN 1415-2177. Disponível em: < <http://periodicos.ufpb.br/index.php/rbcs/article/view/8207/5320> >.

BRANDAO, M. L. et al. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25 Suppl 2, p. 36-41, Dec 2003. ISSN 1516-4446.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA**. Brasília, DF, 2013.

BREDT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic Res**, v. 31, n. 6, p. 577-96, Dec 1999. ISSN 1071-5762 (Print)1029-2470. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/10715769900301161> >.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, n. 1, p. 3-11, Jan 1992. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90104-L](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90104-L) >.

BRENES, J. C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. **Behav Brain Res**, v. 197, n. 1, p. 125-37, Jan 30 2009. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.014> >.

BUTLER, R. K.; FINN, D. P. Stress-induced analgesia. **Prog Neurobiol**, v. 88, n. 3, p. 184-202, Jul 2009. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.003> >.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 35, n. 2, 2013.

CHABY, L. E. et al. Chronic unpredictable stress during adolescence causes long-term anxiety. **Behav Brain Res**, v. 278, p. 492-5, Feb 1 2015. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.003> >.

CHISHOLM, D. et al. Scaling-up treatment of depression and anxiety: a global return on investment analysis. **Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 415-24, May 2016. ISSN 2215-0366. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366\(16\)30024-4](http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366(16)30024-4) >.

CONRAD, C. D. What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? **Behav Cogn Neurosci Rev**, v. 5, n. 1, p. 41-60, Mar 2006. ISSN 1534-5823 (Print)1534-5823. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/1534582306289043> >.

COX, B. M. et al. Neurochemical, hormonal, and behavioral effects of chronic unpredictable stress in the rat. **Behav Brain Res**, v. 220, n. 1, p. 106-11, Jun 20 2011. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.038> >.

CROFTON, E. J.; ZHANG, Y.; GREEN, T. A. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 49, p. 19-31, Feb 2015. ISSN 0149-7634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.017> >.

CRUCES, J. et al. A higher anxiety state in old rats after social isolation is associated to an impairment of the immune response. **J Neuroimmunol**, v. 277, n. 1-2, p. 18-25, Dec 15 2014. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.09.011> >.

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 1, p. 171-6, Sep 1994. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057.

CUENYA, L. et al. Effects of isolation in adulthood on frustration and anxiety. **Behav Processes**, v. 90, n. 2, p. 155-60, Jun 2012. ISSN 0376-6357. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2012.01.003> >.

CUESTA, J. M.; SINGER, M. The stress response and critical illness: a review. **Crit Care Med**, v. 40, n. 12, p. 3283-9, Dec 2012. ISSN 0090-3493.

DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S.; JOELS, M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? **Trends Neurosci**, v. 22, n. 10, p. 422-6, Oct 1999. ISSN 0166-2236 (Print)0166-2236. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01438-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01438-1) >.

DE OLIVEIRA, R. M. et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. **Neurosci Lett**, v. 289, n. 2, p. 123-6, Aug 4 2000.

ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01287-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01287-8) >.

DEKEYZER, S. et al. "Unforgettable" - a pictorial essay on anatomy and pathology of the hippocampus. **Insights Imaging**, v. 8, n. 2, p. 199-212, Apr 2017. ISSN 1869-4101 (Print)1869-4101. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13244-016-0541-2> >.

ECHEVERRY, M. B.; GUIMARAES, F. S.; DEL BEL, E. A. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. **Neuroscience**, v. 125, n. 4, p. 981-93, 2004. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522.

FERDMAN, N. et al. Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. **Behav Brain Res**, v. 180, n. 2, p. 174-82, Jun 18 2007. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.011> >.

FERNANDEZ, R. A. R. et al. Metabolic and vascular pattern in medial pterygoid muscle is altered by chronic stress in an animal model of hypodontia. **Physiol Behav**, v. 185, p. 70-78, Mar 1 2018. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.12.026> >.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 09/2000 2000. ISSN 0104-4230. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302000000300012 >.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behav Brain Res**, v. 175, n. 1, p. 1-8, Nov 25 2006. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.016> >.

FRANK, M. G.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger. **Brain Behav Immun**, v. 33, p. 1-6, Oct 2013. ISSN 0889-1591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2013.02.004> >.

GABRIEL, A. F. et al. Environmental housing affects the duration of mechanical allodynia and the spinal astroglial activation in a rat model of chronic inflammatory pain. **Brain Res**, v. 1276, p. 83-90, Jun 18 2009. ISSN 0006-8993.

_____. Enriched environment and the recovery from inflammatory pain: Social versus physical aspects and their interaction. **Behav Brain Res**, v. 208, n. 1, p. 90-5, Mar 17 2010. ISSN 0166-4328.

GADEK-MICHALSKA, A. et al. Chronic social isolation in adaptation of HPA axis to heterotypic stress. **Pharmacol Rep**, v. 69, n. 6, p. 1213-1223, Dec 2017. ISSN 1734-1140 (Print)1734-1140. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2017.08.011> >.

_____. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 6, p. 1655-62, 2013. ISSN 1734-1140 (Print)1734-1140. Disponível em: < http://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2013/6_1655.pdf >.

_____. Effect of repeated restraint on homotypic stress-induced nitric oxide synthases expression in brain structures regulating HPA axis. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 6, p. 1381-90, 2012. ISSN 1734-1140 (Print)1734-1140. Disponível em: < http://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2012/6_1381.pdf >.

GAMARO, G. D. et al. The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. **Physiol Behav**, v. 63, n. 4, p. 693-7, Feb 15 1998. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking).

GAMEIRO, G. H. et al. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. **Physiol Behav**, v. 87, n. 4, p. 643-9, Apr 15 2006. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking).

GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, and others. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1545-1602, Oct 8 2016. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)31678-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)31678-6) >.

GEBHART, G. F. Descending modulation of pain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 8, p. 729-37, Jan 2004. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.008> >.

GOU, G.; LEANEZ, S.; POL, O. The role of gaseous neurotransmitters in the antinociceptive effects of morphine during acute thermal pain. **Eur J Pharmacol**, v. 737, p. 41-6, Aug 15 2014. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.05.004> >.

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Braz J Med Biol Res**, v. 14, n. 4-5, p. 239-65, Oct 1981. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879x.

_____. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 29, p. 4, 05/2007 2007. ISSN 1516-4446. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462007000500002 >.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. J. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. **Psy Neuro**, v. 3, n. 1, p. 6, 2010. ISSN 1983-3288. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/pn/v3n1/v3n1a02.pdf> >.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. 2nd Edition. Oxford: Oxford University Press, 2000. ISBN 0198522711.

GRIPPO, A. J. et al. The effects of environmental enrichment on depressive and anxiety-relevant behaviors in socially isolated prairie voles. **Psychosom Med**, v. 76, n. 4, p. 277-84,

May 2014. ISSN 0033-3174. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/psy.0000000000000052> >.

GUIMARAES, F. S. et al. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1313-22, 2005. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.026> >.

HALL, F. S. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. **Crit Rev Neurobiol**, v. 12, n. 1-2, p. 129-62, 1998. ISSN 0892-0915 (Print)0892-0915.

HARRIS, J. A.; WESTBROOK, R. F. Effects of benzodiazepine microinjection into the amygdala or periaqueductal gray on the expression of conditioned fear and hypoalgesia in rats. **Behav Neurosci**, v. 109, n. 2, p. 295-304, Apr 1995. ISSN 0735-7044 (Print)0735-7044. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.109.2.295> >.

HELLEMANS, K. G.; BENGE, L. C.; OLMSTEAD, M. C. Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 150, n. 2, p. 103-15, Jun 21 2004. ISSN 0165-3806 (Print)0165-3806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.03.003> >.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 78-84, Feb 1997. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236.

HOLLIS, F.; ISGOR, C.; KABBAJ, M. The consequences of adolescent chronic unpredictable stress exposure on brain and behavior. **Neuroscience**, v. 249, p. 232-41, Sep 26 2013. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.018> >.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. Part III: Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. In: BOGDUK, H. M. A. N. (Ed.). Classification of chronic pain, second edition. Seattle: IASP Press, 2011. p.209-214.

IDE, S. et al. Amelioration of the reduced antinociceptive effect of morphine in the unpredictable chronic mild stress model mice by noradrenalin but not serotonin reuptake inhibitors. **Mol Pain**, v. 11, p. 47, Aug 11 2015. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12990-015-0051-0> >.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 284-92, Jan 15 2015. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature14188> >.

JENNINGS, E. M. et al. Stress-induced hyperalgesia. **Prog Neurobiol**, v. 121, p. 1-18, Oct 2014. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.06.003> >.

JIMENEZ-VELAZQUEZ, G.; LOPEZ-MUNOZ, F. J.; FERNANDEZ-GUASTI, A. Parallel anxiolytic-like and antinociceptive actions of diazepam in the anterior basolateral amygdala

and dorsal periaqueductal gray. **Brain Res**, v. 1349, p. 11-20, Aug 19 2010. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.014> >.

JOCA, S. R.; FERREIRA, F. R.; GUIMARAES, F. S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. **Stress**, v. 10, n. 3, p. 227-49, Aug 2007. ISSN 1025-3890 (Print)1025-3890. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10253890701223130> >.

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 669-78, Dec 2001. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00049-5) >.

KIM, J. J.; YOON, K. S. Stress: metaplastic effects in the hippocampus. **Trends Neurosci**, v. 21, n. 12, p. 505-9, Dec 1998. ISSN 0166-2236 (Print)0166-2236. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01322-8](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01322-8) >.

KIMURA, L. F.; MATTARAIA, V. G. M.; PICOLO, G. Distinct environmental enrichment protocols reduce anxiety but differentially modulate pain sensitivity in rats. **Behav Brain Res**, Nov 11 2017. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.012> >.

KISHIMOTO, J. et al. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. **Brain Res**, v. 720, n. 1-2, p. 159-71, May 13 1996. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00101-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(96)00101-1) >.

KOKARE, D. M. et al. Involvement of alpha-MSH in the social isolation induced anxiety- and depression-like behaviors in rat. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 7, p. 1009-18, Jun 2010. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.01.006> >.

KONKLE, A. T. et al. Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 49, n. 4, p. 427-36, Jul 2010. ISSN 1559-6109 (Print)1559-6109. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919182/> >.

KUBOYAMA, K. et al. Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. **Mol Pain**, v. 7, p. 50, Jul 14 2011. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-7-50> >.

LABUDA, C. J. et al. Antinociceptive activity of the selective iNOS inhibitor AR-C102222 in rodent models of inflammatory, neuropathic and post-operative pain. **Eur J Pain**, v. 10, n. 6, p. 505-12, Aug 2006. ISSN 1090-3801 (Print)1090-3801. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.07.004> >.

LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 73, n. 1, p. 193-207, Aug 2002. ISSN 0091-3057 (Print)0091-3057. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00782-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00782-7) >.

LIN, S. et al. Social Isolation During Adolescence Induces Anxiety Behaviors and Enhances Firing Activity in BLA Pyramidal Neurons via mGluR5 Upregulation. **Mol Neurobiol**, Sep 15 2017. ISSN 0893-7648. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-017-0766-1> >.

LUKES, J. L. et al. Post-weaning social isolation of female rats, anxiety-related behavior, and serotonergic systems. **Brain Res**, v. 1443, p. 1-17, Mar 14 2012. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.01.005> >.

_____. Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. **Horm Behav**, v. 55, n. 1, p. 248-56, Jan 2009. ISSN 0018-506x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.10.014> >.

MARTINEZ, R. C. et al. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience**, v. 172, p. 314-28, Jan 13 2011. ISSN 0306-4522.

MASLOVA, L. N.; BULYGINA, V. V.; MARKEL, A. L. Chronic stress during prepubertal development: immediate and long-lasting effects on arterial blood pressure and anxiety-related behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 5, p. 549-61, Jul 2002. ISSN 0306-4530 (Print)0306-4530. Disponível em: < [http://www.psyneuen-journal.com/article/S0306-4530\(01\)00092-0/pdf](http://www.psyneuen-journal.com/article/S0306-4530(01)00092-0/pdf) >.

MATTHEWS, G. A. et al. Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 617-31, Feb 11 2016. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.040> >.

MATTSON, M. P. et al. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. **Mech Ageing Dev**, v. 122, n. 7, p. 757-78, May 31 2001. ISSN 0047-6374 (Print)0047-6374. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00226-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00226-3) >.

MCCORMICK, C. M.; GREEN, M. R. From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: investigations in rodent models. **Neuroscience**, v. 249, p. 242-57, Sep 26 2013. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.063> >.

MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Prog Neurobiol**, v. 55, n. 3, p. 257-332, Jun 1998. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00003-3) >.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Res**, v. 886, n. 1-2, p. 172-189, Dec 15 2000. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02950-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02950-4) >.

_____. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. **Ann N Y Acad Sci**, v. 933, p. 265-77, Mar 2001. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05830.x/epdf> >.

_____. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 2-3, p. 174-

85, Apr 7 2008. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.071> >.

_____. Brain on stress: how the social environment gets under the skin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109 Suppl 2, p. 17180-5, Oct 16 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1121254109> >.

MCEWEN, B. S. et al. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 3-12, Jan 2012. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.014> >.

MCEWEN, B. S.; GRAY, J.; NASCA, C. Recognizing Resilience: Learning from the Effects of Stress on the Brain. **Neurobiol Stress**, v. 1, p. 1-11, Jan 1 2015. ISSN 2352-2895 (Print)2352-2895. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.09.001> >.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 285-305, May 2004. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634.

MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 4, p. 591-613, Mar 1999. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(98\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(98)00056-6) >.

MENG, Q. et al. Peri-adolescence isolation rearing alters social behavior and nociception in rats. **Neurosci Lett**, v. 480, n. 1, p. 25-9, Aug 9 2010. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.05.067> >.

MESA-GRESA, P.; RAMOS-CAMPOS, M.; REDOLAT, R. Corticosterone levels and behavioral changes induced by simultaneous exposure to chronic social stress and enriched environments in NMRI male mice. **Physiol Behav**, v. 158, p. 6-17, May 1 2016. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.027> >.

MITRA, R. et al. Chronic-stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats. **Neurosci Lett**, v. 383, n. 3, p. 278-83, Aug 5 2005. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2005.04.037> >.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, n. 27, p. 2002-12, Dec 30 1993. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199312303292706> >.

MONCEK, F. et al. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. **J Neuroendocrinol**, v. 16, n. 5, p. 423-31, May 2004. ISSN 0953-8194 (Print)0953-8194. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01173.x> >.

MOSAFERI, B. et al. Post-weaning environmental enrichment improves BDNF response of adult male rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 46, p. 108-14, Nov 2015. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.07.008> >.

MUTHURAJU, S.; TALBOT, T.; BRANDAO, M. L. Dopamine D2 receptors regulate unconditioned fear in deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behav Brain Res**, v. 297, p. 116-23, Jan 15 2016. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.005> >.

MYERS, B.; MCKLVEEN, J. M.; HERMAN, J. P. Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback. **Cell Mol Neurobiol**, Feb 1 2012. ISSN 0272-4340. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-012-9801-y> >.

NEUGEBAUER, V. Amygdala pain mechanisms. **Handb Exp Pharmacol**, v. 227, p. 261-84, 2015. ISSN 0171-2004 (Print)0171-2004. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2_13 >.

NEUGEBAUER, V. et al. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist**, v. 10, n. 3, p. 221-34, Jun 2004. ISSN 1073-8584 (Print)1073-8584. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/1073858403261077> >.

NOBRE, M. J. Environmental enrichment may protect against neural and behavioural damage caused by withdrawal from chronic alcohol intake. **Int J Dev Neurosci**, v. 55, p. 15-27, Dec 2016. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.09.003> >.

NOVAES, L. S. et al. Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. **Neuropharmacology**, v. 113, n. Pt A, p. 457-466, Feb 2017. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.026> >.

OLANGO, W. M.; FINN, D. P. Neurobiology of stress-induced hyperalgesia. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 20, p. 251-80, 2014. ISSN 1866-3370 (Print)1866-3370. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/7854_2014_302 >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. Geneva 2017.

ORTIZ, J. et al. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 6, p. 443-52, Jun 1996. ISSN 0893-133X (Print)0893-133x. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0893-133x\(95\)00152-4](http://dx.doi.org/10.1016/0893-133x(95)00152-4) >.

ORTOLANI, D. et al. Stress-induced endocrine response and anxiety: the effects of comfort food in rats. **Stress**, v. 17, n. 3, p. 211-8, May 2014. ISSN 1025-3890. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10253890.2014.898059> >.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates**. Academic Press, Incorporated, 1998. ISBN 9780125476195. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=2hp5QgAACAAJ> >.

PAXINOS, G. et al. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. **J Neurosci Methods**, v. 13, n. 2, p. 139-43, Apr 1985. ISSN 0165-0270 (Print)0165-0270. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90026-3) >.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985. ISSN 0165-0270 (Print) 0165-0270.

PINTO-RIBEIRO, F. et al. Chronic unpredictable stress inhibits nociception in male rats. **Neurosci Lett**, v. 359, n. 1-2, p. 73-6, Apr 8 2004. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940.

PLOGHAUS, A. et al. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. **J Neurosci**, v. 21, n. 24, p. 9896-903, Dec 15 2001. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://www.jneurosci.org/content/21/24/9896.long> >.

PRITCHARD, L. M.; VAN KEMPEN, T. A.; ZIMMERBERG, B. Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. **Neurosci Lett**, v. 536, p. 47-51, Mar 1 2013. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.12.048> >.

RAVENELLE, R. et al. Housing environment modulates physiological and behavioral responses to anxiogenic stimuli in trait anxiety male rats. **Neuroscience**, v. 270, p. 76-87, Jun 13 2014. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.03.060> >.

RIGOLI, F. et al. Threat visibility modulates the defensive brain circuit underlying fear and anxiety. **Neuroscience Letters**, v. 612, p. 7-13, Jan 26 2016. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.11.026> >.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 2, p. 297-303, Oct 1995. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00138-M](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00138-M) >.

ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behav Brain Res**, v. 78, n. 1, p. 57-65, Jun 1996. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328.

ROSENZWEIG, M. R. et al. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. **Brain Res**, v. 153, n. 3, p. 563-76, Sep 29 1978. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90340-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90340-2) >.

ROY, M. et al. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. In: (Ed.). **Proc Natl Acad Sci U S A**. United States, v.106, 2009. p.20900-5. ISBN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking).

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 803-34, Jul 2003. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00002.2003> >.

SAITO, V. M.; BRANDAO, M. L. The benzodiazepine midazolam acts on the expression of the defensive behavior, but not on the processing of aversive information, produced by exposure to the elevated plus maze and electrical stimulations applied to the inferior colliculus of rats. **Neuropharmacology**, v. 88, p. 180-6, Jan 2015. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.07.018> >.

SELYE, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 32, 1936-07-04 1936. ISSN 1476-4687/1476-4687. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/138032a0> >.

SHETTY, R. A.; SADANANDA, M. Immediate and delayed anxiety- and depression-like profiles in the adolescent Wistar-Kyoto rat model of endogenous depression following postweaning social isolation. **Behav Brain Res**, v. 320, p. 323-332, Mar 1 2017. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.12.030> >.

SHI, M. et al. Increased thermal and mechanical nociceptive thresholds in rats with depressive-like behaviors. **Brain Res**, v. 1353, p. 225-33, Sep 24 2010. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.023> >.

SHI, M.; WANG, J. Y.; LUO, F. Depression shows divergent effects on evoked and spontaneous pain behaviors in rats. **J Pain**, v. 11, n. 3, p. 219-29, Mar 2010. ISSN 1526-5900. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2009.07.002> >.

SIBA, I. P. et al. Fish oil prevents rodent anxious states comorbid with diabetes: A putative involvement of nitric oxide modulation. **Behav Brain Res**, v. 326, p. 173-186, May 30 2017. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.008> >.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. **Behav Brain Res**, v. 222, n. 1, p. 246-64, Sep 12 2011. ISSN 0166-4328.

SKELLY, M. J. et al. Adolescent social isolation increases anxiety-like behavior and ethanol intake and impairs fear extinction in adulthood: Possible role of disrupted noradrenergic signaling. **Neuropharmacology**, v. 97, p. 149-59, Oct 2015. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.025> >.

TALL, J. M. Housing supplementation decreases the magnitude of inflammation-induced nociception in rats. **Behav Brain Res**, v. 197, n. 1, p. 230-3, Jan 30 2009. ISSN 0166-4328.

TANTI, A. et al. Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 3, p. 374-84, Sep 2012. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.022> >.

THORSELL, A. et al. The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 1, p. 28-34, Jan 2006. ISSN 0091-3057 (Print)0091-3057. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2005.12.005> >.

TOMIGA, Y. et al. Effects of environmental enrichment in aged mice on anxiety-like behaviors and neuronal nitric oxide synthase expression in the brain. **Biochem Biophys Res**

Commun, v. 476, n. 4, p. 635-640, Aug 5 2016. ISSN 0006-291x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.010> >.

TOTTENHAM, N.; SHERIDAN, M. A. A review of adversity, the amygdala and the hippocampus: a consideration of developmental timing. **Front Hum Neurosci**, v. 3, p. 68, 2009. ISSN 1662-5161. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/neuro.09.068.2009> >.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LUTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nat Rev Neurosci**, v. 16, n. 6, p. 317-31, Jun 2015. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3945> >.

ULRICH, R. S. View through a window may influence recovery from surgery. **Science**, v. 224, n. 4647, p. 420-1, Apr 27 1984. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397-409, Jun 2009. ISSN 1471-003x.

VACHON-PRESSEAU, E. Effects of stress on the corticolimbic system: implications for chronic pain. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, Oct 25 2017. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.10.014> >.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat Rev Neurosci**, v. 1, n. 3, p. 191-8, Dec 2000. ISSN 1471-003X (Print)1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35044558> >.

VIANNA, D. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDAO, M. L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 711-9, Dec 2001. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00052-5) >.

VILA-VERDE, C. et al. Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 320, p. 30-42, Apr 21 2016. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.040> >.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p. 755-84, 1992. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90184-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90184-4) >.

VOLKE, V. et al. 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 131, n. 4, p. 399-405, Jun 1997. ISSN 0033-3158 (Print)0033-3158. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s002130050309> >.

VYAS, A. et al. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. **J Neurosci**, v. 22, n. 15, p. 6810-8, Aug 1 2002. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/20026655> >.

VYAS, A.; PILLAI, A. G.; CHATTARJI, S. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. **Neuroscience**, v. 128, n. 4, p. 667-73, 2004. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522.

WANG, N. et al. Brain-network mechanisms underlying the divergent effects of depression on spontaneous versus evoked pain in rats: a multiple single-unit study. **Exp Neurol**, v. 250, p. 165-75, Dec 2013. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.09.021> >.

WILLIAMS, B. M. et al. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. **Physiol Behav**, v. 73, n. 4, p. 649-58, Jul 2001. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. In: (Ed.). **Neuropsychobiology**. Switzerland, v.52, 2005. p.90-110. ISBN 0302-282X (Print)0302-282X (Linking).

WORKMAN, J. L. et al. Post-weaning environmental enrichment alters affective responses and interacts with behavioral testing to alter nNOS immunoreactivity. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 1, p. 25-32, Nov 2011. ISSN 0091-3057.

ZAIAS, J. et al. Social and physical environmental enrichment differentially affect growth and activity of preadolescent and adolescent male rats. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 47, n. 2, p. 30-4, Mar 2008. ISSN 1559-6109 (Print)1559-6109. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2653998/> >.

ZANGROSSI, H., JR.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Res Bull**, v. 44, n. 1, p. 1-5, 1997. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230.

ZEENI, N. et al. Environmental enrichment and cafeteria diet attenuate the response to chronic variable stress in rats. **Physiol Behav**, v. 139, p. 41-9, Feb 2015. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.003> >.

ZHOU, L.; ZHU, D. Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide**, v. 20, n. 4, p. 223-30, Jun 2009. ISSN 1089-8603. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2009.03.001> >.

ZHU, L. J. et al. CAPON-nNOS coupling can serve as a target for developing new anxiolytics. **Nat Med**, v. 20, n. 9, p. 1050-4, Sep 2014. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3644> >.

ZURITA, A. et al. Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. **Behav Brain Res**, v. 117, n. 1-2, p. 163-71, Dec 20 2000. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00302-8](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00302-8) >.

ANEXO I

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o Protocolo nº 2014.1.380.58.5 sobre a pesquisa intitulada **“Avaliação dos efeitos do estresse crônico sob a ansiedade e a sensibilidade nociceptiva em ratos mantidos em ambiente enriquecido”**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, foi APROVADO em reunião da CEUA de 15/07/2014 (totalizando 432 animais).

We hereby certify that the protocol nº 2014.1.380.58.5 regarding the research entitled **“Evaluation of the effects of chronic stress on anxiety and nociceptive sensitivity in rats maintained in enriched environment”**, under the responsibility of Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi, is in accordance with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 15/07/2014 (totalizing 432 animals).

Ribeirão Preto, 15 de julho de 2014.

Profa. Dra. Andiara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP