



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
DOUTORADO EM FARMACOLOGIA**



NÍVEA KARLA DE GUSMÃO TAVEIROS SILVA

Enriquecimento ambiental concomitante ao estresse crônico imprevisível induz comportamento tipo-ansioso e diminui a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex pré-frontal de camundongos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosana Camarini

São Paulo

2021

NÍVEA KARLA DE GUSMÃO TAVEIROS SILVA

Enriquecimento ambiental concomitante ao estresse crônico imprevisível induz comportamento tipo-ansioso e diminui a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex pré-frontal de camundongos

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade de São Paulo, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Camarini

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Gusmão Taveiros Silva, Nivea Karla
Enriquecimento ambiental concomitante ao
estresse crônico imprevisível induz comportamento
tipo-ansioso e diminui a expressão do fator
neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex pré-
frontal de camundongos / Nivea Karla de Gusmão
Taveiros Silva; orientadora Rosana Camarini. -- São
Paulo, 2021.
83 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Enriquecimento ambiental. 2. Estresse. 3.
BDNF. 4. Epigenética. 5. Ansiedade. I. Camarini,
Rosana, orientador. II. Título.

DECLARAÇÃO

DECLARO que, o(a) Senhor(a) **NÍVEA KARLA DE GUSMÃO TAVEIROS SILVA** defendeu o título de **DOUTOR EM CIÊNCIAS**, Área de **FARMACOLOGIA** tendo sido *aprovado(a)* em prova pública da Defesa de Tese de Doutorado realizada no 11 de fevereiro de 2021 e que oportunamente, será homologada pela Comissão de Pós-Graduação. O trabalho apresentado tem como título: **“Enriquecimento ambiental concomitante ao estresse crônico imprevisível induz comportamento tipo-ansioso e diminui a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex pré-frontal de camundongos”**. A Comissão Julgadora foi constituída pelos seguintes docentes: Profs. Drs. **Titular: EDUARDO ARY VILLELA MARINHO**, **Titular: VÂNIA D’ALMEIDA**, **Titular: LEONARDO SANTANA NOVAES** e **Orientadora: ROSANA CAMARINI**.

São Paulo, 11 de fevereiro de 2021.


Profa. Dra. **MARIA LUIZA MORAIS BARRETO DE CHAVES**
Presidente CPG / ICB

*“Fé é confiança no que quer que se invista
Tem fé o ateu, tem fé o cientista” (Braza)*

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meus pais, Nilka e Marcos, por serem meus maiores exemplos de dignidade e caráter. Muito obrigada por fazerem tudo pela minha felicidade e por sempre demonstrarem orgulho de mim. Agradeço por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia e por toda compreensão, conselhos e dedicação.

Aos meus irmãos, Marcos, Valentina e Luiza pelas demonstrações de carinho e momentos de diversão.

Ao Leandro, por confiar na minha capacidade, me apoiar em todas as decisões e ser super paciente e compreensivo. Obrigada por compartilhar meus sorrisos, enxugar minhas lágrimas, me dar os melhores conselhos e caminhar ao meu lado. Você é meu ponto de equilíbrio, minha voz da razão.

À Prof.^a Dr.^a Rosana Camarini, por ter aberto as portas e me acolhido no seu laboratório, me orientando como cientista e pessoa.

Ao Dr. Alexis Bailey, por me receber em seu laboratório na *St. George's University of London*, com bastante disposição, e simpatia; sempre disposto a ensinar, discutir resultados e dar boas risadas.

À Dr.^a Priti Chivers, por me receber na *University of Surrey* e colaborar com a minha formação durante o doutorado sanduíche e me ensinar diversas técnicas.

Aos meus amigos de laboratório, especialmente Gabriel, Marina, Veridiana, Priscila, Mariana e Ariádne, que tornaram o dia a dia mais leve e me ajudaram com experimentos, discussões, risadas e rolês. Com vocês não tem feriado, final de semana ou tempo ruim pra trabalhar.

Aos amigos especiais que fiz durante o doutorado sanduíche e que carrego com muito carinho e boas lembranças: Giorgia, Felix, Marcos, Renan, Leonardo, Carol, Raissa, Helen.

À minha corja da graduação: Alex, Amanda, Isa, Bruno e Pedro, que sempre me apoiaram, apesar da distância e cobranças da vida adulta. Estamos sempre juntos.

Às minhas amigas de Maceió: Amanda, Mariah, Marcela e Nanda, que são fontes de inspiração pra mim. Não importa o quesito (ciência, maternidade, família, amizade), vocês são exemplos de empatia e dedicação. Me inspiro demais em mulheres como vocês!

Ao fôlei ICBIÓ, que é cheio de mulheres empoderadas, maravilhosas e super competentes em todos os aspectos.

Aos amigos do CEPE, que reacenderam minha paixão pelo voleibol. Obrigada, principalmente ao Du, pelas conversas, conselhos, risadas e comidas; afinal nunca foi só um esporte.

À uma amiga que conheci por causa do voleibol, mas que virou minha família no Reino Unido. Jana (ou Cobrinha, como eu prefiro), contigo eu compartilhei todos os bons e maus momentos da viagem, fosse por telefone ou pessoalmente. A maioria das boas memórias que eu tenho envolvem você. Muito obrigada por ter sido a “minha pessoa” e por todas as lembranças que construímos juntas.

Aos demais amigos, do Brasil e do mundo, que fiz ao longo da minha formação pessoal e profissional. De alguma maneira, vocês contribuíram para eu trilhar o ciclo que hoje estou finalizando. Obrigada por acreditarem em mim e me darem forças para correr atrás dos meus sonhos.

À banca examinadora pelas sugestões e colocações, sempre agregando ao trabalho.

Aos animais utilizados, dedico meu respeito e agradecimento, pois sem eles nada seria possível. Eles foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À USP, ao Instituto de Ciências Biomédicas, aos professores e funcionários, especialmente à Mônica, um exemplo de competência em todos os aspectos.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Obrigada de coração a todos que fizeram parte destes anos tão importantes da minha vida. Cada um de vocês foi fundamental para meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

SILVA, Nívea Karla de Gusmão Taveiros. **Enriquecimento ambiental concomitante ao estresse crônico imprevisível induz comportamento tipo-ansioso e diminui a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex pré-frontal de camundongos.** Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O enriquecimento ambiental (EA) é um paradigma experimental complexo que fornece estímulos como exercício, novidade, atividade exploratória e contato social. Por promover neurogênese, o EA tem sido apontado como protetor mediante situações de injúrias, como no estresse, uma vez que estímulos estressores podem deflagrar processos neurodegenerativos e acarretar danos neuronais. Devido ao impacto decorrente do estresse em transtornos como ansiedade, o envolvimento de fatores neurotróficos como o BDNF tem sido amplamente estudado. Além da regulação dependente de estímulos, a transcrição de BDNF também parece sofrer regulação epigenética. Diante disto, o presente trabalho avaliou os efeitos do EA sobre o comportamento tipo-ansioso, parâmetros bioquímicos e expressão gênica de *Bdnf* no córtex pré-frontal (CPF) de camundongos *Swiss* machos expostos ao estresse crônico imprevisível (ECI), levando em conta o envolvimento de modificações epigenéticas. O grupo exposto ao EA e submetido ao ECI (EA-ECI) exibiu comportamento tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado. Esse comportamento foi revertido após o pré-tratamento com um inibidor de metilação do DNA (5-azacitidina). Na análise da corticosterona, apenas o grupo enriquecido não estressado (EA-NS) apresentou aumento nas concentrações plasmáticas. Embora o EA *per se* tenha promovido maior expressão do RNAm do éxon IX, considerado o éxon codificante do gene, o grupo EA-ECI apresentou redução na expressão gênica dos éxons I, II, IV, VI e IX do *Bdnf* no CPF. Em relação à epigenética, as três sequências analisadas para metilação do DNA de *Bdnf* no respectivo éxon não mostraram diferenças significativas na porcentagem de metilação do DNA nas ilhas CpG investigadas. Em suma, o presente estudo mostrou evidências de que o EA concomitante ao ECI desencadeia comportamento tipo-ansioso, o qual é revertido por um pré-tratamento com inibidor de metilação do DNA. Isso é acompanhado por uma redução marcante da expressão de *Bdnf* no CPF, sem afetar a metilação do DNA do éxon IX do gene. Juntos, esses achados auxiliam a compreensão da base molecular da complexa interação entre estresse e ambiente no comportamento, o que pode ter implicações no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento de transtornos relacionadas ao estresse.

Palavras-chave: Enriquecimento ambiental; estresse crônico imprevisível; epigenética.

ABSTRACT

SILVA, Nívea Karla de Gusmão Taveiros. **Environmental enrichment concomitant with chronic unpredictable stress induces anxiety-like behavior and decreases the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mice prefrontal cortex.** Thesis (PhD in Sciences) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Environmental enrichment (EE) is a complex experimental paradigm that provides stimuli such as exercise, novelty, exploratory activity and social contact. As it promotes neurogenesis, EE has been identified as a protective agent against injury situations, such as stress, since stressful stimuli can trigger neurodegenerative processes and cause neuronal damage. Due to the impact of stress on disorders such as anxiety, the involvement of neurotrophic factors such as BDNF has been widely studied. In addition to stimulus-dependent regulation, BDNF transcription also appears to undergo epigenetic regulation. In view of this, the present study evaluated the effects of EE on anxiety-like behavior, biochemical parameters and *Bdnf* gene expression in the prefrontal cortex (PFC) of Swiss male mice exposed to chronic unpredictable stress (CUS), taking into account the involvement of epigenetic changes. The group exposed to EE and submitted to CUS (EE-CUS) exhibited anxiety-like behavior in the elevated plus-maze. This behavior was reversed after pretreatment with a DNA methylation inhibitor (5-azacytidine). In corticosterone analysis, only the enriched and non-stressed group (EE-NS) showed an increase in plasma concentrations. Although EE *per se* had promoted greater expression of exon IX, considered the exon encoding the gene, the EE-CUS group showed a reduction in the gene expression of exons I, II, IV, VI and IX of *Bdnf* in the PFC. Regarding epigenetics, the three sequences analyzed for *Bdnf* DNA methylation in the respective exon did not show significant differences in the percentage of DNA methylation in the investigated CpG islands. In short, the present study showed evidence that EE concomitant with CUS triggers anxiety-like behavior, which is reversed by a pretreatment with DNA methylation inhibitor. This is accompanied by a marked reduction in *Bdnf* expression in the PFC, without affecting the DNA methylation of exon IX of the gene. Together, these findings help to understand the molecular basis of the complex interaction between stress and environment in behavior, which may have implications for the development of new therapeutic targets for the treatment of stress-related disorders.

Keywords: Environmental enrichment; chronic unpredictable stress; epigenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do gene do Bdnf em roedores e humanos	19
Figura 2. Acetilação de histonas	22
Figura 3. Metilação do DNA.....	23
Figura 4. Alojamento Não-Enriquecido (NE) x Enriquecimento Ambiental (EA)	26
Figura 5. Representação esquemática - Teste do Campo Aberto	28
Figura 6. Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	29
Figura 7. Representação esquemática do teste da Caixa Claro-Escuro.....	30
Figura 8. Delineamento experimental - Experimento 1	35
Figura 9. Delineamento Experimental - Experimento 3.....	36
Figura 10. Delineamento Experimental - Experimento 2.....	37
Figura 11. Experimento 1 - Teste do Campo Aberto	38
Figura 12. Teste do Labirinto em Cruz Elevado - Experimento 1	40
Figura 13. Caixa Claro-Escuro - Experimento 1.....	41
Figura 14. Teste do Campo Aberto - Experimento 2	42
Figura 15. Labirinto em Cruz Elevado - Experimento 2.....	43
Figura 16. Caixa Claro-Escuro - Experimento 2.....	44
Figura 17. Corticosterona Plasmática - Experimento 2.....	45
Figura 18. Expressão gênica dos diferentes éxon do gene do Bdnf no CPF	46
Figura 19. Metilação em ilhas CpG de 3 diferentes sequências do éxon IX de Bdnf	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de estresse imprevisível utilizado.....	27
Tabela 2. Expressão gênica de Bdnf no CPF (Teste de Dunnet).....	47
Tabela 3. % Metilação em diferentes sequências do éxon IX de Bdnf (Kruskal-Wallis)	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA** – Análise de Variância
- BDNF** – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- BLA** – Amígdala Basolateral
- BNST** – *Bed Nucleus of the Stria Terminalis*
- CCE** – Caixa Claro Escuro
- CPF** – Córtex Pré-Frontal
- CRF** – Fator Liberador de Corticotrofina
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- DNMT** – DNA Metiltransferase
- EA** – Enriquecimento Ambiental
- ECI** – Estresse Crônico Imprevisível
- EPM** – Erro Padrão da Média
- GLM** – *General Linear Model*
- HAT** – Histona Acetiltransferase
- HDAC** – Histona Deacetilase
- HPA** – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
- LCE** – Labirinto em Cruz Elevado
- mL** – Mililitro
- NE** – Não-Enriquecido
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- PND** – Dia Pós-Natal
- RNA** – Ácido Ribonucleico
- TCA** – Teste do Campo Aberto
- TLC** – Tempo no Lado Claro
- TLE** – Tempo no Lado Escuro

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Condições de alojamento	26
3.3. Estresse Crônico Imprevisível (ECI).....	26
3.4. Testes comportamentais	27
3.4.1. Teste do Campo Aberto (TCA)	27
3.4.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	27
3.4.3. Teste da Caixa Claro-Escuro (CCE).....	27
3.5. Dosagem de corticosterona plasmática.....	30
3.6. Coleta de material biológico.....	31
3.7. Envio de material biológico para a <i>University of Surrey</i>	31
3.8. Ensaios epigenéticos.....	31
3.8.1. Extração de DNA/RNA.....	31
3.8.2. Conversão por bissulfito de sódio.....	30
3.8.3. Transcrição reversa	30
3.8.4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).....	31
3.8.5. Pirosequenciamento e análise do perfil de metilação	33
3.9. Análise estatística	32
3.10. Delineamento experimental:.....	35
3.10.1 Experimento 1: Efeito das condições de alojamento na presença ou ausência de ECI sobre o comportamento tipo-ansioso.....	35
3.10.2. Experimento 2: Efeitos de um inibidor de metilação de DNA no comportamento tipo-ansioso em camundongos alojados sob condições de EA na presença ou ausência de ECI.....	36
3.10.3. Experimento 3: Efeito do EA em parâmetros bioquímicos e epigenéticos de animais submetidos ou não ao ECI.....	36
4. RESULTADOS.....	38

4.1. Experimento 1: EA diminui a atividade locomotora independente da exposição ao ECI e promove comportamento tipo-ansioso quando concomitante ao estresse.....	38
4.2. Experimento 2: Tratamento com inibidor de metilação reverteu o comportamento tipo-ansioso em animais expostos ao EA e ECI.....	38
4.3. Efeito do EA em parâmetros bioquímicos e epigenéticos de animais submetidos ao ECI	44
4.3.1. EA de longo prazo, mas não ECI ou a coexposição de EA e ECI aumentam as concentrações plasmáticas de corticosterona.....	44
4.3.2. EA, ECI e sua combinação modulam diferentemente a expressão de <i>Bdnf</i> no córtex pré-frontal	44
4.3.3. O status de metilação do Éxon IX do <i>Bdnf</i> não foi afetado pelo EA, ECI ou sua combinação	44
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8. ANEXOS	83b

1. INTRODUÇÃO

Em 1947, Donald Hebb constatou que ratos permitidos a andar livremente apresentavam uma melhora no comportamento cognitivo quando comparados aos alojados em gaiolas padrão (HEBB, 1947). Desde então, o enriquecimento ambiental (EA) vem sendo descrito como um paradigma experimental complexo no qual objetos como brinquedos, rodas de exercícios, túneis e casas de diferentes cores, formas e texturas são inseridos em gaiolas de animais a fim de promover uma melhor qualidade de vida aos animais (BELZ et al., 2003) e fornecer estímulos como exercício, novidade, atividade exploratória e contato social (ROSENZWEIG et al., 1978; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). Inclusive, já foi associado a um efeito recompensador e liberação de dopamina no *nucleus accumbens* (BARDO; BEVINS, 2000; BELKE, 2000; BEVINS; BARDO, 1999; LOUILOT; LE MOAL; SIMON, 1986; REBEC et al., 1996).

O EA pode incluir estímulos físico e social, onde o primeiro envolve a inserção de aparatos que permitem exercício e exploração do ambiente, enquanto o segundo consiste em alojar animais em grupos a fim de promover interação social entre eles. Entretanto, a combinação dos dois tipos de enriquecimento é vista como sinérgica, de modo que busca otimizar funções sensoriais, cognitivas e motoras dos animais, favorecendo processos como memória e aprendizado (B.B.; A.-L., 1996; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; SIMPSON; KELLY, 2011; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). O contato social promovido pelo EA parece ser de suma importância para seus efeitos, uma vez que animais criados em isolamento apresentam comportamentos relacionados à ansiedade e depressão (WRIGHT; UPTON; MARSDEN, 1991).

Diversos estudos indicam efeitos benéficos do EA em doenças como câncer (CAO et al., 2010); acidente vascular encefálico (RISEDAL et al., 2002) e doença de Huntington (VAN DELLEN et al., 2000). No sistema nervoso, já foi relatado que o EA promove neurogênese hipocampal (BRUEL-JUNGERMAN; LAROCHE; RAMPON, 2005) e proliferação celular (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1998), além de melhorar processos de memória (BAYAT et al., 2015; NILSSON et al., 1999) e aprendizado (CORTESE et al., 2018), sendo estes efeitos observados desde a exposição pré-desmame (LU et al., 2017) até a velhice (KEMPERMANN; GAST; GAGE, 2002).

O aumento da conectividade sináptica e neurogênese hipocampal (HOSSEINY et al., 2015; KEMPERMANN; BRANDON; GAGE, 1998; KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1996, 1998) é frequentemente relacionado a propriedades antidepressivas e ansiolíticas por parte do EA (BRENES; RODRÍGUEZ; FORNAGUERA, 2008; BRENES SÁENZ; VILLAGRA; FORNAGUERA TRÍAS, 2006; CHAPILLON et al., 1999; FRISKE; GAMMIE, 2005; PEÑA et al., 2006; SOARES et al., 2015; URAKAWA et al., 2013).

Os efeitos produzidos pelo EA parecem variar em função do tempo de exposição ao protocolo. Dados indicam que mesmo exposições intermitentes a um ambiente complexo por períodos curtos de tempo (3h por dia, durante 14 dias) são suficientes para promover maior neurogênese no giro denteado e aumento da memória de longo prazo (BRUEL-JUNGERMAN; LAROCHE; RAMPON, 2005). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa indicam que períodos de 21 dias de EA são capazes de induzir alterações comportamentais e moleculares em modelo de sensibilização induzida por etanol (RUEDA et al., 2012). Aliado a isto, a exposição prolongada ao EA (10 meses) demonstrou-se eficaz em aumentar a neurogênese hipocampal, a qual permaneceu elevada com a exposição contínua ao ambiente complexo (KEMPERMANN; GAST; GAGE, 2002).

O nível persistentemente elevado de neurogênese hipocampal (KEMPERMANN; GAST; GAGE, 2002), o efeito pró-sobrevivência celular (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1996, 1998; NILSSON et al., 1999; VAN PRAAG et al., 1999), e o aumento no comprimento, ramificações, número de espinhas dendríticas e eventos sinápticos em populações neuronais promovidos pelo EA (CONNOR; WANG; DIAMOND, 1982; GREENOUGH; VOLKMAR, 1973; GREENOUGH; VOLKMAR; JURASKA, 1973; LEGGIO et al., 2005), sugerem que esse paradigma experimental atua capacitando o cérebro para utilizar redes neuronais de forma otimizada, além de recrutar redes alternativas quando necessário (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006), inclusive diante de situações de injúrias, como no estresse.

Fatores estressantes leves já foram associados à resiliência em macacos (LYONS; PARKER, 2007). Esse processo teria como base o princípio da inoculação do estresse, onde repetidas exposições a estímulos estressores considerados “leves” promoveriam resiliência a futuros estressores severos (FOX; MERALI; HARRISON, 2006; LYONS et al., 2009; MEICHENBAUM, 2017). Diante disto, foi postulada a

hipótese de o EA atuar como um promotor de resiliência (LEHMANN; HERKENHAM, 2011), uma vez que a exposição diária a fatores estressantes leves como a presença da novidade e a constante exploração do meio, além da convivência em grupo em um ambiente complexo que exige interação social e resposta a diferentes estímulos, ajudariam o animal a lidar melhor com situações posteriores de estresse mais severo (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015; LARSSON; WINBLAD; MOHAMMED, 2002).

Em contraste com o estresse crônico leve causado pelo EA (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015), estímulos estressores tidos como intensos podem acarretar danos neuronais e deflagrar processos neurodegenerativos principalmente a longo prazo, afetando a morfologia de dendritos (MAGARIÑOS et al., 1996; WATANABE; GOULD; MCEWEN, 1992), promovendo neurotoxicidade (MCEWEN; SAPOLSKY, 1995) ou mesmo modificando a plasticidade hipocampal (KIM; FOY; THOMPSON, 1996; KIM; YOON, 1998). Dessa forma, estímulos estressantes são relacionadas na literatura com o desenvolvimento de transtornos de humor como comportamentos tipo-ansioso (MALCON et al., 2020; NAKAGAWA et al., 2019; NOVAES et al., 2017) e tipo-depressivo (BANASR et al., 2010; ELIZALDE et al., 2010; SHILPA et al., 2017)

Os efeitos do estresse sobre o sistema nervoso, todavia, parecem variar de maneira região-dependente. Enquanto há aumento de arborização dendrítica e densidade de espinhos neurais na amígdala (COLYN et al., 2019), foram observadas atrofia dendríticas no hipocampo (MAGARIÑOS et al., 1996; SOUSA et al., 2000; WATANABE; GOULD; MCEWEN, 1992) e redução de espinhos dendríticos apicais em neurônios do córtex pré-frontal (CPF) (COLYN et al., 2019; COOK; WELLMAN, 2004; LI et al., 2011).

O CPF, uma região envolvida em processos cognitivos como tomada de decisão e memória de trabalho (KOLB; WHISHAW, 2001), parece ser uma região mais sensível ao estresse quando comparado ao hipocampo, visto que estresses agudos, como nado forçado de 10 minutos (IZQUIERDO; WELLMAN; HOLMES, 2006) ou mesmo estressores leves como injeções diárias de veículos, podem modificar sua morfologia (BROWN; HENNING; WELLMAN, 2005). Depressão e transtorno bipolar já foram associadas à morte celular nessa região (ÖNGÜR; DREVETS; PRICE, 1998; RAJKOWSKA et al., 1999). Além disso, estímulos agudos, como estresse de contenção, levam a déficits nas funções cognitivas dependentes do CPF, tais como

prejuízo na memória de trabalho e no desempenho de tarefas (ARNSTEN, 2009; MIZOGUCHI et al., 2000; SHANSKY et al., 2006).

Outros fatores primordiais para os efeitos do estresse são duração e intensidade do estímulo aplicado. Modelos de estresse crônico como derrota social e estresse imprevisível são amplamente utilizados para estudar transtornos relacionados ao estresse, uma vez que promovem efeitos deletérios tanto no cérebro como em outros órgãos (JOHNSON et al., 1992; KOOLHAAS et al., 1997; KUDRYAVTSEVA, 2000). Contudo, embora evidências apontem que o estresse crônico imprevisível (ECI) promova comportamento do tipo ansioso (BONDI et al., 2008; LOPES et al., 2016; ZHU et al., 2014, 2011), modelos de estresses crônicos previsíveis (como 5 minutos de contenção diária) já foram associados a aumento de neurogênese no hipocampo e melhora em processos de memória e aprendizado (PARIHAR et al., 2011).

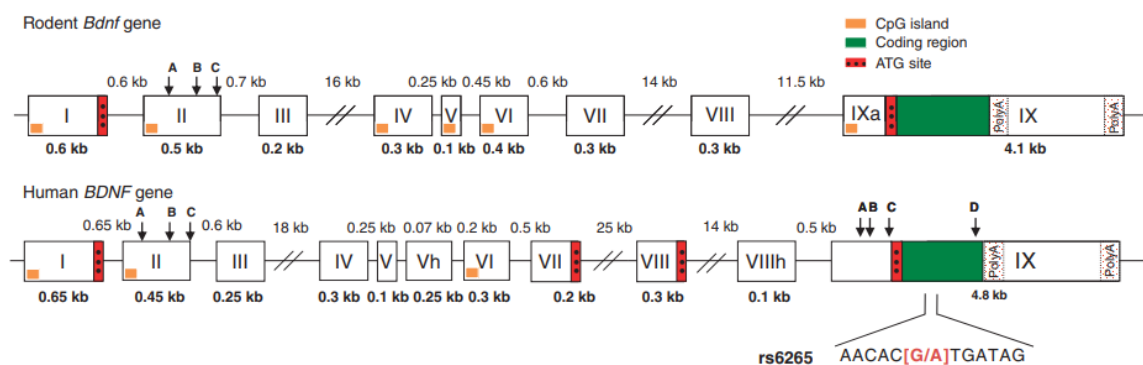
O ECI é composto por diversos estímulos – como isolamento, modificações no ciclo circadiano e privação de água e comida, combinados de maneira crônica e ininterrupta (WILLNER et al., 1987). Esse estresse constitui um modelo que representa a condição humana de exposição a diferentes fatores estressantes diariamente, desencadeando comportamentos relacionados à depressão e anedonia (para revisão, ver Antoniuk et al., 2019) e promovendo contínua ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (MUSCAT; WILLNER, 1992; WILLNER et al., 1987; ZHANG et al., 2015). Logo, a duração do modelo e a capacidade de hiperativação contínua do eixo HPA parecem ser elementos fundamentais para a obtenção dos efeitos deletérios e para a difícil adaptação ao ECI (COVINGTON; MICZEK, 2005; FRANCO et al., 2016; WILLNER, 2017).

Quando o indivíduo é exposto a um estímulo estressor, há secreção de Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo, o qual age sobre a glândula pituitária estimulando a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, por sua vez, age nas glândulas adrenais promovendo a secreção de cortisol (em humanos) ou corticosterona (em animais). A exposição prolongada a estes hormônios mediada por estresses crônicos promove, portanto, mudanças a longo prazo no eixo HPA e no cérebro, aumentando a suscetibilidade do indivíduo ao estresse e atuando como fator de risco para o desenvolvimento de transtornos mentais (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015; LEVINE, 1957; MCEWEN, 2000a, 2000b; ROCERI et al., 2004).

Levando em conta o impacto decorrente do estresse nas funções cognitivas, neurogênese, sobrevivência neuronal, ansiedade e depressão, o envolvimento de fatores neurotróficos como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor* - BDNF) tem sido cada vez mais estudado. O BDNF é um membro da família das neurotrofinas, sintetizado no corpo celular de neurônios e células da glia (LESSMANN; BRIGADSKI, 2009) e amplamente expresso no SNC, principalmente no hipocampo (HOFER et al., 1990). A síntese dessa neurotrofina se inicia a partir do seu precursor pro-BDNF, o qual é clivado posteriormente em BDNF maduro (LEAL et al., 2015). Todavia, é importante ressaltar que os efeitos positivos na plasticidade sináptica e sobrevivência neuronal parecem ser decorrentes do balanço pro-BDNF e BDNF, uma vez que a ação do pró-BDNF já foi associada à sinalização apoptótica, morte celular e degradação sináptica (BOULLE et al., 2012; LU, 2003; LU; JONES; TUSZYNSKI, 2005; PARK; POO, 2013)

A estrutura do *Bdnf* de roedores conta com uma sequência de 8 éxons não codificantes (I-VIII) com um nono éxon codificante em comum (IX); e apesar destes promotores expressarem diferentes transcritos, cada um deles codifica a mesma proteína BDNF (AID et al., 2007; LIU et al., 2005, 2006; PRUUNSILD et al., 2007)

Figura 1. Representação esquemática do gene do *Bdnf* em roedores e humanos



Fonte: BOULLE et al., 2012.

Considerando a relação entre níveis reduzidos de BDNF e o desenvolvimento de transtornos de humor, além da possível atenuação do quadro pelo uso de fármacos antidepressivos (DUMAN; MONTEGGIA, 2006; LARSEN et al., 2010; MOLTENI et al., 2010), o papel dessa neurotrofina em transtornos neuropsiquiátricos vem sendo largamente descrito. Já foi descrito que pacientes com depressão apresentam níveis séricos e plasmáticos de BDNF reduzidos em comparação com indivíduos controle

(AYDEMIR; DEVECI; TANELI, 2005; KAREGE et al., 2002, 2005; PICCINNI et al., 2008; SHIMIZU et al., 2003). Além disso, indivíduos suicidas apresentam níveis mais baixos de RNAm de *Bdnf* tanto no CPF quanto no hipocampo (DWIVEDI et al., 2003); pacientes esquizofrênicos tem menor RNAm de *Bdnf* no CPF dorsolateral (WEICKERT et al., 2003); e pacientes com transtorno bipolar exibem diminuição do RNAm de *Bdnf* no hipocampo (RAY et al., 2011).

Uma vez que transtornos de ansiedade podem ser desencadeados por estresse e têm alta taxa de comorbidade com transtornos depressivos, o *Bdnf* também tem se tornado um gene de interesse nessa patologia. Contudo, a relação entre essa neurotrofina e o desenvolvimento de ansiedade ainda é controversa. Estudos clínicos demonstraram tanto redução (DELL'OSSO et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2011; MAINA et al., 2010; STRÖHLE et al., 2010; WANG et al., 2011), quanto aumento (HAUCK et al., 2010) de BDNF associado a transtornos de ansiedade; enquanto outros estudos não encontraram diferenças nos níveis dessa neurotrofina (BONNE et al., 2011; MOLENDIJK et al., 2011). Ainda, animais transgênicos para superexpressão de BDNF em regiões do córtex, estriado e hipocampo apresentaram déficits de memória e aprendizado (CUNHA et al., 2009), além de aumento no comportamento tipo-ansioso, o qual foi associado a maior densidade de espinhos dendríticos na amígdala basolateral (BLA) (GOVINDARAJAN et al., 2006).

Sabe-se que a exposição a estímulos estressores é largamente associada a alterações nos níveis de BDNF. Contudo, a complexa transcrição desse fator pelos diferentes promotores, a natureza e duração do estresse, bem como a região-alvo estudada parecem influenciar diretamente os efeitos observados (GRAY; MILNER; MCEWEN, 2013). Já foi observado que um estresse pré-natal agudo aumenta os níveis de RNAm de *Bdnf* no CPF (LUONI et al., 2016), ao passo que um estresse crônico de isolamento social aumenta os níveis de BDNF no CPF medial e hipocampo (MENG et al., 2011). Ainda, o estresse por separação materna acarretou maior comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo associados a maior expressão de BDNF no núcleo oval do núcleo intersticial da estria terminal (BNST) (HU et al., 2020).

Apesar dos dados de aumento de BDNF após estresse, o desenvolvimento de transtornos de humor é mais associado ao precursor pro-BDNF (BAI et al., 2016); de forma que estímulos estressantes são normalmente associados à redução do BDNF. O

estresse de separação materna, por exemplo, reduz a expressão de BDNF no CPF (ROCERI et al., 2004). No estresse por imobilização, há redução do RNAm de *Bdnf*, especialmente no hipocampo (LAKSHMINARASIMHAN; CHATTARJI, 2012; NIBUYA et al., 1999; SMITH et al., 1995; UEYAMA et al., 1997). O estresse de derrota social, por sua vez, promove diminuição na expressão do RNAm de *Bdnf* no hipocampo e na amígdala basolateral (BLA) após 24h (PIZARRO et al., 2004); enquanto o estresse de isolamento reduz a expressão de RNAm de *Bdnf* no hipocampo, PFC e amígdala, além de diminuir a proteína BDNF no hipocampo, CPF, sangue e saliva (BARRIENTOS et al., 2003; DJOUMA et al., 2006; HAN et al., 2011; NAKAGAWA et al., 2019; SCACCIANOCE et al., 2006).

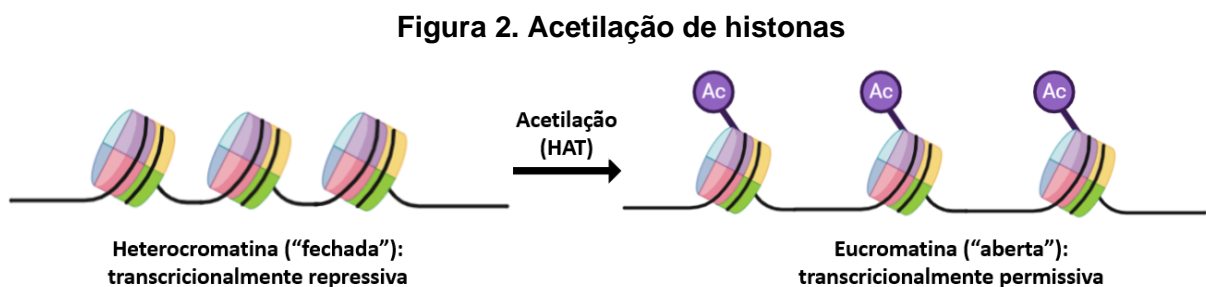
Em contrapartida, a exposição ao EA melhora parâmetros moleculares e comportamentais em modelos de estresse, como má nutrição perinatal (ALBERCA et al., 2020; BERARDINO et al., 2019), estresse por imobilização ou contenção (ASHOKAN; HEGDE; MITRA, 2016; BHAGYA et al., 2017; MARIANNO; ABRAHAO; CAMARINI, 2017; MORADI-KOR et al., 2019; NOVAES et al., 2017; SHILPA et al., 2017) e separação ou privação materna (FRANCIS et al., 2002; MENEZES et al., 2020). Uma vez que o EA promove um efeito pró-sobrevivência celular (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1996, 1998; NILSSON et al., 1999; VAN PRAAG et al., 1999), além de aumentar a neurogênese hipocampal (KEMPERMANN; GAST; GAGE, 2002), tem sido sugerido que os efeitos positivos deste paradigma em modelos de estresse são mediados pelo BDNF.

De fato, o efeito protetor do EA no estresse de separação materna foi associado ao aumento do BDNF no hipocampo (DANDI et al., 2018). Em ratos expostos ao chumbo durante o desenvolvimento, o EA promoveu melhora no desempenho de aprendizagem, o que foi associado à indução da expressão do RNAm de *Bdnf* no hipocampo (GUILARTE et al., 2003). Além disso, um EA de 14 dias reduziu o efeito tipo-ansioso em animais submetidos ao estresse crônico de imobilização e evitou o aumento do RNAm de *Bdnf* na BLA (ASHOKAN; HEGDE; MITRA, 2016). Ademais, o EA restaurou déficits cognitivos induzidos pelo estresse crônico de imobilização via modulação de fatores neurotróficos, incluindo o BDNF (SHILPA et al., 2017). O EA agiria, portanto, capacitando o cérebro tanto para utilizar redes neuronais existentes de forma otimizada, quanto para recrutar redes alternativas quando necessário (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006) diante de situações de injúrias, como as

ocasionadas pelo estresse.

Além da regulação dependente de estímulos, a transcrição de BDNF também parece sofrer ampla regulação epigenética. Os mecanismos epigenéticos incluem modificações sobre o DNA e proteínas histonas (GRÄFF; MANSUY, 2008), e integram influências genéticas, fisiológicas e ambientais ao longo da vida (MILOSAVLJEVIC, 2011); as quais podem promover ou reprimir a transcrição do gene (GRÄFF; MANSUY, 2008; CHAHROUR et al., 2008; MIRANDA; JONES, 2007; SUZUKI; BIRD, 2008).

A acetilação de histonas (Fig.2) é um processo que culmina na redução da interação eletrostática entre estas proteínas e o DNA, o que supostamente relaxa a estrutura da cromatina e torna o material genético mais acessível aos reguladores transcricionais (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Histonas são proteínas formadas por 4 subunidades (H2A, H2B, H3 e H4) que se dispõem em octâmeros, onde a cromatina é envolvida e passa por um complexo processo de superenovelamento, resultando em uma estrutura altamente compacta que permite regular a expressão gênica pela permissão ou repressão de fatores transcricionais (FELSENFELD & GROUDINE, 2003; LI; CAREY; WORKMAN, 2007; LUGER & RICHMOND, 1998). Dessa forma, a hiperacetilação dessas proteínas pelas histonas acetiltransferases (HATs) está ligada à ativação transcricional (CHEUNG et al., 2000), enquanto sua hipoacetilação ou desacetilação – mediada pelas histonas deacetilases (HDACs), está relacionada ao silenciamento de genes (KOUZARIDES, 2007; LEE; WORKMAN, 2007).



Fonte: criado com BioRender.com

A metilação do DNA (Fig.3) é uma modificação epigenética catalisada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) e consiste na adição de um grupo metil a um resíduo de citosina na posição C-5 (5º átomo do anel) (BESTOR, 2000; GOLL; BESTOR, 2005; KLOSE; BIRD, 2006). Este mecanismo epigenético regula a expressão gênica alterando a acessibilidade do DNA à maquinaria de

transcrição sem alterar o código genético (FENG; FAN, 2009). Embora esteja predominantemente associada ao silenciamento de genes, a metilação do DNA é um mecanismo comum em todo o genoma e fundamental para o desenvolvimento normal, impressão genética e inativação do cromossomo X (KIM; FRISO; CHOI, 2009; MIRANDA; JONES, 2007; NEWELL-PRICE; CLARK; KING, 2000; SINGAL; GINDER, 2011).

Figura 3. Metilação do DNA



Fonte: criado BioRender.com

Evidências sugerem que experiências ambientais induzem alterações na estrutura da cromatina e desencadeiam mudanças de longa duração no gene, afetando a disponibilidade e função da proteína BDNF e contribuindo para os efeitos fenotípicos (BOULLE et al., 2012). Já foi observado que estresses pré-natais reduzem a expressão de *Bdnf* hipocampal na prole, o que foi atribuído a menor acetilação e maior expressão de histonas deacetilases (ZHENG et al., 2016b). Estresses perinatais, por sua vez, também diminuem o RNAm de *Bdnf* no hipocampo, efeito associado à diminuição da acetilação da histona H3 e maior metilação do resíduo K27 da mesma histona no promotor IV do gene do *Bdnf* (ONISHCHENKO et al., 2008).

Em relação à metilação do DNA do gene do *Bdnf*, tem-se bastante destaque para os promotores IV e IX, os quais parecem ser amplamente regulados por esse mecanismo epigenético (LUBIN; ROTH; SWEATT, 2008; MA et al., 2009; MARTINOWICH et al., 2003). Estressores ambientais como exposição perinatal ao metilmercúrio levam à hipermetilação do DNA do éxon IV do *Bdnf* no hipocampo (ONISHCHENKO et al., 2008). Estresses gestacionais aumentam a expressão de DNMT1 e a metilação do DNA de diversos éxons do *Bdnf*, incluindo IV e IX, o que foi relacionado à menor expressão de *Bdnf* hipocampal na prole (ZHENG et al., 2016b). Além disso, estresses psicossociais reduzem a expressão de BDNF e aumentam a metilação do DNA do éxon IV do *Bdnf* no hipocampo dorsal, com hipermetilação na região CA1 (ROTH et al., 2011).

Na região do CPF, foi visto que estresses no início da vida induzem aumento na metilação dos éxons IV e IX do DNA do *Bdnf* de ratos adultos, perpetuando esse padrão ao longo de uma geração, o que é resgatado pelo tratamento com inibidor de metilação do DNA (ROTH et al., 2009). Além disso, ratos machos submetidos a estresses imprevisíveis no período pré-natal apresentam maior metilação em diversas ilhas CpG do éxon IV do *Bdnf* no CPF medial (BLAZE et al., 2017a). Todavia, a exposição ao estresse de derrota social na adolescência não alterou a porcentagem de metilação do DNA do éxon IV de *Bdnf* no CPF de camundongos adultos (XU et al., 2018).

Em contraste, modelos de EA têm sido associados a modificações epigenéticas que favorecem a transcrição de *Bdnf*. Animais submetidos a um enriquecimento social apresentaram maior acetilação em alguns promotores do *Bdnf*, tornando a estrutura do gene mais suscetível à transcrição (BRANCHI et al., 2011). Além disso, o EA aumentou a trimetilação da histona H3 em níveis de lisina 4 (H3K4me3) em torno do *Bdnf* no hipocampo de ratos idosos, o que parece estar associado ao resgate de déficits de memória (MORSE et al., 2015). Ainda, camundongos submetidos ao EA apresentaram regulação positiva na transcrição dos éxons IV e VI do *Bdnf* no hipocampo (ZAJAC et al., 2010).

A transcrição de *Bdnf* e comportamentos relacionados a transtornos de humor são bem discutidos na literatura. Contudo, o impacto do EA e da exposição ao estresse nos comportamentos relacionados à ansiedade e o envolvimento de modificações epigenéticas, especificamente a metilação do DNA, no gene do *Bdnf* ainda precisam de mais investigações, especialmente na região do CPF. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do EA sobre o modelo de estresse crônico imprevisível (ECI) nos comportamentos relacionados à ansiedade e na transcrição de *Bdnf*, no que diz respeito à expressão gênica de diferentes éxons e à metilação do DNA genômico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto do EA no comportamento relacionado à ansiedade em camundongos expostos ao estresse crônico imprevisível e o possível envolvimento de alterações epigenéticas no gene do *Bdnf* no córtex pré-frontal destes animais.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Analisar os efeitos do EA em comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos submetidos ao ECI;
- 2.2.2. Investigar alterações epigenéticas no gene do *Bdnf* no CPF de camundongos criados no EA e submetidos ao ECI;
- 2.2.3. Verificar se modificações epigenéticas no gene do *Bdnf* no CPF alteram comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos criados no EA e submetidos ao ECI

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 240 camundongos Swiss machos provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia – Unidade II (biotério de camundongos) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP); os quais foram obtidos no dia pós-natal 28 (PND28) e mantidos no Biotério do Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental até atingirem 7 semanas (PND49). Os animais tiveram livre acesso à água e comida (exceto em momentos de estresse por privação) e foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo as luzes acesas às 7h). Todos os experimentos foram conduzidos seguindo as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (protocolo 120/2016). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes ARRIVES 2.0 (do inglês, *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*, 2020).

3.2. Condições de alojamento

No PND49, os animais foram divididos em 2 condições de alojamento distintas: não-enriquecidos (NE) ou enriquecimento ambiental (EA). Os animais do grupo NE foram alojados em grupos de 5 em gaiolas padrão de polipropileno (27.5x16.5x13cm) durante todo o experimento. Os camundongos do grupo EA foram alojados em gaiolas maiores de policarbonato (42x28x21.5cm), onde foram expostos a diferentes estímulos de objetos com variadas cores e texturas, tais como brinquedos, rodas de exercício, casas, tubos plásticos, escadas e rampas (Fig.4). Os objetos foram trocados e/ou rearranjados 3 vezes por semana a fim de preservar a novidade no ambiente. Os animais foram mantidos nestas condições de alojamento durante todo o experimento.

Figura 4. Alojamento Não-Enriquecido (NE) x Enriquecimento Ambiental (EA)



Fonte: Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental

3.3. Estresse Crônico Imprevisível (ECI)

Após 21 dias (PND70) de alojamento em EA ou condições padrão (NE), os animais foram subdivididos em 4 grupos de acordo com a exposição (ECI) ou não (NS) a um modelo de ECI: (1) NE-NS: não-enriquecido não-estressado; (2) NE-ECI: não-enriquecido estressado; (3) EA-NS: enriquecido não-estressado; e (4) EA-ECI: enriquecido estressado. O modelo de ECI foi realizado conforme descrito previamente (KATZ; ROTH; CARROLL, 1981; QUADIR et al., 2016; SANTOS-ROCHA et al., 2018; WILLNER et al., 1987) com algumas modificações. O protocolo durou 11 dias e contou com diferentes tipos de estresses (Tabela 1). Os estímulos estressores foram realizados de forma variável e em sala separada para manter a imprevisibilidade do protocolo e manter os grupos não estressados distantes da perturbação.

Tabela 1. Protocolo de estresse imprevisível utilizado

Dia	Estresse	Duração	Fase do ciclo circadiano
Dia 1	Contenção física	1 hora	Fase clara
Dia 2	Maravalha molhada	12 horas	Fase escura
Dia 3	Isolamento frio	45 minutos	Fase clara
	Luzes acesas	12 horas	Fase escura
Dia 4	Luzes desligadas	3 horas	Fase clara
	Nado forçado	4 minutos	Fase clara
Dia 5	Maravalha molhada	12 horas	Fase clara
	Privação de água e comida	12 horas	Fase escura
Dia 6	Nado forçado	4 minutos	Fase clara
	Isolamento	12 horas	Fase escura
Dia 7	Isolamento frio	15 minutos	Fase clara
	Luzes desligadas	2 horas	Fase clara
Dia 8	Maravalha molhada e luzes acesas	12 horas	Fase escura
Dia 9	Isolamento e privação de água e comida	12 horas	Fase clara
Dia 10	Contenção física	1 hora	Fase clara
	Luzes acesas	12 horas	Fase escura
Dia 11	Contenção física	1 hora	Fase clara
	Nado forçado	4 minutos	Fase clara

Fase clara: 7-19h; fase escura: 19h-7h

3.4. Testes comportamentais

3.4.1. Teste do Campo Aberto (TCA)

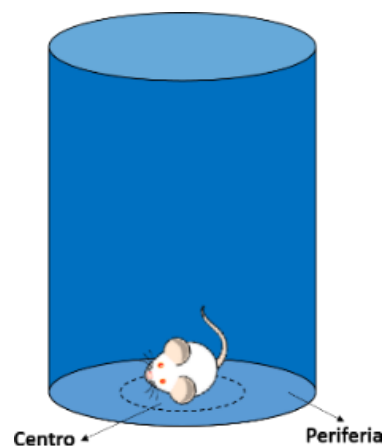
Introduzido por Hall (1941) o TCA foi proposto para avaliar a emocionalidade em ratos, sendo sua eficiência para camundongos demonstrada posteriormente (CHRISTMAS; MAXWELL, 1970). Foi visto que animais em privação de alimento apresentavam maiores níveis de defecação e atividade locomotora predominante na

área periférica do aparato, sugerindo que a atividade locomotora poderia ser indicativa de medo ou ansiedade (HALL, 1941).

O TCA é útil para avaliar a atividade locomotora espontânea, além de permitir uma visão – ainda que superficial – de comportamentos relacionados à ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). Uma vez que roedores apresentam aversão a ambientes novos, quando expostos ao ambiente desconhecido, aberto e iluminado do TCA, eles tendem a entrar em conflito sobre evitar situações perigosas ou explorar o aparato cuja fuga é impedida pelas paredes (CHOLERIS et al., 2001; CRUSIO, 2001; FILE, 1980; PRUT; BELZUNG, 2003; STEIMER; DRISCOLL, 2003; WALSH; CUMMINS, 1976).

No presente trabalho, foi utilizada uma arena circular de acrílico opaco azul (Fig.5) com 40cm de diâmetro, disposto em uma sala experimental com iluminação apropriada ($245\pm 5\text{lux}$). Os animais foram inseridos na área central da arena e tiveram 10 minutos para explorá-la. A atividade deles no aparato foi registrada por uma câmera (Intelbras®) e a distância total percorrida por unidade de tempo (cm/s) na arena, bem como a distância percorrida nas zonas central e periférica do campo aberto foram contabilizadas via software Ethovision XT® (Noldus).

Figura 5. Representação esquemática - Teste do Campo Aberto



Fonte: Autora, 2016

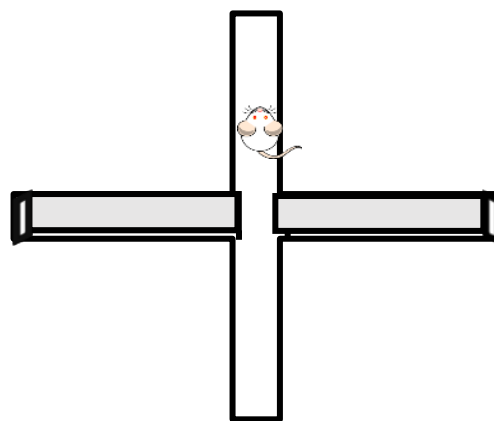
3.4.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O modelo de LCE é bastante simples e difundido e foi planejado para avaliar o efeito de fármacos que atenuam a ansiedade, como os benzodiazepínicos. É também usado para avaliar respostas de ansiedade em roedores (PELLOW et al.,

1985; R.G., 1987; TREIT, 1985). O aparato utilizado consistiu de dois braços abertos (33,5 x 7 cm), margeados por um anteparo de 0,5 cm de altura para evitar a queda dos animais, e dois braços fechados (33,5 x 7 cm, cercados por uma parede de 20 cm de altura) conectados por uma área central (10 x 10 cm) e elevados a 50 cm do chão (figura 6). No presente estudo, os animais foram inseridos individualmente na área central do aparato com a face voltada para o braço aberto oposto ao experimentador e tiveram seu comportamento registrado por uma câmera (Intelbras®) durante 5 minutos. A intensidade da luz foi mantida em 75 ± 5 lux (centro), 90 ± 5 lux (braços abertos) e 10 ± 5 lux (braços fechados) durante todo o experimento.

Comportamentos relacionados à ansiedade foram analisados usando software (Plus MZ®) e expressos como uma função de entradas de braço aberto (entradas nos braços abertos/entradas em todos os braços x 100) e a porcentagem total de tempo gasto nos braços abertos (tempo nos braços abertos/tempo gasto em todos os braços, sem área central, x 100). As transições totais no labirinto foram avaliadas como indicativas de atividade locomotora. Além disso, o índice de ansiedade foi calculado conforme descrito previamente (COHEN et al., 2008), de acordo com a fórmula: $1 - [(\text{tempo gasto nos braços abertos}/\text{tempo total no labirinto}) + (\text{número de entradas nos braços abertos}/\text{exploração total no labirinto})/2]$, variando de 0 a 1, onde o aumento desse parâmetro reflete maior comportamento tipo-ansioso.

Figura 6. Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)



Fonte: Autora, 2016.

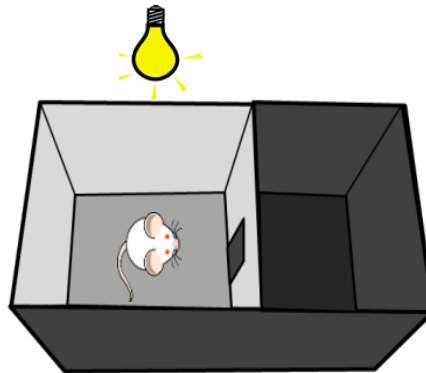
3.4.3. Teste da Caixa Claro/Escuro (CCE)

A CCE (Fig.7) foi descrita como um teste indicativo de atividade locomotora e de parâmetros de ansiedade, baseando-se na aversão natural de roedores por

ambientes abertos e iluminados (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). O aparato utilizado consistiu de uma caixa dividida em 2 compartimentos (21x42x25) revestidos internamente em acrílico preto e branco, conectados por uma porta (10x10cm), onde o lado claro (LC) permaneceu iluminado por uma lâmpada incandescente (65 ± 5 lux) enquanto o lado escuro (LE) recebeu iluminação mínima (5 ± 5 lux).

Neste trabalho, foi utilizado o protocolo validado por Costall et al. (1989), onde os animais foram inseridos individualmente no centro do lado claro, com a face voltada para a porta que conecta os compartimentos, sendo monitorados durante 10 minutos de livre exploração. O tempo gasto no compartimento claro foi usado como parâmetro relacionado à ansiedade e o número de transições entre os compartimentos foi considerado indicativo de atividade locomotora.

Figura 7. Representação esquemática do teste da Caixa Claro-Escuro



Fonte: Adaptado de <https://scanberlincom.files.wordpress.com/2016/10/darkbox.png?w=720>

3.5. Dosagem de corticosterona plasmática

Para a análise bioquímica das concentrações de corticosterona plasmática, amostras de sangue da cauda do animal ou tronco cerebral foram coletadas em tubos heparinizados (500U/mL, 10% do volume total de sangue coletado) durante a fase clara do ciclo circadiano. Após a coleta, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 2000x g (4°C) por 15 minutos e os plasmas foram armazenados a -80°C até análise bioquímica. As concentrações de corticosterona plasmáticas foram medidos por meio da técnica ELISA (*enzyme-like immunosorbent assay*) com o *Corticosterone ELISA* kit (Enzo Life Sciences®) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6. Coleta de material biológico

Ao fim do protocolo, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação em guilhotina específica, de acordo com as diretrizes do CONCEA (Resolução Normativa nº37/2018). Os encéfalos foram prontamente dissecados em gelo seco para isolamento do córtex pré-frontal, seguindo o protocolo descrito em Spijker (2011). Os tecidos foram armazenados em tubos com solução estabilizante de RNA (*RNA later stabilization solution* – Sigma®) a -80°C até posterior análise. Parte das amostras foi mantida em freezer e parte foi enviada para a *University of Surrey* (Guildford, Reino Unido) para realização dos ensaios epigenéticos.

3.7. Envio de material biológico para a *University of Surrey* para realização de análises epigenéticas

As amostras de CPF foram devidamente coletadas e enviadas para o Reino Unido através de transportadora especializada (Bio Transportes®) em condições apropriadas de armazenamento (protocolo BIO 03774R) mediante declaração de anuência do veterinário responsável e do diretor do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com as diretrizes do Serviço de Saúde Animal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

3.8. Ensaios epigenéticos

3.8.1. Extração de DNA/RNA

Para a purificação simultânea do DNA genômico e do RNA total das amostras biológicas, foi utilizado kit específico (*All Prep® DNA/RNA Kit*, QIAGEN®) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram separadas em microtubos *safe-lock* com esferas de metal de 5 mm (QIAGEN®) e processadas em disruptor de células e tecidos (*TissueLyser II* - QIAGEN®) junto com tampão de lise por pulsos de 20-25 segundos, a cada 2 minutos por 2-3 vezes. O produto homogeneizado foi passado através de uma coluna de spin *DNeasy* para ligar seletivamente o DNA genômico (gDNA). A coluna foi lavada com tampões relevantes e o DNA foi eluído da coluna usando tampão de eluição.

Em seguida, um volume igual de EtOH 70% foi adicionado, misturado por repipetagem várias vezes e passado através de uma coluna *RNeasy*, na qual o RNA ficou aderido e posteriormente, lavado com tampões fornecidos no kit. O RNA foi então

eluido usando água livre de nuclease. Finalmente, DNA e RNA purificados foram quantificados por espectrofotometria (*NanoDrop 2000*, Thermo Scientific®) com densidade óptica de 260:280. O DNA foi armazenado a 4°C e o RNA a -80°C.

3.8.2. Conversão por bissulfito de sódio

A conversão por bissulfito é uma técnica eficiente em converter citosinas não metiladas em uracilas, as quais se tornam timinas na amplificação por PCR, enquanto as metiladas permanecem inalteradas, permitindo uma abordagem qualitativa e quantitativa do perfil de metilação da amostra (FROMMER et al., 1992; GRUNAU; CLARK; ROSENTHAL, 2001; LEONTIOU et al., 2015; OLD et al., 2007). No presente trabalho, a conversão por bissulfito foi realizada utilizando-se um kit específico (*Epitect® Bisulfite*, QIAGEN®) de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, o DNA obtido foi misturado com um mix de bissulfito de sódio em tubos de PCR, que foram inseridos no termociclador. Assim que a conversão pelo bissulfito foi concluída, as amostras foram transferidas para tubos de 1.5mL livres de nuclease para purificação. Posteriormente, foi adicionado tampão de lise (BL, do inglês, *Lysis Buffer*) e o tubo foi agitado brevemente e centrifugado. Em seguida, adicionou-se etanol a cada amostra e os tubos foram novamente agitados e centrifugados. As misturas dos tubos foram então transferidas para colunas de rotação e lavadas com tampão (BW, do inglês, *Wash Buffer*) para remover o bissulfito de sódio residual. Uma vez que o DNA se ligou à membrana da coluna, foi adicionado tampão de dessulfonação (BD, do inglês, *Desulfonation Buffer*), resultando em dessulfonação do DNA. O tubo foi lavado novamente com tampão BW para remover o agente de dessulfonação e o DNA convertido foi finalmente eluido. O DNA convertido por bissulfito (fita simples) foi então armazenado a -20°C até uso posterior.

3.8.3. Transcrição reversa

Após a remoção do DNA convertido, foi utilizado um kit de transcrição reversa (*QuantiNova™ Reverse Transcription Kit*, QIAGEN® UK) para transcrição do RNA isolado em DNA complementar (cDNA). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras de RNA foram misturadas a um mix de enzimas (*QuantiNova™ Reverse Transcription Enzymes*, QIAGEN®) e a um mix de primers de transcrição reversa (*QuantiNova™ Reverse Transcription Mix*, QIAGEN®). O mix foi então incubado a 25° por 3 minutos. A seguir, a reação ocorreu por 10 minutos a 45°C e foi inativada a 85°C por 5 minutos. As reações foram

realizadas em termociclador e obteve-se alto rendimento de DNA convertido (cDNA), o qual foi utilizado como molde para amplificação.

3.8.4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

O cDNA foi preparado para amplificação através do kit *QuantiNova™ SYBR® Green PCR* (QIAGEN®) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram preparadas para placas de 384 poços a partir da adição de cDNA (5ng em 1µL) a 4µL de *Master mix* – mistura formada por reagentes (*QuantiNova™ Master Mix SYBR Green PCR*, QIAGEN®) e primers específicos (*F-Forward* e *R-Reverse*). O volume final de cada poço foi, portanto, 5µL. As amostras foram então submetidas à amplificação em equipamento de PCR quantitativa em tempo real (*QuantStudio™ 7 Real-Time PCR System*, ThermoFisher®). As reações foram realizadas em triplicata para todas as amostras. O método delta-ctct relativo foi usado para medir a expressão de RNAm de todos os genes alvo padronizados contra *Gapdh*. Os seguintes *primers* foram utilizados (direção 5´-3´):

TGTCTCTCAGAATGAGGGCG – F; CATCCACCTTGGCGACTACA – R (Éxon I);
 CATTGAGCTCGCTGAAGTTGG – F; CCCAGTATACCAACCCG GAG – R (Éxon II);
 ATGGAGCTTCTCGCTGAAGG – F; CGAGTCTTTGGTGGCCGATA – R (Éxon IV);
 GCGTGACAACAATGTGA CTCC – F; TCTGGCTCTCGCACTTAGC – R (Éxon VI);
 CGACATCACTGGCTGACACT – F; CAAGTCCGCGTCCTTATGGT – R (Éxon IX –
Primer 1)
 ATTAGCGAGTGGGTCAC AGC – F; GCCTTTGGATACCGGGACTT – R (Éxon IX –
Primer 2)

3.8.5. Pirosequenciamento e análise do perfil de metilação

A técnica de pirosequenciamento se baseia na detecção de luz a partir da produção de pirofosfato durante a polimerização do DNA (Nyrén & Lundin 1985). Após a hibridização de um oligonucleotídeo com a fita de DNA a ser sequenciada, a DNA polimerase inicia a replicação usando desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) como substrato. Quando o dNTP complementar correto é incorporado pela DNA polimerase, o pirofosfato inorgânico (PPi) é liberado durante a reação de condensação. Esse PPi é posteriormente convertido em trifosfato de adenosina (ATP), que age como cofator da enzima luciferase. Esta enzima, por sua vez, oxida luciferina em oxiluciferina e luz. Portanto, a emissão de luz pela reação é proporcional à

quantidade de pirofosfato produzida, que é diretamente proporcional ao número de nucleotídeos adicionados (AHMADIAN et al., 2000; AHMADIAN; EHN; HOBBER, 2006; ALDERBORN; KRISTOFFERSON; HAMMERLING, 2000; HARRINGTON et al., 2013; HYMAN, 1988; NYRÉN, 1987; RONAGHI et al., 1996; RONAGHI; UHLÉN; NYRÉN, 1998).

No presente trabalho, o pirosequenciamento foi utilizado conforme previamente descrito por Coley et al. (2012) para determinar a frequência de metilação das regiões alvo. Resumidamente, os *amplicons* biotinilados por PCR foram isolados e deixados a hibridizar com um *primer* de sequenciamento. Eles foram então incubados com as enzimas DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase; além de adenosina 5' fosfosulfato (APS, do inglês, *adenosine 5' phosphosulfate*) e luciferina, que atuaram como substratos. Em seguida, o desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) foi adicionado sequencialmente à reação, levando à liberação do pirofosfato (PPi), em quantidade equimolar à quantidade do nucleotídeo incorporado. A luz produzida na reação catalisada pela luciferase foi detectada por sensores (*PyroMark Q96MD*, QIAGEN®), e vista como um pico na saída de dados brutos (pirograma). Conforme o processo ocorreu, a fita de cDNA foi alongada, e a sequência de nucleotídeos e os dados de metilação consequentes foram determinados a partir dos picos de sinal no traço do pirograma.

3.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no IBM SPSS Statistics 21® e os gráficos foram plotados no GrahPad Prism 7®. Todos os dados foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade (teste de Levene). Dados não-normais ou não-homogêneos foram convertidos e analisados parametricamente como *z-score*. Dados paramétricos foram analisados pelo Modelo Linear Geral (GLM, do inglês, *General Linear Model*). GLM com medidas repetidas foi usado para analisar as concentrações de corticosterona.

Quando o GLM revelou efeito significativo, a análise *post-hoc* foi seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Dados não paramétricos (não-normais e não-homogêneos) foram analisados pela análise de variância de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Valores de *p* inferiores a 0,05 foram aceitos como estatisticamente significativos.

3.10. Delineamento experimental:

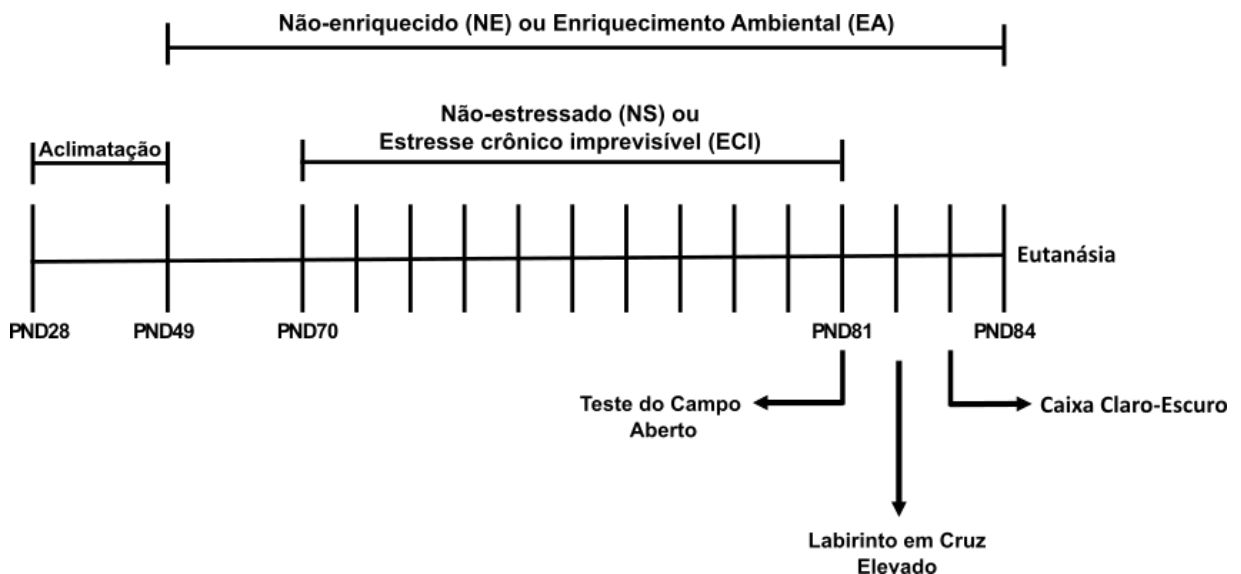
O estudo foi dividido em 3 experimentos com diferentes coortes de animais:

3.10.1 Experimento 1: Efeito das condições de alojamento na presença ou ausência de ECI sobre o comportamento tipo-ansioso

Para avaliar o impacto das condições de alojamento e do ECI na atividade locomotora e em comportamentos relacionados à ansiedade, três testes comportamentais foram realizados: Campo Aberto (TCA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Caixa Claro-Escuro (CCE). Após aclimação de 21 dias, os animais foram divididos randomicamente em 4 grupos ($n=15/\text{grupo}$): (1) NE-NS: não-enriquecido não-estressado; (2) NE-ECI: não-enriquecido estressado; (3) EA-NS: enriquecido não-estressado; e (4) EA-ECI: enriquecido estressado.

No último dia de ECI (PND81), os animais foram submetidos individualmente ao TCA. Para evitar interferência do TCA, os animais foram submetidos ao LCE após 24 horas (PND82). Finalmente, para evitar interferências do LCE, a CCE foi realizada 24 horas após o LCE (PND83). Após cada teste comportamental, os animais retornaram às suas condições de alojamento e os aparelhos foram higienizados com etanol a 5%. No dia seguinte à realização da CCE (PND84), os animais foram submetidos à eutanásia, decapitação e retirada do encéfalo (Fig.8).

Figura 8. Delineamento experimental - Experimento 1

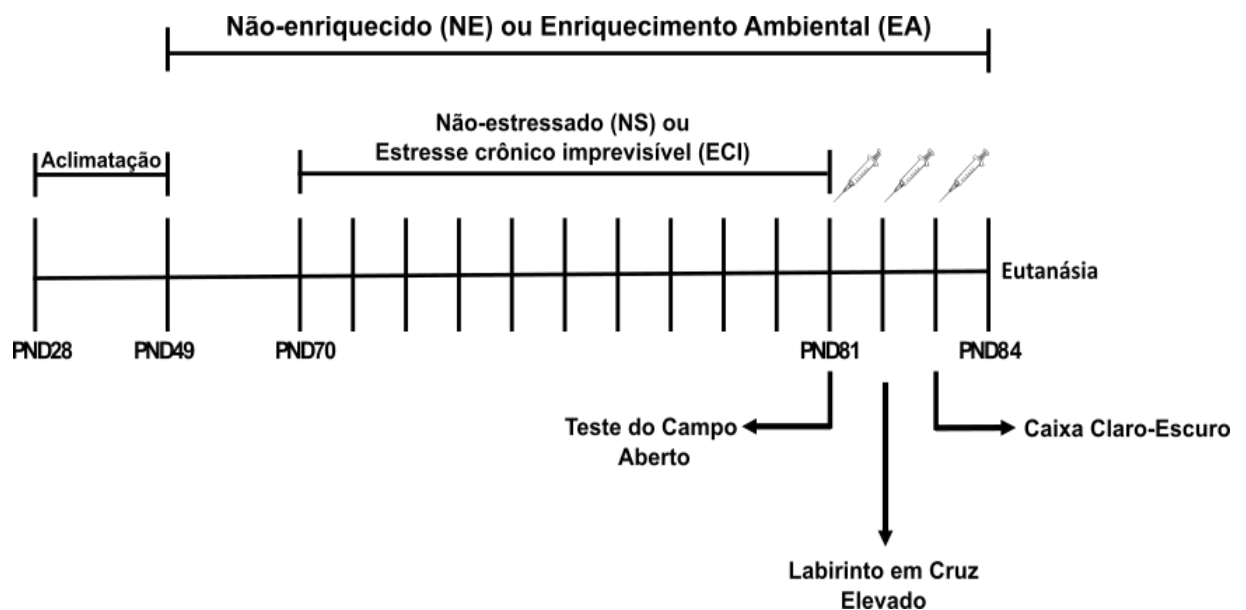


3.10.2. Experimento 2: Efeitos de um inibidor de metilação de DNA no comportamento tipo-ansioso em camundongos alojados sob condições de EA na presença ou ausência de ECI

A fim de avaliar se os efeitos do EA e do ECI nos comportamentos relacionados à ansiedade foram mediados por metilação do DNA, outra coorte de camundongos (n=10-20/grupo) foi submetida ao mesmo protocolo do experimento 1 e tratada com 5-azacitidina (5-azaC), um análogo nucleosídico da citosina que se incorpora ao DNA durante a replicação e inibe a enzima DNA metil transferase (DNMT), agindo, portanto, como um inibidor de metilação do DNA. Os grupos não-tratados com 5-azaC receberam injeções de volumes equivalentes de veículo (DMSO diluído em solução salina 1:5).

A 5-azaC foi preparada diariamente conforme descrito anteriormente por Sakharkar et al. (2019) e administrada por via intraperitoneal na dose de 1mg/kg duas horas antes de cada teste comportamental em PND 81, 82 e 83 (cada injeção com 24h de intervalo). Duas horas após a administração, os animais foram submetidos individualmente aos testes comportamentais conforme descrito anteriormente. O delineamento experimental está representado na figura 9:

Figura 9. Delineamento Experimental - Experimento 2

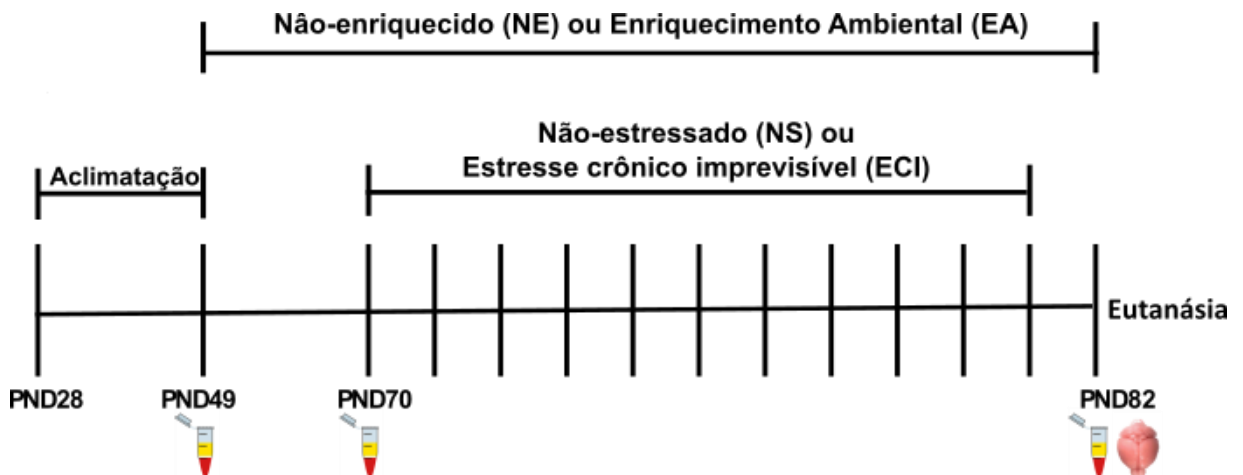


3.10.3. Experimento 3: Efeito do EA em parâmetros bioquímicos e epigenéticos de animais submetidos ou não ao ECI

A fim de se evitar interferências nas medidas bioquímicas, um grupo separado de animais foi submetido às mesmas condições de alojamento e ECI do experimento 1, mas não foram submetidos a nenhum teste comportamental. Após aclimação de 21 dias, os animais foram divididos randomicamente em 4 grupos (n=15-20/grupo): (1) NE-NS: não-enriquecido não-estressado; (2) NE-ECI: não-enriquecido estressado; (3) EA-NS: enriquecido não-estressado; e (4) EA-ECI: enriquecido estressado.

As amostras foram coletadas na fase clara do ciclo circadiano em três momentos diferentes: após a aclimação (PND49), após 21 dias de EA (PND70), ambos da cauda dos animais; e depois de 32 dias (21 dias de EA e 11 dias de ECI; PND82), do tronco cerebral, após decapitação (Fig.10). O CPF dissecado foi utilizado para as análises epigenéticas e o sangue coletado foi processado para dosagem de corticosterona plasmática a fim de se determinar o efeito do EA e do ECI no eixo HPA.

Figura 10. Delineamento Experimental - Experimento 3



4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1: EA diminui a atividade locomotora independente da exposição ao ECI e promove comportamento tipo-ansioso quando concomitante ao estresse

4.1.1. Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora foi medida através do TCA, onde foram analisados os seguintes parâmetros: distância total percorrida pelo animal na arena (cm); distância percorrida no centro (cm) e distância percorrida na periferia (cm). Foi aplicado GLM seguido por *post hoc* de Bonferroni, no software IBM SPSS Statistics 21®. Os resultados encontram-se expressos na figura 11.

Figura 11. Experimento 1 - Teste do Campo Aberto

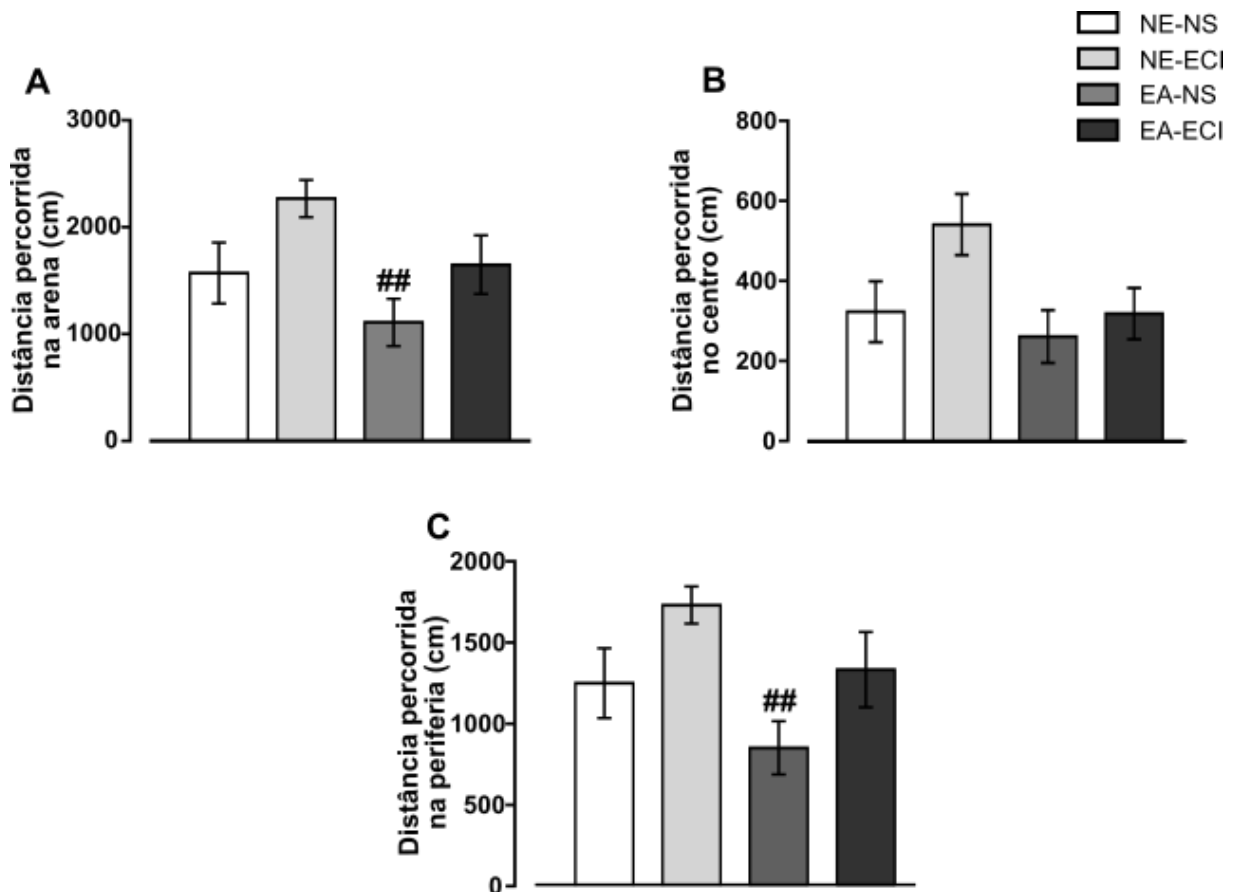


Figura 11. Efeitos do EA e do ECI na atividade locomotora. Animais não estressados alojados em EA (EA-NS) apresentaram redução da atividade locomotora quando comparados ao NE-ECI no TCA. Distância total percorrida (A); distância percorrida no centro (B); distância percorrida na periferia (C). Dados analisados por GLM seguido por *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos como média±EPM (n = 10-15/grupo), com ##p <0,01 quando comparado ao grupo NE-ECI.

A análise da distância percorrida na arena (Fig. 9A) mostrou efeitos significativos das condições de alojamento [$F(1,50) = 4,906$, $p = 0,031$] e exposição ao ECI [$F(1,50) = 6,431$, $p = 0,014$] sem interação entre os fatores [$F(1,50) = 0,1059$, $p = 0,746$]. Não foram observados efeitos significativos de alojamento [$F(1,50) = 3,681$; $p = 0,061$], estresse [$F(1,50) = 3,452$, $p = 0,061$] ou interação entre os fatores [$F(1,50) = 1,168$; $p = 0,285$] para a distância percorrida no centro (Fig. 11B). Para a distância percorrida na periferia (Fig. 11C), foi encontrado padrão semelhante à distância total, isto é, efeitos significativos do alojamento [$F(1,50) = 4,679$, $p = 0,035$] e ECI [$F(1,50) = 6,828$, $p = 0,012$] sem efeito de interação [$F(1, 50) = 1,57e- 0,005$, $p = 0,9969$]. O teste de comparações múltiplas de Bonferroni apontou que o grupo EA-NS apresentou diminuição da atividade locomotora quando comparado ao NE-ECI na distância total percorrida, bem como na distância percorrida na periferia ($p = 0,005$ e $p = 0,005$, respectivamente; Fig. 11A e 11C).

4.1.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Comportamentos relacionados à ansiedade foram analisados por meio do LCE. Foram avaliados parâmetros de porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), número de transições no aparato e índice de ansiedade. Foi aplicado GLM seguido por *post hoc* de Bonferroni, no software IBM SPSS Statistics 21®.

Em termos de %EBA (Fig. 12A), o GLM apontou efeitos significativos das condições de alojamento [$F(1,50) = 8,33$; $p = 0,006$] e da interação alojamento x ECI [$F(1,50) = 18,80$, $p < 0,001$], sem efeito do ECI isolado [$F(1,50) = 0,204$, $p = 0,653$]. Em relação à %TBA (Fig. 12B), foi observado um padrão semelhante, isto é, efeito significativo das condições de alojamento [$F(1,50) = 12,92$; $p < 0,001$] e da interação alojamento x ECI [$F(1,50) = 11,03$; $p = 0,002$], sem efeito do ECI sozinho [$F(1,50) = 0,134$, $p = 0,716$]. Para o número total de transições no LCE foram encontrados efeitos das condições de alojamento [$F(1,50) = 60,7$, $p < 0,001$] e da interação alojamento x ECI [$F(1,50) = 6,048$, $p = 0,017$], sem efeito do ECI isolado [$F(1,50) = 2,156$, $p = 0,148$]. Em relação ao índice de ansiedade, foi encontrado um resultado semelhante, isto é, houve efeito das condições de alojamento [$F(1,50) = 12,12$, $p = 0,001$], interação alojamento x ECI [$F(1,50) = 15,13$, $p < 0,001$], sem efeito do ECI isolado [$F(1,50) = 0,175$; $p = 0,677$].

O *post hoc* de Bonferroni mostrou que o grupo EA-ECI apresentou menor %EBA (Fig. 12A) quando comparado aos grupos NE-ECI e EA-NS ($p < 0,001$ e $p = 0,013$; respectivamente) e menor %TBA (Fig. 12B) quando comparado aos grupos NE-NS e NE-ECI ($p < 0,001$ e $p = 0,048$), respectivamente. Em termos de transições no LCE (Fig. 12C), o *post hoc* indicou que ambos os grupos enriquecidos (EA-NS e EA-ECI) exibiram significativamente menos transições no aparato, independentemente do estresse. O grupo EA-NS apresentou diminuição no número de transições quando comparado aos grupos NE-NS e NE-ECI ($p < 0,0001$ e $p = 0,001$, respectivamente); enquanto o grupo EA-ECI demonstrou redução significativa desse parâmetro também quando comparado aos grupos NE-NS e NE-ECI ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Finalmente, no índice de ansiedade, a análise *post hoc* indicou aumento significativo pelo grupo EA-ECI quando comparado aos grupos NE-ECI e EA-NS ($p < 0,0001$ e $p = 0,029$, respectivamente), além de uma tendência ao aumento do índice quando ao grupo NE-NS ($p = 0,053$) (Fig. 12D).

Figura 12. Teste do Labirinto em Cruz Elevado - Experimento 1

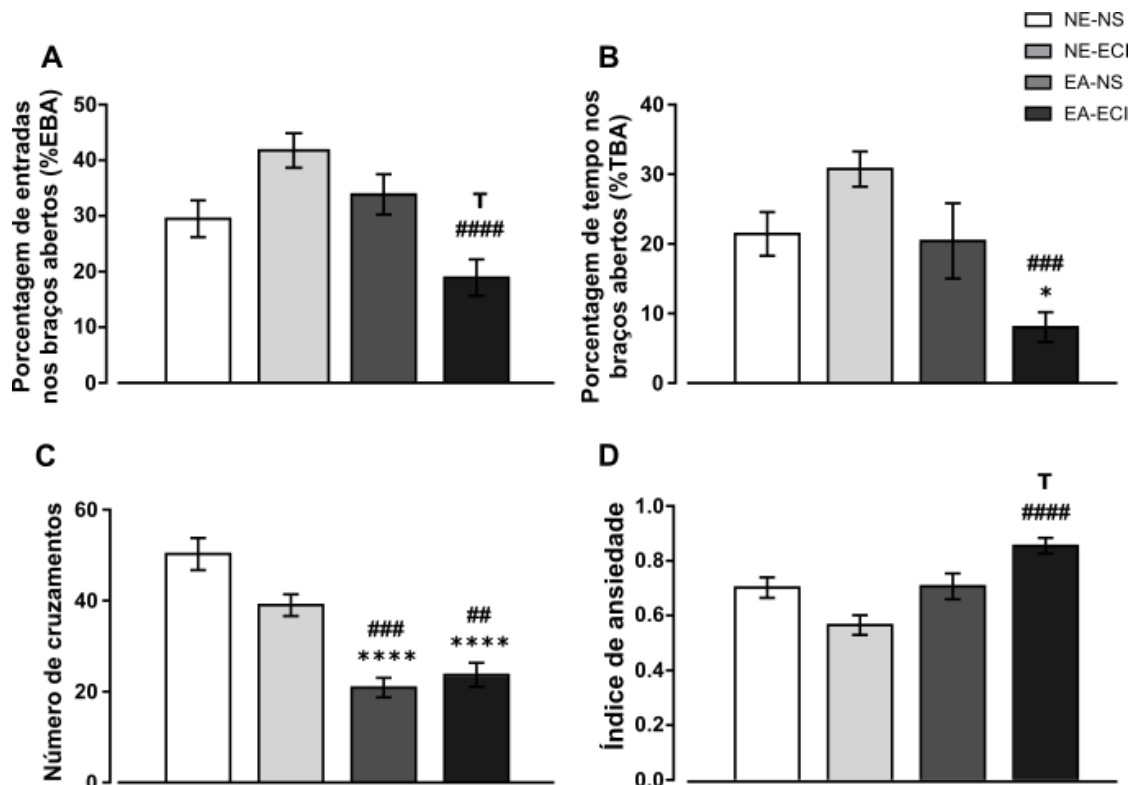


Figura 12. Efeitos do EA e do ECI no comportamento tipo-ansioso no LCE. Animais estressados alojados em EA (EA-ECI) apresentam redução no número de entradas (A) e tempo de permanência nos braços abertos (B); além de aumento no índice de ansiedade (D). Animais enriquecidos apresentam redução no número de cruzamentos no LCE, independente da exposição ao ECI (C). Dados analisados por GLM seguido por *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos como média±EPM ($n = 10-15$ /grupo), com * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo NE-NS; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo NE-ECI; e T $p < 0,05$ quando comparado ao grupo EA-NS.

4.1.3. Caixa Claro-Escuro (CCE)

Além do LCE, comportamentos relacionados à ansiedade foram avaliados também por meio da CCE. Foram analisados os seguintes parâmetros: tempo de permanência no lado claro (TLC) e número de transições entre os compartimentos da caixa. Em relação ao número de transições (Fig.13A), o GLM apontou efeito apenas das condições de alojamento [$F(1,50) = 7,43$, $p = 0,009$], sem efeito do ECI isolado [$F(1,50) = 0,203$, $p = 0,654$] ou da interação entre os fatores [$F(1,50) = 0,037$, $p = 0,849$]. O GLM não apontou efeitos significativos das condições de alojamento [$F(1,50) = 1,814$, $p = 0,184$], exposição ao ECI [$F(1,50) = 3,498$, $p = 0,067$] e da interação entre os fatores [$F(1,50) = 0,307$, $p = 0,582$] no TLC (Fig.13B).

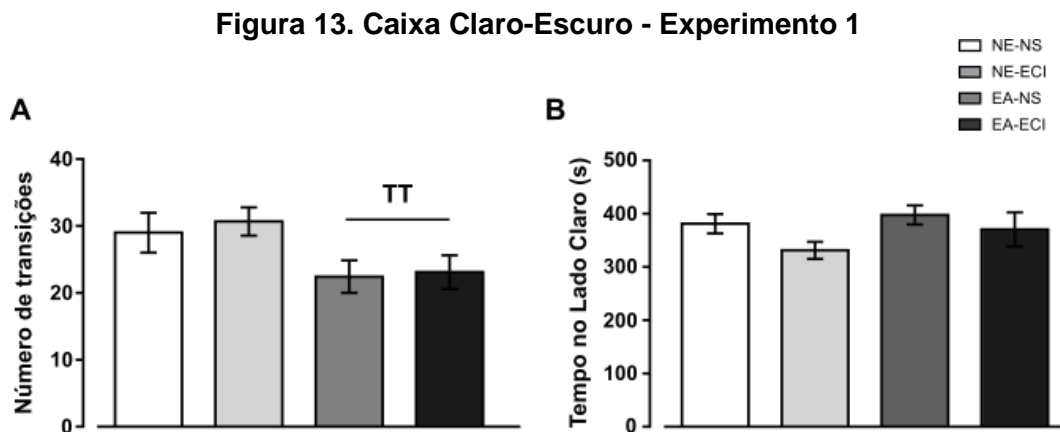


Figura 13. Efeitos do EA e do ECI no comportamento tipo-ansioso na CCE. Animais alojados em EA apresentaram diminuição no número de transições independente da exposição ao ECI (A). Não foram observadas diferenças significativas no TLC (B). Dados analisados por GLM seguido por *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos como média±EPM ($n = 10-15$ /grupo), com ^{TT} $p < 0,05$ quando comparado a grupos não enriquecidos.

4.2. Experimento 2: Tratamento com inibidor de metilação reverteu o comportamento tipo-ansioso em animais expostos ao EA e ECI

4.2.1. Teste do Campo Aberto

Em relação à distância total percorrida no TCA, o GLM apontou apenas efeito significativo do grupo [$F(3,94) = 10,17$, $p < 0,001$], sem efeito do tratamento [$F(1,94) = 1,319$, $p = 0,254$] ou da interação grupo x tratamento [$F(3,94) = 0,716$, $p = 0,544$]. Na distância percorrida na periferia foi observado um padrão semelhante: efeito significativo de grupo [$F(3,94) = 11,17$, $p < 0,001$] e tratamento [$F(1,94) = 7,603$, $p = 0,007$], sem interação entre os fatores [$F(3,94) = 0,498$, $p = 0,684$].

O *post hoc* de Bonferroni indicou que o grupo EA-NS apresentou menor atividade locomotora total, independente do tratamento, quando comparado aos grupos NE-NS ($p = 0,018$), NE-ECI ($p < 0,001$) e EA-ECI ($p = 0,008$; Fig. 14A). Um Padrão semelhante foi observado na distância percorrida na periferia: o grupo EA-NS diferiu de NE-NS ($p = 0,013$), NE-ECI ($p < 0,001$) e EA-ECI ($p = 0,002$; Fig. 14B).

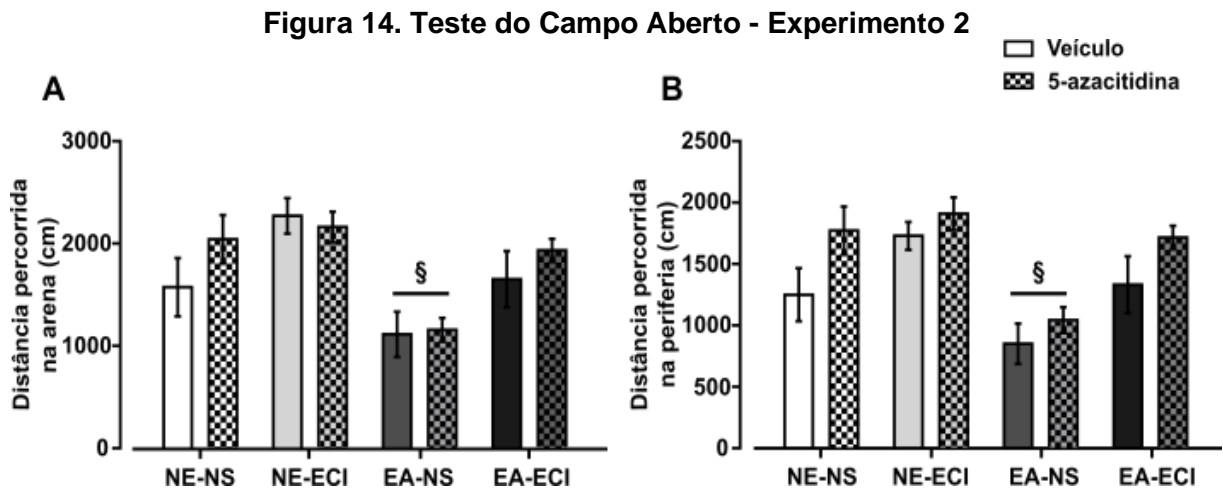


Figura 14. Efeitos da administração de 5 aza-C na atividade locomotora de animais expostos a EA, ECI ou à combinação de ambos. Animais não estressados alojados em enriquecimento ambiental (EA-NS) apresentaram diminuição da atividade locomotora quando comparados a todos os outros grupos em campo aberto: distância total percorrida (A); distância percorrida na periferia (B). Dados analisados por GLM seguido por *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos como média \pm EPM ($n = 9-16$ /grupo), com § $p < 0.05$ quando comparado ao grupo NE-ECI.

4.2.2. Labirinto em Cruz Elevado

Na %EBA, o GLM mostrou efeitos significativos do grupo [$F(3,94) = 8,760$; $p < 0,001$] e da interação grupo x tratamento [$F(3,94) = 3,839$, $p = 0,01$], sem efeito do tratamento isolado [$F(1,94) = 3,252$, $p = 0,075$]. Um resultado semelhante foi encontrado em relação à %TBA: houve efeito significativo do grupo [$F(3,94) = 6,907$; $p < 0,001$] e da interação grupo x tratamento [$F(3,94) = 3,257$; $p = 0,025$], sem efeito do tratamento isolado [$F(1,94) = 3,226$, $p = 0,076$]. No número de transições totais, houve efeito significativo tanto do grupo [$F(3,94) = 29,58$, $p < 0,001$], quanto do tratamento [$F(1,94) = 9,915$, $p = 0,002$], bem como da interação grupo x efeito [$F(3,94) = 2,734$, $p = 0,048$]. No índice de ansiedade (Fig. 5F), foi observado efeito significativo do grupo [$F(3,94) = 8,069$, $p < 0,001$], tratamento [$F(1,94) = 61,61$, $p < 0,001$] e interação grupo x tratamento [$F(3,94) = 2,987$, $p = 0,035$].

Figura 15. Labirinto em Cruz Elevado - Experimento 2

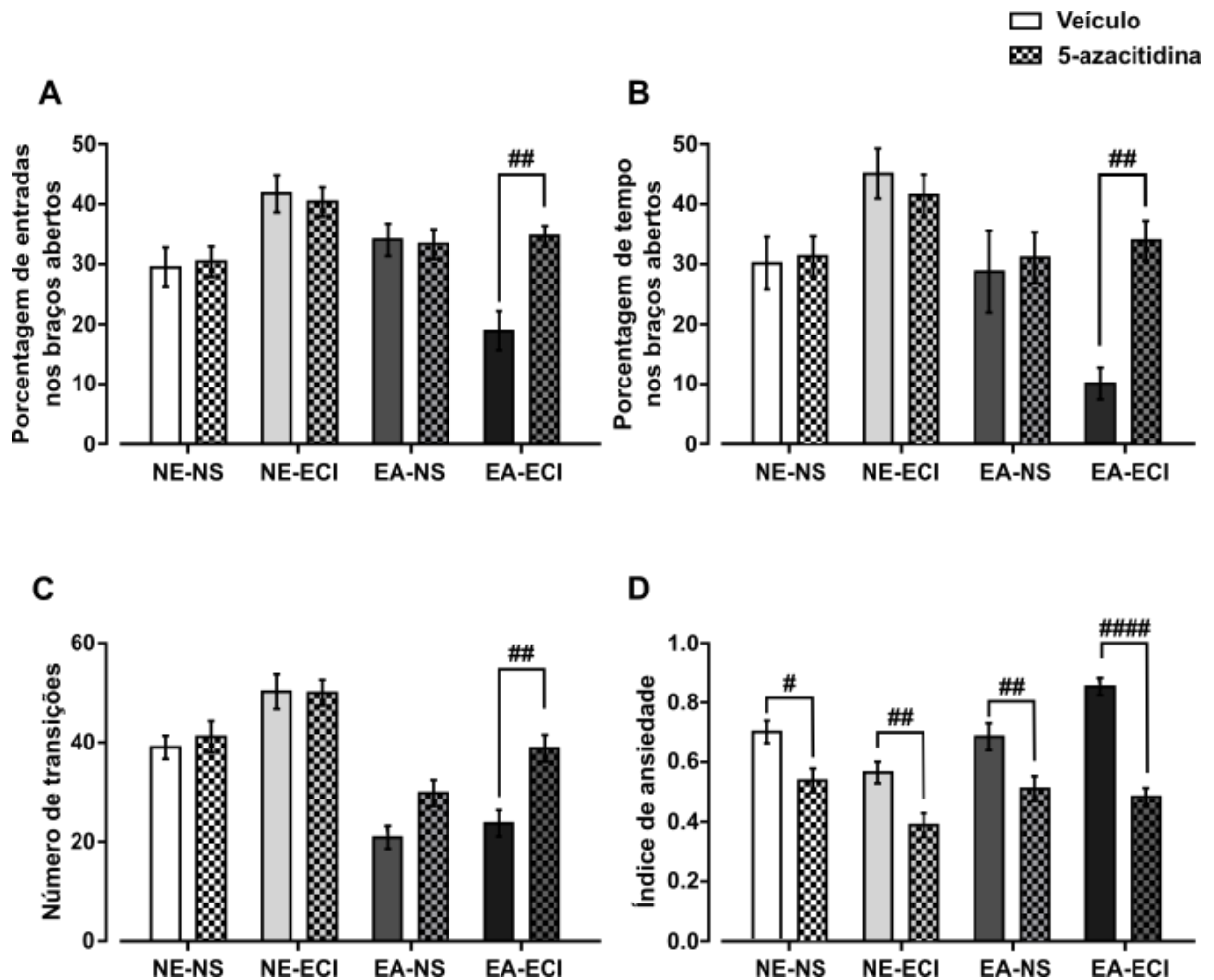


Figura 15. Efeitos da administração de 5 aza-C no comportamento tipo-ansioso de animais expostos ao EA, ECI ou à combinação de ambos no teste do LCE. O grupo EA-ECI tratado 5-azaC demonstrou aumento na %EBA (A), %TBA (B) e número de transições (C) quando comparado ao grupo EA-ECI não tratado. O tratamento com 5-azaC diminuiu o índice de ansiedade, independentemente do grupo (D). Dados analisados por GLM seguido por *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos como média±EPM ($n = 9-16/\text{grupo}$), com $*p < 0.05$ and $****p < 0.0001$ quando comparado ao grupo NE-NS, e $\#p < 0.05$, $##p < 0.01$, e $####p < 0.0001$ quando comparado a si mesmo tratado com veículo.

O *post hoc* de Bonferroni revelou que o grupo EA-ECI exibiu aumento nas %EBA (Fig. 15A) e %TBA (Fig. 15B) após tratamento com 5-azaC quando comparado ao grupo tratado com veículo ($p = 0,001$ e $p = 0,003$, respectivamente). A análise *post hoc* demonstrou que o grupo enriquecido estressado (EA-ECI) apresentou maior número de transições após o tratamento com 5-azaC quando comparado ao grupo tratado com veículo ($p = 0,002$; Fig. 15C). Além disso, o tratamento com 5-azaC reduziu os índices de ansiedade (Fig. 15D) em todos os grupos tratados: NE-NS ($p = 0,027$), NE-ECI ($p = 0,01$), EA-NS ($p = 0,004$) e EA-ECI ($p < 0,001$) (Fig. 15D).

4.2.3. Caixa Claro-Escuro (CCE)

Na CCE, foi observado efeito significativo apenas do grupo no número de transições entre os compartimentos [F (3,94) = 4,619, p = 0,005] e no tempo gasto do lado claro [F (3,94) = 5,694, p = 0,001]. Não houve efeito do tratamento [F (1,94) = 1,152, p = 0,285] ou da interação grupo X tratamento [F (1,94) = 0,579, p = 0,448] no tempo gasto no lado claro; ou no número de transições na CCE [F (3,94) = 0,400, p = 0,753; F (3,94) = 0,800, p = 0,497, respectivamente]. A análise *posthoc* indicou menor número de transições do grupo EA-NS quando comparado ao grupo NE-ECI independente do tratamento (p < 0.05; Fig. 16A) e um menor TLC por parte do grupo EA-NS tratado com 5-azaC quando comparado aos grupos NE-ECI tratado com veículo (p < 0.01) e tratado com 5-azaC (p < 0.05; Fig. 16B).

Figura 16. Caixa Claro-Escuro - Experimento 2

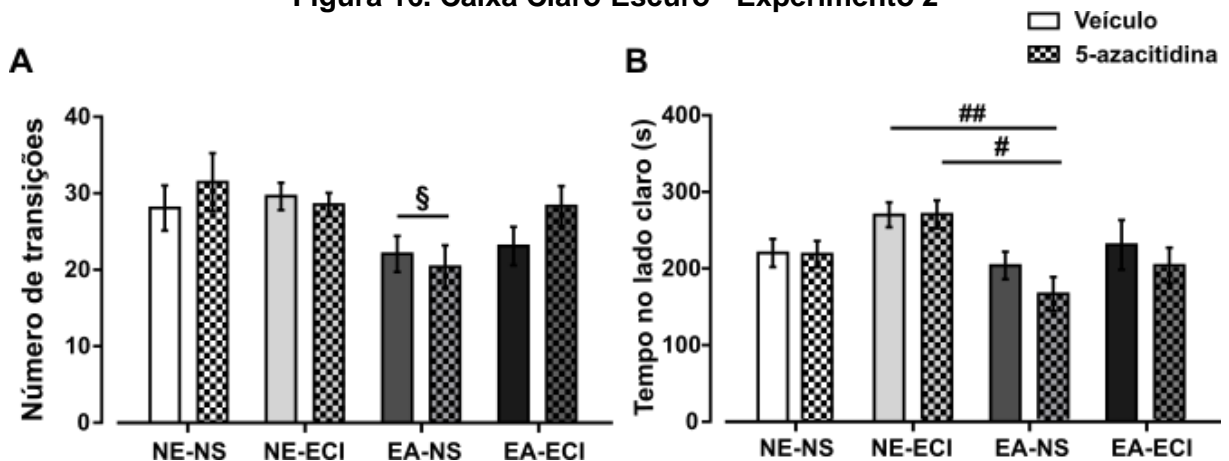


Figura 16. Efeitos da administração de 5-aza-C no comportamento tipo-ansioso de animais expostos ao EA, ECI ou à combinação de ambos no teste da CCE. O tratamento com 5-azaC não alterou significativamente o número de transições (A) nem o tempo no lado claro na CCE (B). Dados analisados por GLM seguido por *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos como média±EPM (n=9-16/grupo), com §p < 0.05 quando comparado aos grupos NE-ECI, #p < 0.05 quando comparado ao grupo NE-ECI tratado com 5-azaC e ##p < 0.01 quando comparado ao grupo NE-ECI tratado com veículo.

4.3. Efeito do EA em parâmetros bioquímicos e epigenéticos de animais submetidos ao ECI

4.3.1. EA de longo prazo, mas não ECI ou a coexposição de EA e ECI aumentam as concentrações plasmáticas de corticosterona

Para investigar o efeito de EA, ECI e sua interação na liberação de corticosterona, as concentrações séricas desse hormônio foram medidos em três momentos, conforme descrito previamente (PND49, PND70 e PND82). Considerando

a variância individual, as concentrações plasmáticas de corticosterona foram calculados como variação percentual da linha de base (PND49 – dados não mostrados). O GLM de medidas repetidas indicou efeito significativo de grupo [F (3,24) = 8,748, $p < 0,001$], tempo [F (1,24) = 9,807, $p = 0,004$] e interação grupo x tempo [F (3, 24) = 5,811, $p = 0,004$]. O *post hoc* de Bonferroni indicou que o grupo EA-NS teve aumento nas concentrações de corticosterona ao longo do tempo (PND70 x PND82: $p < 0,001$). Além disso, o mesmo grupo apresentou concentrações mais elevadas de corticosterona no PND82 quando comparado aos grupos NE-NS ($p < 0,001$), NE-ECI ($p < 0,001$) e EA-ECI ($p < 0,001$) (Fig.17).

Figura 17. Corticosterona Plasmática - Experimento 2

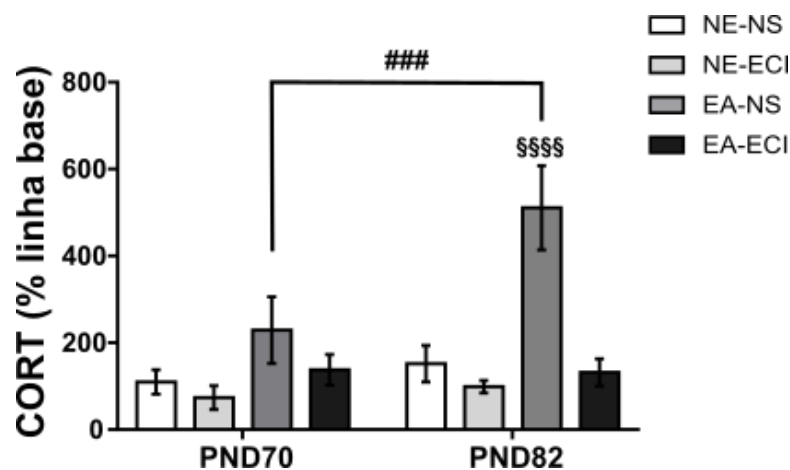


Figura 17. Efeito do EA de longo prazo na presença ou ausência de ECI nas concentrações de corticosterona plasmática. O EA de longo prazo aumenta a liberação de corticosterona, enquanto o ECI não teve efeito. Animais não estressados alojados em EA (EA-NS) exibiram aumento nas concentrações de corticosterona no PND82 quando comparados a todos os outros grupos no mesmo dia e quando comparados a si mesmos no PND70. Dados analisados por GLM para medidas repetidas seguido por *post hoc* de Bonferroni. Valores expressos como média±EPM ($n = 7$ /grupo), com \$\$\$\$ $p < 0,0001$ quando comparado a todos os outros grupos no PND82 e ### $p < 0,001$ quando EA-NS é comparado a ele mesmo no PND70.

4.3.2. EA, ECI e sua combinação modulam diferentemente a expressão de *Bdnf* no córtex pré-frontal

A fim de se avaliar efeito do EA, ECI e sua interação na expressão gênica de *Bdnf* no CPF, foram escolhidos 5 éxons da região promotora: I, II, IV, VI e IX (duas seqüências: IX-1 e IX-2). O teste de Kruskal-Wallis mostrou efeito do grupo para a expressão de *Bdnf* em todos os éxons examinados: éxon I [$\chi^2 (3) = 41,225$, $p < 0,001$]; éxon II [$\chi^2 (3) = 25,198$, $p < 0,001$]; éxon IV [$\chi^2 (3) = 48,028$, $p < 0,001$], éxon VI [$\chi^2 (3) = 33,093$, $p < 0,001$]; éxon IX *primer 1* [$\chi^2 (3) = 33,413$, $p < 0,001$] e éxon IX *primer 2*

[$\chi^2(3) = 37,041, p < 0,001$]. O teste de comparações múltiplas de Dunn demonstrou várias diferenças entre os grupos, a depender do éxon (Figura 18; tabela 2).

Figura 18. Expressão gênica dos diferentes éxon do gene do *Bdnf* no CPF

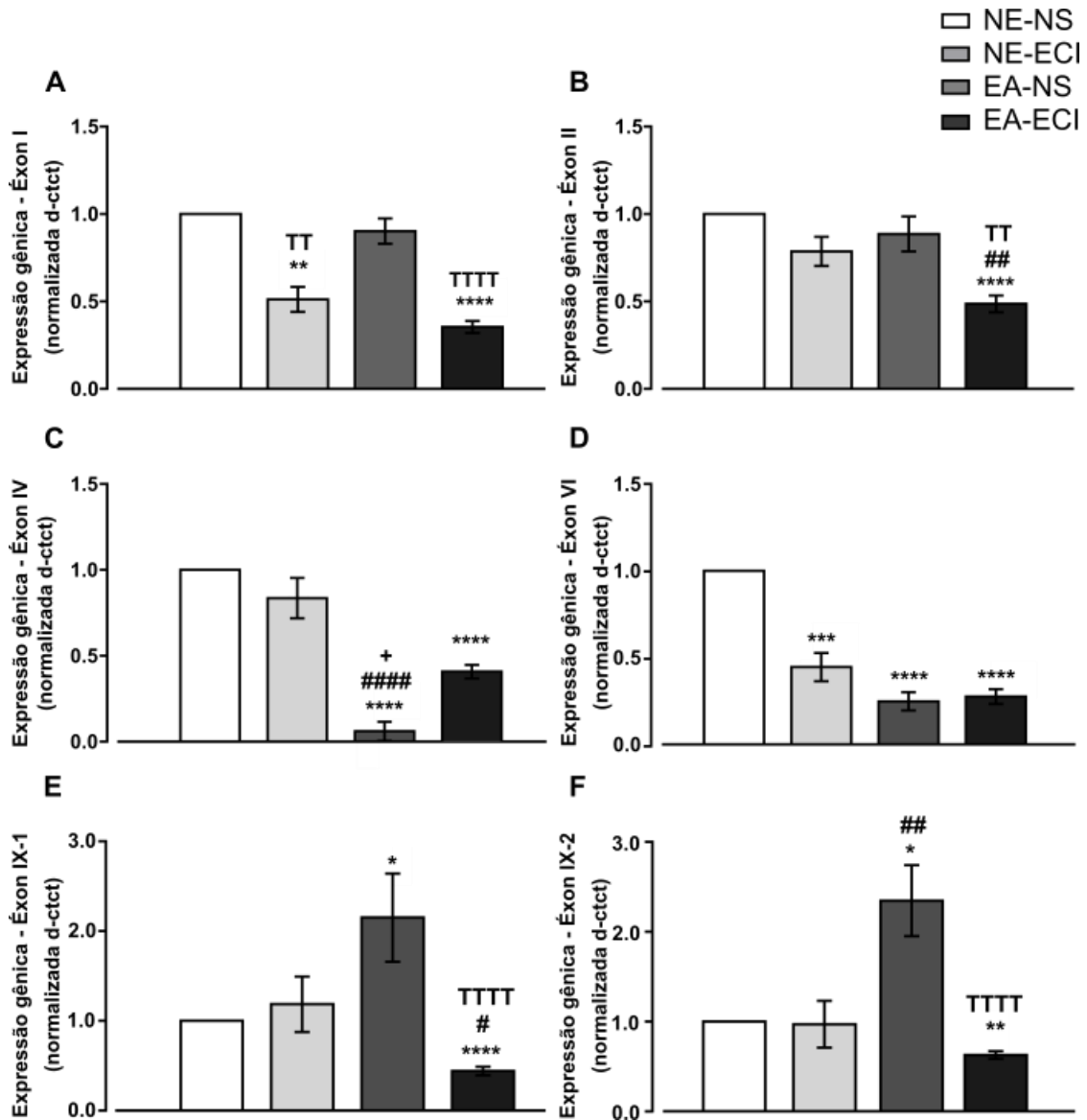


Fig18. EA, ECI ou sua combinação modulam diferencialmente a expressão de *Bdnf* no CPF de maneira éxon-específica. Para o éxon I, os grupos estressados (NE-ECI e EA-ECI) apresentaram diminuição na expressão gênica quando comparados aos grupos não-estressados NE-NS e EA-NS (A). Para o éxon II, apenas o grupo EA-ECI apresentou menor expressão quando comparado a todos os outros grupos (B). Para o éxon IV, o grupo EA-NS apresentou redução da expressão gênica quando comparado a todos os outros grupos, enquanto o grupo EA-ECI teve a expressão do éxon diminuída apenas em relação ao controle NE-NS (C). Para o éxon VI, os grupos NE-ECI, EA-NS e EA-ECI apresentaram menor expressão quando comparados ao NE-NS (D). Para o éxon IX, enquanto o grupo EA-NS apresentou aumento na expressão gênica, o grupo EA-ECI apresentou diminuição na expressão para ambas as partes 1 (E) e 2 (F). Dados analisados por Análise de Variância de Kruskal-Wallis seguido por *post hoc* de Dunn. Valores expressos como média±EPM (n = 8-18/grupo), com *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001 quando comparado ao grupo NE-NS; #p < 0,05, ##p < 0,01 e ####p < 0,0001 quando comparado com NE-ECI; TTp < 0,01 e TTTp < 0,0001 quando comparado ao grupo EA-NS; e +p < 0,05 quando comparado ao grupo EA-ECI.

Tabela 2. Expressão gênica de *Bdnf* no CPF (Teste de Dunnett)

Éxon	NE-NSxNE-ECI	NE-NSxEA-NS	NE-NSxEA-ECI	NE-ECIxEA-NS	NE-ECIxEA-ECI	EA-NSxEA-ECI
Éxon I	p = 0.002	NS	p < 0.001	p = 0.003	NS	p < 0.001
Éxon II	NS	NS	p < 0.001	NS	p = 0.005	p = 0.003
Éxon IV	NS	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	NS	p = 0.047
Éxon VI	p = 0.001	p < 0.001	p < 0.001	NS	NS	NS
Éxon IX Primer 1	NS	p = 0.049	p < 0.001	NS	p = 0.043	p < 0.001
Éxon IX Primer 2	NS	p = 0.049	p = 0.003	p = 0.001	NS	p < 0.001

Valores de $p > 0.05$ foram aceitos como não-significativos (NS)

4.3.3. O status de metilação do éxon IX do *Bdnf* não foi afetado pelo EA, ECI ou sua combinação

A redução na expressão em todos éxons do *Bdnf* pelo grupo EA-ECI levantou a hipótese da metilação do DNA estar envolvidas na repressão gênica. Em roedores, o éxon IX do *Bdnf* é conhecido por ser o codificador entre nove éxons (De Vincenti et al., 2019). Considerando o aumento da expressão gênica do éxon IX pelo grupo EA-NS e redução da expressão pelo grupo EA-ECI, este éxon foi escolhido como alvo de investigação do perfil de metilação de sítios de ilhas CpG. Devido à extensa sequência deste éxon, a região alvo foi dividida em 3 sequências distintas, com 7, 5 e 5 ilhas CpG respectivamente, analisadas com *primers* específicos: Sequência 1 (S1): AGGTATTTGATTGTTGAGTA; Sequência 2 (S2): GTTTAAAAGTGTTAGTTAGTGAT; Sequência 3 (S3): TGGGTAGGTTAAGTTG). A análise de Kruskal-Wallis não revelou diferenças na % de metilação do éxon IX, independente do grupo (tabela 3; Fig 19).

Tabela 3. % Metilação em diferentes sequências do éxon IX de *Bdnf* (Kruskal-Wallis)

Ilha CpG	Sequência 1	Sequência 2	Sequência 3
Ilha CpG 1	$\chi^2(3) = 1,143; p = 0,767$	$\chi^2(3) = 3,372; p = 0,338$	$\chi^2(3) = 3,182; p = 0,364$
Ilha CpG 2	$\chi^2(3) = 0,759; p = 0,859$	$\chi^2(3) = 2,253; p = 0,521$	$\chi^2(3) = 0,396; p = 0,941$
Ilha CpG 3	$\chi^2(3) = 0,42; p = 0,936$	$\chi^2(3) = 0,893; p = 0,827$	$\chi^2(3) = 2,826; p = 0,419$
Ilha CpG 4	$\chi^2(3) = 5,187; p = 0,159$	$\chi^2(3) = 2,167; p = 0,538$	$\chi^2(3) = 0,039; p = 0,998$
Ilha CpG 5	$\chi^2(3) = 0,862; p = 0,835$	$\chi^2(3) = 2,279; p = 0,517$	$\chi^2(3) = 3,385; p = 0,336$
Ilha CpG 6	100% metilação nos grupos		
Ilha CpG 7	$\chi^2(3) = 3,547; p = 0,351$		

Figura 19. Metilação em ilhas CpG de 3 diferentes seqüências do éxon IX de *Bdnf*

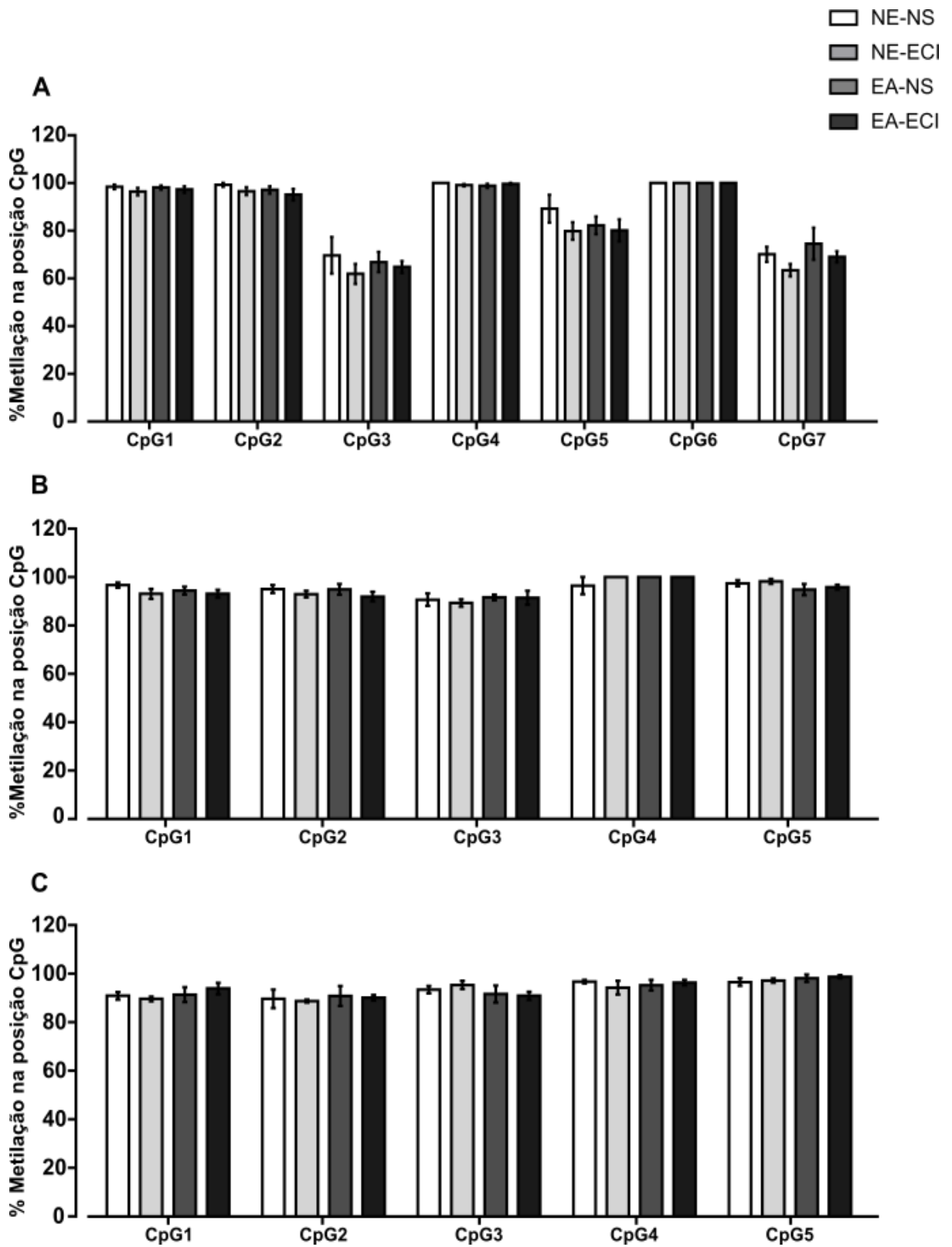


Figura 19. A metilação do éxon IX do *Bdnf* não foi afetada pelo EA, ECI ou sua combinação. Em todas as seqüências analisadas: S1 (A); S2 (B) e S3 (C) não foram observadas diferenças na metilação do éxon IX do *Bdnf*. Dados analisados por Análise de Variância de Kruskal-Wallis seguido por *post hoc* de Dunn. Valores expressos como média±EPM (n = 6/grupo).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que a exposição concomitante ao enriquecimento ambiental (EA) e estresse crônico imprevisível (ECI) precipita um comportamento tipo-ansioso, em vez de exercer um efeito protetor, acompanhado pela redução da expressão do gene do *Bdnf* no córtex pré-frontal, nos diferentes éxons avaliados. Além disso, a inibição da metilação do DNA com 5-azacitidina reverteu esse comportamento tipo-ansioso, sugerindo que o efeito ansiogênico da exposição combinada EA e ECI é, ainda que parcialmente, impulsionado por modificações epigenéticas. No entanto, a falta de alterações na metilação em ilhas CpG do éxon IX em resposta à exposição combinada do EA e ECI indica que o mecanismo subjacente à resposta de supressão do comportamento tipo-ansioso pode não envolver especificamente a modificação epigenética de metilação no DNA do *Bdnf*, pelo menos no éxon IX.

Nossos dados indicam que o EA *per se* reduziu a atividade locomotora espontânea no teste de campo aberto. Foi visto ainda que animais submetidos ao EA demonstraram menos transições no labirinto em cruz elevado e na caixa claro-escuro. Esses dados são apoiados por vários estudos que mostram níveis mais baixos de locomoção em animais enriquecidos (BAKER et al., 2018; BRENES; PADILLA; FORNAGUERA, 2009; GEHRKE; CASS; BARDO, 2006; LÜ et al., 2012; PIETROPAOLO et al., 2004; RADLEY et al., 2004; VAN WAAS; SOFFIÉ, 1996). Essa redução pode ser atribuída a uma habituação, exploração e processamento mais rápidos da novidade por animais enriquecidos (BRENES; PADILLA; FORNAGUERA, 2009; VARTY et al., 2000; ZIMMERMANN et al., 2001), uma vez que ambientes com elevada complexidade de estímulos são conhecidos por estarem ligados à melhora da aprendizagem e memória (SCHRIJVER et al., 2002).

Apesar das evidências de que o EA protege contra o estresse psicossocial (LEHMANN; HERKENHAM, 2011; SCHLOESSER et al., 2010), o presente estudo indica que a exposição concomitante ao EA e ao ECI, mas não ao ECI isolado, desencadeou uma resposta comportamental semelhante à ansiedade. Esses achados são bastante surpreendentes, uma vez que o estresse crônico está amplamente relacionado ao desenvolvimento de comportamentos depressivos e de ansiedade (DE ANDRADE et al., 2013; ELIZALDE et al., 2010; LIU et al., 2020; VENZALA et al., 2012, 2013; ZHU et al., 2011) e o EA tem sido amplamente associado à melhoria de

comportamentos tipo-ansiosos relacionados ao estresse (DANDI et al., 2018). No estudo de Dandi et al. (2018), contudo, a exposição ao EA ocorreu após o estresse, enquanto em nosso estudo a exposição a ambas as condições ambientais (EA e ECI) foi simultânea.

Um estudo realizado em *zebrafish* com um protocolo semelhante de exposição simultânea ao EA e ECI, sugeriu que animais não estressados expostos ao EA estariam mais ansiosos do que animais estressados, provavelmente devido à novidade do ambiente (MARCON et al., 2018). De fato, ambientes complexos podem ser considerados como estresse crônico leve, uma vez que os animais são repetidamente desafiados com uma variedade de estímulos (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2015). Além disto, a exposição contínua ao EA foi associada a comportamento tipo-ansioso em camundongos expostos repetidamente a ciclos de consumo e abstinência de etanol (MARIANNO; ABRAHAO; CAMARINI, 2017). Assim, pode-se supor que a combinação de um estresse leve contínuo induzido pelo EA à exposição a um protocolo de ECI pode ter induzido uma sobrecarga de estresse, resultando em aumento do índice de ansiedade, em vez de induzir resiliência ao animal. Um estudo recente mostrou que a exposição a um estresse repetido curto previsível promoveu resistência ao comportamento tipo-ansioso e um efeito protetor na morfologia encefálica, evidenciado por aumento de espinhas dendríticas no hipocampo e CPF (REGINA DE MELO et al., 2020). Portanto, as mudanças comportamentais resultantes de eventos estressores não seguem um padrão único, mas sim dependem de uma série de fatores relacionados ao estresse, como por exemplo, sua previsibilidade.

Embora modelos de estresse crônico sejam constantemente relacionados à atividade prolongada do eixo HPA e liberação sustentada de corticosterona (HAUGER et al., 1990; KEENEY; HOGG, 1999; KEENEY et al., 2006; KEENEY; HOGG; MARSDEN, 2001), no presente estudo, os animais submetidos ao ECI, independente das condições de alojamento, não apresentaram alteração nas concentrações de corticosterona. Esses dados, no entanto, estão de acordo com estudos anteriores que mostram que não houve alteração nas concentrações de corticosterona em animais alojados em grupo ou isolados submetidos a estresse de contenção (SCHRIJVER et al., 2002).

Evidências sugerem que em modelos animais, a resposta da corticosterona ao estresse depende da natureza, gravidade e duração da exposição ao estresse. Já

foi demonstrado que estresse social repetido diminui as concentrações de corticosterona (BHATNAGAR; VINING, 2003). Além disso, ratos estressados por 3 meses secretaram quantidades menores de corticosterona (BURCHFIELD; WOODS; ELICH, 1980) e exibiram uma resposta atenuada de corticosterona ao LCE (novo ambiente) após 4 e 7 dias de recuperação do estresse (OSTRANDER et al., 2006).

Enquanto animais sob estresse agudo mostram concentrações elevadas de corticosterona sustentadas por 5 h, animais submetidos a estresses subcrônicos ou crônicos exibem secreção diminuída de corticosterona ao longo do tempo (MIZOGUCHI et al., 2001). Em geral, animais expostos a estresses leves repetidos tendem a exibir uma atenuação nas respostas da corticosterona (BARNUM; BLANDINO; DEAK, 2007), enquanto a exposição crônica a estressores graves pode induzir uma sensibilização das concentrações de corticosterona (PITMAN; OTTENWELLER; NATELSON, 1990). Portanto, é provável que o ECI tenha levado a um estado adaptativo no eixo HPA, aumentando o feedback negativo para a liberação de corticosterona ao longo do tempo. Além disso, aumentos nas concentrações de corticosterona induzidos por estresse parecem ter uma relação com mudanças na morfologia dendrítica do CPF. Por exemplo, o estresse aumenta a densidade de espinhas dendríticas na amígdala (KOLB et al., 2017), mas diminui no hipocampo (SOUSA et al., 2000) e no córtex pré-frontal (COOK; WELLMAN, 2004).

A exposição contínua a condições de EA em animais não estressados (EANS), aumentou as concentrações de corticosterona ao final do protocolo (PND82). Conforme mencionado, as concentrações de corticosterona e o estresse não estão necessariamente em sintonia. Aumentos nas concentrações de corticosterona foram descritos tanto na atividade sexual quanto na derrota social (BUWALDA et al., 2012) sugerindo que concentrações elevadas de corticosterona nem sempre significam resultados negativos. Estímulos agradáveis e recompensadores como o exercício voluntário também aumentam as concentrações de corticosterona e o peso da glândula adrenal (DROSTE et al., 2003). Alguns estudos mostram efeitos positivos promovidos por experiências estressoras, como um estado de resiliência (SUO et al., 2013). Esse resultado paradoxal ocorre porque as respostas morfológicas encefálicas e as respostas hormonais dependem do tipo de estresse, duração da exposição, idade de exposição e sexo.

Nossos achados corroboram estudos anteriores que mostram que o EA aumenta a secreção de corticosterona (MCQUAID et al., 2013a; VAN LOO et al.,

2002). Embora a manutenção da novidade seja necessária para o paradigma do EA, mudanças frequentes no ambiente também podem causar um estresse crônico (*National Research Council*, 2011). Além disso, não se deve descartar a hipótese da instabilidade hierárquica que pode se desenvolver em ambientes enriquecidos (MCQUAID; AUDET; ANISMAN, 2012), o que pode levar a mais feridas (MCQUAID et al., 2018), comportamento tipo-ansioso (MCQUAID et al., 2013b), dominância territorial (HAEMISCH; VOSS; GÄRTNER, 1994; PIETROPAOLO et al., 2004) e comportamento agressivo (HOWERTON; GARNER; MENCH, 2008; MARASHI et al., 2003). Todos estes fatores em conjunto podem ter contribuído para o aumento da corticosterona no grupo EA.

A metilação do DNA tem sido amplamente associada ao estresse pré-natal e precoce (BLAZE et al., 2017b; BOERSMA et al., 2013; MURGATROYD et al., 2009; ROTH et al., 2009) e é considerada um marcador epigenético estável que pode persistir na idade adulta (MCGOWAN et al., 2009). Essa modificação epigenética regula a expressão gênica em resposta às experiências de vida (SZYF, 2013), incluindo o estresse, o que resulta em mudanças comportamentais (ELLIOTT et al., 2010). No presente trabalho, foi observado que a inibição da metilação do DNA com 5-azacitidina reverteu o comportamento tipo-ansioso, sugerindo que o efeito ansiogênico da exposição combinada EA e ECI é, pelo menos parcialmente, impulsionado por modificações epigenéticas.

Nossos achados estão de acordo com o estudo de Uchida et al. (2011), que demonstra reversão de comportamentos tipo-ansiosos e tipo-depressivos em camundongos submetidos a ECI após a administração de zebularina, um inibidor de DNA metiltransferase. Além disso, é bem conhecido que o estresse desencadeia alterações no padrão de metilação do DNA global ou gene-específico, o que tem sido amplamente associado ao desenvolvimento de fenótipos de transtornos mentais, como ansiedade (DONG et al., 2018), esquizofrenia (MATRISCIANO et al., 2013) e depressão (MELAS et al., 2012).

Estímulos ambientais induzem mudanças na estrutura da cromatina, a exemplo da metilação do DNA, alteração epigenética que pode promover adaptação do genoma a diferentes ambientes (SZYF, 2012). Dado o papel do *Bdnf* na regulação de psicopatologias relacionadas ao estresse e a suscetibilidade deste gene a sofrer metilação (ilhas CpG) e ter a atividade transcricional induzida/reprimida por estresse

e/ou estímulos ambientais, o *Bdnf* foi identificado como um alvo potencial para investigação de modificações epigenéticas induzidas pelo EA e pelo ECI.

Sabe-se que a transcrição do *Bdnf* pode ser regulada diferencialmente por intervenções ambientais e estressantes (ONISHCHENKO et al., 2008; ROTH et al., 2009, 2011; ZAJAC et al., 2010; ZHENG et al., 2016b). Portanto, um dos principais interesses deste estudo foi avaliar as alterações epigenéticas causadas por estímulos ambientais no *Bdnf*. Nesse contexto, o EA tem sido associado à modificações epigenéticas em diversos promotores do *Bdnf*, tais como II, IV e VI (GOMEZ-PINILLA et al., 2011; KUZUMAKI et al., 2011; NEELEY et al., 2011).

Na literatura, foi observada menor metilação do éxon I do *Bdnf* no soro de pacientes com transtorno depressivo maior (TDM) sob terapia eletroconvulsiva (KLEIMANN et al., 2015), associando a melhora dos sintomas depressivos à regulação positiva da transcrição de *Bdnf*. No presente estudo, foi demonstrado que o EA *per se* não afetou a expressão do éxon I, o que está de acordo com estudos anteriores (NEIDL et al., 2016). No entanto, foi encontrado um efeito geral do ECI, resultando na diminuição da expressão do éxon I de *Bdnf* no CPF, independentemente das condições de alojamento. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo a mostrar que há expressão diferencial de éxons de *Bdnf* no CPF de camundongos sob EA, ECI ou ambos. Estudos anteriores indicam, em geral, mudanças na expressão de éxons usando diferentes estressores e regiões do cérebro, principalmente o hipocampo.

Mostramos uma diminuição da expressão do RNAm do éxon I de *Bdnf* no CPF induzida pelo ECI. Outros estudos encontraram resultados na mesma direção, apesar das diferenças em relação ao tipo, duração do estresse e região encefálica. No estudo de Fuchikami et al. (2009), por exemplo, um único estresse de imobilização diminuiu os níveis de RNAm do éxon I no hipocampo. Além disso, camundongos submetidos a choques nas patas associados ao contexto apresentaram diminuição do RNAm do éxon I na área CA1 do hipocampo quando comparados aos controles (LUBIN; ROTH; SWEATT, 2008). Em contrapartida, o condicionamento aversivo levou a um aumento do RNAm do éxon I na amígdala (OU; GEAN, 2007; RATTINER; DAVIS; RESSLER, 2004) e no hipocampo de ratos previamente submetidos a um único estresse prolongado (FUCHIKAMI et al., 2010; TAKEI et al., 2011); além de também aumentar o RNAm deste éxon no CPF de camundongos após a extinção do medo condicionado (BREDY et al., 2007). Além disso, crises eletroconvulsivas aumentaram os níveis de RNAm do éxon I do *Bdnf* no córtex frontal de camundongos submetidos a um modelo

de depressão induzida por estresse crônico (MAYNARD et al., 2018). No entanto, embora esses estudos atribuam um papel importante do BDNF na fisiopatologia dos transtornos do humor, a dinâmica da expressão de *Bdnf* em relação ao "tempo de estimulação", localização dos receptores e natureza da sinalização deve ser levada em consideração ao se discutir terapias baseadas nessa neurotrofina (LARSEN et al., 2008).

Para o éxon II, o presente estudo encontrou menor expressão do RNAm apenas no grupo submetido concomitantemente ao EA e ECI (EA-ECI). Estudos mostram que camundongos submetidos a 21 dias de paradigma de etanol de livre escolha apresentam suprarregulação do éxon II do *Bdnf* (STRAGIER et al., 2015), enquanto o mesmo éxon sofreu infrarregulação na área tegmental ventral (VTA) de ratos expostos à administração crônica de morfina seguida de abstinência (KOO et al., 2015).

Por outro lado, embora no presente estudo o EA isolado não tenha afetado a expressão do éxon II do *Bdnf*, a presença de rodas de exercício já foi associada ao aumento nos níveis de RNAm deste éxon no hipocampo de camundongos (ZAJAC et al., 2010; ZHENG et al., 2016a). Além disso, foi visto que a atividade física voluntária de 12h é suficiente para promover um aumento no RNAm do éxon II na região CA1 do hipocampo de ratos (OLIFF et al., 1998). Ademais, ratos submetidos ao estresse de separação materna apresentaram aumento na expressão de RNAm do éxon II de *Bdnf* no hipocampo dorsal, mas não ventral, acompanhado por diminuição na expressão de proteínas na idade adulta (HILL et al., 2014). Esses dados sugerem que alterações dependentes da região cerebral, induzidas por estresse ou estímulos ambientais podem causar diferentes efeitos na expressão de *Bdnf*.

O éxon IV é apontado como um promotor particularmente importante para a transcrição de *Bdnf*. Camundongos com a transcrição de *Bdnf* conduzida pelo promotor IV seletivamente bloqueada (conhecidos como *knockin* para o éxon IV - KIV) apresentaram severa inibição da expressão de BDNF no CPF, o que foi associado a prejuízos na transmissão sináptica inibitória (SAKATA et al., 2009). Além disto, a redução na expressão do éxon IV do *Bdnf* após estresses crônicos já foi associada a prejuízos cognitivos (MARTIN et al., 2017). Os dados do presente trabalho indicaram diminuição significativa na expressão do RNAm do éxon IV principalmente no EA-NS, mas também no grupo EA-ECI, evidenciando o impacto do EA ao invés do estresse neste éxon.

Neste estudo, os grupos enriquecidos (EA-NS e EA-ECI) apresentaram diminuição na transcrição do éxon IV do *Bdnf*. Em contraste com nossos achados, foi demonstrado que o EA promove aumento no RNAm do éxon IV (ZAJAC et al., 2010). Além disso, o EA reverteu comportamentos tipo-depressivos e aumentou os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos KIV (JHA; DONG; SAKATA, 2011). É importante destacar, todavia, que o EA aumentou os níveis de BDNF no CPF de camundongos KIV, particularmente quando foi fornecido durante o desenvolvimento, desde o início da vida (DONG et al., 2018), apontando para um efeito dependente da idade na eficácia do EA na indução da expressão gênica. Os resultados deste trabalho sugerem que o EA levou à redução na transcrição do éxon IV do *Bdnf* no CPF, uma vez que esse gene é dinamicamente expresso durante o desenvolvimento e em resposta a insultos ambientais (DENNIS; LEVITT, 2005).

Interessantemente, não foi observado efeito do ECI na transcrição do éxon IV no CPF. A relação entre o estresse e a expressão do éxon IV de *Bdnf* ainda é bastante controversa. Vários estudos relacionam o estresse a uma infrarregulação significativa na expressão do éxon IV deste gene (BOERSMA et al., 2013; MARMIGÈRE et al., 2003; MARTIN et al., 2017; ROTH et al., 2011; SEO et al., 2018; SU et al., 2016; TAKEI et al., 2011; TSANKOVA et al., 2006); enquanto outros autores demonstraram que o estresse aumenta os níveis de RNAm deste éxon (GIVALOIS et al., 2001; HILL et al., 2014). Há ainda estudos que não encontraram diferenças nos níveis de RNAm do éxon IV na amígdala de ratos após o condicionamento aversivo (RATTINER; DAVIS; RESSLER, 2004).

Em relação ao éxon VI do gene do *Bdnf*, já foi demonstrado tanto que um único estresse de imobilização não altera a expressão desse éxon (FUCHIKAMI et al., 2009, 2010), quanto que a exposição a um contexto de condicionamento aversivo ou ao estresse pré-natal leva a um aumento na sua expressão no hipocampo (LUBIN; ROTH; SWEATT, 2008; NEELEY et al., 2011). Além disso, camundongos jovens demonstram maior expressão do éxon VI de *Bdnf* após o estresse, enquanto camundongos idosos não apresentam diferenças significativas (ADLARD; ENGESSER-CESAR; COTMAN, 2011). Em relação a condições ambientais, o EA não afetou a expressão do éxon VI no hipocampo de ratos idosos (NEIDL et al., 2016).

Animais sujeitos a estresse agudo apresentam aumento significativo apenas da expressão do éxon VI do *Bdnf* na região do hipocampo, indicando que este éxon é particularmente sensível a paradigmas estressantes (NEELEY et al., 2011). Em

contraste com esses estudos, os dados aqui apresentados mostram uma diminuição na expressão deste éxon no CPF em todos os grupos submetidos a estímulos, seja EA, ECI ou ambos. É provável que este achado de redução da expressão gênica do éxon VI seja devido ao protocolo de estresse utilizado, visto que o estresse crônico já foi associado à menor expressão deste éxon no hipocampo de camundongos (ADLARD; PERREAU; COTMAN, 2004). Além disso, animais submetidos a estresse pré-natal, quando submetidos a um estresse pós natal, apresentam diminuição nos transcritos do éxon VI no hipocampo (NEELEY et al., 2011). Os resultados deste trabalho sugerem, portanto, que entre todos os éxons do *Bdnf* analisados, o VI é o mais sensível às mudanças transcricionais por desafios ambientais.

O gene do *Bdnf* de camundongos consiste em oito éxons 5' não traduzidos (I-VIII) e um éxon 3' que codifica a proteína, o éxon IX (AID et al., 2007). O aumento da expressão do éxon IX já foi relatado em camundongos após estimulação por corrente contínua transcraniana, o que foi relacionado a uma melhora na potenciação de longo prazo (LTP, do inglês, *Long Term Potentiation*) do hipocampo, aprendizado e memória (PODDA et al., 2016). Em contrapartida, camundongos expostos à cocaína no período pré-natal apresentaram redução do RNAm do éxon IX hipocampal na idade adulta (KABIR et al., 2012).

Neste trabalho, foi encontrado aumento na expressão gênica do RNAm do éxon IX no CPF do grupo EA-NS em ambas as sequências analisadas. Por outro lado, a exposição ao EA concomitantemente ao ECI suprimiu profundamente a expressão desse éxon. Esse resultado corrobora os dados da literatura que mostram que camundongos jovens adultos expostos ao EA apresentam maior expressão do éxon IX do *Bdnf* no hipocampo (DONG; XUE; SAKATA, 2018). No mesmo estudo, foram detectados níveis mais elevados de RNAm do éxon IX no córtex frontal de animais KIV expostos ao EA no início da vida; além de maiores níveis de RNAm do éxon IX no hipocampo após 30 dias da retirada dos estímulos ambientais, sugerindo que os efeitos na expressão gênica mediados pelo EA podem ser de longo prazo (DONG; XUE; SAKATA, 2018).

Estudos prévios mostram que estresse por separação materna (SM) aumenta os níveis de RNAm do éxon IX de *Bdnf* hipocampal, enquanto a SM combinada com exercícios diminuiu esses níveis, sugerindo que a combinação de estímulos pode reduzir a expressão gênica de *Bdnf* (WEARICK-SILVA et al., 2017). Além disso, enquanto camundongos socialmente isolados criados em ambiente padrão exibem

níveis reduzidos de BDNF no CPF medial e hipocampo, camundongos socialmente isolados criados em ambiente enriquecido exibem aumento de BDNF no hipocampo (WANG et al., 2018). É importante destacar que apesar do EA ser amplamente relacionado ao aumento de BDNF em diversas áreas do encéfalo (FALKENBERG et al., 1992; GOBBO; O'MARA, 2004; ICKES et al., 2000; JURGENS; JOHNSON, 2012; MCQUAID et al., 2018; NOVKOVIC; MITTMANN; MANAHAN-VAUGHAN, 2015; ROSSI et al., 2006), esses estudos quantificaram apenas o BDNF total em vez de avaliar os promotores separadamente.

A metilação do DNA está envolvida no silenciamento da expressão gênica e da heterocromatina condensada (BIRD, 1992; KESHET; LIEMAN-HURWITZ; CEDAR, 1986) e parece ser um mecanismo importante na regulação da expressão de *Bdnf* (DENNIS; LEVITT, 2005). Considerando que o comportamento tipo-ansioso demonstrado pelos animais do grupo EA-ECI foi revertido após o tratamento com inibidor de metilação de DNA (5-azacitidina), e mecanismos epigenéticos parecem estar envolvidos nas alterações induzidas por estresse e EA na transcrição de *Bdnf* (FUCHIKAMI et al., 2010), formulou-se a hipótese de que o mecanismo subjacente às alterações induzidas pelo EA isolado e associado ao ECI na expressão do éxon IX de *Bdnf* no CPF poderia envolver alterações de metilação do DNA desse éxon.

Surpreendentemente, apesar do aumento nos níveis de RNAm do éxon IX nos animais do grupo EA-NS, o que foi embotado pela combinação EA-ECI, as três sequências analisadas para metilação do DNA de *Bdnf* no respectivo éxon não mostraram diferenças significativas na porcentagem de metilação do DNA nas ilhas CpG investigadas. Portanto, é provável que a regulação da expressão de *Bdnf* não seja impulsionada por alterações na metilação do DNA, pelo menos no éxon IX. No entanto, vale ressaltar que os dados revelaram quase cem por cento de metilação em praticamente todas as ilhas CpG analisadas, sugerindo um efeito teto que talvez tenha impedido a detecção de diferenças na porcentagem de metilação do DNA.

Os resultados apresentados não excluem a possibilidade de que as alterações de metilação do DNA ocorram em outras ilhas CpG ou mesmo em outros éxons do *Bdnf*. Embora a metilação do DNA esteja geralmente ligada à infrarregulação da expressão gênica, estudos apontam para a ausência de metilação em ilhas CpG, apesar das mudanças nos níveis de proteína ou expressão de *Bdnf* induzida por estresse ou EA (DESARNAUD et al., 2008; ZAJAC et al., 2010). Portanto, é provável que o estado de metilação do DNA do éxon IX do *Bdnf* não esteja envolvido na

expressão diferencial do gene. Contudo, estudos adicionais são necessários para determinar o envolvimento da metilação do DNA de outros éxons na expressão de *Bdnf*.

Em conjunto, esses estudos atribuem um papel importante do *Bdnf* na fisiopatologia em transtornos neuropsiquiátricos. No entanto, a dinâmica da expressão do *Bdnf* em relação ao "ritmo de estimulação", localização dos receptores e natureza da sinalização (SEGAL, 2003) deve ser levada em consideração ao discutir terapias baseadas em estratégias relacionadas ao BDNF (LARSEN et al., 2008). Na verdade, o perfil específico de cada éxon distinto na expressão de *Bdnf* pode estar relacionado às funções individuais de cada éxon, especialmente no que diz respeito a alvos e vias intracelulares (CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010; SEGAL, 2003).

Os estudos a cerca do papel do BDNF em transtornos de ansiedade em modelos animais e em humanos são ainda inconsistentes (SULIMAN; HEMMINGS; SEEDAT, 2013). Da mesma forma, ainda que o EA seja um modelo que exerce efeitos benéficos sobre a fisiologia do estresse e do comportamento tipo-ansiedade, não havia estudos que avaliaram se esse modelo seria capaz de se contrapor aos efeitos do ECI.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou evidências substanciais de que o enriquecimento ambiental concomitante ao estresse crônico imprevisível desencadeia comportamento tipo-ansioso, o qual é revertido por um pré-tratamento com inibidor de metilação do DNA. Em animais não-tratados com o inibidor, este comportamento é acompanhado por uma redução marcante da expressão de *Bdnf* no CPF, sem afetar a metilação do DNA do éxon IX do gene. Juntos, esses achados lançam luz pela primeira vez no sentido de compreender a base molecular da complexa interação entre estresse e EA no comportamento, o que pode ter implicações no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento de psicopatologias relacionadas ao estresse. O envolvimento de mecanismos epigenéticos nesse contexto requer investigações mais aprofundadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLARD, Paul A.; ENGESSER-CESAR, Christie; COTMAN, Carl W. Mild stress facilitates learning and exercise improves retention in aged mice. **Experimental Gerontology**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 53–59, 2011. DOI: 10.1016/j.exger.2010.10.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2010.10.001>.

ADLARD, Paul A.; PERREAU, Victoria M.; COTMAN, Carl W. Chronic immobilization stress differentially affects the expression of BDNF mRNA and protein in the mouse hippocampus. **Stress and Health**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 175–180, 2004. DOI: 10.1002/smi.1022.

AHMADIAN, Afshin; EHN, Maria; HOBBER, Sophia. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 363, n. 1–2, p. 83–94, 2006. DOI: 10.1016/j.cccn.2005.04.038.

AHMADIAN, Afshin; GHARIZADEH, Baback; GUSTAFSSON, Anna C.; STERKY, Fredrik; NYRÉN, Pål; UHLÉN, Mathias; LUNDEBERG, Joakim. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 280, n. 1, p. 103–110, 2000. DOI: 10.1006/abio.2000.4493.

AID, TAMARA; KAZANTSEVA, ANA; PIIRSO, MARKO; PALM KAIA; TIMMUSK, Tonis. Mouse and Rat BDNF Gene Structure and Expression Revisited. **Journal of Neuroscience Research**, [S. l.], v. 3253, n. April, p. 3244–3253, 2007. DOI: 10.1002/jnr.

ALBERCA, C. D.; PAPALE, L. A.; MADRID, Andy; GIANATIEMPO, O. CÁNEPA, E. T.; ALISCH, R. S.; CHERTOFF, M. Perinatal protein malnutrition results in genome-wide disruptions of 5-hydroxymethylcytosine at regions that can be restored to control levels by an enriched environment. **Epigenetics**, [S. l.], v. 00, n. 00, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1080/15592294.2020.1841871. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1841871>.

ALDERBORN, Anders; KRISTOFFERSON, Anna; HAMMERLING, Ulf. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. **Genome Research**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 1249–1258, 2000. DOI: 10.1101/gr.10.8.1249.

ANTONIUK, Svitlana; BIJATA, Monika; PONIMASKIN, Evgeni; WLODARCZYK, Jakub. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 99, n. December 2018, p. 101–116, 2019. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.12.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.002>.

ARNSTEN, Amy F. T. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 410–422, 2009. DOI: 10.1038/nrn2648.

ASHOKAN, Archana; HEGDE, Akshaya; MITRA, Rupshi. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 69, p. 189–196, 2016. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2016.04.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.04.009>.

AYDEMIR, Omer; DEVECI, Artuner; TANELI, Fatma. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: A preliminary study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 261–265, 2005. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2004.11.009.

B.B., Johansson; A.-L., Ohlsson. Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. **Experimental Neurology**, [S. l.], v. 139, n. 2, p. 322–327, 1996. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L26228100> %0A<http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1996.0106>.

- BAI, Yin Yin et al. ProBDNF signaling regulates depression-like behaviors in rodents under chronic stress. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 41, n. 12, p. 2882–2892, 2016. DOI: 10.1038/npp.2016.100.
- BAKER, Elizabeth P.; MAGNUSON, Elliott C.; DAHLY, Ashley M.; SIEGEL, Jessica A. The effects of enriched environment on the behavioral and corticosterone response to methamphetamine in adolescent and adult mice. **Developmental Psychobiology**, [S. l.], v. 60, n. 6, p. 664–673, 2018. DOI: 10.1002/dev.21633.
- BANASR, M.; CHOWDHURY, G. M. I.; TERWILLIGER, R.; NEWTON, S. S.; DUMAN, R. S.; BEHAR, K. L.; SANACORA, G. Glial pathology in an animal model of depression: Reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 501–511, 2010. DOI: 10.1038/mp.2008.106.
- BANNISTER, Andrew J.; KOUZARIDES, Tony. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011. DOI: 10.1038/cr.2011.22. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- BARDO, M. T.; BEVINS, R. A. Conditioned place preference: What does it add to our preclinical understanding of drug reward? **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 153, n. 1, p. 31–43, 2000. DOI: 10.1007/s002130000569.
- BARNUM, C. J.; BLANDINO, P.; DEAK, Terrence. Adaptation in the corticosterone and hyperthermic responses to stress following repeated stressor exposure. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 632–642, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2007.01571.x.
- BARRIENTOS, R. M.; SPRUNGER, D. B.; CAMPEAU, S.; HIGGINS, E. A.; WATKINS, L. R.; RUDY, J. W.; MAIER, S. F. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. **Neuroscience**, [S. l.], v. 121, n. 4, p. 847–853, 2003. DOI: 10.1016/S0306-4522(03)00564-5.
- BAYAT, Mahnaz; SHARIFI, Mohammad Davood; HAGHANI, Masoud; SHABANI, Mohammad. Enriched environment improves synaptic plasticity and cognitive deficiency in chronic cerebral hypoperfused rats. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 119, p. 34–40, 2015. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2015.10.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.10.001>.
- BELKE, Terry W. Studies of Wheel-Running Reinforcement: Parameters of Herrnstein's (1970) Response-Strength Equation Vary With Schedule Order. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, [S. l.], v. 73, n. 3, p. 319–331, 2000. DOI: 10.1901/jeab.2000.73-319.
- BELZ, Emily E.; KENNEL, Jamilyn S.; CZAMBEL, R. Kenneth; RUBIN, Robert T.; RHODES, Michael E. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 76, n. 3–4, p. 481–486, 2003. DOI: 10.1016/j.pbb.2003.09.005.
- BERARDINO, Bruno G.; CHERTOFF, Mariela; GIANATIEMPO, Octavio; ALBERCA, Carolina D.; PRIEGUE, Rocío; FISZBEIN, Ana; LONG, Patrick; CORFAS, Gabriel; CÁNEPA, Eduardo T. Exposure to enriched environment rescues anxiety-like behavior and miRNA deregulated expression induced by perinatal malnutrition while altering oligodendrocyte morphology. **Neuroscience**, [S. l.], v. 408, p. 115–134, 2019. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.03.027. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.027>.
- BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetics**, [S. l.], v. 9, n. 16 REV. ISS., p. 2395–2402, 2000. DOI: 10.1093/hmg/9.16.2395.
- BEVINS, Rick A.; BARDO, Michael T. Conditioned increase in place preference by access to novel objects: Antagonism by MK-801. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 99, n. 1, p. 53–60, 1999. DOI: 10.1016/S0166-4328(98)00069-2.
- BHAGYA, Venkanna Rao; SRIKUMAR, Bettadapura N.; VEENA, Jayagopalan;

SHANKARANARAYANA RAO, Byrathnahalli S. Short-term exposure to enriched environment rescues chronic stress-induced impaired hippocampal synaptic plasticity, anxiety, and memory deficits. **Journal of Neuroscience Research**, [S. l.], v. 95, n. 8, p. 1602–1610, 2017. DOI: 10.1002/jnr.23992.

BHATNAGAR, Seema; VINING, Courtenay. Facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. **Hormones and Behavior**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 158–165, 2003. DOI: 10.1016/S0018-506X(02)00011-9.

BIRD, Adrian. The essentials of DNA methylation. **Cell**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 5–8, 1992. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90526-1.

BLAZE, Jennifer; ASOK, Arun; BORRELLI, Kristyn; TULBERT, Christina; BOLLINGER, Justin; RONCA, April E.; ROTH, Tania L. Intrauterine exposure to maternal stress alters Bdnf IV DNA methylation and telomere length in the brain of adult rat offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [S. l.], v. 62, n. March, p. 56–62, 2017. a. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2017.03.007.

BLAZE, Jennifer; ASOK, Arun; BORRELLI, Kristyn; TULBERT, Christina; BOLLINGER, Justin; RONCA, April E.; ROTH, Tania L. Intrauterine exposure to maternal stress alters Bdnf IV DNA methylation and telomere length in the brain of adult rat offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [S. l.], v. 62, n. December 2016, p. 56–62, 2017. b. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2017.03.007.

BOERSMA, Gretha J.; LEE, Richard S.; CORDNER, Zachary A.; EWALD, Erin R.; PURCELL, Ryan H.; MOGHADAM, Alexander A.; TAMASHIRO, Kellie L. Prenatal stress decreases Bdnf expression and increases methylation of Bdnf exon IV in rats. **Epigenetics**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 437–447, 2013. DOI: 10.4161/epi.27558.

BONDI, Corina O.; RODRIGUEZ, Gustavo; GOULD, Georgianna G.; FRAZER, Alan; MORILAK, David A. Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 320–331, 2008. DOI: 10.1038/sj.npp.1301410.

Bonne, O. et al. Corticotropin-releasing factor, interleukin-6, brain-derived neurotrophic factor, insulin-like growth factor-1, and substance P in the cerebrospinal fluid of civilians with posttraumatic stress disorder before and after treatment with paroxetine. **The Journal of clinical psychiatry**, 72(8), 1124–1128, 2011. <https://doi.org/10.4088/JCP.09m05106blu>

BOULLE, F. et al. Epigenetic regulation of the BDNF gene: Implications for psychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 584–596, 2012. DOI: 10.1038/mp.2011.107.

BRANCHI, Igor; KARPOVA, Nina N.; D'ANDREA, Ivana; CASTRÉN, Eero; ALLEVA, Enrico. Epigenetic modifications induced by early enrichment are associated with changes in timing of induction of BDNF expression. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 495, n. 3, p. 168–172, 2011. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.03.038. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2011.03.038>.

BREDY, Timothy W.; WU, Hao; CREGO, Cortney; ZELLHOEFER, Jessica; SUN, Yi E.; BARAD, Mark. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. **Learning and Memory**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 268–276, 2007. DOI: 10.1101/lm.500907.

BRENES, Juan C.; PADILLA, Michael; FORNAGUERA, Jaime. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 197, n. 1, p. 125–137, 2009. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.08.014.

BRENES, Juan C.; RODRÍGUEZ, Odir; FORNAGUERA, Jaime. Differential effect of

environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 89, n. 1, p. 85–93, 2008. DOI: 10.1016/j.pbb.2007.11.004.

BRENES SÁENZ, Juan Carlos; VILLAGRA, Odir Rodríguez; FORNAGUERA TRÍAS, Jaime. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 169, n. 1, p. 57–65, 2006. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.12.001.

BROWN, Sarah M.; HENNING, Shannon; WELLMAN, Cara L. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 1714–1722, 2005. DOI: 10.1093/cercor/bhi048.

BRUEL-JUNGERMAN, Elodie; LAROCHE, Serge; RAMPON, Claire. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 513–521, 2005. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.03875.x.

BURCHFIELD, Susan R.; WOODS, Stephen C.; ELICH, Matthew S. Pituitary adrenocortical response to chronic intermittent stress. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 297–302, 1980. DOI: 10.1016/0031-9384(80)90090-6.

BUWALDA, Bauke; SCHOLTE, Jan; DE BOER, Sietse F.; COPPENS, Caroline M.; KOOLHAAS, Jaap M. The acute glucocorticoid stress response does not differentiate between rewarding and aversive social stimuli in rats. **Hormones and Behavior**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 218–226, 2012. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2011.12.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.12.012>.

CAO, Lei; LIU, Xianglan; LIN, En Ju D.; WANG, Chuansong; CHOI, Eugene Y.; RIBAN, Veronique; LIN, Benjamin; DURING, Matthew J. Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition. **Cell**, [S. l.], v. 142, n. 1, p. 52–64, 2010. DOI: 10.1016/j.cell.2010.05.029. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.029>.

CHAPILLON, P.; MANNECHÉ, C.; BELZUNG, C.; CASTON, J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. **Behavior Genetics**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 41–46, 1999. DOI: 10.1023/A:1021437905913.

CHEUNG, Peter; TANNER, Kirk G.; CHEUNG, Wang L.; SASSONE-CORSI, Paolo; DENU, John M.; ALLIS, C. David. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 905–915, 2000. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80256-7.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A. W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 235–260, 2001. DOI: 10.1016/S0149-7634(01)00011-2.

CHRISTMAS, A. J.; MAXWELL, D. R. A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 17–29, 1970. DOI: 10.1016/0028-3908(70)90044-4.

COHEN, Hagit; MATAR, Michael A.; BUSKILA, Dan; KAPLAN, Zeev; ZOHAR, Joseph. Early Post-Stressor Intervention with High-Dose Corticosterone Attenuates Posttraumatic Stress Response in an Animal Model of Posttraumatic Stress Disorder. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 64, n. 8, p. 708–717, 2008. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.05.025.

COLEY, H. M.; SAFUWAN, N. A. M.; CHIVERS, P.; PAPACHARALBOUS, E.; GIANNOPOULOS, T.; BUTLER-MANUEL, S.; MADHURI, K.; LOVELL, D. P.; CROOK, T. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57 Kip2 is epigenetically regulated in carboplatin resistance and results in collateral sensitivity to the CDK inhibitor seliciclib in ovarian cancer. **British**

Journal of Cancer, [S. l.], v. 106, n. 3, p. 482–489, 2012. DOI: 10.1038/bjc.2011.566.

COLYN, L.; VENZALA, E.; MARCO, S.; PEREZ-OTAÑO, I.; TORDERA, R. M. Chronic social defeat stress induces sustained synaptic structural changes in the prefrontal cortex and amygdala. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 373, n. July, p. 112079, 2019. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112079. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112079>.

CONNOR, James R.; WANG, Edward C.; DIAMOND, Marian C. Increased length of terminal dendritic segments in old adult rats' somatosensory cortex: An environmentally induced response. **Experimental Neurology**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 466–470, 1982. DOI: 10.1016/0014-4886(82)90064-4.

COOK, Susan C.; WELLMAN, Cara L. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **Journal of Neurobiology**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 236–248, 2004. DOI: 10.1002/neu.20025.

CORTESE, Guiseppe P.; OLIN, Andrew; O'RIORDAN, Kenneth; HULLINGER, Rikki; BURGER, Corinna. Environmental enrichment improves hippocampal function in aged rats by enhancing learning and memory, LTP, and mGluR5-Homer1c activity. **Neurobiology of Aging**, [S. l.], v. 63, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.11.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.11.004>.

COVINGTON, Herbert E.; MICZEK, Klaus A. Intense cocaine self-administration after episodic social defeat stress, but not after aggressive behavior: Dissociation from corticosterone activation. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 183, n. 3, p. 331–340, 2005. DOI: 10.1007/s00213-005-0190-5.

CRAWLEY, Jacqueline; GOODWIN, Frederick K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 167–170, 1980. DOI: 10.1016/0091-3057(80)90067-2.

CROFTON, Elizabeth J.; ZHANG, Yafang; GREEN, Thomas A. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 49, p. 19–31, 2015. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.11.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.017>.

CRUSIO, Wim E. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 125, n. 1–2, p. 127–132, 2001. DOI: 10.1016/S0166-4328(01)00280-7.

CUNHA, Carla; ANGELUCCI, Andrea; D'ANTONI, Angela; DOBROSSY, Mate D.; DUNNETT, Stephen B.; BERARDI, Nicoletta; BRAMBILLA, Riccardo. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments. **Neurobiology of Disease**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 358–368, 2009. DOI: 10.1016/j.nbd.2008.11.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.004>.

CUNHA, Carla; BRAMBILLA, Riccardo; THOMAS, Kerrie L. A simple role for BDNF in learning and memory? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [S. l.], v. 3, n. February, p. 1–14, 2010. DOI: 10.3389/neuro.02.001.2010.

DANDI, Evgenia; KALAMARI, Aikaterini; TOULOUMI, Olga; LAGOUDAKI, Rosa; NOUSIOPOULOU, Evangelia; SIMEONIDOU, Constantina; SPANDOU, Evangelia; TATA, Despina A. Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [S. l.], v. 67, n. March, p. 19–32, 2018. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2018.03.003.

DE ANDRADE, J. S. et al. Chronic unpredictable mild stress alters an anxiety-related defensive response, Fos immunoreactivity and hippocampal adult neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 250, p. 81–90, 2013. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.04.031. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.031>.

DELL'OSSO, Liliana et al. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels in patients suffering from post-traumatic stress disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and**

Biological Psychiatry, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 899–902, 2009. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2009.04.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.04.018>.

DENNIS, Kathleen E.; LEVITT, Pat. Regional expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) is correlated with dynamic patterns of promoter methylation in the developing mouse forebrain. **Molecular Brain Research**, [S. l.], v. 140, n. 1–2, p. 1–9, 2005. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2005.06.014.

DESARNAUD, Frank; JAKOVCEVSKI, Mira; MORELLINI, Fabio; SCHACHNER, Melitta. Stress downregulates hippocampal expression of the adhesion molecules NCAM and CHL1 in mice by mechanisms independent of DNA methylation of their promoters. **Cell adhesion & migration**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 38–44, 2008. DOI: 10.4161/cam.2.1.6013.

DJOUMA, Elvan; CARD, Katie; LODGE, Daniel J.; LAWRENCE, Andrew J. The CRF1 receptor antagonist, antalarmin, reverses isolation-induced up-regulation of dopamine D2 receptors in the amygdala and nucleus accumbens of fawn-hooded rats. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 23, n. 12, p. 3319–3327, 2006. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.04864.x.

DONG, B. E.; XUE, Y.; SAKATA, K. The effect of enriched environment across ages: A study of anhedonia and BDNF gene induction. **Genes, Brain and Behavior**, [S. l.], v. 17, n. 8, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1111/gbb.12485.

DONG, Erbo; GUIDOTTI, Alessandro; ZHANG, Huaibo; PANDEY, Subhash C. Prenatal stress leads to chromatin and synaptic remodeling and excessive alcohol intake comorbid with anxiety-like behaviors in adult offspring. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 140, p. 76–85, 2018. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.07.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.07.010>.

DOS SANTOS, Igor Marcanti; CIULLA, Leandro; BRAGA, Daniela; CERESÉR, Keila Maria; GAMA, Clarissa Severino; KAPCZINSKI, Flávio; FERRÃO, Ygor Arzeno. Symptom dimensional approach and BDNF in unmedicated obsessive-compulsive patients: An exploratory study. **CNS Spectrums**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 179–189, 2011. DOI: 10.1017/s1092852912000363.

DROSTE, Susanne K.; GESING, Angela; ULBRICHT, Sabine; MÜLLER, Marine B.; LINTHORST, Astrid C. E.; REUL, Johannes M. H. M. Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocrinology**, [S. l.], v. 144, n. 7, p. 3012–3023, 2003. DOI: 10.1210/en.2003-0097.

DUMAN, Ronald S.; MONTEGGIA, Lisa M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 2006. DOI: 10.1016/j.biopsych.2006.02.013.

DWIVEDI, YOGESH; RIZAVI, HORRIYAH S.; CONLEY, ROBERT R.; ROBERTS, ROSALINDA C. TAMMINGA, CAROL A.; PANDEY, GHANSHYAM, N. Altered Gene Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Receptor Tyrosine Kinase B in Postmortem Brain of Suicide Subjects. **Biotechnology**, [S. l.], v. 60, 2003.

ELIZALDE, Natalia; GARCÍA-GARCÍA, Alvaro L.; TOTTERDELL, Susan; GENDIVE, Nerea; VENZALA, Elisabet; RAMIREZ, Maria J.; DEL RIO, Joaquin; TORDERA, Rosa M. Sustained stress-induced changes in mice as a model for chronic depression. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 210, n. 3, p. 393–406, 2010. DOI: 10.1007/s00213-010-1835-6.

ELLIOTT, Evan; EZRA-NEVO, Gili; REGEV, Limor; NEUFELD-COHEN, Adi; CHEN, Alon. Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the Crf gene in adult mice. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 1351–1353, 2010. DOI: 10.1038/nn.2642.

FALKENBERG, Torkel; MOHAMMED, Abdul K.; HENRIKSSON, Bengt; PERSSON, Håkan; WINBLAD, Bengt; LINDEFORS, Nils. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 138, n. 1, p. 153–156, 1992. DOI:

10.1016/0304-3940(92)90494-R.

FELSENFELD, GARY; GROUDINE, Mark. Controlling the double helix Gary. **Nature**, [S. l.], v. 421, n. 6921, p. 444–448, 2003. DOI: 10.1038/nature01410.

FENG, Jian; FAN, Guoping. **The Role of DNA Methylation in the Central Nervous System and Neuropsychiatric Disorders**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc, 2009. v. 89 DOI: 10.1016/S0074-7742(09)89004-1. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)89004-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742(09)89004-1).

FILE, Sandra E. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. **Journal of Neuroscience Methods**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 219–238, 1980. DOI: 10.1016/0165-0270(80)90012-6.

FOX, Cosette; MERALI, Zul; HARRISON, Catherine. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 175, n. 1, p. 1–8, 2006. DOI: 10.1016/j.bbr.2006.08.016.

FRANCIS, Darlene D.; DIORIO, Josie; PLOTSKY, Paul M.; MEANEY, Michael J. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 18, p. 7840–7843, 2002. DOI: 10.1523/jneurosci.22-18-07840.2002.

FRANCO, Alier J.; CHEN, Chun; SCULLEN, Tyler; ZSOMBOK, Andrea; SALAHUDEEN, Ahmed A.; DI, Shi; HERMAN, James P.; TASKER, Jeffrey G. Sensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in a male rat chronic stress model. **Endocrinology**, [S. l.], v. 157, n. 6, p. 2346–2355, 2016. DOI: 10.1210/en.2015-1641.

FRISKE, Justin E.; GAMMIE, Stephen C. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 187–194, 2005. DOI: 10.1016/j.physbeh.2005.03.022.

FROMMER, M.; MCDONALD, L. E.; MILLAR, D. S.; COLLIS, C. M.; WATT, F.; GRIGG, G. W.; MOLLOY, P. L.; PAUL, C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 89, n. 5, p. 1827–1831, 1992. DOI: 10.1073/pnas.89.5.1827.

FUCHIKAMI, Manabu; MORINOBU, Shigeru; KURATA, Akiko; YAMAMOTO, Shigeto; YAMAWAKI, Shigeto. Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 73–82, 2009. DOI: 10.1017/S1461145708008997.

FUCHIKAMI, Manabu; YAMAMOTO, Shigeto; MORINOBU, Shigeru; TAKEI, Shiro; YAMAWAKI, Shigeto. Epigenetic regulation of BDNF gene in response to stress. **Psychiatry Investigation**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 251–256, 2010. DOI: 10.4306/pi.2010.7.4.251.

GEHRKE, Brenda J.; CASS, Wayne A.; BARDO, Michael T. Monoamine-depleting doses of methamphetamine in enriched and isolated rats: Consequences for subsequent methamphetamine-induced hyperactivity and reward. **Behavioural Pharmacology**, [S. l.], v. 17, n. 5–6, p. 499–508, 2006. DOI: 10.1097/00008877-200609000-00016.

GIVALOIS, L.; RAGE, F.; MARMIGÈRE, F.; TAPIA-ARANCIBIA, L.; ARANCIBIA, S. Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. **Neuroscience**, [S. l.], v. 112, n. 2, p. 309–318, 2002. DOI: 10.1016/S0306-4522(02)00072-6.

GOBBO, O. L.; O'MARA, S. M. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 152, n. 2, p. 231–241, 2004. DOI: 10.1016/j.bbr.2003.10.017.

GOLL, Mary Grace; BESTOR, Timothy H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annual**

- Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 74, p. 481–514, 2005. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721.
- GOMEZ-PINILLA, F.; ZHUANG, Y.; FENG, J.; YING, Z.; FAN, G. Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 383–390, 2011. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07508.x.
- GOVINDARAJAN, Arvind; SHANKARANARAYANA RAO, B. S.; NAIR, Deepti; TRINH, Mimi; MAWJEE, Nadya; TONEGAWA, Susumu; CHATTARJI, Sumantra. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 103, n. 35, p. 13208–13213, 2006. DOI: 10.1073/pnas.0605180103.
- GRÄFF, Johannes; MANSUY, Isabelle M. Epigenetic codes in cognition and behaviour. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 192, n. 1, p. 70–87, 2008. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.01.021.
- GRAY, J. D.; MILNER, T. A.; MCEWEN, B. S. Dynamic plasticity: The role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors. **Neuroscience**, [S. l.], v. 239, p. 214–227, 2013. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.034. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.034>.
- GREENOUGH, William T.; VOLKMAR, Fred R. Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. **Experimental Neurology**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 491–504, 1973. DOI: 10.1016/0014-4886(73)90090-3.
- GREENOUGH, William T.; VOLKMAR, Fred R.; JURASKA, Janice M. Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. **Experimental Neurology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 371–378, 1973. DOI: 10.1016/0014-4886(73)90278-1.
- GRUNAU, C.; CLARK, S. J.; ROSENTHAL, A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 29, n. 13, p. 65–65, 2001. DOI: 10.1093/nar/29.13.e65.
- GUILARTE, Tomás R.; TOSCANO, Christopher D.; MCGLOTHAN, Jennifer L.; WEAVER, Shelley A. Environmental enrichment reverses cognitive and molecular deficits induced by developmental lead exposure. **Annals of Neurology**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 50–56, 2003. DOI: 10.1002/ana.10399.
- HAEMISCH, Andreas; VOSS, Thomas; GÄRTNER, Klaus. Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 1041–1048, 1994. DOI: 10.1016/0031-9384(94)90341-7.
- HALL, Calvin S. Emotional Behavior in the Rat. **Journal of comparative psychology**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 385–403, 1941.
- HAN, Xiao; WANG, Weiwen; XUE, Xiaofang; SHAO, Feng; LI, Nanxin. Brief social isolation in early adolescence affects reversal learning and forebrain BDNF expression in adult rats. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 86, n. 3–4, p. 173–178, 2011. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2011.07.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.07.008>.
- HARRINGTON, Colleen T.; LIN, Elaine I.; OLSON, Matthew T.; ESHLEMAN, James R. Fundamentals of pyrosequencing. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, [S. l.], v. 137, n. 9, p. 1296–1303, 2013. DOI: 10.5858/arpa.2012-0463-RA.
- HAUCK, Simone; KAPCZINSKI, Flávio; ROESLER, Rafael; DE MOURA SILVEIRA, Érico; MAGALHÃES, Pedro V.; KRUEL, Leticia Rosito Pinto; SCHESTATSKY, Sidnei Samuel; CEITLIN, Lúcia Helena Freitas. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 459–462, 2010. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2010.01.010.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.01.010>.

HAUGER, Richard L.; LORANG, Marge; IRWIN, Michael; AGUILERA, Greti. CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. **Brain Research**, [S. l.], v. 532, n. 1–2, p. 34–40, 1990. DOI: 10.1016/0006-8993(90)91738-3.

HEBB, D.O. The effects of early experience on problem solving at maturity. **Am. Psychol.** 1947; 2: 306–307.

HILL, Rachel A.; KLUG, Maren; KISS VON SOLY, Szerenke; BINDER, Michele D.; HANNAN, Anthony J.; VAN DEN BUUSE, Maarten. Sex-specific disruptions in spatial memory and anhedonia in a “two hit” rat model correspond with alterations in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and signaling. **Hippocampus**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 1197–1211, 2014. DOI: 10.1002/hipo.22302.

HOFER, M.; PAGLIUSI, S. R.; HOHN, A.; LEIBROCK, J.; BARDE, Y. A. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. **EMBO Journal**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 2459–2464, 1990. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07423.x.

HOSSEINY, Salma; PIETRI, Mariel; PETIT-PAITEL, Agnès; ZARIF, Hadi; HEURTEAUX, Catherine; CHABRY, Joëlle; GUYON, Alice. Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. **Brain Structure and Function**, [S. l.], v. 220, n. 6, p. 3435–3448, 2015. DOI: 10.1007/s00429-014-0865-y.

HOWERTON, Christopher L.; GARNER, Joseph P.; MENCH, Joy A. Effects of a running wheel-igloo enrichment on aggression, hierarchy linearity, and stereotypy in group-housed male CD-1 (ICR) mice. **Applied Animal Behaviour Science**, [S. l.], v. 115, n. 1–2, p. 90–103, 2008. DOI: 10.1016/j.applanim.2008.05.004.

HU, Pu et al. Early-life stress alters affective behaviors in adult mice through persistent activation of CRH-BDNF signaling in the oval bed nucleus of the stria terminalis. **Translational Psychiatry**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/s41398-020-01070-3.

HYMAN, Edward David. A new method of sequencing DNA. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 174, n. 2, p. 423–436, 1988. DOI: 10.1016/0003-2697(88)90041-3.

ICKES, Brian R.; PHAM, Therese M.; SANDERS, Linda A.; ALBECK, David S.; MOHAMMED, Abdul H.; GRANHOLM, Ann Charlotte. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Experimental Neurology**, [S. l.], v. 164, n. 1, p. 45–52, 2000. DOI: 10.1006/exnr.2000.7415.

IZQUIERDO, Alicia; WELLMAN, Cara L.; HOLMES, Andrew. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 26, n. 21, p. 5733–5738, 2006. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0474-06.2006.

JHA, S.; DONG, B.; SAKATA, K. Enriched environment treatment reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis and protein levels of brain-derived neurotrophic factor in mice lacking its expression through promoter IV. **Translational Psychiatry**, [S. l.], v. 1, n. June, p. 1–11, 2011. DOI: 10.1038/tp.2011.33.

JOHANSSON, B.B. e OHLSSON, A.L. Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. **Exp. Neurol.** 1996; 139(2): 322-7.

JOHNSON, Elizabeth O.; KAMILARIS, Themis C.; CHROUSOS, George P.; GOLD, Philip W. Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 115–130, 1992. DOI: 10.1016/S0149-7634(05)80175-7.

JURGENS, Heidi A.; JOHNSON, Rodney W. Environmental enrichment attenuates

hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 1006–1016, 2012. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.05.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.05.015>.

KABIR, Zeeba D.; LOURENCO, Frederico; BYRNE, Maureen E.; KATZMAN, Aaron; LEE, Francis; RAJADHYAKSHA, Anjali M.; KOSOFKY, Barry E. Brain-derived neurotrophic factor genotype impacts the prenatal cocaine-induced mouse phenotype. **Developmental Neuroscience**, [S. l.], v. 34, n. 2–3, p. 184–197, 2012. DOI: 10.1159/000337712.

KAREGE, Félicien; BONDOLFI, Guido; GERVASONI, Nicola; SCHWALD, Michèle; AUBRY, Jean Michel; BERTSCHY, Gilles. Low Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 57, n. 9, p. 1068–1072, 2005. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.01.008.

KAREGE, Félicien; PERRET, Guillaume; BONDOLFI, Guido; SCHWALD, Michèle; BERTSCHY, Gilles; AUBRY, Jean Michel. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatry Research**, [S. l.], v. 109, n. 2, p. 143–148, 2002. DOI: 10.1016/S0165-1781(02)00005-7.

KATZ, R. J.; ROTH, K. A.; CARROLL, B. J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 247–251, 1981. DOI: 10.1016/0149-7634(81)90005-1.

KEENEY, ADAM J.; HOGG, S. **Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression**, [s.d.].

KEENEY, A.; JESSOP, David S.; HARBUZ, M. S.; MARSDEN, C. A.; HOGG, S.; BLACKBURN-MUNRO, R. E. Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 330–338, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2006.01422.x.

KEENEY, Adam J.; HOGG, Sandy; MARSDEN, Charles A. Alterations in core body temperature, locomotor activity, and corticosterone following acute and repeated social defeat of male NMRI mice. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 74, n. 1–2, p. 177–184, 2001. DOI: 10.1016/S0031-9384(01)00541-8.

KEMPERMANN, Gerd; BRANDON, Eugene P.; GAGE, Fred H. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Current Biology**, [S. l.], v. 8, n. 16, p. 939–944, 1998. DOI: 10.1016/s0960-9822(07)00377-6.

KEMPERMANN, Gerd; GAST, Daniela; GAGE, Fred H. Neuroplasticity in old age: Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. **Annals of Neurology**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 135–143, 2002. DOI: 10.1002/ana.10262.

KEMPERMANN, Gerd; KUHN, H. Georg; GAGE, Fred H. in an Enriched Environment. [S. l.], v. 7079, n. 1995, p. 432–434, 1996.

KEMPERMANN, Gerd; KUHN, H. Georg; GAGE, Fred H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 3206–3212, 1998. DOI: 10.1523/jneurosci.18-09-03206.1998.

KESHET, Ilana; LIEMAN-HURWITZ, Judy; CEDAR, Howard. DNA methylation affects the formation of active chromatin. **Cell**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 535–543, 1986. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90263-1.

KIM, Jeansok J.; FOY, Michael R.; THOMPSON, Richard F. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 93, n. 10, p. 4750–4753, 1996. DOI: 10.1073/pnas.93.10.4750.

KIM, Jeansok; YOON, Kenneth S. Stress: Metaplastic effects in the hippocampus. **Trends in**

Neurosciences, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 505–509, 1998. DOI: 10.1016/S0166-2236(98)01322-8.

KIM, Kyong chol; FRISO, Simonetta; CHOI, Sang Woon. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 917–926, 2009. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2009.06.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.06.008>.

KLEIMANN, Alexandra et al. BDNF serum levels and promoter methylation of BDNF exon I, IV and VI in depressed patients receiving electroconvulsive therapy. **Journal of Neural Transmission**, [S. l.], v. 122, n. 6, p. 925–928, 2015. DOI: 10.1007/s00702-014-1336-6.

KLOSE, Robert J.; BIRD, Adrian P. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 89–97, 2006. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.12.008.

KOLB, Bryan; HARKER, Allonna; MYCHASIUK, Richelle; DE MELO, Silvana R.; GIBB, Robbin. Stress and prefrontal cortical plasticity in the developing brain. **Cognitive Development**, [S. l.], v. 42, p. 15–26, 2017. DOI: 10.1016/j.cogdev.2017.01.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cogdev.2017.01.001>.

Kolb, B., & Wishaw, I. Q. An introduction to brain and behavior, 2015. Worth Publishers.

KOO, Ja Wook et al. Epigenetic basis of opiate suppression of Bdnf gene expression in the ventral tegmental area. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 415–425, 2015. DOI: 10.1038/nn.3932.

KOOLHAAS, J. M.; DE BOER, S. F.; DE RUITTER, A. J. H.; MEERLO, P.; SGOIFO, A. Social stress in rats and mice. **Acta Physiologica Scandinavica, Supplement**, [S. l.], v. 161, n. 640, p. 69–72, 1997.

KOUZARIDES, Tony. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, [S. l.], v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.005.

KUDRYAVTSEVA, N. N. Agonistic behavior: A model, experimental studies, and perspectives. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 293–305, 2000. DOI: 10.1007/BF02471782.

KUZUMAKI, Naoko et al. Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. **Hippocampus**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 127–132, 2011. DOI: 10.1002/hipo.20775.

LAKSHMINARASIMHAN, Harini; CHATTARJI, Sumantra. Stress leads to contrasting effects on the levels of brain derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–6, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0030481.

LARSEN, Marianne H.; HAY-SCHMIDT, Anders; RØNN, Lars C. B.; MIKKELSEN, Jens D. Temporal expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in the rat hippocampus after treatment with selective and mixed monoaminergic antidepressants. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 578, n. 2–3, p. 114–122, 2008. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.08.050.

LARSEN, Marianne H.; MIKKELSEN, Jens D.; HAY-SCHMIDT, Anders; SANDI, Carmen. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. **Journal of Psychiatric Research**, [S. l.], v. 44, n. 13, p. 808–816, 2010. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2010.01.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.01.005>.

LARSSON, Fredrik; WINBLAD, Bengt; MOHAMMED, Abdul H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 193–207, 2002. DOI: 10.1016/S0091-3057(02)00782-7.

LEAL, Graciano; AFONSO, Pedro M.; SALAZAR, Ivan L.; DUARTE, Carlos B. Regulation of

hippocampal synaptic plasticity by BDNF. **Brain Research**, [S. l.], v. 1621, p. 82–101, 2015. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.10.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.019>.

LEE, Kenneth K.; WORKMAN, Jerry L. Histone acetyltransferase complexes: One size doesn't fit all. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 284–295, 2007. DOI: 10.1038/nrm2145.

LEGGIO, Maria Giuseppa; MANDOLESI, Laura; FEDERICO, Francesca; SPIRITO, Francesca; RICCI, Benedetta; GELFO, Francesca; PETROSINI, Laura. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 163, n. 1, p. 78–90, 2005. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.04.009.

LEHMANN, Michael L.; HERKENHAM, Miles. Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 31, n. 16, p. 6159–6173, 2011. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0577-11.2011.

LEONTIOU, Chrysanthia A.; HADJIDANIEL, Michael D.; MINA, Petros; ANTONIOU, Pavlos; IOANNIDES, Marios; PATSALIS, Philippos C. Bisulfite conversion of DNA: Performance comparison of different kits and methylation quantitation of epigenetic biomarkers that have the potential to be used in non-invasive prenatal testing. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 1–22, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0135058.

LESSMANN, Volkmar; BRIGADSKI, Tanja. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. **Neuroscience Research**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 11–22, 2009. DOI: 10.1016/j.neures.2009.06.004.

LEVINE, Seymour. Infantile experience and resistance to physiological stress. **Science**, [S. l.], v. 126, n. 3270, p. 405, 1957. DOI: 10.1126/science.126.3270.405.

LI, Bing; CAREY, Michael; WORKMAN, Jerry L. The Role of Chromatin during Transcription. **Cell**, [S. l.], v. 128, n. 4, p. 707–719, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.015.

LI, Nanxin; LIU, Rong Jian; DWYER, Jason M.; BANASR, Mounira; LEE, Boyoung; SON, Hyeon; LI, Xiao Yuan; AGHAJANIAN, George; DUMAN, Ronald S. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 69, n. 8, p. 754–761, 2011. DOI: 10.1016/j.biopsych.2010.12.015.

LIU, Jing et al. The BDNF-FoxO1 Axis in the medial prefrontal cortex modulates depressive-like behaviors induced by chronic unpredictable stress in postpartum female mice. **Molecular Brain**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1186/s13041-020-00631-3.

LIU, Qing Rong et al. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's disease. **American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics**, [S. l.], v. 134 B, n. 1, p. 93–103, 2005. DOI: 10.1002/ajmg.b.30109.

LIU, Qing Rong; LU, Lin; ZHU, Xu Guang; GONG, Jian Ping; SHAHAM, Yavin; UHL, George R. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. **Brain Research**, [S. l.], v. 1067, n. 1, p. 1–12, 2006. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.10.004.

LOPES, Danielle A.; LEMES, Jéssica A.; MELO-THOMAS, Liana; SCHOR, Herbert; DE ANDRADE, José S.; MACHADO, Carla M.; HORTA-JÚNIOR, José A. C.; CÉSPEDES, Isabel C.; VIANA, Milena B. Unpredictable chronic mild stress exerts anxiogenic-like effects and activates neurons in the dorsal and caudal region and in the lateral wings of the dorsal raphe nucleus. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 297, p. 180–186, 2016. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.10.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.006>.

LOUILOT, A.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Differential reactivity of dopaminergic neurons in the nucleus accumbens in response to different behavioral situations. An in vivo voltammetric

- study in free moving rats. **Brain Research**, [S. l.], v. 397, n. 2, p. 395–400, 1986. DOI: 10.1016/0006-8993(86)90646-3.
- LU, Bai. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. **Learning and Memory**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 86–98, 2003. DOI: 10.1101/lm.54603.
- LU, Cheng Qiu; ZHONG, Le; YAN, Chong Huai; TIAN, Ying; SHEN, Xiao Ming. Effects of preweaning environmental enrichment on hippocampus-dependent learning and memory in developing rats. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 640, p. 117–122, 2017. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.12.053. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.053>.
- LU, P.; JONES, L. L.; TUSZYNSKI, M. H. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. **Experimental Neurology**, [S. l.], v. 191, n. 2, p. 344–360, 2005. DOI: 10.1016/j.expneurol.2004.09.018.
- LÜ, Xiuyi et al. The effects of rearing condition on methamphetamine self-administration and cue-induced drug seeking. **Drug and Alcohol Dependence**, [S. l.], v. 124, n. 3, p. 288–298, 2012. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2012.01.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.01.022>.
- LUBIN, Farah D.; ROTH, Tania L.; SWEATT, J. David. Epigenetic regulation of bdnf gene transcription in the consolidation of fear memory. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 28, n. 42, p. 10576–10586, 2008. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1786-08.2008.
- LUGER, Karolin; RICHMOND, Timothy J. The histone tails of the nucleosome. **Current Opinion in Genetics and Development**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 140–146, 1998. DOI: 10.1016/S0959-437X(98)80134-2.
- LUONI, A.; BERRY, A.; RAGGI, C.; BELLISARIO, V.; CIRULLI, F.; RIVA, M. A. Sex-Specific Effects of Prenatal Stress on Bdnf Expression in Response to an Acute Challenge in Rats: a Role for Gadd45 β . **Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 53, n. 10, p. 7037–7047, 2016. DOI: 10.1007/s12035-015-9569-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-015-9569-4>.
- LYONS & PARKER. Prevalence and Psychological Correlates of Complicated. [S. l.], v. 20, n. 3, p. 251–262, 2007. DOI: 10.1002/jts.
- LYONS, David M.; PARKER, Karen J.; KATZ, Maor; SCHATZBERG, Alan F. Developmental cascades linking stress inoculation, arousal regulation, and resilience. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 3, n. SEP, p. 1–6, 2009. DOI: 10.3389/neuro.08.032.2009.
- MA, Dengke K. et al. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. **Science**, [S. l.], v. 323, n. 5917, p. 1074–1077, 2009. DOI: 10.1126/science.1166859.
- MAGARIÑOS, Ana María; MCEWEN, Bruce S.; FLÜGGE, Gabriele; FUCHS, Eberhard. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 3534–3540, 1996. DOI: 10.1523/jneurosci.16-10-03534.1996.
- MAINA, Giuseppe; ROSSO, Gianluca; ZANARDINI, Roberta; BOGETTO, Filippo; GENNARELLI, Massimo; BOCCHIO-CHIAVETTO, Luisella. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in drug-naïve obsessive-compulsive patients: A case-control study. **Journal of Affective Disorders**, [S. l.], v. 122, n. 1–2, p. 174–178, 2010. DOI: 10.1016/j.jad.2009.07.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2009.07.009>.
- MALCON, Luiza Martins Costa; WEARICK-SILVA, Luis Eduardo; ZAPARTE, Aline; ORSO, Rodrigo; LUFT, Carolina; TRACTENBERG, Saulo Gantes; DONADIO, Márcio Vinicius Fagundes; DE OLIVEIRA, Jarbas Rodrigues; GRASSI-OLIVEIRA, Rodrigo. Maternal separation induces long-term oxidative stress alterations and increases anxiety-like behavior of male Balb/cJ mice. **Experimental Brain Research**, [S. l.], n. 0123456789, 2020. DOI: 10.1007/s00221-020-05859-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00221-020-05859-y>.

- MARASHI, Vera; BARNEKOW, Angelika; OSSENDORF, Edith; SACHSER, Norbert. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. **Hormones and Behavior**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 281–292, 2003. DOI: 10.1016/S0018-506X(03)00002-3.
- MARCON, Matheus; MOCELIN, Ricieri; BENVENUTTI, Radharani; COSTA, Tales; HERRMANN, Ana P.; DE OLIVEIRA, Diogo L.; KOAKOSKI, Gessi; BARCELLOS, Leonardo J. G.; PIATO, Angelo. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 221, n. 4, 2018. DOI: 10.1242/jeb.176735.
- MARIA CHAHROUR, SUNG YUN JUNG, CHAD SHAW, XIAOBO ZHOU,3 STEPHEN T. C. WONG, JUN QIN, Huda Y. Zoghbi. MeCP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription. **Science**, [S. l.], v. 320, n. May, p. 1224–1229, 2008.
- MARIANNO, Priscila; ABRAHAO, Karina Possa; CAMARINI, Rosana. Environmental enrichment blunts ethanol consumption after restraint stress in C57BL/6 mice. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–15, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0170317.
- MARMIGÈRE, Frédéric; GIVALOIS, Laurent; RAGE, Florence; ARANCIBIA, Sandor; TAPIA-ARANCIBIA, Lucia. Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. **Hippocampus**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 646–655, 2003. DOI: 10.1002/hipo.10109.
- MARTIN, Vincent et al. Effect of agomelatine on memory deficits and hippocampal gene expression induced by chronic social defeat stress in mice. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. November 2016, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1038/srep45907.
- MARTINOWICH, Keri; HATTORI, Daisuke; WU, Hao; FOUSE, Shaun; HE, Fei; HU, Yan; FAN, Guoping; SUN, Yi E. DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity-Dependent Bdnf Gene Regulation. **Science**, [S. l.], v. 302, n. 5646, p. 890–893, 2003. DOI: 10.1126/science.1090842.
- MATRISCIANO, Francesco; TUETING, Patricia; DALAL, Ishani; KADRIU, Bashkim; GRAYSON, Dennis R.; DAVIS, John M.; NICOLETTI, Ferdinando; GUIDOTTI, Alessandro. Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 68, p. 184–194, 2013. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.013>.
- MAYNARD, Kristen R.; HOBBS, John W.; RAJPUROHIT, Sumita K.; MARTINOWICH, Keri. Electroconvulsive seizures influence dendritic spine morphology and BDNF expression in a neuroendocrine model of depression. **Brain Stimulation**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 856–859, 2018. DOI: 10.1016/j.brs.2018.04.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.04.003>.
- MCEWEN, Bruce S. The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, [S. l.], v. 886, n. 1–2, p. 172–189, 2000a. DOI: 10.1016/S0006-8993(00)02950-4.
- MCEWEN, Bruce S. Allostasis and allostatic load: Implications for neuropsychopharmacology. **The Science of Mental Health: Stress and the Brain**, [S. l.], v. 9, n. 99, p. 2–18, 2000b.
- MCEWEN, Bruce S.; SAPOLSKY, Robert M. Stress and cognitive function. **Current Opinion in Neurobiology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 205–216, 1995. DOI: 10.1016/0959-4388(95)80028-X.
- MCGOWAN, Patrick O.; SASAKI, Aya; D’ALESSIO, Ana C.; DYMOV, Sergiy; LABONTÉ, Benoit; SZYF, Moshe; TURECKI, Gustavo; MEANEY, Michael J. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 342–348, 2009. DOI: 10.1038/nn.2270.
- MCQUAID, Robyn J.; AUDET, Marie Claude; ANISMAN, Hymie. Environmental enrichment in male CD-1 mice promotes aggressive behaviors and elevated corticosterone and brain norepinephrine activity in response to a mild stressor. **Stress**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 354–360, 2012. DOI: 10.3109/10253890.2011.623249.

MCQUAID, Robyn J.; AUDET, Marie Claude; JACOBSON-PICK, Shlomit; ANISMAN, Hymie. Environmental enrichment influences brain cytokine variations elicited by social defeat in mice. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 38, n. 7, p. 987–996, 2013. a. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2012.10.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.10.003>.

MCQUAID, Robyn J.; AUDET, Marie Claude; JACOBSON-PICK, Shlomit; ANISMAN, Hymie. The differential impact of social defeat on mice living in isolation or groups in an enriched environment: Plasma corticosterone and monoamine variations. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 351–363, 2013. b. DOI: 10.1017/S1461145712000120.

MCQUAID, Robyn Jane; DUNN, Roderick; JACOBSON-PICK, Shlomit; ANISMAN, Hymie; AUDET, Marie Claude. Post-weaning environmental enrichment in male CD-1 mice: Impact on social behaviors, corticosterone levels and prefrontal cytokine expression in adulthood. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 12, n. July, p. 1–11, 2018. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00145.

MEICHENBAUM, Donald. Stress inoculation training: A preventative and treatment approach. **The Evolution of Cognitive Behavior Therapy: A Personal and Professional Journey with Don Meichenbaum**, [S. l.], p. 101–124, 2017. DOI: 10.4324/9781315748931.

MELAS, Philippe A. et al. Antidepressant treatment is associated with epigenetic alterations in the promoter of P11 in a genetic model of depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 669–679, 2012. DOI: 10.1017/S1461145711000940.

MENEZES, Jefferson; SOUTO DAS NEVES, Ben Hur; GONÇALVES, Rithiele; BENETTI, Fernando; MELLO-CARPES, Pâmela Billig. Maternal deprivation impairs memory and cognitive flexibility, effect that is avoided by environmental enrichment. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 381, n. January, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1016/j.bbr.2020.112468.

MENG, Qingxuan; LI, Nanxin; HAN, Xiao; SHAO, Feng; WANG, Weiwen. Effects of adolescent social isolation on the expression of brain-derived neurotrophic factors in the forebrain. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 650, n. 1, p. 229–232, 2011. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.09.061. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.061>.

MILOSAVLJEVIC, Aleksandar. Emerging patterns of epigenomic variation. **Trends in Genetics**, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 242–250, 2011. DOI: 10.1016/j.tig.2011.03.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.001>.

MIRANDA, Tina Branscombe; JONES, Peter A. DNA methylation: The nuts and bolts of repression. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 213, n. 2, p. 384–390, 2007. DOI: 10.1002/jcp.21224.

MIZOGUCHI, Kazushige; YUZURIHARA, Mitsutoshi; ISHIGE, Atsushi; SASAKI, Hiroshi; CHUI, De Hua; TABIRA, Takeshi. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 1568–1574, 2000. DOI: 10.1523/jneurosci.20-04-01568.2000.

MIZOGUCHI, Kazushige; YUZURIHARA, Mitsutoshi; ISHIGE, Atsushi; SASAKI, Hiroshi; CHUI, De Hua; TABIRA, Takeshi. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 443–459, 2001. DOI: 10.1016/S0306-4530(01)00004-X.

MOLENDIJK, M. L.; BUS, B. A. A.; SPINHOVEN, Ph; PENNINX, B. W. J. H.; KENIS, G.; PRICKAERTS, J.; VOSHAAR, R. C. Oud.; ELZINGA, B. M. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: State-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 1088–1095, 2011. DOI: 10.1038/mp.2010.98.

MOLTENI, Raffaella; CATTANEO, Annamaria; CALABRESE, Francesca; MACCHI, Flavia;

OLIVIER, Jocelien D. A.; RACAGNI, Giorgio; ELLENBROEK, Bart A.; GENNARELLI, Massimo; RIVA, Marco A. Reduced function of the serotonin transporter is associated with decreased expression of BDNF in rodents as well as in humans. **Neurobiology of Disease**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 747–755, 2010. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.12.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.12.014>.

MORADI-KOR, Nasroallah; GHANBARI, Ali; RASHIDIPOUR, Hadi; YOUSEFI, Behpour; BANDEGI, Ahmad Reza; RASHIDY-POUR, Ali. Beneficial effects of *Spirulina platensis*, voluntary exercise and environmental enrichment against adolescent stress induced deficits in cognitive functions, hippocampal BDNF and morphological remodeling in adult female rats. **Hormones and Behavior**, [S. l.], v. 112, n. October 2018, p. 20–31, 2019. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2019.03.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.03.004>.

MORSE, Sarah J.; BUTLER, Anderson A.; DAVIS, Robin L.; SOLLER, Ian J.; LUBIN, Farah D. Environmental enrichment reverses histone methylation changes in the aged hippocampus and restores age-related memory deficits. **Biology**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 298–313, 2015. DOI: 10.3390/biology4020298.

MURGATROYD, Chris et al. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 1559–1566, 2009. DOI: 10.1038/nn.2436.

MUSCAT, Richard; WILLNER, Paul. Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: A methodological analysis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 507–517, 1992. DOI: 10.1016/S0149-7634(05)80192-7.

NAKAGAWA, Yusuke; TO, Masahiro; SARUTA, Juri; YAMAMOTO, Yuko; YAMAMOTO, Toshiharu; SHIMIZU, Tomoko; KAMATA, Yohei; MATSUO, Masato; TSUKINOKI, Keiichi. Effect of social isolation stress on saliva BDNF in rat. **Journal of Oral Science**, [S. l.], v. 61, n. 4, p. 516–520, 2019. DOI: 10.2334/josnusd.18-0409.

National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition, 2011. Washington, DC: **The National Academies Press**. <https://doi.org/10.17226/12910>.

NEELEY, E. W.; BERGER, R.; KOENIG, J. I.; LEONARD, S. Prenatal stress differentially alters brain-derived neurotrophic factor expression and signaling across rat strains. **Neuroscience**, [S. l.], v. 187, p. 24–35, 2011. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.065. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.065>.

NEIDL, Romain et al. Late-life environmental enrichment induces acetylation events and nuclear factor κB-dependent regulations in the hippocampus of aged rats showing improved plasticity and learning. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 36, n. 15, p. 4351–4361, 2016. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3239-15.2016.

NEWELL-PRICE, John; CLARK, Adrian J. L.; KING, Peter. DNA methylation and silencing of gene expression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 142–148, 2000. DOI: 10.1016/S1043-2760(00)00248-4.

NIBUYA, Masashi; TAKAHASHI, Michihiro; RUSSELL, David S.; DUMAN, Ronald S. Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 267, n. 2, p. 81–84, 1999. DOI: 10.1016/S0304-3940(99)00335-3.

NILSSON, Michael; PERFILIEVA, Ekaterina; JOHANSSON, Ulf; ORWAR, Owe; ERIKSSON, Peter S. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. **Journal of Neurobiology**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 569–578, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4695(19990615)39:4<569::AID-NEU10>3.0.CO;2-F.

NITHIANANTHARAJAH, Jess; HANNAN, Anthony J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 697–709, 2006. DOI: 10.1038/nrn1970.

NOVAES, Leonardo S.; DOS SANTOS, Nilton Barreto; BATALHOTE, Rafaela F. P.; MALTA, Marília Brinati; CAMARINI, Rosana; SCAVONE, Cristoforo; MUNHOZ, Carolina Demarchi.

Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 113, p. 457–466, 2017. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.10.026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.026>.

NOVKOVIC, Tanja; MITTMANN, Thomas; MANAHAN-VAUGHAN, Denise. BDNF contributes to the facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment. **Hippocampus**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 1–15, 2015. DOI: 10.1002/hipo.22342.

NYRÉN, Pål. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 167, n. 2, p. 235–238, 1987. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90158-8.

OLD, Robert W.; CREA, Francesco; PUSZYK, William; HULTÉN, Maj Anita. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. **Reproductive BioMedicine Online**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 227–235, 2007. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)60713-4. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60713-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60713-4).

OLIFF, Heather S.; BERCHTOLD, Nicole C.; ISACKSON, Paul; COTMAN, Carl W. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. **Molecular Brain Research**, [S. l.], v. 61, n. 1–2, p. 147–153, 1998. DOI: 10.1016/S0169-328X(98)00222-8.

ÖNGÜR, Dost; DREVETS, Wayne C.; PRICE, Joseph L. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 95, n. 22, p. 13290–13295, 1998. DOI: 10.1073/pnas.95.22.13290.

ONISHCHENKO, Natalia; KARPOVA, Nina; SABRI, Farideh; CASTRÉN, Eero; CECCATELLI, Sandra. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 106, n. 3, p. 1378–1387, 2008. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05484.x.

OSTRANDER, Michelle M.; ULRICH-LAI, Yvonne M.; CHOI, Dennis C.; RICHTAND, Neil M.; HERMAN, James P. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. **Endocrinology**, [S. l.], v. 147, n. 4, p. 2008–2017, 2006. DOI: 10.1210/en.2005-1041.

OU, Li Chin; GEAN, Po Wu. Transcriptional regulation of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 350–358, 2007. DOI: 10.1124/mol.107.034934.

PARIHAR, V. K.; HATTIANGADY, B.; KURUBA, R.; SHUAI, B.; SHETTY, A. K. Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 171–183, 2011. DOI: 10.1038/mp.2009.130.

PARK, Hyungju; POO, Mu Ming. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 7–23, 2013. DOI: 10.1038/nrn3379.

PELLOW, Sharon; CHOPIN, Philippe; FILE, Sandra E.; BRILEY, Mike. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985. DOI: 10.1016/0165-0270(85)90031-7.

PEÑA, Yolanda; PRUNELL, Margarita; DIMITSANTOS, Vagelis; NADAL, Roser; ESCORIHUELA, Rosa M. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 174, n. 1, p. 181–187, 2006. DOI: 10.1016/j.bbr.2006.07.007.

PICCINNI, Armando et al. Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, [S. l.], v. 105, n. 1–3, p. 279–283, 2008. DOI: 10.1016/j.jad.2007.05.005.

- PIETROPAOLO, Susanna; BRANCHI, Igor; CIRULLI, Francesca; CHIAROTTI, Flavia; ALOE, Luigi; ALLEVA, Enrico. Long-term effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behaviour in mice: Social versus physical enrichment. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 81, n. 3, p. 443–453, 2004. DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.02.022.
- PITMAN, David L.; OTTENWELLER, John E.; NATELSON, Benjamin H. Effect of Stressor Intensity on Habituation and Sensitization of Glucocorticoid Responses in Rats. **Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 104, n. 1, p. 28–36, 1990. DOI: 10.1037/0735-7044.104.1.28.
- PIZARRO, José M. et al. Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. **Brain Research**, [S. l.], v. 1025, n. 1–2, p. 10–20, 2004. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.06.085.
- PODDA, Maria Vittoria; COCCO, Sara; MASTRODONATO, Alessia; FUSCO, Salvatore; LEONE, Lucia; BARBATI, Saviana Antonella; COLUSSI, Claudia; RIPOLI, Cristian; GRASSI, Claudio. Anodal transcranial direct current stimulation boosts synaptic plasticity and memory in mice via epigenetic regulation of Bdnf expression. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. February, p. 1–19, 2016. DOI: 10.1038/srep22180.
- PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003. DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01272-X.
- PRUUNSILD, Priit; KAZANTSEVAL, Anna; AID, Tamara; PALM, Kaia; TIMMUSK, Tõnis. Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. **Genomics**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 397–406, 2007. DOI: 10.1016/j.ygeno.2007.05.004.
- QUADIR, Sema G.; SANTOS, Jaqueline Rocha Borges Dos; CAMPBELL, Rianne R.; WROTEN, Melissa G.; SINGH, Nimrita; HOLLOWAY, John J.; BAL, Sukhmani K.; CAMARINI, Rosana; SZUMLINSKI, Karen K. Homer2 regulates alcohol and stress cross-sensitization. **Addiction Biology**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 613–633, 2016. DOI: 10.1111/adb.12252.
- R.G., Lister. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.
- RADLEY, J. J.; SISTI, H. M.; HAO, J.; ROCHER, A. B.; MCCALL, T.; HOF, P. R.; MCEWEN, B. S.; MORRISON, J. H. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, [S. l.], v. 125, n. 1, p. 1–6, 2004. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.01.006.
- RAJKOWSKA, Grazyna; MIGUEL-HIDALGO, José J.; WEI, Jinrong; DILLEY, Ginny; PITTMAN, Stephen D.; MELTZER, Herbert Y.; OVERHOLSER, James C.; ROTH, Bryan L.; STOCKMEIER, Craig A. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 45, n. 9, p. 1085–1098, 1999. DOI: 10.1016/S0006-3223(99)00041-4.
- RATTINER, Lisa M.; DAVIS, Michael; RESSLER, Kerry J. Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts during the consolidation of fear learning. **Learning and Memory**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 727–731, 2004. DOI: 10.1101/lm.83304.
- RAY, Mia Thompson; WEICKERT, Cynthia Shannon; WYATT, Eugene; WEBSTER, Maree J. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 195–203, 2011. DOI: 10.1503/jpn.100048.
- REBEC, G. V.; GRABNER, C. P.; JOHNSON, M.; PIERCE, R. C.; BARDO, M. T. Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. **Neuroscience**, [S. l.], v. 76, n. 3, p. 707–714, 1996. DOI: 10.1016/S0306-4522(96)00382-X.
- REGINA DE MELO, Silvana; TATIANE DE DAVID ANTONIAZZI, Caren; HOSSAIN, Shakhawat; KOLB, Bryan. Short predictable stress promotes resistance to anxiety behavior

and increases dendritic spines in prefrontal cortex and hippocampus. **Brain Research**, [S. l.], v. 1746, n. April, p. 147020, 2020. DOI: 10.1016/j.brainres.2020.147020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899320303760?dgcid=rss_sd_all&utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RESR_MRKT_Researcher_inbound.

RISEDAL, Anette; MATTSSON, Bengt; DAHLQVIST, Per; NORDBORG, Claes; OLSSON, Tommy; JOHANSSON, Barbro B. Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 315–321, 2002. DOI: 10.1016/S0361-9230(02)00796-7.

ROCERI, Mila; CIRULLI, Francesca; PESSINA, Cassandra; PERETTO, Paolo; RACAGNI, Giorgio; RIVA, Marco A. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 55, n. 7, p. 708–714, 2004. DOI: 10.1016/j.biopsych.2003.12.011.

RONAGHI, Mostafa; KARAMOHAMED, Samer; PETTERSSON, Bertil; UHLE, Mathias. Ronaghi 1996. [S. l.], v. 89, p. 1–6, 1996. Disponível em: <papers2://publication/uuid/A0EF1F35-BFDD-435C-8D06-1703C2603D1E>.

RONAGHI, Mostafa; UHLÉN, Mathias; NYRÉN, Pål. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, [S. l.], v. 281, n. 5375, p. 363–365, 1998. DOI: 10.1126/science.281.5375.363.

ROSENZWEIG, Mark R.; BENNETT, Edward L.; HEBERT, Marie; MORIMOTO, Hiromi. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. **Brain Research**, [S. l.], v. 153, n. 3, p. 563–576, 1978. DOI: 10.1016/0006-8993(78)90340-2.

ROSSI, Chiara et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 24, n. 7, p. 1850–1856, 2006. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.05059.x.

ROTH, Tania L.; LUBIN, Farah D.; FUNK, Adam J.; SWEATT, J. David. Lasting Epigenetic Influence of Early-Life Adversity on the BDNF Gene. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 65, n. 9, p. 760–769, 2009. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.11.028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.028>.

ROTH, Tania L.; ZOLADZ, Phillip R.; SWEATT, J. David; DIAMOND, David M. Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder. **Journal of Psychiatric Research**, [S. l.], v. 45, n. 7, p. 919–926, 2011. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2011.01.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.01.013>.

RUEDA, André Veloso Lima; TEIXEIRA, Ana Maria Aristimunho; YONAMINE, Mauricio; CAMARINI, Rosana. Environmental enrichment blocks ethanol-induced locomotor sensitization and decreases BDNF levels in the prefrontal cortex in mice. **Addiction Biology**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 736–745, 2012. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2011.00408.x.

SAKATA, Kazuko; WOO, Newton H.; MARTINOWICH, Keri; GREENE, Joshua S.; SCHLOESSER, Robert J.; SHEN, Liya; LU, Bai. Critical role of promoter IV-driven BDNF transcription in GABAergic transmission and synaptic plasticity in the prefrontal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 106, n. 14, p. 5942–5947, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0811431106.

SAKHARKAR, Amul J.; KYZAR, Evan J.; GAVIN, David P.; ZHANG, Huaibo; CHEN, Ying; KRISHNAN, Harish R.; GRAYSON, Dennis R.; PANDEY, Subhash C. Altered amygdala DNA methylation mechanisms after adolescent alcohol exposure contribute to adult anxiety and alcohol drinking. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 157, n. December 2018, p. 107679, 2019. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107679. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107679>.

SANTOS-ROCHA, Jaqueline Borges; RAE, Mariana; TEIXEIRA, Ana Maria Aristimunho; TEIXEIRA, Simone Aparecida; MUNHOZ, Carolina Demarchi; MUSCARÁ, Marcelo Nicolas; MARCOURAKIS, Tania; SZUMLINSKI, Karen K.; CAMARINI, Rosana. Involvement of neuronal nitric oxide synthase in cross-sensitization between chronic unpredictable stress and ethanol in adolescent and adult mice. **Alcohol**, [S. l.], v. 68, p. 71–79, 2018. DOI: 10.1016/j.alcohol.2017.10.004.

SCACCIANOCE, Sergio; DEL BIANCO, Paola; PAOLONE, Giovanna; CAPRIOLI, Daniele; MODAFFERI, Antonella M. E.; NENCINI, Paolo; BDIANI, Aldo. Social isolation selectively reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 168, n. 2, p. 323–325, 2006. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.04.024.

SCHLOESSER, R. J.; LEHMANN, M.; MARTINOWICH, K.; MANJI, H. K.; HERKENHAM, M. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 1152–1163, 2010. DOI: 10.1038/mp.2010.34. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2010.34>.

SCHRIJVER, Nicole C. A.; BHR, Nina I.; WEISS, Isabelle C.; WÜRBEL, Hanno. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 209–224, 2002. DOI: 10.1016/S0091-3057(02)00790-6.

SEGAL, Rosalind A. Selectivity in neurotrophin signaling: Theme and variations. **Annual Review of Neuroscience**, [S. l.], v. 26, p. 299–330, 2003. DOI: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131421.

SEO, Mi Kyoung et al. Effects of antipsychotic drugs on the epigenetic modification of brain-derived neurotrophic factor gene expression in the hippocampi of chronic restraint stress rats. **Neural Plasticity**, [S. l.], v. 2018, 2018. DOI: 10.1155/2018/2682037.

SHANSKY, Rebecca M.; RUBINOW, Katya; BRENNAN, Avis; ARNSTEN, Amy F. T. The effects of sex and hormonal status on restraint-stress-induced working memory impairment. **Behavioral and Brain Functions**, [S. l.], v. 2, p. 4–9, 2006. DOI: 10.1186/1744-9081-2-8.

SHILPA, B. M.; BHAGYA, V.; HARISH, G.; SRINIVAS BHARATH, M. M.; SHANKARANARAYANA RAO, B. S. Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 76, p. 88–100, 2017. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.02.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.02.025>.

SHIMIZU, Eiji et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 70–75, 2003. DOI: 10.1016/S0006-3223(03)00181-1.

SIMPSON, Joy; KELLY, John P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 222, n. 1, p. 246–264, 2011. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.04.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.002>.

SINGAL, RAKESH; GINDER, Gordon D. DNA Methylation. **Nutrition in Epigenetics**, [S. l.], p. 9–45, 2011. DOI: 10.1002/9780470959824.ch2.

SMITH, Mark A.; MAKINO, Shinya; KVETNANSKY, Richard; POST, Robert M. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 15, n. 31, p. 1768–1777, 1995. DOI: 10.1523/jneurosci.15-03-01768.1995.

SOARES, Roberto O.; RORATO, Rodrigo C.; PADOVAN, Diego; LCHAT, João José; ANTUNES-RODRIGUES, José; ELIAS, Lucila L. K.; ALMEIDA, Sebastião S. Environmental enrichment reverses reduction in glucocorticoid receptor expression in the hippocampus of

- and improves behavioral responses of anxiety in early malnourished rats. **Brain Research**, [S. l.], v. 1600, p. 32–41, 2015. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.12.047.
- SOUSA, N.; LUKOYANOV, N. V.; MADEIRA, M. D.; ALMEIDA, O. F. X.; PAULA-BARBOSA, M. M. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. **Neuroscience**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 253–266, 2000. DOI: 10.1016/S0306-4522(00)00050-6.
- SPIJKER, Sabine. Neuroproteomics: Dissection of Rodent Brain Regions. **Neuromethods**, [S. l.], v. 57, p. 13–27, 2011. DOI: 10.1007/978-1-61779-111-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-111-6>.
- STEIMER, Thierry; DRISCOLL, Peter. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: Behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. **Stress**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 87–100, 2003. DOI: 10.1080/1025389031000111320.
- STRAGIER, E.; MASSART, R.; SALERY, M.; HAMON, M.; GENY, D.; MARTIN, V.; BOULLE, F.; LANFUMEY, L. Ethanol-induced epigenetic regulations at the Bdnf gene in C57BL/6J mice. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 405–412, 2015. DOI: 10.1038/mp.2014.38.
- STRÖHLE, Andreas; STOY, Meline; GRAETZ, Barbara; SCHEEL, Michael; WITTMANN, André; GALLINAT, Jürgen; LANG, Undine E.; DIMEO, Fernando; HELLWEG, Rainer. Acute exercise ameliorates reduced brain-derived neurotrophic factor in patients with panic disorder. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 364–368, 2010. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2009.07.013.
- SU, Chun Lin; SU, Chun Wei; HSIAO, Ya Hsin; GEAN, Po Wu. Epigenetic regulation of BDNF in the learned helplessness-induced animal model of depression. **Journal of Psychiatric Research**, [S. l.], v. 76, p. 101–110, 2016. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2016.02.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.02.008>.
- SULIMAN, Sharain; HEMMINGS, Sian M.; SEEDAT, Soraya. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: Systematic review and meta-regression analysis. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, [S. l.], v. 7, n. JUL, p. 1–11, 2013. DOI: 10.3389/fnint.2013.00055.
- SUO, Lin et al. Predictable chronic mild stress in adolescence increases resilience in adulthood. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 38, n. 8, p. 1387–1400, 2013. DOI: 10.1038/npp.2013.67.
- SUZUKI, Miho M.; BIRD, Adrian. DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 465–476, 2008. DOI: 10.1038/nrg2341.
- SZYF, M. The early-life social environment and DNA methylation. **Clinical Genetics**, [S. l.], v. 81, n. 4, p. 341–349, 2012. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2012.01843.x.
- SZYF, Moshe. DNA methylation, behavior and early life adversity. **Journal of Genetics and Genomics**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 331–338, 2013. DOI: 10.1016/j.jgg.2013.06.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2013.06.004>.
- TAKEI, Shiro; MORINOBU, Shigeru; YAMAMOTO, Shigeto; FUCHIKAMI, Manabu; MATSUMOTO, Tomoya; YAMAWAKI, Shigeto. Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder. **Journal of Psychiatric Research**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 460–468, 2011. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2010.08.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.08.009>.
- TREIT, Dallas. Animal models for the study of anti-anxiety agents: A review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 203–222, 1985. DOI: 10.1016/0149-7634(85)90046-6.

TSANKOVA, Nadia M.; BERTON, Olivier; RENTHAL, William; KUMAR, Arvind; NEVE, Rachel L.; NESTLER, Eric J. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 519–525, 2006. DOI: 10.1038/nn1659.

UCHIDA, Shusaku; HARA, Kumiko; KOBAYASHI, Ayumi; OTSUKI, Koji; YAMAGATA, Hirotaka; HOBARA, Teruyuki; SUZUKI, Takayoshi; MIYATA, Naoki; WATANABE, Yoshifumi. Epigenetic status of Gdnf in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events. **Neuron**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 359–372, 2011. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.12.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.023>.

UEYAMA, Takashi; KAWAI, Yoshinori; NEMOTO, Kiyomitsu; SEKIMOTO, Masashi; TONÉ, Shigenobu; SENBA, Emiko. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. **Neuroscience Research**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 103–110, 1997. DOI: 10.1016/S0168-0102(97)00030-8.

URAKAWA, Susumu; TAKAMOTO, Kouich; HORI, Etsuro; SAKAI, Natsuko; ONO, Taketoshi; NISHIJO, Hisao. Rearing in enriched environment increases parvalbumin-positive small neurons in the amygdala and decreases anxiety-like behavior of male rats. **BMC neuroscience**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1, 2013. DOI: 10.1186/1471-2202-14-13. Disponível em: BMC Neuroscience.

VAN DELLEN, Anton; BLAKEMORE, Colin; DEACON, Robert; YORK, Denis; HANNAN, Anthony J. Delaying the onset of Huntington's in mice. **Nature**, [S. l.], v. 404, n. 6779, p. 721–722, 2000. DOI: 10.1038/35008142.

VAN LOO, P. L. P.; KRUITWAGEN, C. L. J. J.; KOOLHAAS, J. M.; VAN DE WEERD, H. A.; VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BAUMANS, V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. **Applied Animal Behaviour Science**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 65–81, 2002. DOI: 10.1016/S0168-1591(01)00200-3.

VAN PRAAG, Henriette; CHRISTIE, Brian R.; SEJNOWSKI, Terrence J.; GAGE, Fred H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 96, n. 23, p. 13427–13431, 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.23.13427.

VAN PRAAG, Henriette; KEMPERMANN, Gerd; GAGE, Fred H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 191–198, 2000. DOI: 10.1038/35044558.

VAN WAAS, Martine; SOFFIÉ, Monique. Differential environmental modulations on locomotor activity, exploration and spatial behaviour in young and old rats. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 265–271, 1996. DOI: 10.1016/0031-9384(95)02151-5.

VARTY, Geoffrey B.; PAULUS, Martin P.; BRAFF, David L.; GEYER, Mark A. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: Effects on locomotor behavior and startle response plasticity. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 864–873, 2000. DOI: 10.1016/S0006-3223(99)00269-3.

VENZALA, E.; GARCÍA-GARCÍA, A. L.; ELIZALDE, N.; DELAGRANGE, P.; TORDERA, R. M. Chronic social defeat stress model: Behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 224, n. 2, p. 313–325, 2012. DOI: 10.1007/s00213-012-2754-5.

VENZALA, E.; GARCÍA-GARCÍA, A. L.; ELIZALDE, N.; TORDERA, R. M. Social vs. environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. **European Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 697–708, 2013. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2012.05.010.

WALSH, Roger N.; CUMMINS, Robert A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, [S. l.], v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976. DOI: 10.1037/0033-2909.83.3.482.

- WANG, Xin; MENG, Zhaoxiang; WANG, Jibing; ZHOU, Hongyu; WU, Yi; WU, Junfa. Enriched environment improves working memory impairment of mice with traumatic brain injury by enhancing histone acetylation in the prefrontal cortex. **PeerJ**, [S. l.], v. 2018, n. 12, 2018. DOI: 10.7717/peerj.6113.
- WANG, Yuan; MATHEWS, Carol A.; LI, Ying; LIN, Zhiguang; XIAO, Zeping. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plasma levels in drug-naïve OCD patients are lower than those in healthy people, but are not lower than those in drug-treated OCD patients. **Journal of Affective Disorders**, [S. l.], v. 133, n. 1–2, p. 305–310, 2011. DOI: 10.1016/j.jad.2011.04.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2011.04.002>.
- WATANABE, Yoshifumi; GOULD, Elizabeth; MCEWEN, Bruce S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Research**, [S. l.], v. 588, n. 2, p. 341–345, 1992. DOI: 10.1016/0006-8993(92)91597-8.
- WEARICK-SILVA, Luis Eduardo et al. Running during adolescence rescues a maternal separation-induced memory impairment in female mice: Potential role of differential exon-specific BDNF expression. **Developmental Psychobiology**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 268–274, 2017. DOI: 10.1002/dev.21487.
- WEICKERT, C. S.; HYDE, T. M.; LIPSKA, B. K.; HERMAN, M. M.; WEINBERGER, D. R.; KLEINMAN, J. E. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 592–610, 2003. DOI: 10.1038/sj.mp.4001308.
- WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S.; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 358–364, 1987. DOI: 10.1007/BF00187257.
- WILLNER, Paul. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of Stress**, [S. l.], v. 6, p. 78–93, 2017. DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.08.002.
- WRIGHT, Ian K.; UPTON, N.; MARSDEN, C. A. Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 1129–1132, 1991. DOI: 10.1016/0031-9384(91)90572-6.
- XU, Hang; WANG, Jiesi; ZHANG, Ke; ZHAO, Mei; ELLENBROEK, Bart; SHAO, Feng; WANG, Weiwen. Effects of adolescent social stress and antidepressant treatment on cognitive inflexibility and Bdnf epigenetic modifications in the mPFC of adult mice. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 88, n. July 2017, p. 92–101, 2018. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2017.11.013.
- ZAJAC, M. S.; PANG, T. Y. C.; WONG, N.; WEINRICH, B.; LEANG, L. S. K.; CRAIG, J. M.; SAFFERY, R.; HANNAN, A. J. Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. **Hippocampus**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 621–636, 2010. DOI: 10.1002/hipo.20658.
- ZHANG, Yi; LIU, Lei; LIU, Yun Zi; SHEN, Xiao Liang; WU, Teng Yun; ZHANG, Ting; WANG, Wei; WANG, Yun Xia; JIANG, Chun Lei. NLRP3 inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuroinflammation. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 18, n. 8, p. 1–8, 2015. DOI: 10.1093/ijnp/pyv006.
- ZHENG, Fei; ZHANG, Ming; DING, Qi; SETHNA, Ferzin; YAN, Lily; MOON, Changjong; YANG, Miyoung; WANG, Hongbing. Voluntary running depreciates the requirement of Ca²⁺-stimulated cAMP signaling in synaptic potentiation and memory formation. **Learning and Memory**, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 442–449, 2016. a. DOI: 10.1101/lm.040642.115.
- ZHENG, Yu; FAN, Weidong; ZHANG, Xianquan; DONG, Erbo. Gestational stress induces depressive-like and anxiety-like phenotypes through epigenetic regulation of BDNF expression in offspring hippocampus. **Epigenetics**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 150–162, 2016. b. DOI:

10.1080/15592294.2016.1146850.
<http://dx.doi.org/10.1080/15592294.2016.1146850>.

Disponível

em:

ZHU, Shenghua; SHI, Ruoyang; WANG, Junhui; WANG, Jun Feng; LI, Xin Min. Unpredictable chronic mild stress not chronic restraint stress induces depressive behaviours in mice. **NeuroReport**, [S. l.], v. 25, n. 14, p. 1151–1155, 2014. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000243.

ZHU, Wei Li; SHI, Hai Shui; WANG, Shen Jun; WU, Ping; DING, Zeng Bo; LU, Lin. Hippocampal CA3 calcineurin activity participates in depressive-like behavior in rats. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 117, n. 6, p. 1075–1086, 2011. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07285.x.

ZIMMERMANN, Aurelia; STAUFFACHER, Markus; LANGHANS, Wolfgang; WÜRBEL, Hanno. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 121, n. 1–2, p. 11–20, 2001. DOI: 10.1016/S0166-4328(00)00377-6.

8. ANEXOS

8.1. Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CEUA-ICB USP - Avenida Arns Joffe, 454 - Butantã - São Paulo - SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
CEUA-ICB USP - Telefone: (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Estudo do envolvimento de modificações epigenéticas no gene do Bdnf no córtex pré-frontal na resiliência ao estresse promovida pelo enriquecimento ambiental*", registrado sob o protocolo nº **120/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **12/12/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

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

- Departamento: *Farmacologia*

- Membros da Equipe: *Nívea Karla de Gusmão Taveiros Silva (Pós-graduando), Gabriel de Araujo Costa (Pós-graduando), Sonia Maria Rodrigues Leite (Técnico de laboratório)*

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

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Study of the involvement of epigenetic changes in Bdnf gene in the prefrontal cortex in the resilience to stress promoted by environmental enrichment*", protocol nº **120/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **12/12/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

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

- Team members: *Nívea Karla de Gusmão Taveiros Silva (Graduate Student), Gabriel de Araujo Costa (Graduate Student), Sonia Maria Rodrigues Leite (Laboratory Technician)*.

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

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Swiss</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>60-70 dias/days</i>	240

São Paulo, 12 de dezembro de 2016.

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

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