



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Louise Castro de Jesus

**Efeitos comportamentais do refinamento ambiental e manejo não-aversivo em camundongos *Swiss* fêmeas submetidas ao estresse de contenção**

Florianópolis - SC

2024

Louise Castro de Jesus

**Efeitos comportamentais do refinamento ambiental e manejo não-aversivo em camundongos *Swiss* fêmeas submetidas ao estresse de contenção**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Florianópolis - SC

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC. Dados inseridos pelo próprio autor.

de Jesus, Louise Castro

Efeitos comportamentais do refinamento ambiental e manejo não-aversivo em camundongos Swiss fêmeas submetidas ao estresse de contenção / Louise Castro de Jesus ; orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues, 2024.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Estresse. 3. Refinamento ambiental. 4. Manejo não-aversivo. 5. Comportamento animal. I. Rodrigues, Ana Lúcia Severo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

Louise Castro de Jesus

**Efeitos comportamentais do refinamento ambiental e manejo não-aversivo em camundongos *Swiss* fêmeas submetidas ao estresse de contenção**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 05 de Abril de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Patricia de Souza Brocardo, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Luciana Aparecida Honorato, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Profa. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues  
Orientadora

Dedico este trabalho a todos os animais utilizados na ciência.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família em Manaus por sempre ter apoiado meus estudos.

A Deus e à espiritualidade pelo apoio na jornada.

Ao meu companheiro, Vitor, por ser a fonte de muito amor, companheirismo e apoio.

À minha orientadora, Ana Lúcia, por ter me aceitado em seu laboratório e apoiado o meu projeto.

Aos colegas de laboratório pelo aprendizado e descontração.

À Luciana Honorato pelas trocas de tanto conhecimento sobre os animais de laboratório.

Aos colegas da Ampere Racing UFSC pelo meu crescimento enquanto membro de equipe e pela contribuição para as minhas habilidades de gestão.

Ao DIJ da Associação Espírita Fé e Caridade pela leveza trazida à minha jornada.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPESC.

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFSC.

Aos camundongos de laboratório.

## RESUMO

O estresse estimula o encéfalo a iniciar o enfrentamento e a adaptação de curto prazo gerando respostas para manter a homeostase. O estresse possui um efeito bifásico sobre as adaptações cerebrais (e.g. alteração em processos eletrofisiológicos e morfológicos de neurônios) que varia conforme a intensidade do estressor. Estudos com roedores tem mostrado que o estresse crônico pode levar ao comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso. Fatores envolvidos na criação ou manutenção de animais de laboratório, como as condições de alojamento e forma de manejo, podem levar a alterações comportamentais associadas ao estresse, porém são frequentemente ignorados. No presente trabalho buscou-se avaliar o impacto do ambiente refinado (AR) e do manejo não-aversivo (MNA) por *cupping*, isoladamente ou em associação, no comportamento de camundongos *Swiss* fêmeas adultas submetidas ao estresse. O AR consistiu na adição de papel picado para ninho, um túnel de PVC e um túnel de papelão para abrigo; e o MNA, na captura do animal com as mãos do pesquisador em plataforma. Foram realizadas avaliações dos comportamentos relacionados à emocionalidade durante os procedimentos de troca de caixa e administração intraperitoneal (i.p.), e dos comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso por meio do teste de suspensão pela cauda (TSC), teste de borrifagem de sacarose (TBS) e teste do campo aberto (TCA), após exposição ao estresse crônico por contenção (ECC, 2 horas/dia por 10 dias). Em nosso trabalho, foi observado que o MNA, mas não o AR, reduziu os comportamentos de emocionalidade (defecação e tentativas de fuga da mão do experimentador) dos animais durante as trocas de caixa. Entretanto, o AR e/ou MNA não foram capazes de promover alterações nos comportamentos de emocionalidade (defecação, micção, relutância e vocalização) durante a administração i.p. Nos testes comportamentais, animais submetidos ao ECC não apresentaram alterações em parâmetros associados ao comportamento tipo-depressivo no TSC e TBS. Ainda, nenhuma das intervenções promoveu alterações nos mesmos parâmetros. Em relação ao comportamento exploratório no TCA, o ECC e a associação AR+MNA promoveram efeito tipo-ansiolítico. No mesmo teste, ao avaliar o comportamento de autolimpeza não-induzida, o efeito tipo-ansiolítico foi promovido apenas pelo MNA. O conjunto de nossos resultados sugere que o ECC de 2 horas/dia por 10 dias não foi capaz de conferir um fenótipo tipo-depressivo e que a ausência de efeitos tipo-antidepressivo do AR/MNA e tipo-ansiolítico do AR nos testes comportamentais, bem como o efeito tipo-ansiolítico promovido pelo ECC no TCA podem estar relacionados à habituação dos animais ao estresse utilizado em nosso trabalho.

**Palavras-chave:** estresse; refinamento ambiental; manejo não-aversivo; comportamento tipo-depressivo; comportamento tipo-ansioso

## ABSTRACT

Stress stimulates the brain to initiate short-term coping and adaptation, generating responses to maintain homeostasis. Stress has a biphasic effect on physical adaptations (for example, changes in electrophysiological and morphological processes of neurons) that varies depending on the intensity of the stressor. In studies with rodents, it has been shown that stressful stress can lead to depressive-like and anxiety-like behavior. Factors involved in the husbandry or maintenance of laboratory animals, such as housing conditions and handling, may lead to behavioral changes associated with stress, but are often ignored. In the present work we sought to evaluate the impact of the refined environment (RE) and non-aversive handling (NAH) by cupping, alone or in combination, on the behavior of adult female Swiss mice subjected to stress. The RE consisted of adding shredded paper for nesting, one PVC tunnel and one cardboard tunnel for shelter; and the NAH corresponded to capturing the animal with the researcher's hands as in a platform position. Assessments of behaviors related to emotionality were carried out during the cage cleaning and intraperitoneal (i.p.) administration procedures, and of depressive-like and anxious-like behaviors through the tail suspension test (TST), splash test (ST) and open field test (OFT), after exposure to chronic restraint stress (CRS; 2 hours/day for 10 days). In our work, we found that NAH, but not RE, prevents animals' emotionality behaviors (defecation and attempts to escape from the experimenter's hands) during cage cleaning. However, RE and/or NAH were not able to promote changes in emotionality behaviors (defecation, urination, reluctance and vocalization) during i.p. administration. In behavioral tests, animals subjected to CRS did not show changes in parameters associated with depressive-like behavior in the TST and ST. Moreover, none of the interventions elicited changes in the same parameters. When evaluating exploratory behavior in the OFT, CRS and the ER+NAH association promoted an anxiolytic-like effect. In the same test, when evaluating non-induced self-grooming behavior, the anxiolytic-like effect was promoted only by NAH. The set of our results suggests that CRS 2 hours/day for 10 days did not elicit a depressive-like phenotype and that the absence of antidepressive-like effects of RE/NAH and anxiolytic-like effects of RE in behavioral tests, as well as the anxiolytic-like effect promoted by CRS in OFT may be related to the animals' habituation to the stress employed in our work.

**Keywords:** stress; environmental refinement; non-aversive handling; depressive-like behavior; anxious-like behavior.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Resposta ao estresse.....	13
<b>Figura 2.</b> Efeito bifásico do estresse.....	16
<b>Figura 3.</b> Grupos experimentais .....	26
<b>Figura 4.</b> Condições de alojamento .....	28
<b>Figura 5.</b> Formas de manejo de camundongos. ....	29
<b>Figura 6.</b> Desenho experimental .....	31
<b>Figura 7.</b> Habituação ao manejo ( <i>handling</i> ) .....	33
<b>Figura 8.</b> Técnica de contenção de 3 dedos.....	34
<b>Figura 9.</b> Manipulação para contenção. ....	35
<b>Figura 10.</b> Simulação do teste de suspensão pela cauda.....	38
<b>Figura 11.</b> Efeito do AR e MNA nos comportamentos de emocionalidade evidentes durante as trocas de caixa e marcação de cauda ao longo dos primeiros 14 dias de protocolo.....	43
<b>Figura 12.</b> Efeito do AR e MNA nos comportamentos de emocionalidade evidentes durante a administração intraperitoneal .....	46
<b>Figura 13.</b> Efeito do AR, MNA e ECC no ganho de peso .....	47
<b>Figura 14.</b> Efeito do RA, MNA e ECC no ganho de peso .....	48
<b>Figura 15.</b> Efeito do AR, MNA e ECC no TSC.....	50
<b>Figura 16.</b> Efeito do AR, MNA e ECC na atividade locomotora no TCA.....	51
<b>Figura 17.</b> Efeito do AR, MNA e ECC no TBS.....	53
<b>Figura 18.</b> Efeito do AR, MNA e ECC no comportamento do tipo-ansioso avaliado pelo TCA. ....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AR	Ambiente refinado
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CRS	Chronic restraint stress
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EA	Enriquecimento ambiental
ECC	Estresse crônico por contenção
ECLI	Estresse crônico leve imprevisível
GR	Receptor de glicocorticoide
GRE	Elemento responsivo à glicocorticoide
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
i.p.	Intraperitoneal
MNA	Manejo não-aversivo
MR	Receptor de mineralocorticoide
NAH	Non-aversive handling
OFT	Open field test
PVN	Núcleo paraventricular
SAM	Simpático-adrenal-medular
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
ST	Splash test
RE	Refined environment
TBS	Teste de borrifagem de sacarose
TCA	Teste do campo aberto
TCCE	Teste da caixa clara-escura
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TLCE	Teste do labirinto em cruz elevado
TNF	Teste do nado forçado
TPS	Teste de preferência pela sacarose
TSC	Teste de suspensão pela cauda
TST	Tail suspension test
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

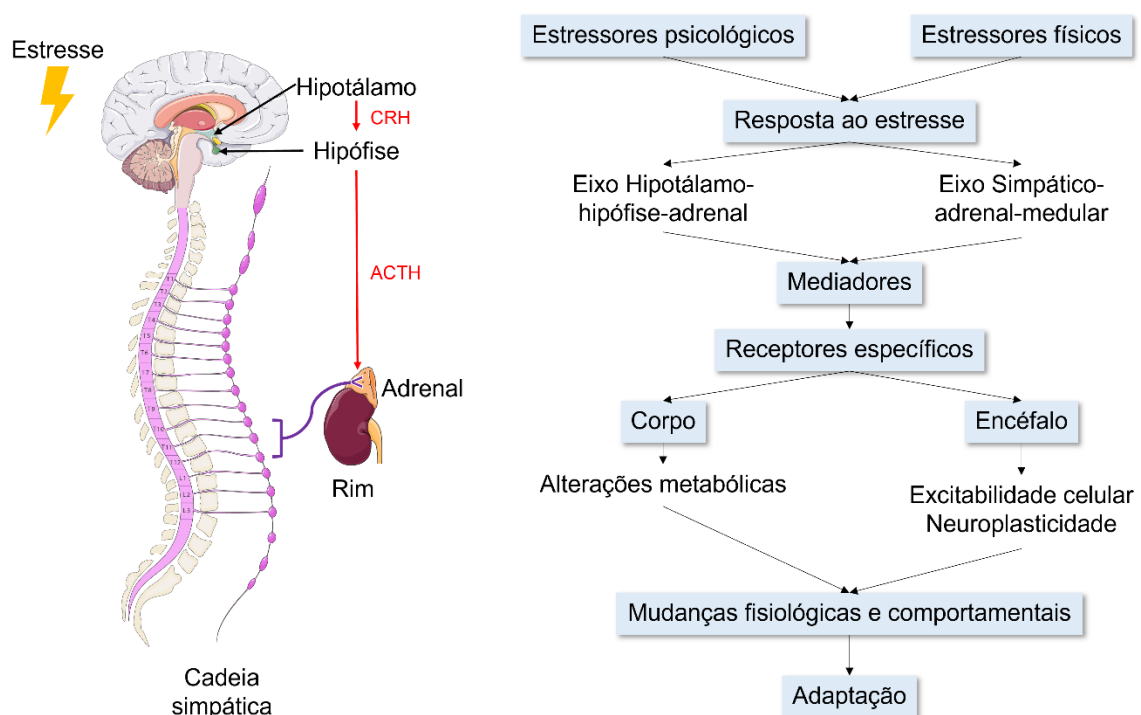
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1	ESTRESSE.....	13
1.2	ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL (EA).....	18
1.3	MANEJO NÃO-AVERSIVO (MNA).....	19
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
4.1	OBJETIVO GERAL .....	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
5.1	ANIMAIS .....	25
5.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	25
<b>5.2.1</b>	<b>Condições de alojamento</b> .....	<b>26</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Formas de manejo</b> .....	<b>28</b>
5.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
<b>5.3.1</b>	<b>Recebimento dos animais</b> .....	<b>31</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Troca de caixas</b> .....	<b>32</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Habituação ao manejo não-aversivo</b> .....	<b>32</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Administração intraperitoneal (i.p.)</b> .....	<b>33</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Estresse crônico por contenção</b> .....	<b>34</b>
5.4	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	35
<b>5.4.1</b>	<b>Escores comportamentais – troca de caixa</b> .....	<b>35</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Escores comportamentais – administração i.p.</b> .....	<b>36</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Avaliação dos comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso</b> .....	<b>37</b>
5.4.3.1	<i>Teste de suspensão pela cauda</i> .....	37
5.4.3.2	<i>Teste do campo aberto</i> .....	38
5.4.3.3	<i>Teste de borrifagem de sacarose</i> .....	39
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>

6.1	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO EM PROCEDIMENTOS DE ROTINA.....	41
<b>6.1.1</b>	<b>Escores comportamentais – trocas de caixa.....</b>	<b>41</b>
<b>6.1.2</b>	<b>Escores comportamentais – administração i.p. ....</b>	<b>44</b>
6.2	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS .....	46
<b>6.2.1</b>	<b>Peso corporal .....</b>	<b>46</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Peso das adrenais .....</b>	<b>48</b>
6.3	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO.....	49
<b>6.3.1</b>	<b>Teste de suspensão pela cauda.....</b>	<b>49</b>
<b>6.3.2</b>	<b>Teste do campo aberto .....</b>	<b>50</b>
<b>6.3.3</b>	<b>Teste de borrifagem de sacarose .....</b>	<b>52</b>
6.4	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO.....	54
<b>6.4.1</b>	<b>Teste do campo aberto .....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ESTRESSE

Estresse é definido como “uma resposta não-específica de um indivíduo a qualquer demanda desafiadora do ambiente (i.e. um estressor)” (RIBONI; BELZUNG, 2017). Segundo Selye, o “eustresse” está relacionado a respostas adaptativas que levam o organismo a interagir adequadamente com o ambiente. Já o “distresse” traz respostas negativas ao organismo (RIBONI; BELZUNG, 2017). Em mamíferos, a resposta ao estresse (**Figura 1**) é mediada de maneira rápida com efeitos de curta duração pelo eixo simpático-adrenal-medular (SAM) ou com efeitos curtos e duradouros pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (GODOY et al., 2018).



**Figura 1. Resposta ao estresse.** Diante de um evento estressor, o organismo responde por meio de dois eixos: o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o eixo simpático-adrenal-medular. O primeiro atua por meio do hormônio liberador de

corticotrofina (CRH) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) para estimular a secreção de cortisol pelo córtex da adrenal. No segundo, neurônios colinérgicos da cadeia simpática estimulam a secreção de adrenalina e noradrenalina pela medula da adrenal. Adaptado de Godoy et al. (2018).

O estresse estimula o encéfalo a iniciar o enfrentamento e a adaptação de curto prazo gerando respostas para manter a homeostase (RIBONI; BELZUNG, 2017). O estresse interno ou externo é percebido por diferentes vias aferentes que estimulam estruturas de centros integrativos no encéfalo (e.g. hipotálamo). A resposta rápida a estressores se dá pela ativação do sistema nervoso autônomo (SNA) e confere ao organismo o estado de “luta ou fuga” (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Neurônios do tronco encefálico e da cadeia simpática na medula espinal estimulam a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) sintetizadas em neurônios da divisão simpática do SNA e na medula das glândulas adrenais (WILLIAM TANK; LEE WONG, 2014). O aumento dessas catecolaminas promove efeitos imediatos no músculo liso e em diversos órgãos, resultando na manutenção do estado alerta e em alterações metabólicas (aumento da disponibilidade de glicose, consumo de oxigênio e termogênese) e cardiovasculares (GODOY et al., 2018).

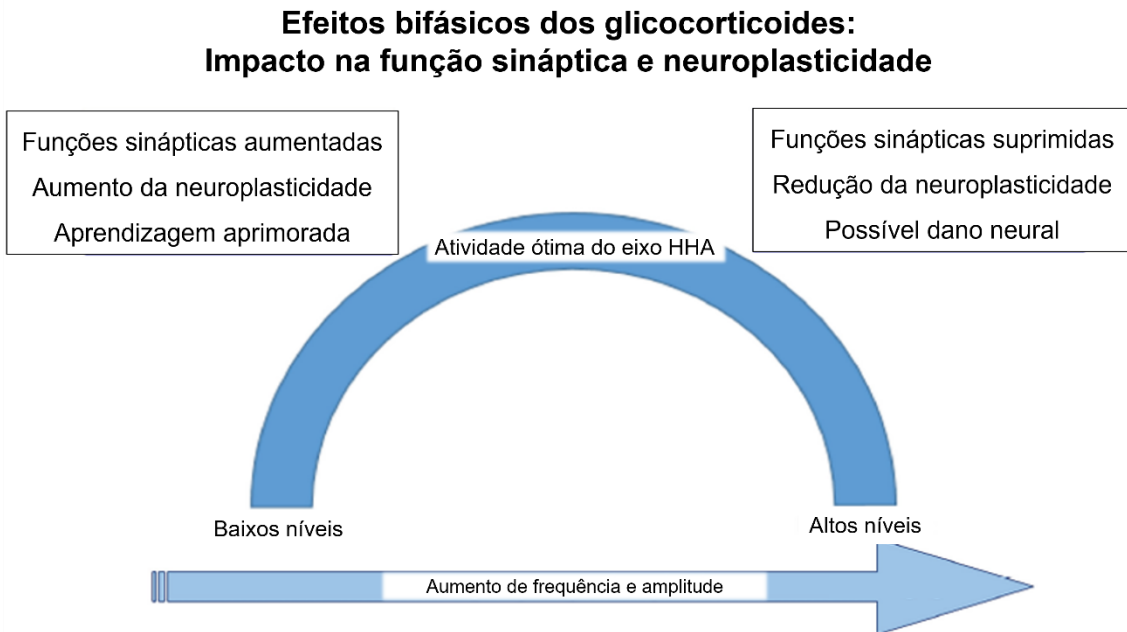
O eixo HHA atua paralelamente ao eixo SAM. Frente a um estímulo estressor, a adenohipófise (ou pituitária anterior) sofre estímulo do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina sintetizados pelas células do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. A adenohipófise, então, produz e secreta o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual estimula a síntese de glicocorticoides no córtex da glândula adrenal. Os glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) são hormônios esteroides que, ao se ligarem a receptores citosólicos de mineralocorticoides (MR) ou de glicocorticoides (GR), promovem alterações em processos fisiológicos necessários para a adaptação fisiológica e comportamental (GODOY et al., 2018). Esse mecanismo ocorre devido a formação do complexo ligante-receptor, seguido da ativação da transcrição mediada por elementos responsivos a glicocorticoides (GRE) ou por fatores de transcrição de

proteínas envolvidas em respostas imunes, cognição e processos metabólicos adaptativos (GODOY et al., 2018). O MR está localizando principalmente nas regiões límbicas, enquanto GR é amplamente distribuído no encéfalo. Devido ao MR possuir maior afinidade a glicocorticoides do que o GR, este receptor é ativado em baixas concentrações e medeia o funcionamento basal dos glicocorticoides no ciclo circadiano e respostas iniciais ao estresse. Por outro lado, a ativação de GR ocorre em concentrações pico de glicocorticoides induzidas pelo ciclo circadiano ou pelo estresse, contribuindo para a adaptação comportamental e recuperação (MCEWEN; AKIL, 2020; TER HORST et al., 2012).

Respostas rápidas ao estresse seguido de sua resolução são fundamentais para uma resposta saudável a estressores (MCEWEN; AKIL, 2020). O hipocampo está envolvido no término das respostas ao estresse mediadas pelo eixo SAM e HHA. O término da resposta rápida ao estresse mediada pelo SNA ocorre através dos efeitos não-genômicos (e.g. aumento da excitabilidade celular) de corticosteroides sobre neurônios hipocâmpais (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Já a resposta mediada pelo eixo HHA é encerrada pelo mecanismo de feedback negativo mediado pelo hipocampo e o PVN (MCEWEN; AKIL, 2020).

O estresse possui um efeito bifásico sobre as adaptações cerebrais (e.g. alteração em processos eletrofisiológicos e morfológicos de neurônios) que varia conforme a intensidade do estressor, obedecendo uma curva em formato de U invertido (MCEWEN, 2019) (**Figura 2**). Também conhecido como hormese, esse efeito é um processo evolutivo conservado que contribui para sobrevivência em condições adversas (CALABRESE; MATTSON, 2017; ZIMMERMANN et al., 2014). Em baixos níveis de glicocorticoide, a resposta inicial de adaptação ao estresse consiste no aumento de alerta e atenção, bem como o aumento de funções cognitivas e de memória no hipocampo (DIAMOND et al., 1992). As adaptações promovidas por baixas doses de estresse levam à resiliência. Isso significa que ao ser exposto a doses semelhantes ou mais altas de estressores, organismos pré-condicionados exibem a capacidade de manter funções físicas e psicológicas normais, evitando consequências negativas em seu bem-estar (OSÓRIO et al., 2017). Entretanto, com

o aumento da intensidade, duração ou frequência do estresse, os níveis de glicocorticoides alcançam concentrações mais altas e há prejuízo nas funções adaptativas, resultando em prejuízos na saúde física e mental (DIAMOND et al., 1992; MCEWEN, 2007).



**Figura 2. Efeito bifásico do estresse.** HHA: hipotálamo-hipófise-adrenal. Adaptado de McEwen & Akil (2020).

O estresse é considerado um fator de risco para diversas doenças, incluindo o Transtorno Depressivo Maior (TDM), um transtorno que coexiste com a ansiedade (OTTE et al., 2016; ZIMMERMAN et al., 2019). Relata-se que episódios de estresse intenso na vida adulta (e.g. luto, desemprego, separação, problemas crônicos ou ameaçadores à saúde) precedem episódios depressivos (KESSLER, 1997). Notavelmente, a exposição a estressores durante a infância (e.g. abuso físico ou sexual, perda dos pais) parece estar associado com o risco, gravidade e cronicidade do TDM na vida adulta (LI; D'ARCY; MENG, 2016). As mulheres têm o risco duas vezes maior do que homens de desenvolver depressão após a puberdade (OTTE et



al., 2016). Apesar de o TDM possuir maior prevalência e incidência em mulheres, estudos pré-clínicos investigando depressão e ansiedade são realizados majoritariamente em machos (TER HORST et al., 2012). No estudo de Camargo et al. (2022), por exemplo, o efeito profilático de um composto antidepressivo de ação rápida foi avaliado apenas em camundongos machos. Em geral, relata-se que o motivo da não utilização de fêmeas em estudos pré-clínicos é a variabilidade advinda do ciclo estral (TER HORST et al., 2012). Machos e fêmeas respondem de maneiras diferentes ao estresse. Essas diferenças incluem, por exemplo, maior reatividade do eixo HHA em fêmeas e diferentes níveis de neurotransmissores associados à adaptação ao estresse (HODES et al., 2024). Apesar do menor número de estudos com fêmeas em estudos pré-clínicos, uma gama de informações acerca da fisiopatologia de transtornos associados ao estresse foi revelada a partir de experimentos com animais não-humanos (HODES et al., 2024).

Em estudos com roedores, foi demonstrado que o estresse crônico pode levar ao comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso. Seguido da exposição ao estressor, os animais são comumente submetidos ao teste de nado forçado (TNF) ou teste de suspensão pela cauda (TSC). Esses testes são baseados em interpretações antropomórficas de que a imobilidade do animal frente a uma situação inescapável representaria, em alguma proporção, a desesperança – um sintoma presente no TDM (PETKOVIĆ; CHAUDHURY, 2022). Dentre os tipos de estresse que resultam no comportamento tipo-depressivo, figuram o estresse físico por imobilização, administração crônica de corticosterona, estresse crônico leve imprevisível (ECLI), conflito por derrota social, desamparo aprendido e a separação materna (PETKOVIĆ; CHAUDHURY, 2022). Esses mesmos estressores resultam, ainda, no comportamento tipo-ansioso, avaliado principalmente pelo teste do labirinto em cruz elevado (TLCE), mas também pelo teste do campo aberto (TCA) e pelo teste da caixa clara-escuro (TCCE). Esses testes trazem o conflito abordagem-evitação, o qual reflete a contradição entre a curiosidade natural do animal de explorar um ambiente novo e a preferência por estarem em espaços fechados ou escuros em vez de locais abertos ou iluminados (BECKER; PINHASOV; ORNOY, 2021).

Outros fatores envolvidos na criação ou manutenção de animais de laboratório, como as condições de alojamento e forma de manejo, podem levar a alterações comportamentais associadas ao estresse. Esses dois fatores serão abordados nas próximas seções deste trabalho.

## 1.2 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL (EA)

Estudos com EA iniciaram na década de 40 com Donald Hebb. Hebb observou que permitir que seu rato doméstico explorasse outros ambientes garantia ao animal melhoria nas funções cognitivas (SMAIL et al., 2020). O termo “enriquecimento ambiental” ainda não possui definição determinada. Contudo, parece comum entre os estudos nessa área o agrupamento de maior número de animais alojados em gaiolas maiores contendo brinquedos de diferentes cores e tamanhos, túneis, materiais para ninho e roda de exercício voluntário (KEMPERMANN, 2019). Alternativas para o termo “enriquecimento ambiental” incluem “modificações no ambiente ou nas condições de alojamento” (OLSSON; DAHLBORN, 2002), “suplementação habitacional” (BENEFIEL; DONG; GREENOUGH, 2005), “complexidade ambiental” (PRITCHETT-CORNING, 2019) e “refinamento ambiental” (BAUMANS; VAN LOO, 2013). Diferentes estudos adotam itens arbitrários e duração de exposição variada ao enriquecimento, abrangendo períodos específicos ou exposição contínua nas gaiolas de alojamento (KEMPERMANN, 2019). Apesar da dificuldade de comparar estudos devido à falta de padronização nas condições de enriquecimento, essa intervenção tem gerado resultados consistentes (KEMPERMANN, 2019).

Os efeitos do EA têm sido avaliados em uma variedade de distúrbios do sistema nervoso central (KIM et al., 2021; LAZAROV et al., 2005; LIN et al., 2021; ZERAATI et al., 2021), incluindo o TDM (MANOSSO et al., 2022). A exposição a diferentes objetos durante o período de EA pode ser capaz de promover habituação à novidade de maneira mais rápida e aumentar a habilidade dos animais de enfrentar estressores (SMAIL et al., 2020). É relatado que o EA é capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo (SCHLOESSER et al., 2010; SHILPA et al., 2017; VEENA et al., 2009) e

tipo-ansioso (SCHLOESSER et al., 2010) induzidos por estresse crônico em roedores adultos. Os efeitos tipo-antidepressivos do EA foram observados em diferentes testes, como o TSC, teste de borrifagem de sacarose (TBS), enquanto os efeitos tipo-ansiolíticos foram evidenciados por outros testes, como o TCA e TLCE (SMAIL et al., 2020). Apesar dos benefícios comportamentais relatados, os efeitos do EA podem variar conforme as características dos animais em estudo (sexo, idade, linhagem) e duração da exposição ao EA (horas ou dias X semanas) e os elementos de enriquecimento adotados (SMAIL et al., 2020).

No Brasil, através da Resolução Normativa CONCEA nº 57 de 06 de dezembro de 2022 (BRASIL, 2022), instaurou-se a obrigatoriedade do EA nos recintos primários de roedores e lagomorfos em instituições de ensino e pesquisa científica com a finalidade de estimular positivamente o animal tendo em vista a prevenção da ansiedade, frustração e o estresse. Segundo o Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, EA é “qualquer medida que promove a expressão de tipos de comportamento naturais específicos da espécie e uma diminuição, se não o desaparecimento, de tipos de comportamento anormais. Deve ser baseado na promoção de um efeito positivo no bem-estar físico e psicológico do animal” (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2023). O guia brasileiro sugere modificações em diversos âmbitos de relação do animal com o seu ambiente, incluindo a interação com o experimentador. Entretanto, apesar de sugerir diversas estratégias de EA, a versão vigente deste guia não define os elementos obrigatórios para cumprir esta medida.

### 1.3 MANEJO NÃO-AVERSIVO (MNA)

A manipulação de animais de laboratório pela cauda, apesar de ser a forma mais comum de manipulação, é um fator frequentemente ignorado que leva ao estresse e a prejuízos comportamentais (HURST; WEST, 2010). O importante trabalho de Hurst & West (2010) demonstrou que camundongos de diferentes linhagens que foram manipulados pelo método de *cupping* (captura do animal com as mãos abertas

em plataforma) ou com o auxílio de um túnel por 9 dias consecutivos apresentaram diminuição de comportamentos associados à ansiedade em comparação com animais manipulados pela cauda. Ainda, observou-se que os animais manipulados por *cupping* ou com auxílio do túnel apresentaram maior tempo de interação com o experimentador, mesmo após terem sido submetidos à contenção. A partir deste estudo, diversos trabalhos buscaram investigar os efeitos da manipulação de animais pela cauda comparando-os com diferentes tipos de manejo não-aversivo (MNA): *cupping* e manejo por túnel.

Adoção de técnicas de refinamento e avaliação dos comportamentos exibidos após procedimentos específicos (i.e. contenção) também têm sido realizados. Em relação à contenção, medidas protetivas para alterações comportamentais induzidas por esse procedimento incluem o menor tempo de captura e realização da técnica (AZIZ; ELSHAFFEY; RAMADAN, 2023), bem como a adoção de diferentes estratégias de refinamento para esse procedimento. Por exemplo, a substituição da captura pela cauda por MNA durante a contenção de camundongos adultos reduz comportamentos de desconforto, evidenciados pela diminuição da relutância para contenção e do número de ocorrências de vocalizações (DAVIES et al., 2022). Essa mesma redução nos comportamentos associados a desconforto foi observada após o refinamento da técnica de contenção em ratos machos adultos, os quais também apresentaram números reduzidos de bolos fecais (STUART; ROBINSON, 2015).

Outros estudos avaliaram o impacto do MNA realizado durante manipulações de rotina (i.e. troca de caixa) sobre o comportamento tipo-ansioso. Animais permitidos a explorar as mãos do experimentador ao longo de três semanas ou manipulados por túnel ou *cupping* durante as trocas de caixa apresentaram redução do comportamento tipo-ansioso no TLCE quando comparado com animais manipulados pela cauda durante os mesmos períodos (GOUVEIA; HURST, 2019; UENO et al., 2020). Esse comportamento também foi observado após a manipulação por túnel (2x/semana) (NOVAK et al., 2022). Notavelmente, ao chegar nas unidades de pesquisa, camundongos manipulados pela cauda durante procedimentos de rotina desde o

nascimento já apresentam comportamentos de ansiedade e medo (DAVIES et al., 2022).

Os resultados obtidos com animais submetidos ao MNA divergem, entretanto, quanto ao comportamento tipo-depressivo. Isso pode ser devido, provavelmente, à variação na duração da manipulação, testes realizados e o sexo avaliado. Foi observado que a manipulação diária pela cauda, em comparação com o manejo por túnel, induz comportamento tipo-anedônico, evidenciado pela redução no consumo de sacarose (CLARKSON et al., 2018, 2020). Esses resultados não foram confirmados no estudo de Novak et al. (2022), o qual não observou efeito do manejo sobre o comportamento tipo-anedônico avaliado pelo mesmo teste. Em testes preditivos para atividade antidepressiva, os efeitos do manejo também variaram. Apesar de não promover alterações em fêmeas, o manejo diário ou semanal de camundongos machos com auxílio de túnel promoveu efeito tipo-antidepressivo, evidenciado pela diminuição no tempo de imobilidade no TNF (SENSINI et al., 2020). Entretanto, não foi observada nenhuma diferença nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado após 21 dias de exploração livre das mãos do pesquisador ou manipulação pela cauda no mesmo período (UENO et al., 2020).

Diferentemente de estudos anteriores, Novak et al. (2022) avaliaram o comportamento de camundongos BALB/c machos manejados ou não pela cauda após terem sido expostos a cinco semanas de ECLI, um modelo de depressão induzido por estresse. Segundo os autores, a exposição dos animais ao ECLI serviria de controle positivo para a manipulação pela cauda. Apesar de não se evidenciar o comportamento tipo-depressivo no estudo, é importante a realização de outros estudos utilizando modelos de estresse.

## 2 JUSTIFICATIVA

O estresse crônico por contenção (ECC) em roedores é utilizado no estudo de diferentes patologias, incluindo os transtornos de humor. O estresse e doenças afetadas pelo estresse, como o TDM, possuem maior incidência em mulheres do que em homens. Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa identificaram efeitos profiláticos de compostos antidepressivos de ação rápida em camundongos *Swiss* machos submetidos ao ECC de 2 horas/dia por 10 dias porém camundongos fêmeas não foram avaliadas. Nesse estudo, as condições de alojamento consistiram em gaiolas contendo apenas maravalha e a forma de manejo dos animais foi realizada através da captura pela cauda. A ausência de elementos que aumentem a complexidade das gaiolas dos animais de laboratório e a sua captura pela cauda são fatores que podem levar a alterações comportamentais associadas ao estresse. Desde dezembro de 2022, é obrigatória a adoção de estratégias de EA nos recintos de roedores em instituições de ensino e pesquisa no Brasil. Considerando a necessidade de avaliar os efeitos profiláticos dos compostos antidepressivos de ação rápida também em fêmeas e a implementação de condições de alojamento e manejo que promovam o bem-estar animal, nosso trabalho servirá como um estudo piloto para a avaliação dos efeitos do refinamento ambiental e/ou MNA em camundongos *Swiss* fêmeas submetidas ao ECC (2 horas/dia por 10 dias).

### **3 HIPÓTESE**

A hipótese deste trabalho é que a exposição dos animais ao AR e/ou ao MNA previamente e concomitante ao ECC (2 horas/dia por 10 dias) prevenirá contra o comportamento tipo-depressivo e/ou tipo-ansioso induzido pelo estresse de contenção.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto do refinamento ambiental e do MNA por *cupping*, isoladamente ou em associação, no comportamento de camundongos fêmeas submetidas ao estresse.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os comportamentos de emocionalidade evidentes durante as trocas de gaiola em camundongos fêmeas submetidas ao AR ou MNA, isoladamente ou em associação.

- Avaliar os comportamentos de emocionalidade evidentes durante o procedimento de administração intraperitoneal em camundongos fêmeas submetidas ao AR ou MNA, isoladamente ou em associação.

- Avaliar a resiliência à indução do comportamento tipo-depressivo conferida pelo AR ou MNA, isoladamente ou em associação, em camundongos fêmeas submetidos a um modelo de estresse por contenção.

- Avaliar a resiliência à indução do comportamento tipo-ansioso conferida pelo AR ou MNA, isoladamente ou em associação em camundongos fêmeas submetidos a um modelo de estresse por contenção.



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

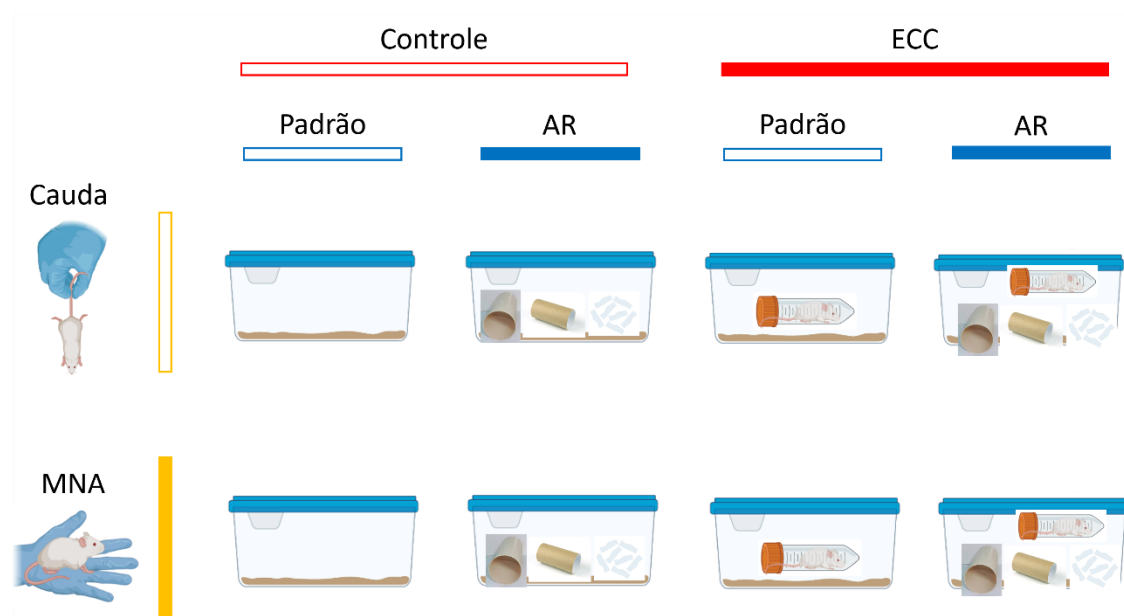
### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas, pesando, em média, entre 36 e 39g (primeiro e último dia de protocolo, respectivamente) e com idade de 46 dias ao chegar, finalizando com 70 dias. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFSC a uma temperatura de 21°C ( $\pm$  1°C) e umidade ~56%, sob um ciclo claro-escuro de 12:12h (07:00-19:00). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (8 animais por gaiola) de dimensões de 16 cm x 34 cm x 40 cm (altura x largura x profundidade) com acesso a ração e água *ad libitum*. A troca das gaiolas foi realizada 2 vezes por semana. Os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC) sob número 4711200722. A escolha pela utilização de fêmeas se deve a resultados prévios de nosso grupo no qual foram observados efeitos tipo-antidepressivo de compostos antidepressivos de ação rápida em camundongos *Swiss* machos submetidos ao ECC (CAMARGO et al., 2022) e a necessidade de estudar o comportamento de camundongos fêmeas neste modelo. Para mais detalhes, ver **seção 7 DISCUSSÃO**. Além disso, alguns estudos reportam que camundongos fêmeas e mulheres apresentam maior vulnerabilidade ao estresse e uma maior prevalência de sintomas de depressão e ansiedade ocorre em mulheres (HELMAN et al., 2023).

### 5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Este trabalho buscou avaliar os efeitos da exposição ao ambiente refinado (AR), ao MNA e ao estresse crônico por contenção (ECC). Para isso, os animais foram

alocados aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais (8 animais por grupo) (**Figura 3**): 1- Cauda Padrão, 2- Cauda AR, 3- MNA Padrão, 4- MNA AR, 5- ECC Cauda Padrão, 6- ECC Cauda AR, 7- ECC MNA Padrão e 8- ECC MNA AR. Ao longo deste documento, o termo “AR” fará referência exclusivamente às condições de alojamento adotadas neste trabalho, enquanto “EA” se referirá às modificações, complexas ou não, realizadas por outros trabalhos. Para mais detalhes sobre o AR e MNA adotados, ver seções **5.2.1 Condições de alojamento** e **5.2.2 Formas de manejo**.



**Figura 3. Grupos experimentais.** AR: ambiente refinado, ECC: estresse crônico por contenção. Fonte: Elaborado pela autora.

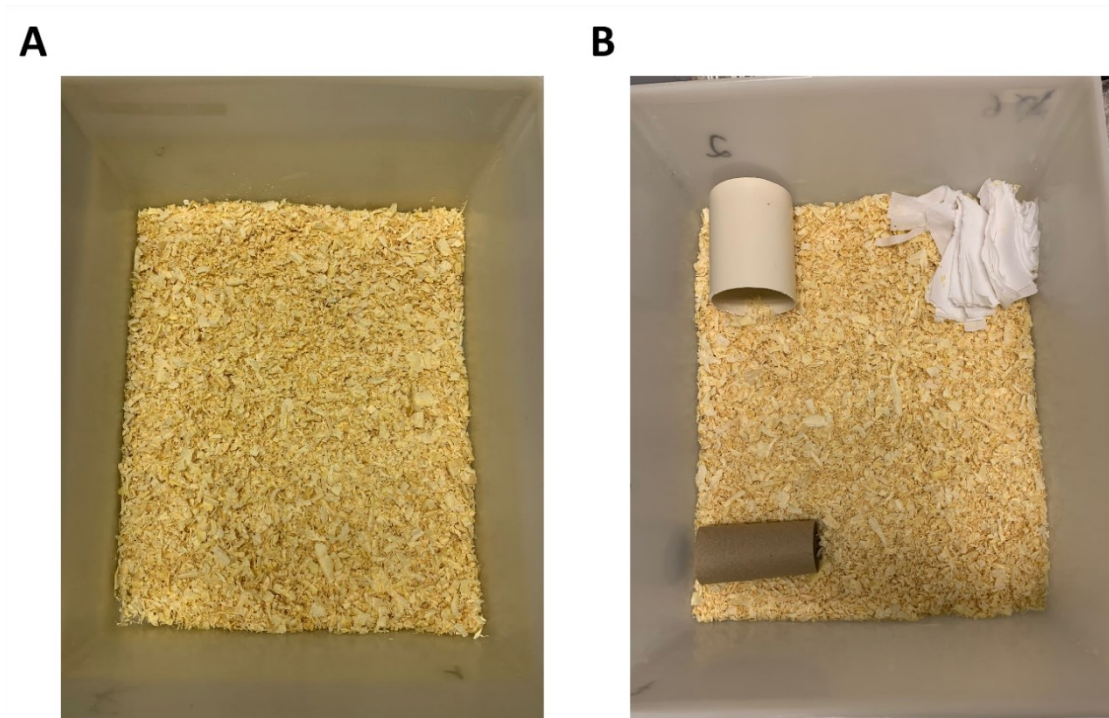
### 5.2.1 Condições de alojamento

Através da Resolução nº 57 de 06 de dezembro de 2022, instaurou-se a obrigatoriedade do EA nos recintos primários de roedores e lagomorfos em instituições de ensino e pesquisa científica com a finalidade de estimular positivamente o animal tendo em vista a prevenção da ansiedade, frustração e o estresse crônico

(CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2023). Previamente, a condição de alojamento adotada para a realização de estudos com roedores era a adição de apenas maravalha à gaiola. Apesar de sugerir diversas estratégias de EA, a versão vigente do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica não define os elementos obrigatórios para cumprir esta medida.

Em nosso trabalho, gaiolas em condição padrão continham apenas maravalha (serragem de madeira) para representar as condições de alojamento dos animais utilizadas em estudos prévios. A fim de aderir à obrigatoriedade do EA proposto pelo CONCEA, as gaiolas com refinamento ambiental continham, além da maravalha, 05 folhas de papel toalha picadas para substrato para ninho, 01 túnel de papelão (4 cm X 10 cm, diâmetro:comprimento) e 01 túnel cilíndrico de PVC (7,5cm X 10 cm diâmetro:comprimento) para abrigo. A escolha dos elementos adotados para a condição refinada foi baseada na meta-revisão de Ratuski & Weary (2022). Em nosso trabalho, o papel picado e os túneis correspondem, respectivamente, ao material para ninho e abrigo sugeridos pelos autores do estudo citado como parte dos elementos básicos para o alojamento de roedores. Apesar de serem considerados “elementos básicos” pelos autores, aqui trazemos como elementos de um “ambiente refinado” em comparação com as condições prévias de estudo.

Os túneis de papelão foram previamente autoclavados e foram considerados adequados para o alojamento quando, após a autoclavagem, possuíam rigidez. Túneis com a rigidez comprometida foram excluídos. A troca dos túneis de papelão foi realizada conforme o cronograma de troca de caixa (higienização) dos animais (2x/semana). No caso de troca das caixas dos grupos expostos ao refinamento ambiental, os elementos foram posicionados conforme a **Figura 4**. Aqui, os termos “gaiola” e “caixa” são equivalentes.



**Figura 4. Condições de alojamento.** Gaiola em condição padrão (A) e gaiola com ambiente refinado (B). Fonte: Imagem disponibilizada pela autora.

Foram inseridos na nova gaiola o túnel de PVC vindo da gaiola anterior, um novo túnel de papelão e papeis picados novos para ninho. Apenas os pesquisadores executantes realizaram a troca de caixa. Para que o cheiro dos animais pudesse ser transposto às gaiolas limpas ao longo do protocolo, os túneis de PVC foram higienizados uma única vez com sabão neutro anteriormente ao experimento.

### 5.2.2. Formas de manejo

Os animais foram manejados pela cauda ou pelo método de MNA desde seu recebimento no Biotério Setorial e durante todas as etapas deste protocolo (**Figura 5**). Os animais manejados pela cauda foram capturados pela base da cauda para serem erguidos ou contidos, a depender do procedimento. Caso a suspensão do animal demorasse mais que 2 segundos, o animal eram mantidos capturados pela base da

cauda, porém permitido apoio das patas dianteiras no dorso da mão do pesquisador (GOUVEIA; HURST, 2019). O método de MNA consistiu em posicionar as mãos em frente ao animal, próximo ao chão da gaiola, para erguê-lo com as mãos em plataforma, sem segurá-los pela cauda (GOUVEIA; HURST, 2019). Os pesquisadores utilizaram luvas nitrílicas para todos os procedimentos.

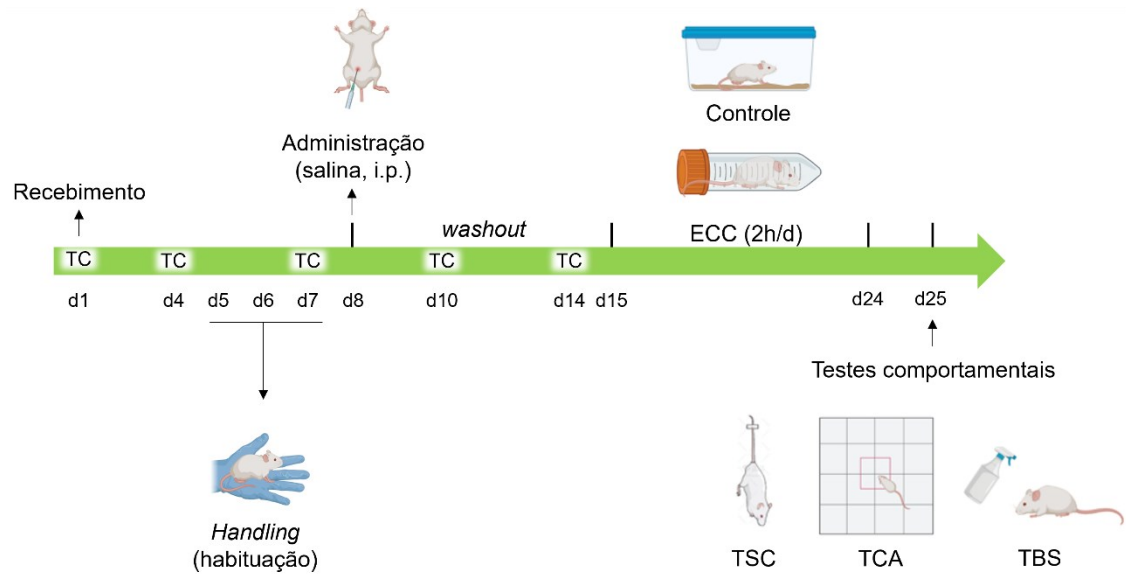
**A****B**

**Figura 5. Formas de manejo de camundongos.** Representação da captura pela cauda (A) e da captura com mãos em plataforma (B). Fonte: Imagem disponibilizada pela autora.

### 5.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental foi seguido conforme ilustrado na **Figura 6**. Os animais foram recebidos e distribuídos para novas caixas de acordo com as condições de alojamento e manejo definidos para cada grupo. Entre os dias 5 e 7 foi realizada a habituação ao MNA (*handling*) (conforme descrito na seção **5.3.3 Habituação ao manejo não-aversivo**). No 8º dia, os animais foram submetidos à administração via intraperitoneal (i.p.) de salina (0,9%). Após 7 dias, os animais foram pesados e submetidos ao estresse crônico de contenção durante 2 horas. A contenção foi realizada por mais 9 dias consecutivos e a pesagem foi feita a cada dois dias durante esse período, finalizando 1 dia após a última contenção. No 25º dia, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e nos dias 26 (grupos submetidos ao estresse) e 27 (grupos controle) realizou-se a eutanásia e dissecação de estruturas encefálicas (córtex cerebral e hipocampo) para futuras determinações de proteínas sinápticas. Devido à influência dos anestésicos comumente usados (xilazina, cetamina) sobre a fosforilação de proteínas sinápticas de interesse (KOHTALA et al., 2016; YANG et al., 2011), a eutanásia foi realizada por decapitação sem anestesia a fim de preservar os parâmetros bioquímicos e neurofisiológicos relacionados ao modelo proposto neste projeto. A manipulação dos animais ocorreu entre o período de 8:00 e 12:00, com exceção dos dias em que ocorreram a administração i.p. (8:00 – 11:00; 13:00 – 16:30) e testes comportamentais (8:00 – 11:00; 13:00 – 18:00).

A escolha por este desenho experimental se deve a resultados prévios de nosso grupo em camundongos *Swiss* machos submetidos ao ECC (CAMARGO et al., 2022). Para mais detalhes, ver **seção 7 DISCUSSÃO**.



**Figura 6. Desenho experimental.** Para avaliar os efeitos do refinamento ambiental e/ou do manejo não-aversivo, os animais foram submetidos a procedimentos de rotina (troca de caixa, dias 1, 4, 7, 10 e 14) e à administração intraperitoneal (salina 0,9%) (dia 8). Animais submetidos ao manejo não-aversivo foram manipulados por 3 dias consecutivos anteriormente à administração i.p. para habituação ao manejo. No 15º dia, os animais foram submetidos ao ECC (2 horas/dia) por 10 dias, seguido de testes comportamentais no 15º dia. ECC: estresse crônico por contenção. i.p.: intraperitoneal. TC: troca de caixa. TCA: teste do campo aberto. TBS: teste de borrifagem de sacarose. TSC: teste de suspensão pela cauda. Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.3.1 Recebimento dos animais

Os animais foram recebidos em 3 gaiolas contendo 21-22 animais cada. Eles foram ambientados por pelo menos 40 minutos na sala central da sala de apoio do biotério setorial BQA sem nenhum outro animal presente. Para identificação do grupo experimental, cada animal teve a base de sua cauda marcada por canetas de tinta atóxica (Sharpie e Acrilex) no menor tempo possível de manipulação (20 a 60

segundos). Após a marcação, os animais foram distribuídos para as gaiolas respectivas ao grupo experimental ao qual foram designados.

### **5.3.2 Troca de caixas**

A troca de caixa ocorreu duas vezes por semana. Os animais foram manejados de acordo com a técnica de manejo designada. Durante as trocas de caixas, fez-se o retoque das marcações nas caudas, adotando um tempo de manipulação fixo de 1 minuto para cada animal. Durante o retoque, os animais ficaram suspensos imediatamente acima da gaiola (grupos MNA) ou com auxílio de uma grade (grupos Cauda) acima da gaiola imediatamente ao lado. A partir do início do protocolo de ECC, a manipulação para retoque da cauda foi estipulada para ser a de menor tempo possível, resultando em um retoque de aproximadamente 30 segundos.

### **5.3.3 Habituação ao manejo não-aversivo**

Foram realizadas três sessões de habituação ao MNA (uma sessão por dia por três dias consecutivos) (adaptado de HURST; WEST, 2010). O procedimento de habituação está ilustrado na **Figura 7**. No primeiro dia, cada animal foi suspenso com as mãos em plataforma imediatamente acima da gaiola e o animal foi enclausurado com as mãos do pesquisador, em formato de concha, durante 30 segundos. Em seguida, o animal foi devolvido à gaiola e imediatamente suspenso novamente para mais 30 segundos de habituação, agora com as mãos em plataforma para que o animal pudesse explorar o ambiente. No segundo e no terceiro dia, cada animal passou por uma única sessão de habituação na mão do pesquisador disposta em plataforma.



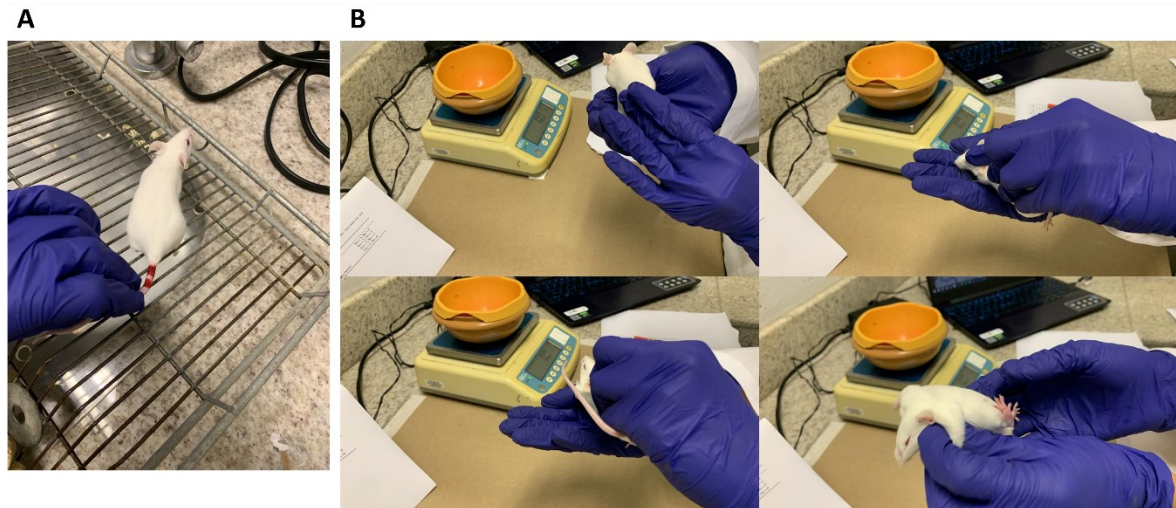


**Figura 7. Habituação ao manejo (*handling*).** Representação das etapas de habituação ao manejo. De cima para baixo: captura com as mãos em plataforma, conchinha (30s), e exploração livre. Fonte: Imagem disponibilizada pela autora.

#### **5.3.4 Administração intraperitoneal (i.p.)**

Com o objetivo de simular a administração de compostos potencialmente profiláticos, salina (0,9%) foi administrada por via i.p. (1 mL/kg) utilizando agulha hipodérmica (0,30 mm x 13 mm, diâmetro:comprimento). Os animais dos grupos Cauda foram contidos com auxílio de uma grade e tiveram a base da cauda seguradas. Animais dos grupos MNA foram posicionados apenas na mão ou no braço

do pesquisador. Nos dois casos foi realizada a técnica de contenção por três dedos (**Figura 8**).

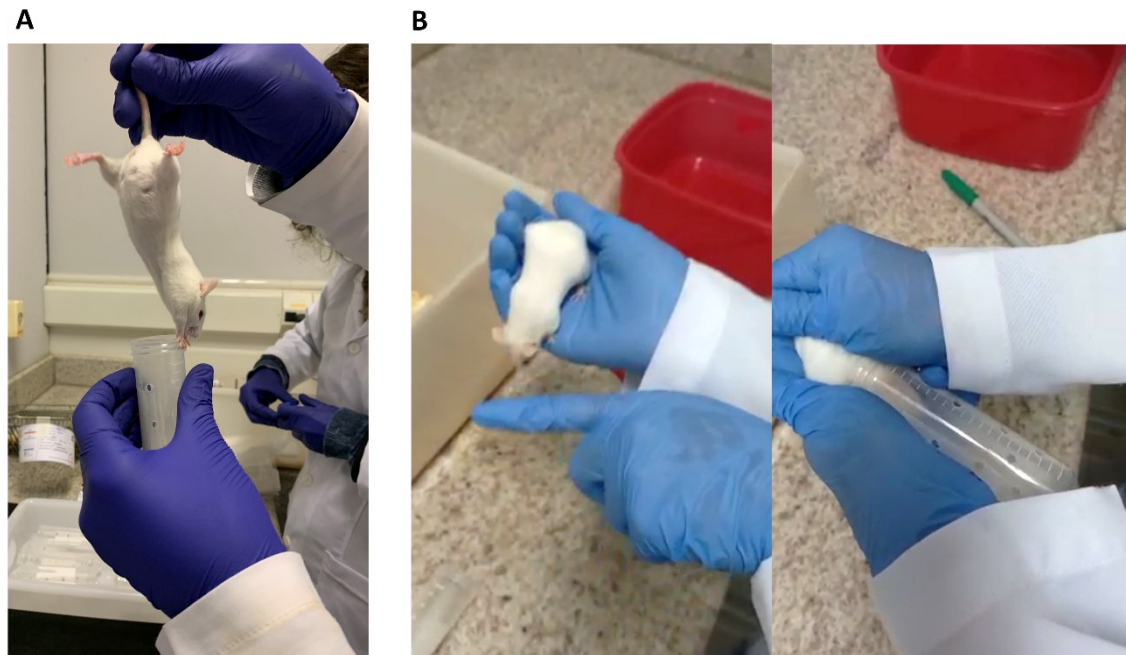


**Figura 8. Técnica de contenção de 3 dedos.** Animal capturado pela cauda apoiado em grade (A). Etapas da contenção: o animal está contido por meio da captura por pinça com dois dedos das pelagens laterais e da testa, formando prega única em direção ao dorso, permitindo que a traqueia se mantenha desobstruída (B). Fonte: Imagem disponibilizada pela autora.

### 5.3.5 Estresse crônico por contenção

Com o objetivo de proporcionar uma situação inescapável por meio da imobilização, cada animal foi enclausurado em um tubo de centrífuga fenestrado de 50mL, conforme Camargo et al. (2022). Os animais do grupo Cauda foram suspensos pela cauda para serem inseridos nos tubos, enquanto os animais do grupo MNA foram posicionados na mão do experimentador e direcionado aos tubos (**Figura 9**). Os animais permaneceram contidos na própria caixa de moradia durante um período de 2 horas e a técnica foi realizada por um período total de 10 dias consecutivos, conforme realizado em camundongos *Swiss* machos (CAMARGO et al., 2022) e

camundongos fêmeas 129S6/SvEv e C57BL6/J (CHEN et al., 2020; RAMIREZ et al., 2015) para conferir fenótipo tipo-depressivo aos animais. Durante a contenção, os animais foram isolados visual e acusticamente. Este procedimento foi realizado no período da manhã (8:00 – 12:00).



**Figura 9. Manipulação para contenção.** Animal suspenso pela cauda em direção ao tubo (A). Animal posicionado sobre a mão do experimentador e direcionado ao tubo (B). Fonte: Imagem disponibilizada pela autora.

## 5.4 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

### 5.4.1 Escores comportamentais – troca de caixa

Durante os procedimentos de troca de caixa, avaliou-se os comportamentos de emocionalidade evidentes de cada animal durante a manipulação, atribuindo-os um escore comportamental (adaptado de DAVIES et al., 2022). Os parâmetros de defecação ou micção foram avaliados pela presença ou ausência de bolos fecais ou

urina, respectivamente, durante a marcação. Para os animais manejados pela cauda, definiu-se o parâmetro “fuga” como a resistência à captura representada pela movimentação em direção contrária à mão do experimentador, tendo sido necessário maior firmeza para manter o animal capturado. Para os animais submetidos ao MNA, foi considerado “fuga” quando os animais escapavam da mão do experimentador. Para cada parâmetro avaliado, definiu-se a presença do comportamento como “Sim” e a ausência como “Não”, conforme indicado na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Comportamentos visualmente observados durante a marcação de cauda nas trocas de caixa.

Comportamento	Escore
Defecação	Sim = 1, Não = 0
Micção	Sim = 1, Não = 0
Fuga	Sim = 1, Não = 0

#### 5.4.2 Escores comportamentais – administração i.p.

Durante a contenção dos animais para a administração via i.p., os comportamentos de emocionalidade evidentes foram avaliados conforme a **Tabela 2** (adaptado de DAVIES et al., 2022). A avaliação dos comportamentos se deu durante a tentativa de captura do animal e durante o período em que esteve contido. A defecação foi avaliada pelo número de bolos fecais produzidos durante; a micção, pela ausência ou presença de urina; a vocalização, pela escuta de ruídos agudos feitos pelo animal (sem auxílio de equipamentos de captação sonora, e.g. microfone). A relutância foi avaliada apenas durante a contenção e foi determinada pela movimentação corporal intensa do animal como tentativa de fuga da contenção. Aqui, foram contados o número de bolos fecais e não somente a presença ou ausência dos mesmos devido à quantidade significativa para realização de testes estatísticos de maior força.

**Tabela 2.** Comportamentos de emocionalidade evidentes durante o procedimento de administração intraperitoneal.

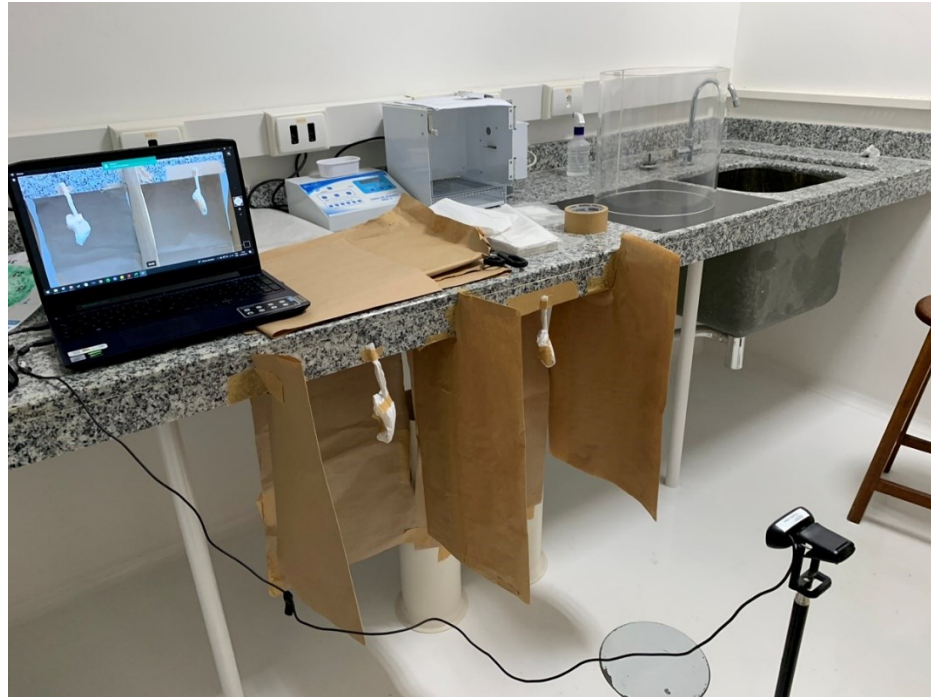
<b>Comportamento</b>	<b>Critério de avaliação ou score</b>
Defecação	Número de bolos fecais
Micção	Sim = 1, Não = 0
Vocalização	Sim = 1, Não = 0
Relutância	Sim = 1, Não = 0

### **5.4.3 Avaliação dos comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso**

#### *5.4.3.1 Teste de suspensão pela cauda*

Os colaboradores envolvidos na realização deste teste foram previamente treinados através de simulação a fim de padronizar a execução da técnica (**Figura 10**). Os animais foram suspensos a 50cm do chão por uma fita adesiva colada aproximadamente a 1cm da ponta da cauda em uma bancada de mármore durante 6 minutos e avaliados conforme Steru et al. (1985). Foram contabilizados como imobilidade os períodos em que o animal permaneceu totalmente imóvel ou realizando movimentos passivos, como o movimento de pêndulo, resultante de movimentações anteriores. Cada teste foi realizado com dois animais ao mesmo tempo, sendo estes visualmente isolados um do outro. Diferentemente de outros testes preditivos, como o TNF, reporta-se que a concomitância do TSC com mais de um animal não interfere no seu resultado (UENO et al., 2022).





**Figura 10. Simulação do teste de suspensão pela cauda.** Imagem representativa do treinamento dos pesquisadores envolvidos na execução do TSC. Na imagem estão presentes o aparato do teste (divisórias e fundo de papel pardo), camundongos feitos de papel, fita adesiva, computador e webcam. Todos os elementos estão dispostos na posição real do dia do teste. Fonte: Imagem disponibilizada pela autora.

#### 5.4.3.2 *Teste do campo aberto*

Para avaliar a locomoção e atividade exploratória dos animais, os animais foram submetidos, individualmente, ao teste de campo aberto conforme Fraga et al. (2018). Este teste ocorreu no mínimo 4 horas após o animal ter realizado o TSC para que quaisquer alterações comportamentais resultantes do teste pudessem ser evitadas. O aparato do campo aberto consistiu em uma caixa de madeira medindo 60 cm de largura x 40 cm de profundidade x 50 cm de altura. O piso do aparato foi dividido em 12 quadrantes iguais e o piso envelopado com papel *contact* preto para melhor contraste na observação do animal pelo pesquisador. Os animais foram posicionados no mesmo canto pré-definido do aparato e os comportamentos foram registrados

durante uma sessão de 6 minutos. O aparelho foi limpo com uma solução de álcool 10% entre os testes para evitar pistas olfativas dos animais anteriores. O teste ocorreu de forma individual, porém concomitante à realização do TBS em outro animal.

Nesse teste, foram avaliados três parâmetros: atividade locomotora, comportamento tipo-depressivo e comportamento tipo-ansioso. A distância percorrida, latência para entrada no centro do aparato, número de entradas no centro e tempo de permanência no centro foram contabilizados pelo software Any-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). Já os parâmetros de latência para a autolimpeza e tempo de autolimpeza foram avaliados manualmente. O episódio de autolimpeza foi definido pelo comportamento do animal de passar as patas sobre a cabeça atrás das orelhas em direção a frente ou por lamber suas patas dianteiras ou traseiras, dorso, genitais ou cauda (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005).

#### *5.4.3.3 Teste de borrifagem de sacarose*

A realização do TBS ocorreu 10 minutos após o TCA, conforme Camargo et al. (2022). Inicialmente, os animais foram posicionados dentro de um aparato cilíndrico transparente (9 × 7 × 11 cm) por 1 minuto para habituação ao ambiente. Em seguida, os animais foram retirados do aparato e foi borrifada uma solução de sacarose a 10% (m/V) sobre a pelagem dorsal. Após a borrifagem, os animais foram imediatamente recolocados no aparato. Após a borrifagem, o tempo de latência para o primeiro episódio de autolimpeza e o tempo total de autolimpeza foram registrados por 5 min. O aparato foi limpo com solução de álcool 10% entre os testes. O teste ocorreu de forma individual, porém concomitante à realização do TCA em outro animal. O parâmetro de autolimpeza foi avaliado manualmente conforme descrito na **seção 5.4.3.2 Teste do Campo Aberto**.

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos resultados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk e a identificação de *outliers* pelo teste de Grubbs. As análises estatísticas de dados paramétricos foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) de duas ou três vias, seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan quando apropriado. Os dados não-paramétricos foram avaliados pelo Teste Exato de Fisher ou Teste do Chi-quadrado para tendência. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Foram utilizados os softwares GraphPad Prism versão 8.0.2. e Statistica versão 13.5.0.17.



## 6 RESULTADOS

### 6.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO EM PROCEDIMENTOS DE ROTINA

#### 6.1.1 Escores comportamentais – trocas de caixa

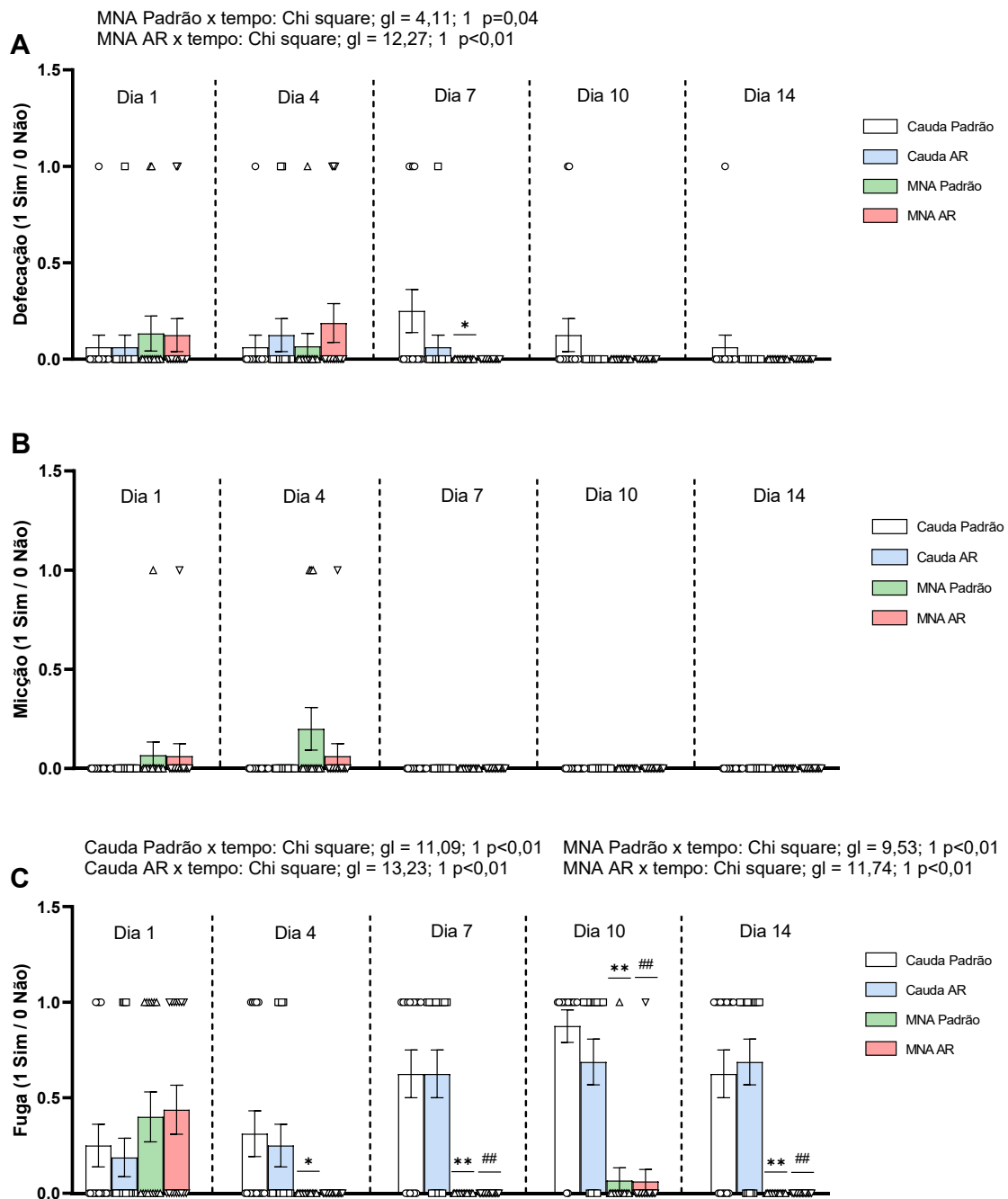
Primeiro, os escores relativos aos comportamentos durante as trocas de caixa foram analisados dois a dois pelo Teste Exato de Fisher bicaudal para verificar o efeito do alojamento e do manejo (**Tabela 3**). Para isso, os grupos foram analisados da seguinte maneira: 1- Cauda (Padrão x AR), 2- MNA (Padrão x AR), 3- Padrão (Cauda x MNA), e 4- AR (Cauda x MNA). Em seguida, cada grupo foi submetido ao Teste do Chi-quadrado para tendência, no qual o efeito do tempo sobre este parâmetro foi avaliado.

Conforme pode ser observado na **Tabela 3**, no dia 4, o Teste Exato de Fisher verificou diferenças significativas apenas no comportamento de fuga entre os grupos Cauda Padrão e MNA Padrão, indicando efeito do manejo neste parâmetro ( $p < 0,05$ ). Comparando os mesmos dois grupos, diferenças significativas nesse parâmetro também se apresentaram nos dias 7 ( $p < 0,01$ ), 10 ( $p < 0,01$ ) e 14 ( $p < 0,01$ ) e no parâmetro de defecação no dia 7 ( $p < 0,05$ ). Já a comparação entre os grupos Cauda AR e MNA AR revelou efeitos significativos do manejo no comportamento de fuga nos dias 7, 10 e 14 ( $p < 0,01$ ). O Teste do Chi-quadrado para tendência revelou efeitos significativos do tempo no comportamento de defecação nos grupos MNA Padrão ( $p < 0,05$ ) e MNA AR ( $p < 0,01$ ), e nos comportamentos de fuga de todos os grupos ( $p < 0,01$ ). Os comportamentos de defecação, micção e fuga apresentados pelos diferentes grupos ao longo das trocas de caixa podem ser observados na **Figura 11**. Conforme ilustrado, não houve alterações significativas nos comportamentos de defecação (com exceção do dia 7) (**Figura 11A**) e micção (**Figura 11B**) entre os grupos. Por outro lado, quando comparado com grupos sob a mesma forma de alojamento, os animais submetidos ao MNA apresentaram, a partir dos dias 4 (grupo MNA Padrão) e 7 (grupo MNA AR), diminuição no comportamento de fuga (**Figura 11C**) em relação aos grupos manejados pela cauda.

**Tabela 3.** Avaliação dos escores comportamentais durante as trocas de caixa.

Teste Exato de Fisher															
	Dia 1			Dia 4			Dia 7			Dia 10			Dia 14		
	Fezes	Urina	Fuga	Fezes	Urina	Fuga	Fezes	Urina	Fuga	Fezes	Urina	Fuga	Fezes	Urina	Fuga
Manejo: Cauda Padrão x AR	0,60	>0,99	>0,99	0,60	>0,99	>0,99	0,39	>0,99	>0,99	0,48	0,48	0,39	>0,99	>0,99	>0,99
Manejo: MNA Padrão x AR	0,39	>0,99	>0,99	0,65	0,33	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
Alojamento: Padrão Cauda x MNA	>0,99	0,48	0,46	>0,99	0,10	0,04	0,04	>0,99	<0,01	0,48	0,48	<0,01	>0,99	>0,99	<0,01
Alojamento: AR Cauda x MNA	0,17	>0,99	0,25	>0,99	>0,99	0,10	0,48	>0,99	<0,01	>0,99	>0,99	<0,01	>0,99	>0,99	<0,01
Teste do Chi-quadrado para tendência (em função do tempo)															
	Fezes		Urina		Fuga										
	Chi square; gl	Valor de p	Chi square; gl	Valor de p	Chi square; gl	Valor de p									
Grupo: Cauda Padrão	0,44; 1	0,51	1,03; 1	0,31	11,09; 1	<0,01									
Grupo: Cauda AR	2,25; 1	0,13	-	-	13,23; 1	<0,01									
Grupo: MNA Padrão	4,11; 1	0,04	3,30; 1	0,07	9,53; 1	<0,01									
Grupo: MNA AR	12,27; 1	<0,01	2,31; 1	0,13	11,74; 1	<0,01									

AR: ambiente refinado. MNA: manejo não-aversivo. gl: graus de liberdade.



**Figura 11. Efeito do AR e MNA nos comportamentos de emocionalidade evidentes durante as trocas de caixa e marcação de cauda ao longo dos primeiros 14 dias de protocolo.** Representações esquemáticas dos comportamentos de emocionalidade evidentes. (A) Defecação. (B) Micção. (C) Fuga. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 15-16). \* p<0,05 em comparação com o grupo Cauda Padrão. \*\* p<0,01 em comparação com o grupo Cauda Padrão. ## p<0,01 em comparação com o grupo Cauda AR. Os resultados foram avaliados pelo

teste exato de Fisher e pelo teste do Chi-quadrado para tendência. AR: ambiente refinado. Ctrl: controle. gl: graus de liberdade. MNA: manejo não-aversivo.

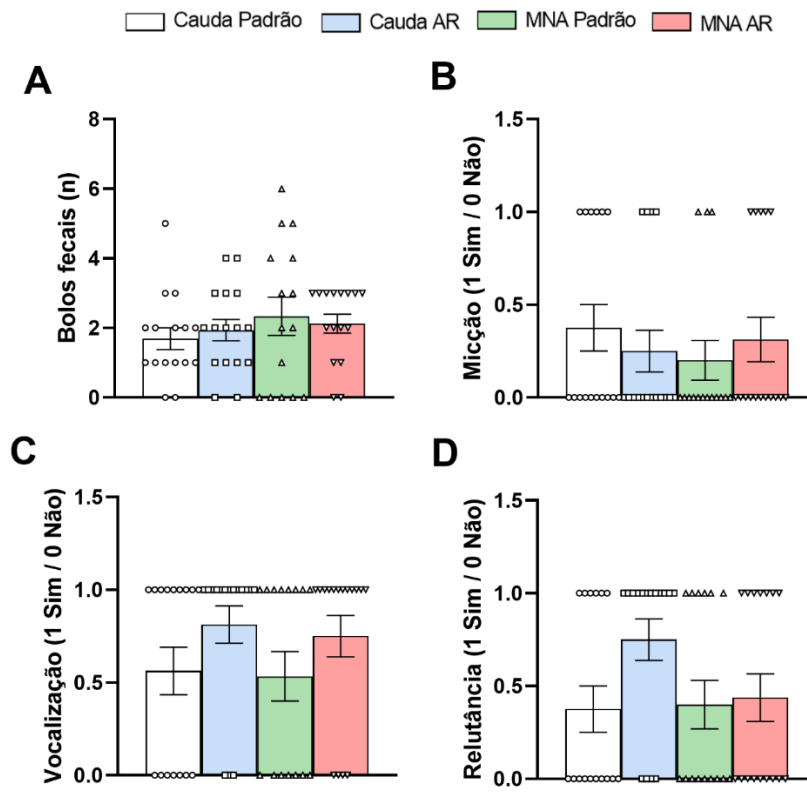
### **6.1.2 Escores comportamentais – administração i.p.**

Os escores relativos aos comportamentos durante a administração via i.p., com exceção da defecação, foram analisados dois a dois pelo Teste Exato de Fisher bicaudal para verificar o efeito do alojamento e do manejo (**Tabela 4**). Para isso, os grupos foram analisados da seguinte maneira: 1- Cauda (Padrão x AR), 2- MNA (Padrão x AR), 3- Padrão (Cauda x MNA), e 4- AR (Cauda x MNA). O parâmetro de defecação foi analisado por ANOVA de duas vias.

O Teste Exato de Fisher não verificou nenhuma diferença significativa entre os grupos para os comportamentos de micção, vocalização e relutância. Também não foram encontradas pelo teste ANOVA de duas vias diferenças significativas no comportamento de defecação entre os grupos. A **Figura 12** ilustra os resultados obtidos quanto aos parâmetros de defecação (**Figura 12A**), micção (**Figura 12B**), vocalização (**Figura 12C**) e relutância (**Figura 12D**) durante a administração i.p.

**Tabela 4.** Avaliação dos escores comportamentais durante administração intraperitoneal.

<b>Teste exato de Fisher</b>			
	<b>Urina</b>	<b>Vocalização</b>	<b>Relutância</b>
Manejo: Cauda Padrão x AR	0,70	0,25	0,073
Manejo: MNA Padrão AR	0,69	0,46	>0,99
Alojamento: Padrão Cauda x MNA	0,43	>0,99	0,72
Alojamento: AR Cauda x MNA	>0,99	>0,99	0,15
<b>ANOVA de duas vias</b>			
	<b>F<sub>(1,58)</sub></b>	<b>Valor de p</b>	
AR	0,13	0,72	
MNA	2,16	0,15	
Interação AR x MNA	0,89	0,35	



**Figura 12. Efeito do AR e MNA nos comportamentos de emocionalidade evidentes durante a administração intraperitoneal.** Representações esquemáticas dos comportamentos de emocionalidade evidentes. (A) Defecação. (B) Micção. (C) Vocalização. (D) Fuga. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 15-16). Os resultados foram avaliados pela ANOVA de duas vias e pelo teste exato de Fisher. AR: ambiente refinado. Ctrl: controle. MNA: manejo não-aversivo.

## 6.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

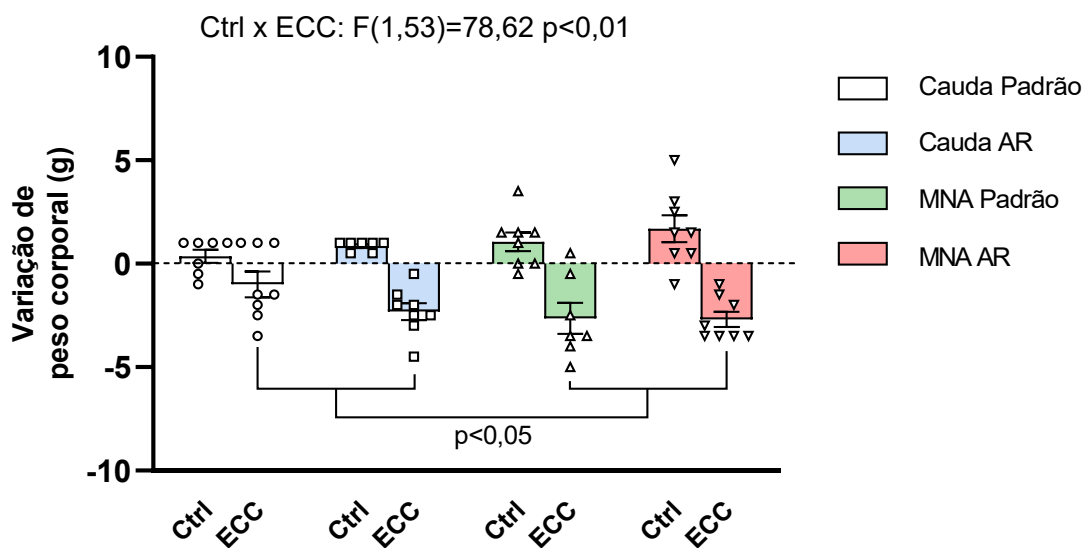
### 6.2.1 Peso corporal

Para verificar o efeito do AR, MNA e ECC sobre o ganho de peso, os animais foram pesados no dia seguinte após a 10<sup>a</sup> sessão de contenção. A ANOVA de três vias revelou diferenças significativas para o protocolo de ECC e na interação MNA x ECC (**Tabela 5**). Conforme ilustrado na **Figura 13**, o teste post-hoc mostrou que: 1- em animais manejados pela cauda, o grupo submetido ao ECC apresentou menor ganho de peso em comparação com o grupo controle ( $p < 0,01$ ); 2- nos animais

submetidos ao MNA, o grupo exposto ao ECC apresentou menor ganho de peso em comparação com o grupo controle ( $p < 0,01$ ); 3- nos animais submetidos ao ECC, o grupo tratado com MNA apresentou maior perda de peso em comparação com o grupo manejado pela cauda ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5.** Valores da ANOVA de três vias dos efeitos do AR, MNA e ECC no ganho de peso.

Ganho de peso		
	Valor de $F_{(1,53)}$	Valor de $p$
AR	0,03	0,87
MNA	0,11	0,74
ECC	<b>78,62</b>	<b>&lt;0,01</b>
Interação AR X MNA	0,96	0,33
Interação AR X ECC	3,05	0,09
Interação MNA X ECC	<b>6,25</b>	<b>0,02</b>
Interação AR X MNA X ECC	0,65	0,43



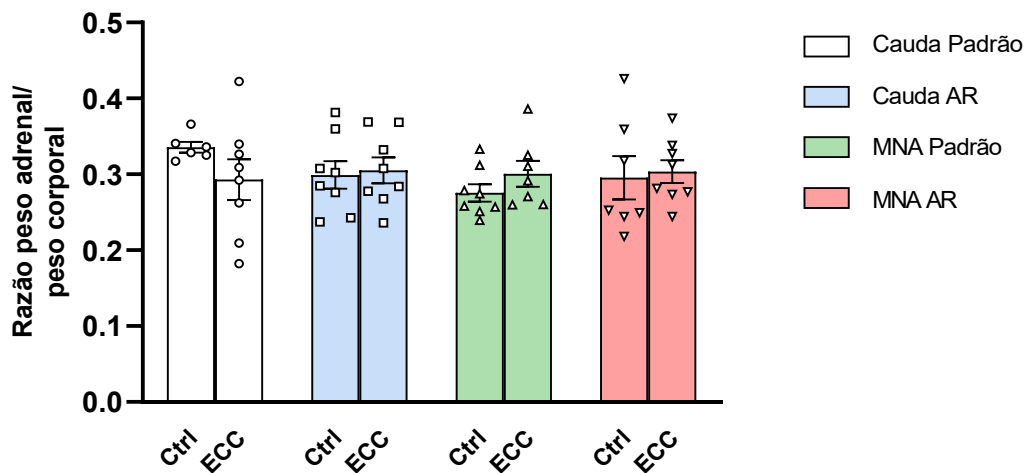
**Figura 13.** Efeito do AR, MNA e ECC no ganho de peso. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n=7-8$ ). Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguido pelo post-hoc de Duncan. As diferenças estatísticas encontram-se indicadas na figura. AR: ambiente refinado. Ctrl: controle. ECC: estresse crônico por contenção. MNA: manejo não-aversivo.

### 6.2.2 Peso das adrenais

Para verificar o efeito do AR, MNA e ECC sobre o peso das glândulas adrenais, componentes do eixo HHA, estas estruturas foram pesadas após a dissecação. A ANOVA de três vias não revelou diferenças entre os grupos (**Tabela 6**). Os resultados podem ser observados na **Figura 14**.

**Tabela 6.** Valores da ANOVA de três vias dos efeitos do AR, MNA e ECC no peso das adrenais.

Razão entre peso da adrenal e peso corporal		
	Valor de F <sub>(1,52)</sub>	Valor de p
AR	0,00	0,98
MNA	1,14	0,29
ECC	0,00	0,95
Interação AR X MNA	0,76	0,39
Interação AR X ECC	0,35	0,56
Interação MNA X ECC	1,64	0,21
Interação AR X MNA X ECC	1,48	0,23



**Figura 14.** Efeito do AR, MNA e ECC no ganho de peso. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8). Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias. AR: ambiente refinado. Ctrl: controle. ECC: estresse crônico por contenção. MNA: manejo não-aversivo.



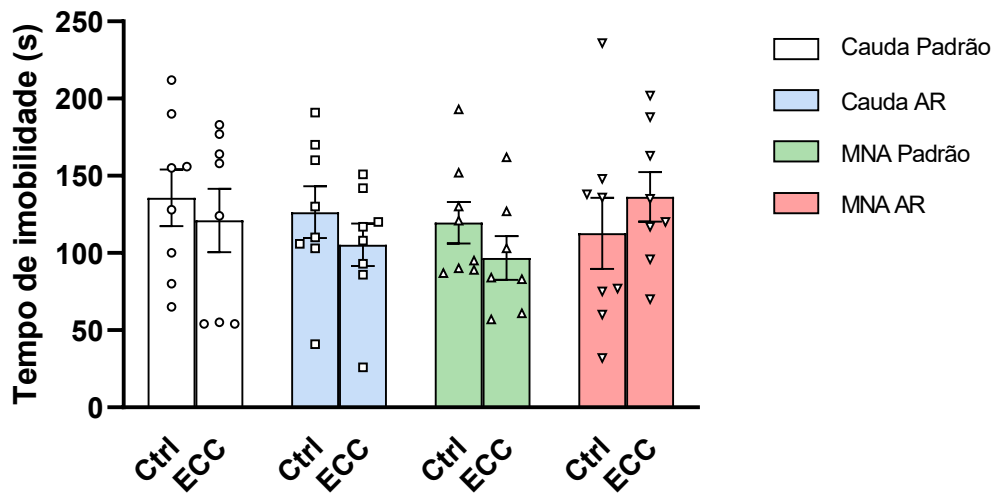
## 6.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO

### 6.3.1 Teste de suspensão pela cauda

Com o objetivo de avaliar se o AR e o MNA isoladamente ou em associação são capazes de promover um efeito do tipo-antidepressivo, avaliamos o tempo de imobilidade dos animais submetidos ou não ao ECC no TSC. Conforme representado na **Figura 15**, a ANOVA de três vias revelou que o AR, o MNA e o ECC não afetaram o parâmetro avaliado neste teste (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Valores da ANOVA de três vias dos efeitos do AR, MNA e ECC no TSC.

Teste de suspensão pela cauda – tempo de imobilidade		
	Valor de $F_{(1,55)}$	Valor de p
AR	0,02	0,88
MNA	0,22	0,64
ECC	0,50	0,48
Interação AR X MNA	1,38	0,25
Interação AR X ECC	0,66	0,42
Interação MNA X ECC	0,54	0,46
Interação AR X MNA X ECC	1,15	0,29



**Figura 15. Efeito do AR, MNA e ECC no TSC.** Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=7-8). Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias. AR: ambiente refinado. Ctrl: controle. ECC: estresse crônico por contenção. MNA: manejo não-aversivo.

### 6.3.2 Teste do campo aberto

Para avaliar se o AR, o MNA, o protocolo de ECC e suas associações poderiam estar relacionados com alterações na atividade locomotora basal dos animais e influenciar o perfil de imobilidade dos animais no TSC, nós avaliamos a mobilidade dos animais no TCA. Conforme a **Figura 16**, a ANOVA de três vias revelou diferenças significativas para o protocolo de ECC e na interação AR x MNA x ECC (**Tabela 8**). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que os animais controle submetidos ao MNA na ausência, mas não na presença, de AR apresentaram menor atividade locomotora quando comparado com o grupo controle e com o seu respectivo grupo submetido ao ECC ( $p < 0,01$ ).

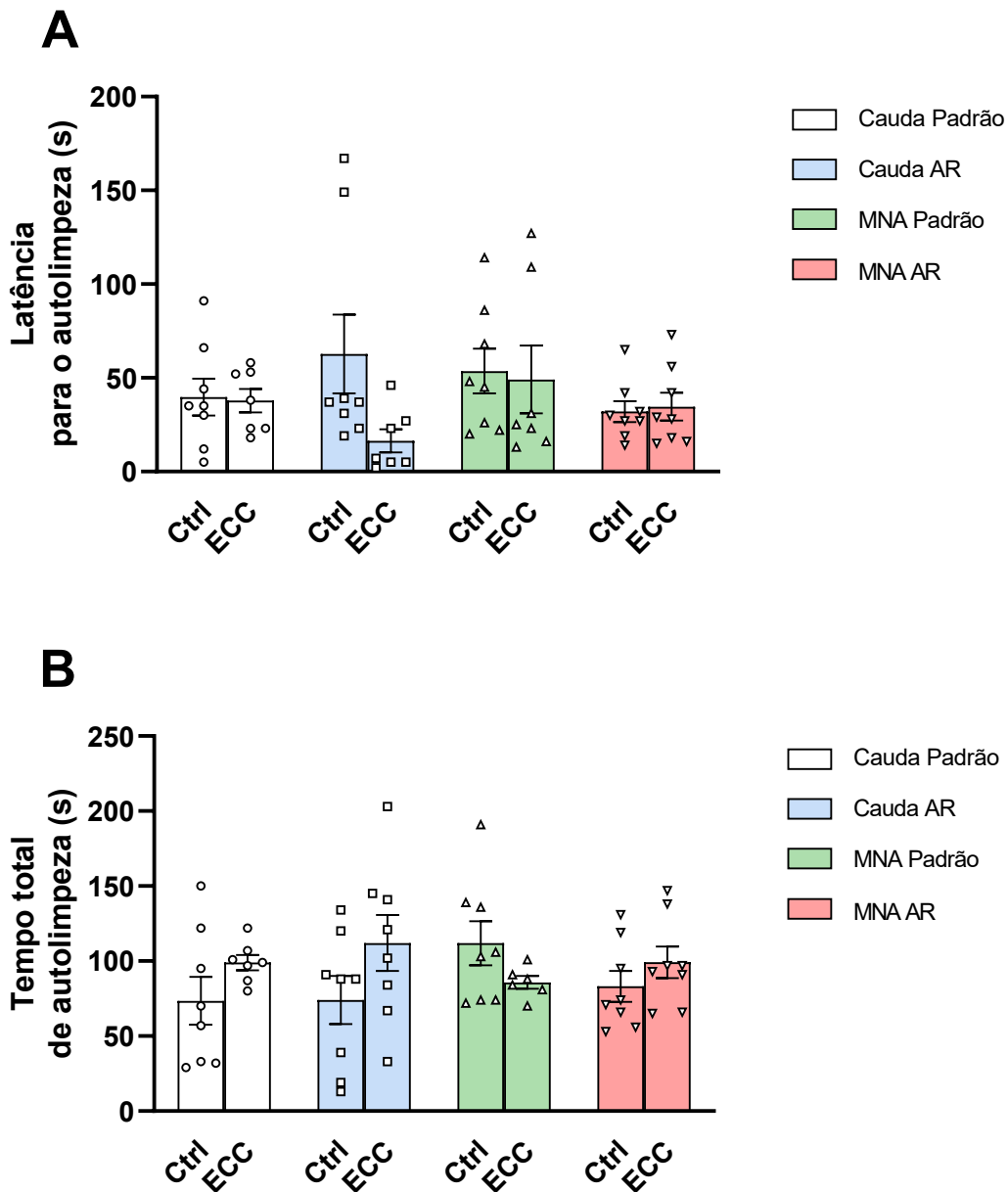


### 6.3.3 Teste de borrifagem de sacarose

Para avaliar se o AR, o MNA, o protocolo de ECC e suas associações promoveram alterações nos comportamentos associados ao autocuidado e anedonia, foi realizado o TBS. A ANOVA de três vias não identificou quaisquer alterações na latência para o autolimpeza e no tempo total de autolimpeza (**Tabela 9**), conforme ilustrado na **Figura 17**.

**Tabela 9.** Valores da ANOVA de três vias dos efeitos do AR, MNA e ECC no TBS.

<b>Teste de borrifagem de sacarose – latência para a autolimpeza</b>		
	<b>Valor de F<sub>(1,53)</sub></b>	<b>Valor de p</b>
AR	1,01	0,32
MNA	0,13	0,72
ECC	2,11	0,15
Interação AR X MNA	1,20	0,28
Interação AR X ECC	1,17	0,28
Interação MNA X ECC	1,81	0,18
Interação AR X MNA X ECC	2,24	0,14
<b>Teste de borrifagem de sacarose – tempo total de autolimpeza</b>		
	<b>Valor de F<sub>(1,53)</sub></b>	<b>Valor de p</b>
AR	0,00	0,96
MNA	0,32	0,58
ECC	1,94	0,17
Interação AR X MNA	0,56	0,46
Interação AR X ECC	2,02	0,16
Interação MNA X ECC	3,65	0,06
Interação AR X MNA X ECC	0,60	0,44



**Figura 17. Efeito do AR, MNA e ECC no TBS.** Representações esquemáticas da latência para a autolimpeza (A) e tempo total de autolimpeza (B). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 7-8$ ). Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias. AR: ambiente refinado. Ctrl: controle. ECC: estresse crônico por contenção. MNA: manejo não-aversivo.

## 6.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO

### 6.4.1 Teste do campo aberto

Para avaliar se o AR, o MNA, o protocolo de ECC e suas associações promoveram alterações nos comportamentos associados à ansiedade, foi realizado o TCA.

Na avaliação da latência para entrada no centro, a ANOVA de três vias não indicou efeitos significativos para o AR, o MNA e as interações AR x ECC, MNA x ECC e AR x MNA x ECC, mas revelou efeitos significativo para o ECC e a interação AR x MNA (**Tabela 10**). Conforme ilustrado na **Figura 18A**, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o ECC diminuiu a latência para entrada na área central do aparato do campo aberto, em comparação com o grupo não submetido ao ECC ( $p < 0,05$ ). Este teste também mostrou que: 1- independentemente de terem sido submetidos ou não ao ECC, os animais expostos ao AR apresentaram menor tempo de latência quando manejados por MNA em comparação com os animais expostos ao AR manejados pela cauda ( $p < 0,05$ ); 2- independentemente de terem sido submetidos ou não ao ECC, os animais manejados por MNA apresentaram menor tempo de latência quando expostos ao AR em comparação com os animais manejados por MNA em condição padrão ( $p < 0,01$ );

Na avaliação do número de entradas no centro do aparato, a ANOVA de três vias não indicou efeitos significativos para o AR, o MNA e as interações AR x ECC, MNA x ECC e AR x MNA x ECC, mas revelou efeitos significativo para o ECC e a interação AR x MNA (**Tabela 10**). Conforme ilustrado na **Figura 18B**, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o ECC aumentou o número de entradas na área central do aparato do campo aberto, em comparação com o grupo não submetido ao ECC ( $p < 0,01$ ). Este teste também mostrou que, independentemente de terem sido submetidos ou não ao ECC, os animais expostos ao AR entraram mais vezes na área central do aparato quando manejados por MNA em comparação com os animais manejados pela cauda ( $p < 0,05$ ).

Na avaliação do tempo dispendido no centro do aparato, a ANOVA de três vias revelou efeitos significativos para AR e MNA, mas não para ECC e as interações AR

x MNA, AR x ECC, MNA x ECC e AR x MNA x ECC (**Tabela 10**). Conforme ilustrado na **Figura 18C**, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que, independentemente da exposição ao ECC, a associação do AR com o MNA promoveu aumento no tempo de permanência dos animais no centro do aparato do campo aberto em comparação com o grupo que foi manejado pela cauda em condição padrão ( $p < 0,01$ ), com o grupo manejado pela cauda exposto ao AR ( $p < 0,01$ ) e com o grupo manejado por MNA em condição padrão ( $p < 0,05$ ).

Na avaliação da latência para a autolimpeza, a ANOVA de três vias revelou efeitos significativos apenas para o MNA (**Tabela 10**). Conforme ilustrado na **Figura 18D**, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que, independentemente da exposição ao AR ou ao ECC, o manejo por MNA promoveu aumento no tempo de latência para a autolimpeza ( $p < 0,01$ ).

Na avaliação do tempo de autolimpeza, a ANOVA de três vias revelou efeitos significativos para o MNA, mas não para AR, ECC e as interações AR x MNA, AR x ECC, MNA x ECC e AR x MNA x ECC (**Tabela 10**). Conforme ilustrado na **Figura 18E**, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que, independentemente da exposição ao AR ou ao ECC, o MNA promoveu diminuição no tempo de autolimpeza realizado pelos animais no campo aberto em comparação com os animais manejados pela cauda ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 10.** Valores da ANOVA de três vias dos efeitos do AR, MNA e ECC no comportamento tipo-ansioso avaliado pelo TCA.

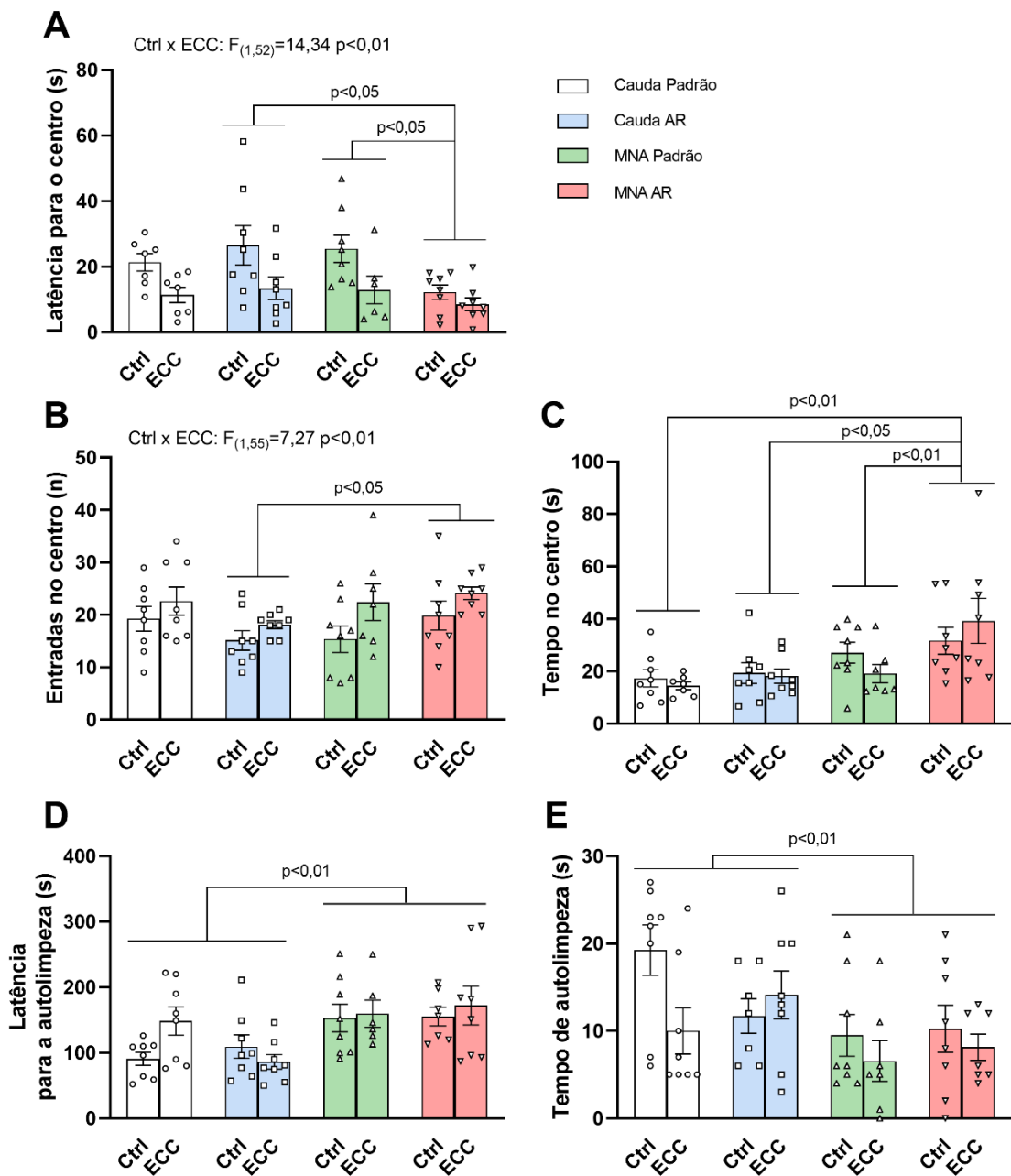
<b>Teste do campo aberto – latência para entrada no centro</b>		
	<b>Valor de F<sub>(1,52)</sub></b>	<b>Valor de p</b>
AR	0,99	0,33
MNA	1,70	0,20
ECC	<b>14,34</b>	<b>&lt;0,01</b>
Interação AR X MNA	<b>5,70</b>	<b>0,02</b>
Interação AR X ECC	0,30	0,59
Interação <i>cupping</i> X ECC	0,43	0,52
Interação AR X <i>cupping</i> X ECC	1,32	0,26
<b>Teste do campo aberto – entradas no centro</b>		
	<b>Valor de F<sub>(1,55)</sub></b>	<b>Valor de p</b>
AR	0,14	0,71
MNA	1,04	0,31
ECC	<b>7,27</b>	<b>&lt;0,01</b>
Interação AR X MNA	<b>5,11</b>	<b>0,03</b>
Interação AR X ECC	0,23	0,63
Interação MNA X ECC	0,56	0,46
Interação AR X MNA X ECC	0,14	0,71
<b>Teste do campo aberto – tempo no centro</b>		
	<b>Valor de F<sub>(1,54)</sub></b>	<b>Valor de p</b>
AR	<b>5,29</b>	<b>0,03</b>
MNA	<b>13,18</b>	<b>&lt;0,01</b>
ECC	0,12	0,73
Interação AR X MNA	2,08	0,16
Interação AR X ECC	1,71	0,20
Interação MNA X ECC	0,07	0,79
Interação AR X MNA X ECC	1,12	0,30
<b>Teste do campo aberto – latência para a autolimpeza</b>		
	<b>Valor de F<sub>(1,53)</sub></b>	<b>Valor de p</b>
AR	0,28	0,60



MNA	13,90	<0,01
ECC	1,10	0,30
Interação AR X MNA	1,12	0,30
Interação AR X ECC	1,64	0,21
Interação MNA X ECC	0,04	0,84
Interação AR X MNA X ECC	2,72	0,10

**Teste do campo aberto – tempo de autolimpeza**

	Valor de F <sub>(1,53)</sub>	Valor de p
AR	0,02	0,88
MNA	8,61	<0,01
ECC	2,85	0,10
Interação AR X MNA	0,66	0,42
Interação AR X ECC	3,15	0,08
Interação MNA X ECC	0,07	0,80
Interação AR X MNA X ECC	2,38	0,13



**Figura 18. Efeito do AR, MNA e ECC no comportamento do tipo-ansioso**

**avaliado pelo TCA.** Representações esquemáticas da latência para a entrada no centro do aparato (A), número de entradas no centro do aparato (B), tempo de permanência no centro do aparato (C), latência para a autolimpeza (D) e tempo de autolimpeza (E). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6-8$ ). Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguido pelo post-hoc de Duncan. As diferenças estatísticas encontram-se indicadas na figura. AR: ambiente refinado. Ctrl: controle. ECC: estresse crônico por contenção. MNA: manejo não-aversivo.

## 7 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós avaliamos os efeitos do refinamento ambiental e do MNA isoladamente ou em associação sobre o comportamento de camundongos submetidos a procedimentos de manutenção no biotério (i.e. troca de caixa) e nos procedimentos específicos de manipulação para experimentação (i.e. administração i.p.). Subsequentemente, investigamos os efeitos do estresse crônico de contenção sobre parâmetros fisiológicos e sobre os comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso de camundongos, e se o refinamento ambiental e o MNA isoladamente ou em associação seriam capazes de prevenir contra os efeitos induzidos pelo estresse.

A escolha do desenho experimental de nosso trabalho se deve a resultados prévios obtidos por nosso grupo acerca dos efeitos profiláticos de compostos antidepressivos de ação rápida. No trabalho de Camargo et al. (2022), camundongos *Swiss* machos adultos foram administrados cetamina (1 ou 5 mg/kg, i.p.) uma semana antes da realização do modelo de ECC (2 horas/dia por 10 dias). No TSC, foi observado que o ECC utilizado aumentou o tempo de imobilidade dos animais, conferindo um fenótipo tipo-depressivo. Ainda, observou-se que a administração de cetamina 5 mg/kg (i.p.), mas não 1 mg/kg (i.p.) preveniu contra a indução do fenótipo tipo-depressivo induzido pelo ECC.

No estudo de Camargo et al. (2022), as condições de alojamento consistiram em gaiolas contendo apenas maravalha e a forma de manejo dos animais foi realizada através da captura pela cauda. Considerando a necessidade de avaliar os efeitos profiláticos da cetamina em fêmeas e a implementação de condições de alojamento e manejo que promovam o bem-estar animal, nosso trabalho servirá como um estudo piloto para a avaliação dos efeitos do refinamento ambiental e/ou MNA em camundongos *Swiss* fêmeas submetidas ao ECC (2 horas/dia por 10 dias). A fim de comparar os resultados de nosso trabalho com os de Camargo et al. (2022), optamos por manter todas as etapas realizadas no estudo prévio de nosso grupo (i.e. frequência de troca de caixas e administração i.p.). Em nosso trabalho, o grupo Cauda Padrão e ECC Cauda Padrão correspondem, respectivamente, ao grupo administrado veículo não submetido ao ECC e ao grupo administrado veículo submetido ao ECC avaliados em Camargo et al. (2022).

Nossos resultados indicaram que o MNA reduziu a reatividade dos animais à manipulação ao longo dos procedimentos de rotina, porém o refinamento ambiental e/ou MNA não foram capazes de promover alterações nos comportamentos de emocionalidade evidentes durante a administração i.p. Após o protocolo de ECC, os animais submetidos ao estresse apresentaram perda de peso corporal, a qual foi mais acentuada nos animais submetidos ao MNA. Para inferir se alterações no eixo HHA haviam ocorrido, as glândulas adrenais dos animais foram pesadas, porém nenhuma das intervenções promoveu alterações neste parâmetro. Nenhuma das intervenções promoveu alterações em parâmetros associados ao comportamento tipo-depressivo (i.e. imobilidade e anedonia). Em relação à atividade locomotora dos animais, animais alojados em condição padrão submetidos ao MNA apresentaram hipolocomoção. Quando avaliado o comportamento de exploração, o ECC foi capaz de promover efeito tipo-ansiolítico, o qual também foi observado pela associação AR+MNA. Já no comportamento de autolimpeza, o efeito tipo-ansiolítico foi promovido apenas pelo MNA.

Em nosso trabalho, os comportamentos de defecação e fuga, mas não urina, foram modificados conforme maior número de trocas de caixa. A partir da terceira troca de caixa já foi possível observar os efeitos do MNA *per se*, evidenciado pela diminuição de ocorrências de defecação em comparação com os animais manejados pela cauda. Entretanto, essa diferença não se manteve nas duas trocas subsequentes. Em relação ao comportamento de fuga, o MNA e o manejo pela cauda exerceram efeitos opostos ao longo das trocas. Enquanto MNA reduziu o comportamento de fuga, o manejo pela cauda aumentou. Essa diferença pôde ser observada a partir da segunda troca nos animais alojados em condição padrão, e a partir da terceira troca em animais alojados em ambientes refinados. Essa diferença se manteve nas trocas de caixa subsequentes.

Ao melhor do nosso conhecimento, estudos sobre o impacto do EA e/ou do MNA sobre os parâmetros avaliados após sucessivas trocas de caixa são escassos. Entretanto, outros trabalhos avaliaram o comportamento tipo-ansioso de animais submetidos ou não ao MNA no TLCE após procedimentos de rotina. Após 5 trocas de caixa sendo manejados por túnel ou *cupping*, camundongos C57BL/6JOla/Hsd adultos apresentaram menores níveis de ansiedade em comparação com animais manejados pela cauda, evidenciados pela diminuição na ocorrência de posturas

esticadas de atenção protegidas (um tipo de avaliação de risco) e aumento no número de entradas nos braços abertos do TLCE (GOUVEIA; HURST, 2019). Animais manejados por túnel, mas não por *cupping*, também dispenderam mais tempo nos braços abertos do aparato. Em concordância, a diminuição do comportamento tipansioso também foi observada após a manipulação dos camundongos adultos por túnel (2x/semana) durante um período de 5 semanas quando comparado com o grupo manejado pela cauda durante o mesmo período (NOVAK et al., 2022). É possível que a redução do comportamento de fuga dos animais submetidos ao MNA em nosso estudo esteja relacionada com o efeito protetor induzido pelo MNA (túnel ou *cupping*) observado nos estudos citados.

Com o objetivo de simular a administração de compostos potencialmente profiláticos, conforme previamente realizado em nosso grupo de pesquisa (CAMARGO et al., 2022), em nosso estudo salina (0,9%) foi administrada por via i.p. Não houve alterações nos comportamentos de emocionalidade, avaliados pelo número de bolos fecais e pela ocorrência ou não de micção, vocalização ou relutância durante a administração i.p. Ao melhor do nosso conhecimento, a avaliação desses parâmetros durante a realização da técnica de contenção após exposição ao EA e/ou MNA não foi realizada por outros trabalhos. Entretanto, dois estudos, os quais serão aqui discutidos, observaram os efeitos da duração da manipulação durante a contenção e o refinamento da técnica sobre o comportamento de camundongos adultos.

Camundongos C57BL/6 e CD1 machos, mas não fêmeas, submetidos à técnica refinada de contenção (contenção por *cupping* e não realizando captura pela cauda) apresentaram menor relutância durante a contenção quando comparados com animais contidos pela técnica convencional (DAVIES et al., 2022). No mesmo estudo, a utilização da técnica refinada levou à diminuição na ocorrência de vocalizações durante o procedimento. Esses dois resultados estão em concordância com o estudo de Stuart et al. (2015), no qual a utilização da técnica refinada para contenção de ratos também se demonstrou eficaz em reduzir o número de bolos fecais gerados durante a procedimento. Apesar de esses estudos indicarem que a substituição do manejo pela cauda por alternativas refinadas de contenção leva à redução dos comportamentos de emocionalidade evidentes, nenhuma alteração foi observada nos grupos submetidos ao MNA em nosso estudo. Uma vez que menores tempos de

manipulação animal levam à redução da defecação e comportamentos associados à ansiedade (AZIZ; ELSHAFFEY; RAMADAN, 2023), é possível que a variação no tempo da realização da técnica de contenção em nosso estudo tenha mascarado os efeitos positivos do MNA.

Nossos resultados indicaram que, independentemente das condições de alojamento e forma de manejo, os animais submetidos ao estresse apresentaram perda de peso corporal. Resultados semelhantes aos nossos foram relatados em outros estudos com estresse de contenção (BAEK et al., 2022; JEONG; LEE; KANG, 2013; RAMIREZ et al., 2015; SADLER; BAILEY, 2016). Observamos, ainda, que a redução no peso corporal em animais expostos ao ECC foi mais acentuada nos animais submetidos ao MNA. Considerando que o manejo pela cauda é um estresse homotípico, é possível que as sucessivas manipulações tenham levado à habituação e uma consequente redução na susceptibilidade a alterações nos sistemas centrais que regulam a ingestão alimentar e homeostase energética. Em contraste, nossos achados revelaram que, na ausência de estresse, o tipo de manejo não promove alterações no peso corporal. Esse resultado concorda com outros estudos, nos quais a manipulação diária por 9 ou dias pela cauda ou por túnel não influenciou no peso corporal de camundongos C57BL/6 machos adultos (CLARKSON et al., 2018, 2020).

Em relação aos efeitos do refinamento ambiental, não observamos diferenças significativas entre o peso corporal de animais alojados em condições padrão e os de animais alojados em AR submetidos ou não ao estresse. Em concordância, em outros dois estudos também não foram observadas alterações no peso corporal de ratos *Wistar* e camundongos ICRS machos após exposição ao EA (6 horas/dia por 14 dias, ou 2-4 semanas consecutivas) (MAO et al., 2020; SHILPA et al., 2017). Ainda, semelhante ao observado no trabalho de Mao et al. (2020), a exposição ao refinamento ambiental também não foi capaz de prevenir a perda de peso induzida pelo estresse.

O aumento das adrenais está associado ao aumento de secreção de corticosterona pelo córtex da adrenal em resposta ao estresse (ULRICH-LAI et al., 2006). Seguido de exposição ao estresse, o aumento das adrenais foi observado em diversos estudos com estresse crônico em roedores (ADACHI et al., 2022; LAPMANEE et al., 2017; SADEGHI; RADAHMADI; REISI, 2015; SADLER; BAILEY,

2016; ULRICH-LAI et al., 2006). Em nosso trabalho, entretanto, não foram observadas alterações no peso das adrenais de animais submetidos ao ECC. Relata-se que a exposição repetida ao estresse de contenção pode levar à habituação ao estressor e, conseqüentemente, à diminuição da secreção de corticosterona em resposta ao estresse (SADLER; BAILEY, 2016), acompanhado do tamanho inalterado das glândulas adrenais (FLAK et al., 2012).

Semelhante aos achados de Shilpa et al. (2017) com ratos *Wistar* machos, a exposição ao refinamento ambiental *per se* também não promoveu alterações no peso das adrenais em nosso trabalho. Shilpa et al. (2017), entretanto, observaram que a exposição ao EA (6 horas/dia por 14 dias) reverteu o aumento no peso das adrenais dos animais que haviam sido submetidos ao ECC (2 horas/dia por 10 dias). Em relação ao MNA, foi demonstrado por Clarkson et al. (2020) que camundongos C57BL/6 machos manejados diariamente pela cauda (9 dias) apresentaram glândulas adrenais maiores do que animais manejados por túnel. Em nosso trabalho, porém, essa diferença não foi observada. Em concordância com nossos achados, no estudo de Novak et al. (2022), a exposição à manipulação de rotina de camundongos pela cauda ou por túnel durante 5 semanas não promoveu alterações no peso das adrenais. A ausência de alterações nesse parâmetro pode estar relacionada à ausência de diferenças entre os níveis de corticosterona plasmática de animais manejados pela cauda e animais manejados por túnel observada no mesmo estudo. Os resultados mencionados acerca dos efeitos positivos do EA e do MNA por túnel sugerem que estes se tornam evidentes apenas na presença de alterações induzidas por estresse.

O TSC é um teste preditivo para antidepressivos alternativo ao TNF (STERU et al., 1985). O TSC é fundamentado pela seguinte hipótese: um animal submetido a uma situação aversiva inescapável inicialmente reluta demonstrando intensa agitação e, depois, começa a apresentar períodos de imobilidade, os quais aumentam gradualmente (BECKER; PINHASOV; ORNOY, 2021). A alternância entre esses dois comportamentos, com favorecimento da imobilidade indica um fenótipo do tipo-depressivo, o qual é passível de ser revertido por antidepressivos (STERU et al., 1985).

Em trabalhos anteriores, a exposição de camundongos *Swiss* fêmeas adultas ao estresse agudo de contenção (7 horas) (BETTIO et al., 2014) e de camundongos

129S6/SvEv e C57BL6/J fêmeas adultas ao ECC (2 horas/dia por 10 dias) (CHEN et al., 2020; RAMIREZ et al., 2015) promoveu aumento no tempo de imobilidade dos animais no TSC e no TNF. Ao serem avaliados no TSC, esse mesmo efeito foi observado em camundongos *Swiss* machos adultos submetidos ao ECC (2 horas/dia por 10 dias) (CAMARGO et al., 2022). Em nosso estudo, entretanto, não se observou diferenças significativas no tempo de imobilidade entre os grupos no TSC. Isso sugere que o ECC não foi capaz de conferir um fenótipo tipo-depressivo nos animais. Esse resultado concorda com os achados de Ashokan et al. (2018), no qual observou-se que a exposição de ratos machos adultos ao ECC (2 horas/dia por 10 dias) não resultou em alterações comportamentais avaliadas no TNF. Apesar de o ECC figurar entre os modelos para o estudo da depressão (CAMARGO et al., 2022; CHEN et al., 2020; RAMIREZ et al., 2015; SEO et al., 2017; ZHU et al., 2023), o estresse homotípico repetido pode levar à habituação (DING et al., 2021; GIROTTI et al., 2006; SADLER; BAILEY, 2016; WEINBERG et al., 2010). A resposta primária ao estresse se dá pela ativação do eixo HHA, resultando na liberação de corticosterona (em roedores) para que processos adaptativos mediados por estruturas cerebrais sensíveis ao estresse (e.g PVN, hipocampo) ocorram (GODOY et al., 2018). A habituação consiste na redução da resposta do eixo HHA a estressores homotípicos, mas não a estressores heterotípicos (GIROTTI et al., 2006). A proteína c-fos parece ser responsável pela ativação de respostas ao estresse. Após exposições repetidas ao estresse, há uma diminuição da expressão de c-fos em diferentes regiões do encéfalo responsivas ao estresse (GIROTTI et al., 2006). No estudo de Weinberg et al. (2010), a exposição ao estresse repetido de contenção (30 minutos/dia por 3 dias) levou à habituação de ratos *Wistar* machos, evidenciada por menores níveis de corticosterona circulante e de mRNA de c-fos no córtex pré-frontal medial dorsal em comparação com animais que foram submetidos ao estresse uma única vez. É possível que a ausência do comportamento tipo-depressivo observado em nosso trabalho esteja relacionado à habituação dos animais ao ECC, um estressor homotípico.

Diversos estudos apontam para o efeito tipo-antidepressivo do EA em animais submetidos ao estresse (MANOSSO et al., 2022; SMAIL et al., 2020). Entretanto, em concordância com os nossos achados, outros estudos não observaram alterações no tempo de imobilidade de animais expostos ao EA *per se*. No estudo de Vanisree &



Thamizhoviya (2021), a exposição ao EA (2 horas/dia por 28 dias) não promoveu alterações no comportamento observado de ratos *Wistar* machos no TSC. Entretanto, o EA se mostrou eficaz em atenuar o aumento no tempo de imobilidade induzido por ECC (4 horas/dia por 28 dias) neste teste. Isso pode indicar que o EA promove efeitos benéficos quando na presença de estressores efetivos na promoção de prejuízos comportamentais. De fato, em outros dois estudos, o EA *per se* (6 horas/dia por 14 dias ou 6 horas/dia por 10 dias) não promoveu alterações no tempo de imobilidade no TNF, mas foi capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo induzido pelo ECC (2 horas/dia por 10 dias ou 6 horas/dia por 21 dias) (SHILPA et al., 2017; VEENA et al., 2009).

Estudos sobre o impacto do *cupping* sobre comportamentos tipo-depressivos avaliados por testes preditivos ainda são escassos. Nossos resultados indicaram que o MNA por *cupping* não promoveu alterações no comportamento supracitado. Este resultado está de acordo com o trabalho de Ueno et al. (2020), no qual foi observado que a exposição crônica (21d) a sessões de 30 segundos de exploração de mão aberta não alterou o tempo imobilidade dos animais no TSC e no TNF.

Com exceção do grupo MNA Padrão, as exposições ao AR, AR+MNA ou ao ECC não alteraram a distância total percorrida pelos animais, sugerindo que não houve prejuízo na atividade locomotora. Nossos achados são comparáveis com outros estudos na literatura que realizaram a contenção em camundongos machos durante 10 (CAMARGO et al., 2022) ou 14 dias (ZHU et al., 2023) e exposição contínua de ratos adultos ao EA (gaiolas com o dobro do tamanho de gaiolas convencionais, contendo diferentes objetos, túneis, plataformas e material para ninho) (NOVAES et al., 2017, 2018). Em nosso trabalho, o MNA *per se* levou à diminuição na atividade locomotora dos animais controle em comparação com os animais manejados pela cauda. Contrário ao nosso resultado, a exposição ao *cupping* durante 9 ou 21 dias em camundongos machos não resultou em diferenças na locomoção comparado com animais manejados pela cauda nos estudos de Ghosal et al. (2015) e Ueno et al. (2020). Considerando que o tempo de imobilidade no TSC pode ser influenciado pelas condições da função motora do animal, a hipolocomoção observada no grupo MNA Padrão pode indicar que o tempo de imobilidade observado nesse grupo no TSC pode estar superestimado, o que poderia impedir de evidenciar um efeito tipo-antidepressivo desta intervenção.

No TBS, o comportamento de autolimpeza é induzido devido à viscosidade da sacarose borrifada e está associado à motivação e autocuidado, considerados paralelos com alguns sintomas de depressão, como a apatia (MORETTI et al., 2012). A apatia é considerada um déficit no comportamento motivado. No TBS, o aumento na latência para a autolimpeza e a redução da frequência desse comportamento estão associados com um fenótipo tipo-depressivo (BECKER; PINHASOV; ORNOY, 2021). O aumento do tempo de latência para a autolimpeza é observado em animais após a exposição a diferentes tipos de estresse (BRACHMAN et al., 2016; CAMARGO et al., 2020; STRELOW et al., 2023). Em nosso estudo, não foram observadas diferenças significativas na latência para a autolimpeza em nenhum dos grupos, indicando ausência do fenótipo tipo-depressivo nesses animais. Nossos achados são similares aos de estudos utilizando o mesmo protocolo de ECC em camundongos *Swiss* machos (CAMARGO et al., 2022) e o modelo de depressão induzida por corticosterona em camundongos *Swiss* fêmeas (OLESCOWICZ et al., 2018), nos quais também não foram observadas alterações na latência para autolimpeza. Entretanto, em outro estudo com camundongos C57BL/6 machos (LI et al., 2018), a exposição a 6 horas de contenção durante 10 dias levou ao aumento na latência para a autolimpeza. Isso sugere que as alterações neste parâmetro podem estar sujeitas à duração do estressor.

Uma diminuição no tempo de autolimpeza é esperada após exposição ao estresse agudo (DOMINGUES et al., 2022) ou crônico (FRANCESHELLI et al., 2015; SZEWCZYK et al., 2019), incluindo o ECC equivalente ao utilizado em nosso trabalho (CAMARGO et al., 2022). Contudo, o tempo total de autolimpeza entre os grupos não diferiu significativamente em nosso estudo, sugerindo ausência de anedonia nos animais. A ausência do comportamento tipo-anedônico, evidenciado pela ausência de alterações no tempo total de autolimpeza no TBS, após administração crônica (21 dias) de corticosterona (20 mg/kg) em camundongos *Swiss* fêmeas também foi demonstrada no trabalho de Olescowicz et al. (2018).

Em relação aos efeitos do EA neste parâmetro, a exposição de ratos *Wistar* machos ao EA (2 horas/dia) imediatamente após a realização da contenção (4 horas/dia) durante 28 dias atenuou a redução do tempo total de autolimpeza induzida pelo estresse no TBS (VANISREE; THAMIZHOVIYA, 2021). Visto que o tempo total de autolimpeza do animal no TBS pode estar relacionado à hedonia ao consumir a

sacarose borrifada na pelagem, podemos inferir que os resultados do TBS são comparáveis, em alguma proporção, com o observado no teste de preferência pela sacarose (TPS). Pela escassez de estudos que investigam o efeito do EA sobre o comportamento tipo-anedônico avaliado pelo TBS, estudos que avaliaram este comportamento pelo TPS serão mencionados.

O TPS é um teste baseado na preferência natural do animal por doce, assumindo que essa preferência é proporcional ao prazer (hedonia) experienciado durante o consumo da solução com sacarose (HOFFMAN, 2016). Ao serem avaliados pelo TPS, camundongos C57BL/6J adultos submetidos a 14 dias de conflito por derrota social (CDS) apresentaram diminuição na preferência pela sacarose, sugerindo um fenótipo tipo-anedônico. Entretanto, após serem expostos ao EA (28 dias consecutivos) após os 14 dias de CDS, esse comportamento foi revertido (CORDNER et al., 2021). A diminuição na preferência pela sacarose também foi vista em modelos de ECC (2 horas/dia por 10 dias ou 6 horas/dia 21 dias) em ratos *Wistar* machos seguidos de durações definidas de exposição ao EA. Nesses estudos, a exposição ao EA (6 horas/dia por 14 dias ou 6 horas/dia por 10 dias) após o período de estresse foi capaz de reverter esse comportamento (SHILPA et al., 2017; VEENA et al., 2009). De forma similar aos nossos resultados, não foram observadas alterações no comportamento tipo-anedônico após exposição dos animais ao EA *per se* nos estudos supracitados.

Há pouco trabalhos na literatura que tenham investigado comportamento anedônico em animais de laboratório submetidos ao MNA. É relatado que o manejo diário (9 dias) de camundongos machos com o auxílio de um túnel promove maior consumo de sacarose 4% em comparação com animais manejados pela cauda (CLARKSON et al., 2018, 2020). Entretanto, em nosso estudo, o MNA por *cupping* não promoveu alterações na latência para a autolimpeza ou no tempo total de autolimpeza, sugerindo que essa intervenção não foi capaz de promover efeito tipo-antidepressivo. Nosso resultado é semelhante ao observado no estudo de Novak et al. (2022), no qual o manejo por túnel por cinco semanas (2x/semana) não promoveu alterações no consumo de sacarose no TPS. A nosso conhecimento, o nosso trabalho é o primeiro a avaliar os efeitos do *cupping* sobre o comportamento tipo-anedônico de camundongos. Considerando que: 1- o manejo pela cauda foi acompanhado pela ativação de respostas ao estresse (evidenciado pelo aumento das adrenais) nos

estudos de Clarkson et al. (2018, 2020), mas não no estudo de Novak et al. (2022), e; 2- em nosso trabalho, o MNA não foi capaz de promover efeito do tipo-antidepressivo no TSC; é possível que, em nosso trabalho, não tenham ocorrido diferenças na resposta ao estresse entre os grupos manejados pela cauda e os grupos submetidos ao MNA, resultando na ausência de efeito tipo-antidepressivo do MNA por *cupping* no TBS. Seria importante, entretanto, avaliar os efeitos do manejo por *cupping* em outros testes que avaliam a anedonia, como o TPS.

A tendência de roedores permanecerem próximo a paredes, chamada de tigmotaxia, é um comportamento relacionado à ansiedade nesses animais. Com o intuito de evitar áreas potencialmente perigosas, os roedores tendem a se manter próximos às paredes. No TCA, evitar a área central do aparato está associado a um fenótipo tipo-ansioso (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Em nosso trabalho, animais submetidos ao ECC apresentaram menor latência para entrar no centro do aparato do TCA e maior número de entradas no centro em comparação com os animais não submetidos ao ECC, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico do estresse. Entretanto, apesar de menor latência e maior número de entradas no centro do aparato, nossos resultados indicaram que não houve diferença no tempo dispendido no centro do aparato entre os animais submetidos ao ECC e os não submetidos. Esse resultado está de acordo com um estudo prévio com camundongos *Swiss* machos adultos submetidos ao mesmo protocolo de ECC utilizado em nosso trabalho (CAMARGO et al., 2022). Nosso resultado sugere que o ECC não conferiu um fenótipo tipo-ansioso nos animais, provavelmente devido à habituação ao estresse previamente discutida neste trabalho.

Nossos resultados indicaram, ainda, que não houve alterações na latência para o centro e número de entradas no centro do aparato do TCA nos animais submetidos ao alojamento em AR ou ao MNA *per se*, sugerindo que essas intervenções não foram capazes de promover efeito tipo-ansiolítico. Entretanto, em comparação com os animais submetidos à associação AR+MNA, os grupos submetidos ao refinamento ambiental *per se* apresentaram maior latência e menor número de entradas no centro. Em comparação com o mesmo grupo, os grupos submetidos ao MNA *per se* apresentaram maior latência para o centro. Esses resultados sugerem que, em relação à adoção das intervenções isoladas, a adoção

da associação das intervenções poderia ser uma estratégia para contribuir em um fenótipo menos ansioso nos animais.

Em nosso trabalho, animais alojados em AR *per se* não apresentaram alterações no tempo dispendido no centro do aparato em comparação com animais alojados em condição padrão. Isso sugere que o EA *per se* não foi efetivo em promover efeito ansiolítico. Nosso resultado está de acordo com o estudo de Speck et al. (2023), no qual camundongos CF1 machos e fêmeas expostos ao EA (DPN21 – DPN58) não apresentaram diferenças no tempo dispendido na periferia do campo aberto quando comparado com animais alojados em condição padrão. Em outro estudo, a exposição de ratos *Sprague-Dawley* machos adultos ao EA (DPN1-30, 2 horas/dia) também não promoveu alterações no tempo dispendido no centro do campo aberto (SUN et al., 2016). O efeito tipo-ansiolítico do EA *per se* também não foi observado em estudos utilizando o TLCE (SHILPA et al., 2017) e o TCCE (VANISREE; THAMIZHOVIYA, 2021), dois testes que evocam o paradigma abordagem-evitação, semelhante ao TCA.

Diferentes estudos apontam para um efeito tipo-ansiolítico promovido pelo MNA. No TCA, Clarkson et al. (2018, 2020) observaram que camundongos C57BL/6 manejados por túnel diariamente (1 minuto/dia por 9 dias) dispenderam mais tempo no centro do campo aberto do que animais manejados pela cauda nesse mesmo período. O efeito tipo-ansiolítico do MNA também foi observado em camundongos Balb/c avaliados no TLCE. Após 9 dias de manejo por túnel (1 minuto/dia), os camundongos apresentaram maior número de entradas e tempo dispendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (NOVAK et al., 2022). Em nosso estudo, entretanto, animais submetidos ao MNA *per se* não apresentaram diferenças no tempo dispendido no centro do campo aberto. Nosso resultado é semelhante ao estudo de Ueno et al. (2020), no qual camundongos C57BL/6 machos adultos permitidos a explorar as mãos dos pesquisadores por 30 segundos durante 21 dias não apresentaram diferenças no tempo dispendido no centro do TCA quando comparado com animais manejados pela cauda. Ueno et al. (2020), entretanto, observaram um efeito tipo-ansiolítico do MNA no TLCE. Estes dados sugerem que a ausência de efeito tipo-ansiolítico por parte do MNA *per se* em nosso estudo pode estar relacionado ao teste utilizado para avaliação.

Independentemente da exposição ao ECC, a exposição ao refinamento ambiental em associação com o MNA promoveu efeito tipo-ansiolítico. Esse efeito foi evidenciado pelo aumento no tempo dispendido no centro do aparato quando comparado com animais alojados em condição padrão manejados pela cauda. Ainda, os animais submetidos à associação do refinamento ambiental e MNA apresentaram maior tempo no centro do que os grupos submetidos a apenas uma dessas intervenções. Ao melhor do nosso conhecimento, a investigação dessas duas intervenções ainda não foi realizada por outros estudos. Considerando que muitas instituições estabelecem o EA como uma condição obrigatória (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2023; EUROPEAN ANIMAL RESEARCH ASSOCIATION, 2016; NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 2011), é possível que o efeito tipo-ansiolítico do MNA *per se* observado nos estudos previamente citados possa ter relação com as condições de alojamento adotadas para a realização do estudo. Logo, é possível que o resultado positivo da associação AR+MNA verificado neste trabalho seja comparável aos resultados dos estudos com MNA previamente citados.

Diferentemente do comportamento de autolimpeza observado no TBS, a autolimpeza realizada no TCA não é induzida por soluções viscosas como a sacarose. A introdução em um novo ambiente resulta em um estresse agudo, promovendo a realização da autolimpeza. O estresse crônico, entretanto, promove a diminuição na latência, o aumento na duração e disrupções no padrão desse comportamento (CAMARGO et al., 2022; KALUEFF et al., 2016). Em estudos com camundongos *Swiss* machos adultos, a exposição ao ECC (2 horas/dia por 10 dias) ou administração crônica de corticosterona (20 mg/kg, p.o., 21 dias) resultou na diminuição da latência para a autolimpeza e o aumento do tempo total de duração desse comportamento (CAMARGO et al., 2021, 2022). O aumento no tempo total de autolimpeza também foi evidenciado em ratos *Sprague-Dawley* fêmeas adultas após seis semanas de exposição ao ECLI (ZHANG; KALUEFF; SONG, 2019). Em nosso trabalho, contudo, não foram observadas alterações no comportamento de autolimpeza nos grupos submetidos ao ECC. A ausência dessas alterações pode estar relacionada a uma possível habituação ao estresse, previamente discutidas neste trabalho.

Em relação aos efeitos do refinamento ambiental sobre a autolimpeza em nosso estudo, esta intervenção não promoveu alterações. Nossos resultados contrastam com os resultados obtidos no estudo de Speck et al. (2023), o qual observou uma redução no tempo de autolimpeza em camundongos CF1 machos e fêmeas expostos ao EA (DPN0 – DPN21) quando comparado aos não expostos, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico dessa intervenção. Entretanto, no mesmo estudo, os autores observaram um aumento no tempo de autolimpeza nos animais expostos ao EA introduzido em diferentes períodos (DPN0 – DPN58; DPN21 – DPN58), o qual foi associado pelos autores a um comportamento de enfiletamento a um novo ambiente.

Nossos resultados indicaram que a exposição ao MNA, mas não ao refinamento ambiental ou ao ECC, aumentou a latência para a autolimpeza e diminuiu o tempo total de autolimpeza no TCA. Esse resultado sugere que o MNA pode gerar um efeito do tipo-ansiolítico. Ao melhor do nosso conhecimento, nosso trabalho é o primeiro a avaliar os efeitos do *cupping* sobre o comportamento de autolimpeza não-induzida. Apesar de a autolimpeza não-induzida ativar regiões específicas do encéfalo, é possível que nossos resultados sejam comparáveis aos efeitos tipo-ansiolíticos promovidos pelo MNA nos estudos anteriormente citados.

## 8 CONCLUSÕES

Ao longo dos procedimentos de rotina, o MNA, mas não o refinamento ambiental, reduziu os comportamentos de emocionalidade evidentes dos animais durante as trocas de caixa.

O refinamento ambiental e/ou MNA não foram capazes de promover alterações nos comportamentos de emocionalidade evidentes durante a administração i.p.

Nenhuma das intervenções promoveu alterações em parâmetros associados ao comportamento tipo-depressivo (i.e. imobilidade e anedonia) no TSC e no TBS.

Ao avaliar o comportamento exploratório no TCA, o ECC e a associação AR+MNA promoveram efeito tipo-ansiolítico. No mesmo teste, ao avaliar o comportamento de autolimpeza, o efeito tipo-ansiolítico foi promovido apenas pelo MNA.

Em relação aos comportamentos de emocionalidade evidentes durante as trocas de caixa, a redução do comportamento de fuga dos animais submetidos ao MNA pode estar relacionada com o efeito tipo-ansiolítico induzido pelo MNA. A ausência de um efeito protetor desta intervenção durante a administração i.p., entretanto, pode estar relacionada à variação no tempo da realização da técnica de contenção em nosso estudo. Em relação aos efeitos das intervenções após exposição ao estresse, o conjunto de nossos resultados sugere que o protocolo de ECC adotado não foi capaz de promover prejuízos comportamentais (comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso) comumente vistos após o estresse crônico em roedores. A ausência desses prejuízos provavelmente se deu devido ao processo de habituação ao estresse. Em nosso trabalho, não observamos o efeito do AR *per se*, somente em associação com o MNA em comportamentos associados à ansiedade. É possível que os efeitos tipo-antidepressivos e tipo-ansiolíticos do AR pudessem ter sido observado nos grupos submetidos ao ECC, caso o ECC tivesse sido efetivo em promover prejuízos comportamentais. Por outro lado, os efeitos tipo-ansiolíticos do MNA foram observados independentemente do AR. Considerando que os animais manejados pela cauda apresentaram maior comportamento tipo-ansioso em relação aos animais submetidos ao MNA, e que essa é a forma de manejo mais comum em roedores, seria interessante que a forma de manejo utilizada fosse descrita e discutida em trabalhos



investigando alterações comportamentais induzidas por estresse. Diante dos resultados apresentados e discutidos, esperamos que o presente trabalho possa contribuir para a compreensão da influência do manejo pela cauda em roedores em estudos com modelos de estresse.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar outros aspectos comportamentais relacionados ao estresse, como o índice de interação voluntária com o pesquisador durante as trocas de caixa, o comportamento de exploração (*rearing*) no TCA e a microestrutura do comportamento de autolimpeza no TCA.

Avaliar a emocionalidade de cada animal a partir da determinação do score-z, um escore que permite agrupar diferentes parâmetros do comportamento emocional dos animais.

Realizar estudo semelhante a este, porém com um protocolo de estresse efetivo para indução de prejuízos comportamentos a fim de verificar os possíveis efeitos protetores do refinamento ambiental e/ou MNA.

Realizar estudo semelhante a este, porém com camundongos *Swiss* machos submetidos a um protocolo de estresse efetivo para indução de prejuízos comportamentais a fim de comparar o efeito do sexo sobre a resposta às intervenções estudadas.

## REFERÊNCIAS

ADACHI, N. et al. Kamikihito rescued depressive-like behaviors and hippocampus neurogenesis in chronic restraint stress rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 12, n. 2, p. 172–179, mar. 2022.

ASHOKAN, A. et al. Housing environment influences stress-related hippocampal substrates and depression-like behavior. **Brain Research**, v. 1683, p. 78–85, mar. 2018.

AZIZ, E.; ELSHAFFEY, B.; RAMADAN, S. Behavioural markers of stress during routine laboratory handling in mice. **Kafrelsheikh Veterinary Medical Journal**, v. 21, n. 1, p. 12–17, 1 ago. 2023.

BAEK, S. J. et al. VTA-projecting cerebellar neurons mediate stress-dependent depression-like behaviors. **eLife**, v. 11, 14 fev. 2022.

BAUMANS, V.; VAN LOO, P. L. P. How to improve housing conditions of laboratory animals: The possibilities of environmental refinement. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 24–32, jan. 2013.

BECKER, M.; PINHASOV, A.; ORNOY, A. Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? **Diagnostics**, v. 11, n. 1, p. 123, 14 jan. 2021.

BENEFIEL, A. C.; DONG, W. K.; GREENOUGH, W. T. Mandatory “Enriched” Housing of Laboratory Animals: The Need for Evidence-based Evaluation. **ILAR Journal**, v. 46, n. 2, p. 95–105, 1 jan. 2005.

BETTIO, L. E. B. et al. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 7–14, dez. 2014.

BRACHMAN, R. A. et al. Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 9, p. 776–786, maio 2016.

BRASIL. **RESOLUÇÃO Nº 57, DE 6 DE DEZEMBRO DE 2022**. [s.l.] Diário Oficial da União, 2022. v. Seção 1

CALABRESE, E. J.; MATTSON, M. P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? **npj Aging and Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 13, 15 set. 2017.

CAMARGO, A. et al. Cholecalciferol abolishes depressive-like behavior and hippocampal glucocorticoid receptor impairment induced by chronic corticosterone administration in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 196, p. 172971, set. 2020.

CAMARGO, A. et al. A low-dose combination of ketamine and guanosine counteracts corticosterone-induced depressive-like behavior and hippocampal synaptic impairments via mTORC1 signaling. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 111, p. 110371, dez. 2021.

CAMARGO, A. et al. Prophylactic efficacy of ketamine, but not the low-trapping NMDA receptor antagonist AZD6765, against stress-induced maladaptive behavior and 4E-BP1-related synaptic protein synthesis impairment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 115, p. 110509, 20 abr. 2022.

CHEN, B. K. et al. Sex-specific neurobiological actions of prophylactic (R,S)-ketamine, (2R,6R)-hydroxynorketamine, and (2S,6S)-hydroxynorketamine. **Neuropsychopharmacology**, v. 45, n. 9, p. 1545–1556, 17 ago. 2020.

CLARKSON, J. M. et al. Handling method alters the hedonic value of reward in laboratory mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2448, 5 fev. 2018.

CLARKSON, J. M. et al. Negative mood affects the expression of negative but not positive emotions in mice. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 287, n. 1933, 26 ago. 2020.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Brasília: [s.n.].

CORDNER, Z. A. et al. Fluoxetine and environmental enrichment similarly reverse chronic social stress-related depression- and anxiety-like behavior, but have differential effects on amygdala gene expression. **Neurobiology of Stress**, v. 15, p. 100392, nov. 2021.

DAVIES, J. R. et al. Impact of Refinements to Handling and Restraint Methods in Mice. **Animals**, v. 12, n. 17, p. 2173, 24 ago. 2022.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience** 2005 6:6, v. 6, n. 6, p. 463–475, 13 maio 2005.

DIAMOND, D. M. et al. Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. **Hippocampus**, v. 2, n. 4, p. 421–430, 4 out. 1992.

DING, J. X. et al. Physical restraint mouse models to assess immune responses under stress with or without habituation. **STAR Protocols**, v. 2, n. 4, p. 100838, dez. 2021.

DOMINGUES, M. et al. Selanylimidazopyridine abolishes inflammation- and stress-induced depressive-like behaviors by modulating the oxido-nitrosative system. **European Journal of Pharmacology**, v. 914, p. 174570, jan. 2022.

EUROPEAN ANIMAL RESEARCH ASSOCIATION. **EU Regulations on Animal Research**. Disponível em: <<https://www.eara.eu/animal-research-law>>. Acesso em: 19 mar. 2024.

FLAK, J. N. et al. Identification of chronic stress-activated regions reveals a potential recruited circuit in rat brain. **The European journal of neuroscience**, v. 36, n. 4, p. 2547–55, ago. 2012.

FRAGA, D. B. et al. Anxiolytic effects of ascorbic acid and ketamine in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 100, p. 16–23, maio 2018.

FRANCESCHELLI, A. et al. Sex differences in the rapid and the sustained antidepressant-like effects of ketamine in stress-naïve and “depressed” mice exposed to chronic mild stress. **Neuroscience**, v. 290, p. 49–60, abr. 2015.

GHOSAL, S. et al. Mouse handling limits the impact of stress on metabolic endpoints. **Physiology & Behavior**, v. 150, p. 31–37, out. 2015.

GIROTTI, M. et al. Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. **Neuroscience**, v. 138, n. 4, p. 1067–1081, jan. 2006.

GODOY, L. D. et al. A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 3 jul. 2018.

GOUVEIA, K.; HURST, J. L. Improving the practicality of using non-aversive handling methods to reduce background stress and anxiety in laboratory mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 20305, 30 dez. 2019.

HELMAN, T. J. et al. The sex-dependent response to psychosocial stress and ischaemic heart disease. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 10, 21 abr. 2023.

HODES, G. E. et al. Sex Differences in Stress Response: Classical Mechanisms and Beyond. **Current Neuropharmacology**, v. 22, n. 3, p. 475–494, mar. 2024.

HOFFMAN, K. L. What can animal models tell us about depressive disorders? Em: **Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 35–86.

HURST, J. L.; WEST, R. S. Taming anxiety in laboratory mice. **Nature Methods**, v. 7, n. 10, p. 825–826, 12 out. 2010.

JEONG, J. Y.; LEE, D. H.; KANG, S. S. Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. **Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 4, p. 288, 2013.

KALUEFF, A. V. et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59, 17 jan. 2016.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 508, n. 1–3, p. 147–153, jan. 2005.

KEMPERMANN, G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 235–245, 5 abr. 2019.

KESSLER, R. C. THE EFFECTS OF STRESSFUL LIFE EVENTS ON DEPRESSION. **Annual Review of Psychology**, v. 48, n. 1, p. 191–214, fev. 1997.

KIM, K. et al. Reduced Interaction of Aggregated  $\alpha$ -Synuclein and VAMP2 by Environmental Enrichment Alleviates Hyperactivity and Anxiety in a Model of Parkinson’s Disease. **Genes**, v. 12, n. 3, p. 392, 10 mar. 2021.

KOHTALA, S. et al. Brief Isoflurane Anesthesia Produces Prominent Phosphoproteomic Changes in the Adult Mouse Hippocampus. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 749–756, 15 jun. 2016.

LAPMANEE, S. et al. Agomelatine, venlafaxine, and running exercise effectively prevent anxiety- and depression-like behaviors and memory impairment in restraint stressed rats. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187671, 2017.

LAZAROV, O. et al. Environmental Enrichment Reduces A $\beta$  Levels and Amyloid Deposition in Transgenic Mice. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 701–713, mar. 2005.

LI, K. et al. Melatonin Augments the Effects of Fluoxetine on Depression-Like Behavior and Hippocampal BDNF–TrkB Signaling. **Neuroscience Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 303–311, 31 abr. 2018.

LI, M.; D'ARCY, C.; MENG, X. Maltreatment in childhood substantially increases the risk of adult depression and anxiety in prospective cohort studies: systematic review, meta-analysis, and proportional attributable fractions. **Psychological Medicine**, v. 46, n. 4, p. 717–730, 28 mar. 2016.

LIN, Y. et al. Environmental enrichment implies GAT-1 as a potential therapeutic target for stroke recovery. **Theranostics**, v. 11, n. 8, p. 3760–3780, 2021.

MANOSSO, L. M. et al. Beneficial effects and neurobiological aspects of environmental enrichment associated to major depressive disorder and autism spectrum disorder. **Brain Research Bulletin**, v. 190, p. 152–167, nov. 2022.

MAO, Y. et al. Concurrent environmental enrichment and chronic restraint stress: Effects on innate anxiety and depressive-like behavior in male adolescent mice. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 80, n. 8, p. 730–736, 19 dez. 2020.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, jul. 2007.

MCEWEN, B. S. Resilience of the Brain and Body. Em: **Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 19–33.

MCEWEN, B. S.; AKIL, H. Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 12–21, 2 jan. 2020.

MORETTI, M. et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 3, p. 331–340, mar. 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.

NOVAES, L. S. et al. Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 457–466, fev. 2017.

NOVAES, L. S. et al. Environmental enrichment prevents acute restraint stress-induced anxiety-related behavior but not changes in basolateral amygdala spine density. **Psychoneuroendocrinology**, v. 98, p. 6–10, dez. 2018.

NOVAK, J. et al. Handling method affects measures of anxiety, but not chronic stress in mice. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 20938, 3 dez. 2022.

OLESCOWICZ, G. et al. Antidepressant and pro-neurogenic effects of agmatine in a mouse model of stress induced by chronic exposure to corticosterone. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 395–407, fev. 2018.

OLSSON, I. A. S.; DAHLBORN, K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of “environmental enrichment”. **Laboratory Animals**, v. 36, n. 3, p. 243–270, 1 jul. 2002.

OSÓRIO, C. et al. Adapting to Stress: Understanding the Neurobiology of Resilience. **Behavioral Medicine**, v. 43, n. 4, p. 307–322, 2 out. 2017.

OTTE, C. et al. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers** 2016 2:1, v. 2, n. 1, p. 1–20, 15 set. 2016.

PETKOVIĆ, A.; CHAUDHURY, D. Encore: Behavioural animal models of stress, depression and mood disorders. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 16, 8 ago. 2022.

PRITCHETT-CORNING, K. R. Environmental Complexity and Research Outcomes. **ILAR Journal**, v. 60, n. 2, p. 239–251, 31 dez. 2019.

RAMIREZ, S. et al. Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour. **Nature**, v. 522, n. 7556, p. 335–339, 17 jun. 2015.

RIBONI, F. V.; BELZUNG, C. Stress and psychiatric disorders: from categorical to dimensional approaches. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 14, p. 72–77, 1 abr. 2017.

SADEGHI, M.; RADAHMADI, M.; REISI, P. Effects of repeated treatment with cholecystinin sulfated octapeptide on passive avoidance memory under chronic restraint stress in male rats. **Advanced Biomedical Research**, v. 4, p. 150, 2015.

SADLER, A. M.; BAILEY, S. J. Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. **Physiology & Behavior**, v. 167, p. 313–323, dez. 2016.

SCHLOESSER, R. J. et al. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 12, p. 1152–1163, 23 dez. 2010.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, 6 fev. 2015.

SENSINI, F. et al. The impact of handling technique and handling frequency on laboratory mouse welfare is sex-specific. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 17281, 14 out. 2020.

SEO, J.-S. et al. Cellular and molecular basis for stress-induced depression. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 10, p. 1440–1447, 26 out. 2017.

SHILPA, B. et al. 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**, v. 76, p. 88–100, jun. 2017.

SMAIL, M. A. et al. Differential impact of stress and environmental enrichment on corticolimbic circuits. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 197, p. 172993, out. 2020.

SPECK, M. L. et al. Environmental enrichment affects behavioral and pharmacological response to antidepressants in CF1 mice. **Neuroscience Letters**, v. 813, p. 137432, set. 2023.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, mar. 1985.

STRELOW, D. N. et al. Depressive-like behavior and cognitive impairment induced by acute administration of dexamethasone: Pharmacological effects of 2-phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran in female Swiss mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 125, p. 110772, jul. 2023.

STUART, S. A.; ROBINSON, E. S. J. Reducing the stress of drug administration: implications for the 3Rs. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14288, 23 set. 2015.

SUN, X. R. et al. Amelioration of oxidative stress-induced phenotype loss of parvalbumin interneurons might contribute to the beneficial effects of environmental enrichment in a rat model of post-traumatic stress disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 84–92, out. 2016.

SZEW CZYK, B. et al. Antidepressant-like activity of hyperforin and changes in BDNF and zinc levels in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. **Behavioural Brain Research**, v. 372, p. 112045, out. 2019.

TER HORST, J. P. et al. Relevance of Stress and Female Sex Hormones for Emotion and Cognition. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 725–735, 24 jul. 2012.

UENO, H. et al. Effects of repetitive gentle handling of male C57BL/6NCrl mice on comparative behavioural test results. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3509, 26 fev. 2020.

UENO, H. et al. Effect of simultaneous testing of two mice in the tail suspension test and forced swim test. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9224, 2 jun. 2022.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 5, p. E965–E973, nov. 2006.

VANISREE, A. J.; THAMIZHOVIYA, G. Enriched Environment Minimizes Anxiety/Depressive-Like Behavior in Rats Exposed to Immobilization Stress and



Augments Hippocampal Neurogenesis (In Vitro). **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 1, p. 3, 2021.

VEENA, J. et al. Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of newborn cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. **Neuroscience Letters**, v. 455, n. 3, p. 178–182, maio 2009.

WEINBERG, M. S. et al. Medial prefrontal cortex activity can disrupt the expression of stress response habituation. **Neuroscience**, v. 168, n. 3, p. 744–756, jul. 2010.

WILLIAM TANK, A.; LEE WONG, D. Peripheral and Central Effects of Circulating Catecholamines. Em: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2014. p. 1–15.

YANG, G. et al. Transient Effects of Anesthetics on Dendritic Spines and Filopodia in the Living Mouse Cortex. **Anesthesiology**, v. 115, n. 4, p. 718–726, 1 out. 2011.

ZERAATI, M. et al. Environmental enrichment alters neurobehavioral development following maternal immune activation in mice offspring with epilepsy. **Behavioural Brain Research**, v. 399, p. 112998, fev. 2021.

ZHANG, C.; KALUEFF, A. V.; SONG, C. Minocycline ameliorates anxiety-related self-grooming behaviors and alters hippocampal neuroinflammation, GABA and serum cholesterol levels in female Sprague-Dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress. **Behavioural Brain Research**, v. 363, p. 109–117, maio 2019.

ZHU, W. et al. Chronic salmon calcitonin exerts an antidepressant effect via modulating the p38 MAPK signaling pathway. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 16, 10 mar. 2023.

ZIMMERMAN, M. et al. Validity of the DSM-5 anxious distress specifier for major depressive disorder. **Depression and Anxiety**, v. 36, n. 1, p. 31–38, jan. 2019.

ZIMMERMANN, A. et al. When less is more: hormesis against stress and disease. **Microbial cell (Graz, Austria)**, v. 1, n. 5, p. 150–153, 5 maio 2014.