

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

Cristiane Felisbino Silva

**CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO: INFLUÊNCIA NO
COMPORTAMENTO, NA NEUROGÊNESE DO HIPOCAMPO E
NO EFEITO DE DROGAS PADRÃO EM CAMUNDONGOS
SWISS ADULTOS**

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientadora: Dra. Thereza C.M. de Lima

Co-orientadora: Dra. Cilene Lino de Oliveira

Florianópolis – SC

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S586c Silva, Cristiane Felisbino

Condições de alojamento [tese]: Influência no comportamento, na neurogênese do hipocampo e no efeito de drogas padrão em camundongos Swiss adultos / Cristiane Felisbino Silva ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima. - Florianópolis, SC, 2011.

111 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Camundongo como animal de laboratório - Testes. 3. Condição ambiental. I. Lima, Thereza Christina Monteiro de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Agradecimentos

À professora **Thereza**, pela confiança, por me aceitar como orientanda, obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelas conversas e planejamentos na sua sala, pela capacidade de ser professora e amiga, por me ensinar a sempre querer mais.

À professora **Cilene** por somar na minha orientação de forma muito ativa e presente, pelos ensinamentos, pela parceria nos experimentos, pelas correções que me fizeram saber mais.

Vocês duas são um exemplo de trabalho e dedicação, obrigada por me guiarem nesse caminho e me ensinarem a construir um trabalho. Tudo isso só foi possível graças a vocês, muito obrigada.

Ao Filipe, grande amigo, por tudo que você me ensinou, pela incansável parceria nos experimentos, pelas conversas amigas. Você foi fundamental para a conclusão desse trabalho. Minha eterna gratidão.

Ao professor **Marino** por me aceitar em seu laboratório, pelos seminários onde eu aprendi muitos pontos de vista que eu jamais tinha pensado.

Ao professor **Pádua** e sua equipe por me acolherem em seu laboratório, me dando todo o suporte para a minha pesquisa e, especialmente, a **Graziela** que sempre me tratou com carinho e me ensinou a imuno e seus mistérios.

A todos os **professores do Departamento de Farmacologia** da UFSC, pela qualidade do Curso de Pós-graduação e pelos conhecimentos transmitidos.

À **direção e funcionários do Biotério Central e Setorial do Departamento de Farmacologia**, especialmente ao **Pedro, Redna** e o **Murilo**, pela amizade, auxílio técnico e zelo pelos animais.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia e do PPGF, **Rita e Diana**, pela colaboração e momentos de descontração.

Aos companheiros do laboratório, **Marcelo, Ana, Rebeca, Ana, Tiago, Fernando, Crispim, Heloísa, Graziela, Alexandre**, pela amizade, pela constante troca de conhecimentos e por tornarem este ambiente de trabalho agradável.

Aos professores **Rogério, Leandro e Alcíbia**, membros da banca de qualificação do doutorado, pelas críticas, sugestões e reflexões adicionais, que contribuíram dando maior consistência e qualidade à pró-forma da tese.

Aos professores membros da banca examinadora do doutorado, pela atenção dispensada na leitura da tese e sugestões para o aprimoramento desta versão final.

As amigas, sempre parceiras Cristina, Suzi, Marizabel, Edna, Glória, Gê, vocês foram meu alicerce para eu concluir mais essa etapa.

Aos animais que involuntariamente cederam suas vidas para o progresso da ciência.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas não mencionadas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

À família, em especial, a minha sogra, sempre incansável, muito obrigada. Essa conquista também é sua.

Ao meu marido Ondivaldo, pelo incentivo, por nunca me deixar desistir, por acreditar em mim.

Ao meu filho Pedro, razão de tudo.

As condições de alojamento são importantes determinantes do comportamento animal. Seu impacto sobre o comportamento depende do comportamento de interesse, da espécie, da linhagem e da idade dos animais avaliados. No presente estudo, camundongos Swiss machos criados a partir do desmame até 8 semanas em isolamento social (IS8), ambiente enriquecido (AE8) ou em ambiente padrão (P8) foram avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), teste do campo aberto (TCA) e teste da suspensão pela cauda (TSC). O efeito do alojamento por seis semanas no AE seguido por 2 semanas em IS (AE6IS2) e a condição oposta (IS6AE2) também foram estudadas. As condições de alojamento são conhecidas por afetar a neurogênese e, portanto, a expressão de doublecortina (DCX) no giro denteado do hipocampo (GD) desses camundongos foi avaliada. Os dados mostraram que AE8, IS8 e AE6IS2 reduziram o número de estiramentos corporais no LCE, quando comparados com P8. A exploração no TCA em camundongos AE8 foi semelhante aos P8, indicando que o AE8 não afetou a atividade motora. O comportamento de camundongos no TSC não foi alterado em nenhuma das condições de alojamento, indicando que este teste não foi sensível às mudanças ambientais nesta linhagem. Comparado com P8, o AE8 não afetou o número de células DCX, enquanto o AE6IS, IS8 e IS6AE2 diminuíram este número. Em conjunto, nossos dados sugerem que o comportamento dos camundongos Swiss adultos no LCE e TCA foi afetado por mudanças ambientais, mas que essas mudanças parecem ser independentes da neurogênese. Adicionalmente, o resultado das diferentes condições de alojamento, uma semana antes dos testes

comportamentais (período de habituação frequente nos laboratórios) indica que o enriquecimento e o isolamento alteram o efeito do diazepam no LCE e nas convulsões induzidas por PTZ. Além disso, o enriquecimento parece melhorar a memória de longa duração. As condições de alojamento não alteraram os resultados no teste do nado forçado ou na suspensão pela cauda, bem como no efeito da imipramina. A condição de alojamento, padrão ou enriquecida, mas não o isolamento, poderia ser utilizada para a criação dos animais que forem testados no LCE, TCA ou TSC. Em outros testes comportamentais, ou que envolvam a neurogênese, seria bom fazer uma padronização e o isolamento social deve ser evitado. Esses resultados são específicos para camundongos Swiss, linhagem mais usada em testes comportamentais e de neurogênese.

Palavras-chave: Camundongos Swiss, enriquecimento ambiental, isolamento social, labirinto em cruz elevado, doublecortina, neurogênese.

Abstract

Housing conditions are important determinants of animal behavior. Their impact on behavioral output depends on the behavior of interest, species, strain, and age of the animals evaluated. In the present study, male Swiss mice reared from weaning up to 8 weeks in social isolation (SI8), in an enriched environment (EE8) or in a standard environment (SE8) were evaluated in the elevated plus-maze (EPM), open-field (OFT) and tail-suspension (TST) tests. The effect of housing for six weeks in EE followed by 2 weeks in SI (EE6SI2) and the opposite condition (SI6EE2) were also studied. Housing conditions are reported to affect hippocampal neurogenesis; therefore, the expression of doublecortin (DCX) in the dentate gyrus of the hippocampus (DG) of these mice was monitored. Data showed that SI8, EE8 and EE6SI2 reduced the stretching-attend postures in the EPM when compared to SE8. Exploration during the OFT in EE8 mice was similar to SE8, indicating that EE8 did not affect motor activity. However, the SI8 mice explored the OFT more than the EE8 mice, suggesting a hyperactivity induced by isolation. Behavior of Swiss mice in the TST was not altered, indicating that this test was not sensitive to the environmental changes in this mice strain. Compared to SE8, EE8 did not affect the number of DCX cells, whereas SI8, EE6SI2, and SI6EE2 decreased it. Taken together, our data suggest that the behavior of adult Swiss mice in the EPM and OFT was affected by environmental changes but these changes seem to be independent of hippocampal neurogenesis. The result of the different housing conditions, a week before the behavioral tests (habituation period in most laboratories) indicate that the

enrichment and isolation alter the effects of diazepam in the EPM and in PTZ-induced seizures. Furthermore, the enrichment appears to improve long-term memory. And none of the housing conditions caused changes in the forced swim test or tail suspension as well as in the imipramine's effects. The condition of accommodation, standard or enriched, but not isolation, could be used to create animals that are tested in the EPM, OFT or TST. In other behavioral tests, or involving neurogenesis, it would make a good pattern and social isolation should be avoided. These results are specific to Swiss mice, the most used mice strain in behavioral and neurogenesis studies.

Keywords: Swiss mice, enriched environment, social isolation, elevated plus-maze, doublecortin, neurogenesis.

Lista de quadros e figuras

Quadro 1 – Comparação entre o número de trabalhos publicados versando sobre comportamento (<i>behavior</i>), de uma maneira geral, e neurogênese (<i>neurogenesis</i>), no Brasil e no mundo com algumas linhagens de camundongos (PubMed, acesso em 05/03/2011).	3
Quadro 2 – Resumo dos principais resultados da tese.	49
Figura 1 – Enriquecimento ambiental e as diferentes áreas do cérebro ativadas pela estimulação sensorial, cognitiva e motora. (retirada de Nithianantharajah e Hannan, 2006).	8
Figura 2 – Divisão e diferenciação de uma célula-tronco.	16
Figura 3 – Protocolo experimental usado na primeira parte dos experimentos.	24
Figura 4 – Influência dos diferentes tipos de alojamento sobre o comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado por 5 min.	30
Figura 5 – Influência dos diferentes tipos de alojamento na atividade locomotora de camundongos avaliados no campo aberto por 5 min.	31
Figura 6 – Influência dos diferentes tipos de alojamento no comportamento de camundongos avaliados no teste de suspensão pela cauda por 5 min.	32
Figura 7 – Influência dos diferentes tipos de alojamento na neurogênese hipocampal de camundongos.	33
Figura 8 – Protocolo experimental usado na segunda parte dos experimentos.	37
Figura 9 – Protocolo experimental usado no LCE na segunda	38

parte dos experimentos.

Figura 10 – Protocolo experimental usado no TNF na segunda parte dos experimentos. 39

Figura 11 – Protocolo experimental usado no *step down* na segunda parte dos experimentos. 40

Figura 12 – Protocolo experimental usado nas convulsões induzidas por PTZ na segunda parte dos experimentos. 41

Figura 13 – Influência dos diferentes tipos de alojamento (padrão, enriquecido ou isolamento) no comportamento de camundongos tratados com salina (0,9%, i.p.) ou diazepam (1 mg/kg, i.p.) e avaliados no labirinto em cruz elevado por 5 min. 44

Figura 14 – Influência dos diferentes tipos de alojamento (padrão, enriquecido ou isolamento) no comportamento de camundongos tratados com salina (0,9%, i.p.) ou imipramina (15 mg/kg, i.p.) e avaliados no teste do nado forçado por 6 min. 45

Figura 15 – Influência dos diferentes tipos de alojamento (padrão, enriquecido ou isolamento) na latência para descida da plataforma em camundongos tratados com salina (0,9%, i.p.) ou escopolamina (1 mg/kg, i.p.) e avaliados na esquiva passiva na sessão treino e 5s, 90 min e 24h após a sessão treino. 46

Figura 16 – Influência dos diferentes tipos de alojamento (padrão, enriquecido ou isolamento) nas convulsões induzidas por PTZ em camundongos pré-tratados com salina (0,9%, i.p.) ou diazepam (1 mg/kg, i.p.) tratados com pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.) e avaliados por 30 min no teste. 47

Lista de abreviaturas

AE/AE8	ambiente enriquecido/ ambiente enriquecido por 8 semanas
AE6IS2	ambiente enriquecido por 6 semanas e Isolamento social por 2 semanas
BSA	albumina sérica bovina
DCLK	<i>doublecortin-like kinase</i>
DCX	doublecortina
DZP	diazepam
ESC	escopolamina
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABAA	receptor gabaérgico tipo A
GD	giro denteado
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Imuno	imunohistoquímica
i.p.	intraperitoneal
IS/IS8	isolamento social/ Isolamento social por 8 semanas
IS6AE2	isolamento social por 6 semanas e ambiente enriquecido por 2 semanas
MAP	proteína associada aos microtúbulos
MC	memória de curta duração
ML	memória de longa duração
MT	memória de trabalho
PBS	tampão fosfato salina
P/P8	ambiente padrão/ ambiente padrão por 8 semanas
PTZ	pentilenotetrazol
RMS	<i>rostral migratory stream</i>
SGR	zona granular do hipocampo
SVZ	zona subventricular
TCA	teste do campo aberto
TNF	teste do nado forçado
TSC	teste da suspensão pela cauda

	Página
1. Introdução	1
1.1 Camundongos	1
1.2. Camundongos Swiss - histórico	2
1.3. Ambiente e comportamento	3
1.3.1. Condições padrão de alojamento	5
1.3.2. Ambiente enriquecido	7
1.3.3. Isolamento social	13
1.4. Neurogênese	15
1.4.1. Marcadores	18
Justificativa	19
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. Material e Métodos - PARTE I	23
3.1. Animais	23
3.2. Condições de alojamento	23
3.3. Testes comportamentais	24
3.3.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)	24
3.3.2. Teste do campo aberto (TCA)	25
3.3.3. Teste da suspensão pela cauda (TSC)	26
3.4. Imunohistoquímica	26
3.5. Análise estatística	27
4. Resultados – PARTE I	29
4.1. Influência das condições de alojamento no comportamento avaliado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	29
4.2. Influência das condições de alojamento no comportamento avaliado no teste do campo aberto (TCA)	29
4.3. Influência das condições de alojamento no comportamento avaliado no teste de suspensão pela cauda (TSC)	31
4.4. Influência das condições de alojamento na neurogênese hipocampal	32
3. Material e Métodos - PARTE II	35

3.6. Animais	35
3.7. Drogas e reagentes	35
3.8. Delineamento experimental para os testes comportamentais	35
3.9. Testes comportamentais	37
3.9.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)	37
3.9.2. Teste do nado forçado (TNF)	38
3.9.3. Esquiva passiva (Step-Down)	39
3.9.4. Convulsões induzidas por PTZ	40
3.10. Análise estatística	41
4. Resultados – PARTE II	43
4.5. Efeito das condições de alojamento no comportamento avaliado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) – tratamento com diazepam	43
4.6. Efeito das condições de alojamento no comportamento avaliado no teste do nado forçado (TNF) – tratamento com imipramina	45
4.7. Efeito das condições de alojamento no comportamento avaliado no teste da esquiva passiva do tipo step-down – tratamento com escopolamina	46
4.8. Efeito das condições de alojamento no comportamento avaliado nas convulsões induzidas por PTZ – tratamento com diazepam	47
5. Discussão	49
6. Conclusões	75
7. Referências bibliográficas	77

1. Introdução

1.1. Camundongos

Camundongos são mamíferos onívoros e granívoros, altamente sociais, e se comunicam principalmente por meio de sinais olfativos e auditivos. Na cadeia alimentar ocupam a posição de presas, por isso, fogem e se escondem de ameaças. Eles são principalmente noturnos, vivem em tocas e constroem ninhos (Suckow et al., 2001). Os machos lutam pelo território e pela posição social, mesmo após a conquista das hierarquias de dominância (Jennings et al., 1998).

O camundongo se estabeleceu como um modelo animal no início do século XX. Como resultado do refinamento das tecnologias de reprodução assistida, a produção de camundongos transgênicos (animais que tiveram seu patrimônio genético alterado com a introdução de genes de outras espécies que não a sua) e nocaute (animal geneticamente modificado no qual um ou mais genes são inativados por uma mutação alvo, *knockout*) e as mutações espontâneas, as linhagens produzidas (por ex: C57 BL/6, BALB/c, e DBA) possuem características distintas que levam a inúmeras variações entre os camundongos de laboratório (Knight e Abbot, 2002). Apesar de muitas gerações de domesticação e melhoramento genético dirigido, as linhagens mais comuns de camundongos de laboratório retêm a maior parte dos repertórios comportamentais dos seus progenitores. Os comportamentos de nidificação e de fazer tocas ainda persistem em grande parte deles. Em um estudo no qual o comportamento de nidificação foi observado, camundongos C57 BL/6J e DBA/2J construíram ninhos que diferiam em termos de qualidade (Bond et al., 2002) e quando tinham acesso a caixas de enterramento, tanto os BALB/c quanto os C57BL/6, construíram tocas espontaneamente, embora a complexidade da escavação tenha variado entre eles (Dudek et al., 1983).

Os comportamentos sociais de camundongos de laboratório são também conservados e eles preferem a proximidade com outros camundongos (Van Loo et al., 2004). Os níveis de agressão variam nas linhagens e vários pesquisadores têm relatado que os DBA/2 são mais agressivos do que os C57 BL/6 (Crawley et al., 1997). Os camundongos *Swiss* também apresentam comportamento agressivo e são bons modelos para se estudar as causas e os mecanismos da agressão (Ferrari et al., 1996). Os camundongos são amplamente estudados nas pesquisas biomédicas (Abramov et al., 2008; Arndt et al., 2009; Koike et al.,

2009). Em laboratório, os camundongos são alojados em grupos como no ambiente selvagem, mas são normalmente segregados por sexo, em contraste com o seu *habitat* natural (Allewa, 1993). Essas condições podem ser apropriadas para camundongos fêmeas em período não-reprodutivo, uma vez que geralmente são dóceis quando alojadas em grupo (Bartolomucci et al., 2009). No entanto, os camundongos do sexo masculino apresentam aumento dos comportamentos agressivos quando alojados em grupos, às vezes, provocando ferimentos graves nos seus companheiros (Van Loo et al., 2003), embora não se possa generalizar os comportamentos exibidos pelos camundongos, pois muitos são específicos de uma determinada linhagem. Em nosso trabalho estudaremos o camundongo *Swiss*.

1.2. Camundongos *Swiss* – histórico

Em 1926, Clara J. Lynch, uma pesquisadora da genética do câncer do Instituto de Pesquisa Médica Rockefeller, em Nova York, importou dois machos e sete fêmeas de camundongos albinos *stocks*, não isogênicos, de André de Coulon. Como André trabalhava no Centro Anticâncer em Lausanne, na Suíça, todos os camundongos derivados deste local ficaram conhecidos como *Swiss* (suíço) devido ao apelido utilizado por Lynch e o pessoal de seu laboratório.

Esses animais de Coulon eram derivados de uma colônia não isogênica (população formada por indivíduos geneticamente diferentes e heterozigóticos)

do Instituto Pasteur em Paris, comprados antes de 1920. Então, os camundongos *Swiss* não são provenientes de linhagens puras (população formada por indivíduos geneticamente idênticos e homozigóticos) (Lynch, 1969). Apesar dessa origem, muitas linhagens puras, como FVB, SJL e SWR são derivadas dos *Swiss*. No entanto, como quase todos os camundongos e ratos não isogênicos usados na pesquisa biomédica são albinos, os pesquisadores ficam com a falsa impressão de que eles são geneticamente iguais, quando na verdade, eles são geneticamente heterogêneos.

Lynch também enviou seu camundongo *Swiss* para outros pesquisadores, dentro e fora do Instituto Rockefeller. Em 1932, um desses pesquisadores, Leslie Webster, que realizava experimentos sobre a suscetibilidade a infecções virais, cedeu esses camundongos para criadores acadêmicos e comerciais, como o *Carworth Farms*, no Reino Unido, o qual produziu o *Swiss Webster* (ou CF-1 ou CFW - não isogênico) (Lynch, 1969; Rice e O'Brien, 1980).

Outra linhagem de camundongos, o CD-1 (ou ICR - não isogênico) foi a primeira produzida pelo laboratório Charles River, em 1959 (Rice e O'Brien, 1980), e foi originária dos pesquisadores do *Roswell Park Memorial Institute*, Buffalo, no estado de Nova York. Esses pesquisadores obtiveram esses animais da colônia criada na década de 1940, no *Institute of Cancer Research*, Fox Chase, Filadélfia, a qual é originária dos camundongos *Swiss Webster* do Instituto Rockefeller (Rice e O'Brien, 1980). Assim, as linhagens CD-1 e *Swiss Webster* são relacionadas, mas foram separadas em 1930.

Como os *stocks Swiss* heterozigotos não foram selecionados para desenvolver um traço específico, as informações obtidas nas linhagens derivadas dos *Swiss* não são necessariamente válidas para eles. Além da importância do *Swiss* como espécie de origem de muitas outras, vemos também seu grande uso nas pesquisas biomédicas (Quadro 1).

Linha gem	BRASIL			MUNDO		
	Comportamento	Neurogênese	TOTAL	Comportamento	Neurogênese	TOTAL
<i>Swiss</i>	690	1	7.393	50.196	1.151	1.049.393
Balb/c	42	0	1.524	3.093	36	121.876
C57/Bl6	28	0	361	1.496	56	23.612
DBA	3	0	67	1.612	20	20.128
ICR	4	0	15	1.092	39	21.478

Quadro 1. Comparação entre o número de trabalhos publicados versando sobre comportamento (*behavior*), de uma maneira geral, e neurogênese (*neurogenesis*), no Brasil e no mundo com algumas linhagens de camundongos (PubMed, acesso em 05/03/2011) (Método de busca - *Swiss mice*, *Swiss mice and Brazil*, *Swiss mice and behavior*, *Swiss mice and behavior and Brazil* e *Swiss mice and neurogenesis*, *Swiss mice and neurogenesis and Brazil*).

1.3. Ambiente e comportamento

O cérebro de mamíferos é gerado por complexos programas genéticos e epigenéticos que garantem que a maior parte das células e áreas estruturais esteja pronta ao nascimento. No entanto, a interação com o meio ambiente desde o nascimento promove o refinamento da circuitaria neuronal necessária para a função cerebral normal. Fatores genéticos e neuroquímicos que modulam a função e disfunção cerebral têm sido muito explorados nas últimas décadas, mas os parâmetros

ambientais têm recebido menos atenção (Nithianantharajah e Hannan, 2006).

Investigações epidemiológicas de doenças neurológicas e psiquiátricas, incluindo estudos envolvendo gêmeos monozigóticos, têm fornecido pistas importantes sobre a contribuição dos fatores genéticos e ambientais (Mayeux, 2003; Spire e Hannan, 2005). Entretanto, devido ao enorme número de variáveis ambientais nas populações humanas, tais estudos se limitam a relatar o envolvimento de fatores ambientais nos distúrbios cerebrais. Por outro lado, os modelos animais têm sido fundamentais na identificação de mediadores moleculares e celulares das patologias, bem como de moduladores ambientais.

Manipulações específicas do ambiente social pós-natal podem resultar em mudanças crônicas no desenvolvimento de ratos (Pryce et al., 2005). Essas mudanças, quando estudadas em termos de comportamento e da fisiologia tem sido propostas como modelos de sintomas e anormalidades associadas, por exemplo, à depressão e/ou à ansiedade (Pryce et al., 2005).

As pesquisas biomédicas e na área da neurociência possuem poderosas ferramentas genéticas, moleculares e celulares que têm facilitado a geração de novos modelos animais que podem ser investigados através de abordagens integrativas. A grande maioria dos modelos animais envolve camundongos ou ratos, devido a sua relevância para a genética, fisiologia e anatomia humana, bem como restrições técnicas, temporais, financeiras e éticas. São frequentes os casos em que o sucesso nos resultados pré-clínicos em um modelo em rato ou camundongo de laboratório é tomado diretamente em ensaios clínicos. No entanto, na medida em que cada modelo animal exibe validade de construto para uma doença particular, eles são um modelo de interações gene \times ambiente altamente variável: desvendando novos fenótipos (para revisão, ver Burrows et al., 2010). Apesar dos recentes avanços na genética psiquiátrica, tem-se revelado difícil ligar diretamente genótipos com comportamentos distintos e isolar genes que contribuem para deficiências comportamentais específicas nos indivíduos afetados (Mackay e Anholt, 2007; Hanmer et al., 2010). Parte dessa dificuldade decorre da natureza poligênica dos distúrbios psiquiátricos, e da tendência das recentes pesquisas para se concentrar em explorar uma relação linear entre genes e comportamento (Kas e van Ree, 2004). Quando combinados com mudanças ambientais, certas mutações genéticas podem ser protetoras ou patogênicas, dependendo da natureza do fator ambiental e o tempo de interação. Assim, um foco sobre a validade teórica (*construct validity*) genética sozinha tem

limitado valor heurístico devido às interações de interdependência entre fatores genéticos e ambientais que desempenham papéis importantes nas patogêneses. Modelos que incorporam tanto os fatores genéticos quanto ambientais podem produzir fenótipos completamente novos, anteriormente não detectados em camundongos mutantes ou em animais selvagens expostos a uma manipulação ambiental. Na verdade, não é possível compreender plenamente a ação dos genes em transtornos cognitivos e comportamentais sem levar em consideração o meio ambiente. Assim, modelos animais válidos devem abordar as variáveis genéticas e ambientais de forma integrada, isso possibilita uma reprodução dos fatores etiológicos e ajuda a elucidar os mecanismos patogênicos envolvidos (para revisão, ver Burrows et al., 2010).

Uma consideração importante para a validade teórica em modelos animais da esquizofrenia, por exemplo, é o fato de que os primeiros sintomas de comportamento alterado surgem em pacientes durante a adolescência (Woods, 1998). Acredita-se que influências precoces e tardias no desenvolvimento neurológico, além do ambiente e suas interações, contribuem para a transição da vulnerabilidade à eventual expressão de sintomas que compõem a esquizofrenia. Assim, as manipulações ambientais que ocorrem durante períodos críticos do desenvolvimento do cérebro podem fornecer ideias valiosas sobre as interações gene-ambiente envolvidas na patogênese da esquizofrenia (Burrows *et al.*, 2010). Dentre as manipulações que perturbam precocemente o ambiente de criação, temos a separação materna (Pryce et al., 2005; Millstein e Holmes, 2007), as intervenções pós-desmame (Blanchard et al., 2001; Cilia et al., 2001), os paradigmas de estresse crônico (Blanchard et al., 2001; Willner, 2005) e, recentemente, a exposição aos derivados de *cannabis* para imitar as drogas de abuso na adolescência (Boucher et al., 2007; O'Tuathaigh et al., 2010).

1.3.1. Condições padrão de alojamento

Trabalhar com testes comportamentais em animais requer um conhecimento e controle dos fatores internos e externos que podem influenciar os resultados dos experimentos. Os fatores internos compreendem o sexo do animal, idade, estado hormonal, saciedade e *background* genético; os fatores externos são as condições envolvidas no alojamento e as interações sociais (Chourbaji et al., 2005). Embora a importância dos fatores internos tenha sido amplamente reconhecida nos últimos anos (Banbury Conference on genetic background in mice, 1997), o alojamento de animais experimentais é apenas relatado como "padrão", sem uma definição clara para isso.

As condições de alojamento de camundongos que são consideradas "padrão" na maioria dos laboratórios são estéreis em comparação com qualquer ambiente natural e, portanto, implicam em privação comportamental e social (no caso de caixas individuais). Isso resulta em uma redução do repertório comportamental natural (Wolfer et al., 2004), bem como em alterações de funções específicas do cérebro dos animais (Würbel, 2001).

As condições padrão de alojamento são aparentemente pobres (confinamento, isolamento ou em grupo, com forragem, em um ambiente com ciclo de luz e temperatura constantes e com água e comida *ad libitum*) (Nithianantharajah e Hannan, 2006). Esse excesso de comida é oferecido mesmo sabendo-se que a restrição alimentar em roedores de laboratório e outros animais, geralmente, têm efeitos benéficos sobre o metabolismo, fisiologia e longevidade (Mattson e Wan, 2005). Outro problema é que a caixa de laboratório de alojamento padrão geralmente fornece pouca estimulação sensorial, cognitiva e motora, isto contrasta com a condição humana que pretendemos estudar. A maioria das pessoas recebe, desde o nascimento até a adolescência e a idade adulta, uma riquíssima variedade de estímulos sensoriais e oportunidades para o exercício cognitivo e a realização de atividades físicas (Burrows et al., 2010). A falta de exercício físico na maioria dos alojamentos padrão de roedores leva a comportamentos sedentários que podem atuar sinergicamente com a dieta *ad libitum* para facilitar a obesidade (Martin et al., 2010), produzindo potenciais problemas metodológicos que são relevantes para uma vasta gama de diferentes modelos de doenças (Burrows et al., 2010). No entanto, modelos de transtornos cerebrais em roedores precisam não apenas do modelo do corpo humano, com relação à dieta, exercício físico, fisiologia e metabolismo, mas também dos níveis de estimulação dentro do cérebro (Burrows et al., 2010). Indivíduos experimentais criados em caixas padrão muitas vezes apresentam sinais de anormalidade (Würbel, 2001) expressos por comportamentos atípicos para sua espécie, como estereotípias.

Assim, as condições ambientais a que os animais experimentais são expostos afetam vários aspectos do seu comportamento (Deacon, 2006). Esses aspectos parecem depender das particularidades da caixa (Arndt et al., 2009), do comportamento de interesse (Sáenz et al., 2006), bem como do sexo (Starkey et al., 2007; Wood et al., 2010), da linhagem (Abramov et al., 2008), e da idade (Simonetti et al., 2009) das espécies animais avaliadas.

Além disso, uma variedade de condições de alojamento, tais como forração, ciclo circadiano, temperatura, e o tamanho da caixa podem ser alterados durante um experimento (Zhao et al., 2009). As caixas dos animais experimentais são alteradas durante a limpeza e substituição da serragem suja por produtos frescos. O tamanho da caixa também é frequentemente alterado durante um experimento. E mesmo que estas mudanças ambientais pareçam suaves e inofensivas, não se sabe se esses afetam as funções cognitivas e emocionais dos animais (Zhao et al., 2009).

Durante as últimas décadas, a modernização das técnicas de alojamento e manuseio de roedores apresentou melhorias para garantir a biossegurança para os animais e pessoas que os manuseiam. Estas mudanças foram feitas para minimizar as variáveis, tais como doenças infecciosas, exposição a toxinas, ou variações no meio ambiente (Hutchinson et al., 2005). Tudo isso na tentativa de oferecer um ambiente higiênico e padronizado para melhorar a validade científica (Würbel, 2001). O resultado foi uma melhora na manutenção da saúde dos animais e da reprodutibilidade dos resultados das pesquisas, e a diminuição do número de animais necessários para atingir resultados estatisticamente significativos. Como a manipulação física de roedores de laboratório tornou-se altamente padronizada, muitos bioteristas perceberam as consequências adversas para os roedores de laboratório em termos de falta de complexidade do ambiente dos roedores. A preocupação com esse aspecto do bem-estar animal levou muitos centros de pesquisa a proporcionar o enriquecimento ambiental para roedores como um método para melhorar a qualidade de vida dessas espécies (para revisão, ver Hutchinson et al., 2005).

1.3.2. Ambiente enriquecido

A associação entre fatores ambientais e o aparecimento de comportamentos específicos tem motivado a concepção dos dispositivos e técnicas de manipulação do ambiente dos animais (Sáenz et al., 2006). Por exemplo, a condição de alojamento que fornece objetos que aumentam as estimulações sensoriais, cognitivas e motoras (Figura 1) aliada ao convívio social (alojamento em grupo) tem sido chamada de ambiente enriquecido (AE). O enriquecimento ambiental tem mostrado promover efeitos celulares, moleculares e comportamentais em ratos e camundongos (Nithianantharajah e Hannan, 2006).

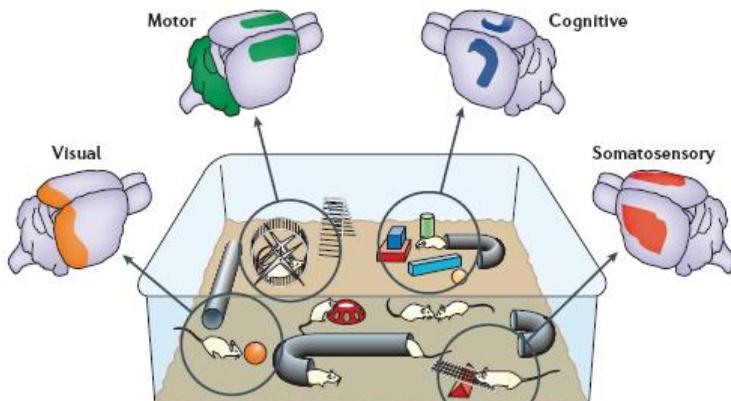


Figura 1. Enriquecimento ambiental e as diferentes áreas do cérebro ativadas pela estimulação sensorial, cognitiva e motora (retirada de Nithianantharajah e Hannan, 2006).

A ideia de fornecer atividades aos animais e oferecer ambientes mais estimulantes veio de dois psicólogos, na década de 1940, interessados na influência da experiência na resolução de problemas. Em 1947, o Dr. Hebb levou para sua casa ratos de laboratório para serem tratados como animais de estimação. Ele também manteve em seu laboratório uma colônia de ratos em um ambiente não estimulante. Quando os ratos de estimação e os de laboratório foram testados para uma mesma tarefa (passar por um labirinto), os ratos de estimação a realizaram de forma muito mais eficiente (Adams, 2007). Hediger (1964) expandiu o conceito de enriquecimento ambiental dizendo que o fornecimento de espaço de qualidade era mais importante que a quantidade de espaço. Ele ainda declarou que o bem-estar dos animais de cativeiro dependia da possibilidade de satisfazer as atividades que eram essenciais para a espécie (Hediger, 1964). Corroborando essa ideia, temos que os comportamentos de uma dada espécie evoluem favorecendo suas chances de sobrevivência e os comportamentos inatos favorecem a homeostase biológica e promovem a saúde física (Hutchinson et al., 2005).

O histórico do AE para os roedores começou como uma variável experimental primária dentro de uma série de projetos na década de 1960 que exploravam a relação entre o ambiente de um animal e a composição básica de seu cérebro (Hutchinson et al., 2005). Essa investigação continua até hoje, e ainda constitui a maior parte das pesquisas publicadas nessa área. Desde as primeiras conclusões sobre os

efeitos do enriquecimento em parâmetros macroscópicos, tais como peso do cérebro (van Praag et al., 2000), o refinamento dos estudos evoluiu para demonstrar efeitos a nível molecular e celular, incluindo a estrutura neuronal (Fernandez et al., 2003), gliogêneses (Steiner et al., 2004), plasticidade sináptica e expressão gênica (Farmer et al., 2004). Os investigadores também descobriram que o enriquecimento atenua insultos ou facilita o reparo do cérebro em uma variedade de situações, incluindo a exposição ao chumbo no desenvolvimento (Guilarte et al., 2003), acidente vascular cerebral e trauma (Xerri et al., 2003; Dahlgvist et al., 2004), estresse pré-natal (Morley-Fletcher et al., 2003) e até mesmo envelhecimento (Frick e Fernandez, 2003).

Em 2004, Moncek e seu grupo estudaram os efeitos da criação de ratos em AE sobre a reatividade destes animais quando submetidos a situações de estresse. Neste estudo, os pesquisadores compararam esses animais com animais criados também em grupo, porém, sem enriquecimento ambiental. Os resultados mostraram que os animais criados em AE apresentavam níveis basais de corticosteroide mais elevados e um aumento das glândulas adrenais (Moncek et al., 2004). Esses dois parâmetros são medidas fisiológicas clássicas de estresse e sugeririam a presença de um componente aversivo no AE. No entanto, deve-se levar em conta que nem todo o estresse pode ser considerado prejudicial. Essas respostas fisiológicas poderiam ter valor adaptativo necessário ao funcionamento do organismo, tornando-o apto a se adaptar a novas situações. Na verdade, o que se vê nos animais expostos ao AE é uma rápida habituação ao estresse com picos de corticosteroide, que são rapidamente estabilizados pelo organismo sem apresentar os efeitos deletérios do estresse (Moncek et al., 2004). O enriquecimento ambiental poderia então ser visto como uma oportunidade para o animal exercitar os comportamentos naturais de sua espécie e essenciais para a manutenção da homeostase do organismo. Sendo assim, os animais criados em AE estariam menos sujeitos às alterações comportamentais e fisiológicas causadas por pequenas variações que ocorrem entre biotérios, laboratórios e experimentadores. Nesta linha de raciocínio, Richter e colaboradores (2009) questionaram a validade da padronização ambiental dos experimentos e propuseram que ela é crucial para falta de reprodutibilidade dos resultados entre os laboratórios uma vez que é impossível reproduzir completamente as condições ambientais exatas entre os laboratórios. Estes autores verificaram ainda que a padronização ambiental induz mais resultados falso-positivos do que a heterogeneidade de ambientes, indicando o enriquecimento ambiental como uma forma de minimizar esse problema.

O enriquecimento das condições de alojamento, por sua vez, dependendo da linhagem estudada, afeta de várias maneiras os camundongos. Por exemplo, o alojamento em um ambiente enriquecido foi relatado por aumentar a agressão na linhagem isogênica CS (Marashi et al., 2003) ou de não mudar a agressão na dócil linhagem isogênica ABG (Marashi et al., 2004). A linhagem do camundongo também interferiu no efeito das condições de alojamento em outros tipos de expressão comportamental (Van Weerd et al., 1994; Roy et al., 2001; Guo et al., 2004; Võikar et al., 2005; Zhu et al., 2006; Abramov et al., 2008; Bouet et al., 2011). Por exemplo, o camundongo "ansioso" BALB/c apresentou comportamentos mais aversivos após a exposição ao enriquecimento do que o "não-ansioso" C57 BL/6 no labirinto em cruz elevado (LCE; Van de Weerd et al., 1994, Roy et al., 2001, Zhu et al., 2006). Notavelmente, esta forma de modificação ambiental tem sido demonstrada ser benéfica em vários modelos animais relevantes para o estudo das doenças psiquiátricas. Isto comprova que a modulação da estimulação sensorial/cognitiva e níveis de atividade física têm grande impacto sobre os modelos animais de transtornos cerebrais (Burrows et al., 2010). Existe hoje uma extensa literatura demonstrando que roedores de laboratório controle (tipo selvagem) alojados em ambiente enriquecido mostram um melhor desempenho cognitivo, redução da ansiedade, bem como uma série de alterações fisiológicas, metabólicas e moleculares, em relação ao alojado em condições padrão (Van Praag et al., 2000; Sale et al., 2009). Além disso, uma gama de diferentes modelos animais geneticamente manipulados para transtornos cerebrais mostrou um atraso no início e progressão lenta da doença, e outras indicações de fenótipo melhorado, após o enriquecimento ambiental (revisado por Nithianantharajah e Hannan, 2006; Laviola et al., 2008). Isto foi mostrado pela primeira vez em modelos de camundongos transgênicos na doença de Huntington (Van Dellen et al., 2000; Hockly et al., 2002; Spires et al., 2004) e, posteriormente, foi demonstrado em modelos genéticos de outras doenças neurológicas, como Alzheimer (Arendash et al., 2004; Jankowsky et al., 2005; Lazarov et al., 2005), síndrome do X frágil (Restivo et al., 2005) e síndrome de Rett (Kondo et al., 2008; Nag et al., 2009; Nithianantharajah e Hannan, 2009), em camundongos.

A abordagem de investigar a capacidade de enriquecimento ambiental para modular anormalidades induzidas por genes pode também facilitar a otimização da validade teórica em relação a interações gene-ambiente envolvidas nos transtornos psiquiátricos (Burrows *et al.*, 2010). Foi demonstrado que o enriquecimento

ambiental melhora anormalidades comportamentais em modelos animais de transtornos psiquiátricos, incluindo comportamentos tipo-esquizofrênicos e tipo-depressivos (Brenes et al., 2008; Chourbaji et al., 2008; McOmish et al., 2008; Pang et al., 2009). Além disso, o aumento das condições de estimulação ambiental em roedores pode alterar as suas respostas comportamentais e neuroquímicas para drogas de abuso (Solinas et al., 2008, 2009).

Estudos sobre o efeito do enriquecimento em vários distúrbios cerebrais têm usado uma variedade de condições metodológicas e, enquanto não há um consenso sobre qual enriquecimento ambiental é ideal em relação aos efeitos benéficos sobre o cérebro e o comportamento, um aspecto fundamental parece ser a prestação de uma complexidade ambiental e a novidade (Nithianantharajah e Hannan, 2006). O comportamento de roedores permite a caracterização das estratégias de enriquecimento para roedores de laboratório dentro de um número de grandes categorias: estrutura e substrato, manipulação, novos alimentos, contato social, e outros tipos menos comuns.

Estrutura e substrato incluem quaisquer objetos ou parâmetros em sua dimensão e forma, as quais permitem que o animal se isole em diferentes microambientes, experiências com variadas texturas ou materiais, ou que permitam expressar padrões normais de locomoção (Hutchinson et al., 2005). Estas estratégias de enriquecimento são talvez as mais comumente associadas com roedores de laboratório, e incluem materiais de nidificação, as rodas de correr e abrigos para se esconder (Hutchinson et al., 2005). O fornecimento de material de nidificação é considerado um componente fundamental do protocolo de enriquecimento. O material de nidificação é muito valorizado pelos camundongos machos e fêmeas que constroem um ninho quando esse material é oferecido (Van de Weerd et al., 1998).

A manipulação inclui todos os objetos que podem ser alterados por um animal ou encorajá-lo a se envolver em movimentos de coordenação motora fina, como blocos, de madeira, ou plástico e brinquedos de mastigar (Hutchinson et al., 2005). O enriquecimento por meio de manipulações da dieta pode ser conseguido através de novos alimentos. Os itens selecionados (por exemplo, frutas, verduras, grãos) podem diferir em sabor, textura, ou conveniência, ou podem exigir dos animais a forragem ativa ou um processo de dieta (por exemplo, espalhando-se pequenas porções de alimentos através da forração para incentivar o forrageamento) (Hutchinson et al., 2005).

Outro componente, um dos mais importantes do enriquecimento é a interação social que pode consistir em qualquer escala de interações

entre animais individuais, do simples contato visual ou comunicação auditiva. Nos animais alojados em grupo as interações são auto-limpeza mútua, exploração social, vocalizações e brincadeiras, por isso, o número de animais alojados em conjunto pode ser outra fonte de variação (Hutchinson et al., 2005). O contato social continua a ser um dos componentes mais importantes de um ambiente enriquecido, mas a interação social sozinha não pode produzir todos os efeitos de um ambiente enriquecido (Rosenzweig, et al., 1978).

Outros tipos de enriquecimento podem estimular outros sentidos como o toque ou gosto, mas têm sido utilizados com menor frequência. Exemplos incluem a oferta de música ou ruído neutro e o uso de estímulos olfativos, como a baunilha (Hutchinson et al., 2005).

A idade em que começa o enriquecimento, a duração da exposição a um ambiente enriquecido, a frequência com que os objetos e suas posições são alterados e se os animais estão continuamente expostos ao enriquecimento ou se é restrito à apenas algumas horas por dia, constituem outras fontes de variação (Burrows et al., 2010). Além dos componentes explícitos do enriquecimento, a delimitação temporal também requer alguma padronização. Apesar de algumas evidências ligarem determinados resultados induzidos pelo enriquecimento à duração específica da exposição, o exato momento para testar os animais depois de serem alojados nessas condições ainda permanece indefinido.

Outro aspecto dos efeitos benéficos do enriquecimento ambiental, é que ele pode ter utilidade substancial no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A compreensão de como fatores ambientais específicos induzem efeitos benéficos nos modelos de doenças poderia ser usada para identificar alvos moleculares para 'ambientomiméticos': drogas que imitam ou aumentam os efeitos benéficos em associação com a estimulação ambiental (Hannan, 2005; McOmish e Hannan, 2007). Mas existem fatores ambientomiméticos disponíveis atualmente? Poderíamos argumentar que os inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRSs) têm efeitos celulares e moleculares em modelos de roedores, tais como aumento da expressão de BDNF e da neurogênese hipocampal adulta (revisado por Banasr e Duman, 2007) que são muito semelhantes àqueles induzidos por enriquecimento ambiental e exercício físico (revisado por Nithianantharajah e Hannan, 2009). No entanto, os estímulos ambientais induzem uma série de outros efeitos moleculares e celulares e o uso de manipulações experimentais que modulam os níveis de estimulação sensorial, cognitiva e física podem assim, identificar

uma rica variedade de potenciais alvos para um futuro desenvolvimento de ambientomiméticos (Burrows et al., 2010).

Destacamos aqui a importância dos fatores ambientais na modelagem dos transtornos psiquiátricos em animais e, em sinergia com fatores genéticos, obtendo uma melhor validade de constructo. No entanto, há uma série de outros fatores, incluindo delineamento experimental e questões metodológicas que podem impactar a validade dos modelos animais, e também afetar a eficácia terapêutica dos resultados pré-clínicos nos estudos clínicos (Van der Worp et al., 2010).

É aceito que diversos fatores ambientais podem afetar o comportamento dos animais (Sáenz et al., 2006). Sem o controle destas variáveis, é muito difícil para os pesquisadores obter não apenas confiança, mas também a reprodutibilidade dos dados a partir de vários experimentos comportamentais, testando, por exemplo, funções cognitivas e emocionais em animais (Burrows et al., 2010).

1.3.3. Isolamento social

Alguns autores argumentam que o AE seria a situação natural no desenvolvimento neurológico do animal, enquanto o empobrecimento ambiental é uma condição artificial que induziria a um desenvolvimento neurológico anormal (Morgan, 1973; Sahakian et al., 1975). Realmente, nota-se que ratos alojados individualmente (extremo da condição empobrecida) podem mostrar comportamentos anormais, tais como déficits de atenção, hiperatividade, comportamento emocional exagerado e estereotípias (Wright et al., 1991; Cilia et al., 2001) que são acompanhados de mudanças neuroquímicas subjacentes (Lodge e Lawrence, 2003). A falta de manipulação durante a infância também foi relatada como prejudicial à aprendizagem e memória em ratos adultos (Pryce et al., 2003). As alterações fisiológicas e comportamentais observadas em animais criados em isolamento mostram que esta condição causa consequências de longo prazo, indicativas de uma incapacidade de se adaptar às exigências do ambiente (Olsson e Dahlborn, 2002). Já foi observado também que quando se comparam ratos isolados socialmente com ratos oriundos de ambientes enriquecidos, os animais isolados geralmente mostram mais comportamentos de aversão, e tornam-se mais responsivos e vulneráveis às mudanças ambientais (Einin e Morgan, 1977; Gentsch et al., 1982; Gentsch et al., 1983; Domeney e Feldon, 1998). Isto sugere que o isolamento social pode afetar a confiabilidade e a reprodutibilidade dos experimentos comportamentais, ou até mesmo, neuroquímicos, em certas condições artificiais de laboratório.

No entanto, a criação de animais em condições de isolamento é um paradigma relevante para o estudo dos efeitos do estresse no início da vida e para a compreensão da origem de certas doenças neurológicas e psiquiátricas (Myhrer, 1998; Whitaker-Azmitia et al., 2000). A chamada síndrome de isolamento tem sido bem caracterizada e consiste de uma hiperatividade locomotora espontânea e condicionada (Heidbreder et al., 2000), aumento das respostas frente a novos ambientes e alteração das respostas comportamentais aos efeitos das drogas, como opiáceos e psicoestimulantes, tipo anfetamina (Smith et al., 1997).

O alojamento em situação de isolamento social das linhagens de camundongos machos C57BL/6J e DBA/2 leva a um aumento da exploração (Võikar et al., 2005), enquanto camundongos NMRI exploram menos os braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) do que os grupos socialmente alojados (Bouet et al., 2011). Além da expressão comportamental no LCE, o desempenho dos camundongos em outros testes comportamentais, tais como, campo aberto ou teste do nado forçado parece também ser afetado pela linhagem e pelas condições de alojamento. Uma hiperatividade foi encontrada no campo aberto e uma imobilidade reduzida foi observada no teste do nado forçado (TNF) em animais socialmente isolados (Guo et al., 2004; Võikar et al., 2005). Assim, é evidente que os efeitos das condições de alojamento sobre o comportamento de uma dada linhagem de camundongos não parece ser previsível, levando-se em conta, os dados obtidos a partir de diferentes linhagens.

Durante a execução de experimentos comportamentais, entretanto, às vezes é inevitável que o pesquisador mude o ambiente dos animais, como a troca da caixa em que o animal experimental estava alojado e a separação dos animais em pequenos grupos experimentais. Kwak e colaboradores (2009) investigaram os efeitos das mudanças ambientais sobre os comportamentos emocionais de camundongos socialmente isolados ou que tiveram redução do tamanho da caixa. Eles demonstraram que o isolamento social aumenta seletivamente os níveis de ansiedade dos animais, enquanto a inibição comportamental (também chamado de comportamento do tipo-depressivo) não foi alterada. Por outro lado, a alteração das dimensões do alojamento não afetou nem a ansiedade nem a inibição comportamental. Estes resultados sugerem que as variáveis ambientais podem ter um importante impacto sobre os comportamentos emocionais de animais experimentais e possivelmente seus estados psicológicos, levando a um viés nos dados comportamentais produzidos a partir dos experimentos.

Um exemplo extremo de privação sensorial, motora e cognitiva reside na aplicação do isolamento social pós-desmame em roedores. Submeter roedores ao isolamento afeta profundamente o desenvolvimento do cérebro e resulta em alterações comportamentais que podem estar ligadas a traços psicopatológicos humanos clinicamente relevantes, incluindo aqueles observados na esquizofrenia, por exemplo (Van den Buuse et al., 2003; Fone e Porkess, 2008). Enquanto muitas pesquisas têm focado os efeitos do isolamento social em camundongos tipo-selvagem, a exposição de camundongos com alterações genéticas ao isolamento social pós-desmame é um conceito relativamente novo para investigar a interação entre o estresse precoce e predisposição genética, com relevância para a compreensão da patogênese das doenças psiquiátricas (Burrows et al., 2010). Camundongos heterozigóticos para *Nurr1*, um fator de transcrição que tem importância fundamental para o desenvolvimento de neurônios dopaminérgicos (Zetterstrom et al., 1997) apresentam maior vulnerabilidade para o isolamento, o que leva a deficiências comportamentais em relação ao seu controle do tipo selvagem (Eells et al., 2006). Por outro lado, em outro modelo genético, a ablação do receptor de histamina do tipo 1 bloqueou os efeitos do isolamento social em camundongos (Dai et al., 2005). Assim, a análise do controle genético da sensibilidade a fatores ambientais levará, certamente, a melhor compreensão de como as interações entre o ambiente-gene contribuem para o risco de desenvolver doenças psiquiátricas (Burrows et al., 2010). Por exemplo, camundongos de laboratório que tiveram ambientes restritos mostraram propriedades de potenciação sináptica diferentes de animais selvagens (Zhao et al., 2009).

Várias evidências indicam que o convívio social no início da vida influencia significativamente a organização do comportamento e o desenvolvimento do cérebro. O isolamento social prejudica processos de memória, por um mecanismo pouco conhecido, mas que envolve a plasticidade de neurônios e circuitos cerebrais (Nilsson et al., 1999).

1.4. Neurogênese

Primeiramente se pensava que, diferentemente das células da maioria dos tecidos, que eram renovadas ao longo da vida, a maioria dos neurônios do cérebro de mamíferos eram gerados totalmente durante o início do desenvolvimento e não eram substituídos em caso de perda (Rakic, 1985). Somente em 1990, com o advento dos marcadores moleculares, como a bromodesoxiuridina (BrdU), começou-se a aceitar a existência de neurogênese em mamíferos adultos (Sadananda, 2004;

Colucci-d'Amato e di Porzio, 2008). E a partir de então, vários trabalhos têm demonstrado que, em determinadas áreas cerebrais como o hipocampo, bulbo olfatório e neocórtex, novos neurônios também são gerados durante a idade adulta (Gould e Tanapat, 1997; Gould et al., 1999; Gould e Gross, 2002; Rakic, 2002). Esses neurônios novos foram detectados no giro dentado de seres humanos, em autópsia do material de pacientes em idade avançada, expostos ao um análogo da timidina, 5-bromodesoxiuridina (Gould e Gross, 2002).

Nos últimos anos, estudos têm delineado a sequência de etapas da neurogênese adulta, que consiste na proliferação das células-tronco, especificação do destino dos progenitores neurais para a diferenciação, maturação, organização dos axônios e dendritos, formação de sinapses funcionais, e sobrevivência seletiva de neurônios novos (Duan et al., 2008; Ge et al., 2008). Essas células-tronco são tipos especiais de astrócitos que expressam GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) e apresentam certas propriedades de astroglia (Duan et al., 2008). As células-tronco possuem capacidade de auto-renovação, podendo se dividir assimetricamente, dando origem a novas células-tronco ou a células progenitoras. Essas células progenitoras, dependendo do seu fenótipo, podem se dividir simetricamente, dando origem a células que irão se diferenciar em neurônios e/ou células da glia (Leuner e Gould, 2010) (Figura 2).

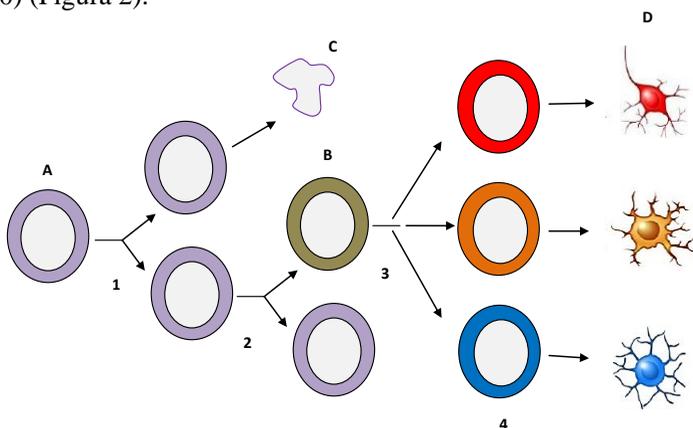


Figura 2. Divisão e diferenciação de uma célula-tronco. A – célula-tronco; B – célula progenitora; C – morte celular; D - célula diferenciada; 1 – divisão simétrica da célula-tronco; 2 - divisão assimétrica da célula-tronco; 3 – divisão do progenitor; 4 – diferenciação terminal.

Esses neurônios recém-formados precisam passar por um processo de maturação para então migrar para sua posição final no cérebro (Cayre et al., 2002; Lindsey e Tropepe, 2006). Nos mamíferos temos duas regiões que acolhem essas células proliferativas, a zona subventricular (SVZ) e a zona granular do hipocampo (SGR) (Malberg et al., 2000; García-Verdugo et al., 2002). As células formadas na SVZ migram através da via de migração rostral (rostral migratory stream ou RMS) até o bulbo olfatório onde são incorporadas (Ramirez-Amaya et al., 2006). Já as células geradas na região subgranular do hipocampo tem sua posição final na camada granular do giro denteado (Malberg et al., 2000; García-Verdugo et al., 2002).

Devido a essa renovação, o hipocampo é uma região do cérebro crucial para aquisição de novos episódios de memória e o giro denteado desempenha um papel na distinção da informação contextual (McHugh et al., 2007). Este requisito funcional exige que o giro denteado seja sensível as alterações do meio ambiente. Além disso, como parte do sistema límbico, outro papel bem definido do giro denteado é a modulação das emoções, como o estresse, a ansiedade e a depressão (Sahay e Hen, 2007).

A neuroplasticidade refere-se às mudanças que ocorrem na organização anatômica e funcional do cérebro como resultado da experiência (Spolidoro et al., 2009). O enriquecimento ambiental é uma situação experimental que estimula a neuroplasticidade por proporcionar aumento da atividade física, das experiências de aprendizagem, estímulos visuais e somatossensoriais e da interação social entre os animais em seu alojamento (Van Praag et al., 2000; Mohammed et al., 2002). O ambiente enriquecido promove plasticidade e proteção neuronal através do aumento dos níveis de neurotrofinas (Ickes et al., 2000; Rossi et al., 2006), alterações na proliferação celular (Steiner et al., 2004), indução de cascatas de sinalização (Li et al., 2006), e aumento das ramificações dendríticas e sinaptogênese (Rampon et al., 2000; Mattson e Magnus, 2006). O enriquecimento também induz remodelamento da cromatina e acetilação de histonas que regulam a susceptibilidade do DNA para a transcrição e, portanto, controlam a formação de proteínas (Fischer et al., 2007). Em última análise, estas mudanças conduzem a alterações na morfologia e na fisiologia cerebral (Rampon et al., 2000).

Camundongos criados em AE com estímulos inanimados ou interação social, ou que executaram atividade de caminhada, produzem mais neurônios novos no hipocampo quando comparados com animais criados em condições padrão. Eles também apresentam melhor

desempenho nas tarefas de aprendizagem envolvendo o hipocampo (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999; Van Praag et al., 1999). Em virtude do efeito positivo do enriquecimento ambiental sobre a neurogênese hipocampal, é bastante provável que ambientes pobres de estímulos atuem de maneira oposta, exercendo efeitos negativos sobre neurogênese.

Entretanto, as etapas da neurogênese não ocorrem da mesma forma para todas as linhagens, a proliferação, diferenciação e sobrevivência de neurônios novos dependem do *background* genético do camundongo (Kempermann et al., 1997). Como existem vários tipos celulares nas regiões proliferativas no cérebro de vertebrados adultos, fica difícil a detecção de neurônios recém-formados. Essa detecção é feita então a partir da determinação das propriedades de células imaturas e a exclusão de características de neurônios maduros ou de células gliais, utilizando-se, para isso, diversos marcadores moleculares (Komitova et al., 2005; Von Bohlen e Halbach, 2007). Esses marcadores são normalmente proteínas expressas por estas células neurais em diferentes fases de seus desenvolvimentos. A identificação dessas proteínas através de técnicas bioquímicas, moleculares ou de ensaios imunohistoquímicos, é uma ferramenta útil para a caracterização da célula e de seu respectivo estágio de desenvolvimento. Dentre estes marcadores podemos citar a nestina (marcador de células multipotentes), Sox-2 (marcador de células progenitoras), Ki67 (marcador de proliferação celular), GFAP (marcador de astrócitos), NeuN (*Neuronal Nuclei* - marcador de neurônios maduros) e doublecortina (marcador de neurônios imaturos) (Duan et al., 2008).

1.4.1. Marcadores

A doublecortina (DCX) é uma fosfoproteína associada aos microtúbulos (MAP), produto do gene *DCLK* (*doublecortin-like kinase*) que controla os processos de polimerização e estabilização do citoesqueleto (Burgess e Reiner, 2000). É expressa em células pós-mitóticas em diferenciação, desempenhando um papel chave no posicionamento final dos neurônios novos (Francis et al., 1999; Boseret et al., 2007; Cai et al., 2009). Essa fosfoproteína contém dois domínios que medeiam diretamente a ligação aos microtúbulos. O domínio N-terminal se liga aos polímeros dos microtúbulos, enquanto o C-terminal se liga aos microtúbulos e aos dímeros de tubulina (Kim et al., 2003). No giro dentado do hipocampo de ratos e camundongos adultos, a expressão de DCX é específica para neurônios recém-formados, porque

praticamente todas as células DCX-positivas expressam antígenos neuronais precoces (Rao e Shetty, 2004).

A DCX é amplamente conservada em vertebrados e sua expressão defeituosa acarreta problemas como migração neuronal defeituosa, epilepsia, dislexia e retardo mental (Reiner et al., 2006). Mutações nos genes LIS-1 e nos genes responsáveis pela expressão da DCX causam a lisencefalia-Tipo I, doença caracterizada pela diminuição ou ausência dos giros e sulcos da superfície cerebral e que acarreta atrasos psicomotores e retardo mental (Sapir et al., 2000; Friocourt et al., 2003). O nome **doublecortina** se originou de uma mutação no gene da DCX, em que pacientes do sexo feminino apresentavam uma neuropatologia incomum chamada heterotopia da região subventricular ou síndrome **doublecortex**, na qual uma região da massa cinzenta ficava subjacente a uma região do córtex de aparência normal (Gleeson et al., 1998; des Portes et al., 1998).

A DCX é bastante expressa no encéfalo do embrião, mas sofre uma redução nos primeiros dias após o nascimento e essa redução persiste no encéfalo até a idade adulta. Mesmo com uma expressão reduzida, a DCX promove a migração de novas células e o crescimento de neuritos em neurônios maduros (Friocourt et al., 2003; Reiner et al., 2006). Sua expressão ocorre em zonas proliferativas da SVZ e SGR e, em roedores, está presente em áreas envolvidas com a neurogênese, como regiões proliferativas e na via de migração rostral (Nacher et al., 2001; Couillard-Despres et al., 2005; Cai et al., 2009).

Justificativa

As informações sobre alojamento, neurogênese e comportamento são dispersas e muitas vezes contraditórias, além de escassas no caso da linhagem de camundongos *Swiss*. Assim, no presente estudo, comparamos os efeitos de um período prolongado (8 semanas) de alojamento em situação de enriquecimento e de em empobrecimento (isolamento) com aquelas condições que são usuais nos biotérios e laboratórios em geral (alojamento padrão). Esta comparação não foi, até o momento, realizada sistematicamente nos estudos que verificam a influência do enriquecimento e do empobrecimento ambiental no comportamento, ou na neurogênese hipocampal. Além disso, comparamos os efeitos de um período de habituação normal em laboratórios (uma semana), em diferentes condições de alojamento, com o efeito de drogas padrão em vários testes comportamentais. A partir desses dados pretendíamos verificar o quanto a escolha do tipo de alojamento antes dos testes pode influenciar nos resultados dos

experimentos comportamentais. Todos esses dados foram coletados em camundongos *Swiss*, pois apesar de ser a espécie e a linhagem mais utilizada nas pesquisas no Brasil e no mundo, ainda não havia dados na literatura relacionando as condições de alojamento com efeitos comportamentais, no efeito de drogas padrão, e na neurogênese desta linhagem, conforme já apresentado no Quadro 1.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral foi avaliar se as diferentes condições de alojamento, em camundongos *Swiss*, teriam influência em testes comportamentais usualmente usados na varredura de vários fármacos, naturais ou sintéticos. Assim como verificar se o efeito de drogas padrão seria influenciado pelas diferentes condições de alojamento, visando investigar se o enriquecimento do ambiente em que os animais são mantidos poderia ser benéfico na avaliação comportamental dos mesmos. Também foi verificado se a neurogênese hipocampal poderia estar envolvida nos mecanismos das possíveis mudanças comportamentais encontradas.

2.2. Objetivos específicos

Parte I

- Verificar a influência das condições de alojamento no comportamento de camundongos *Swiss* avaliados:
 - no labirinto em cruz elevado;
 - no campo aberto;
 - no teste de suspensão pela cauda;
- Comparar a influência das condições de alojamento na neurogênese hipocampal de camundongos *Swiss*.

Parte II

- Identificar possíveis alterações na resposta comportamental, após ambientação em diferentes condições de alojamento, de camundongos *Swiss*:
 - tratados com diazepam e avaliados no labirinto em cruz elevado;
 - tratados com imipramina e avaliados no teste de nado;
 - tratados com escopolamina e avaliados no teste de esquiva;
 - tratados com diazepam e avaliados no teste das convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

3. Material e Métodos – PARTE I

3.1. Animais

Camundongos *Swiss* (Ordem Rodentia; Família Muridae; Espécie *Mus musculus*; Linhagem *Swiss*) machos ao desmame (peso médio de 10 g, 21 dias de idade), foram mantidos sob iluminação (luzes acesas às 07:00 h, ciclo claro-escuro de 12 h) e temperatura controladas ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), com livre acesso à comida e água. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e o seu uso foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC - 23080.057217/2008-18/UFSC).

3.2. Condições de alojamento

Os animais foram mantidos em condições de alojamento padrão, enriquecido ou isolamento social por 8 semanas desde o desmame (21 dias) com livre acesso à água e à comida, exceto durante a execução dos experimentos comportamentais. O ambiente padrão (P8) consistiu em manter 10 animais alojados em caixas plásticas ($42 \times 34 \times 17$ cm) forradas com maravalha, durante um período de 8 semanas. No grupo enriquecido (AE8), 10 animais foram alojados, durante 8 semanas, em caixas plásticas ($42 \times 34 \times 17$ cm), as quais foram adicionados, além das condições-padrão: um fundo de garrafa PET (*shelter*), um tubo de PVC (10 cm), um tubo de papel (10 cm, 1 por caixa) e toalhas de papel amassado (2 folhas de 20 cm x 22 cm). Dez animais do grupo de isolamento social (IS8) foram alojados, durante 8 semanas, em pequenas caixas plásticas ($30 \times 22 \times 15$ cm) sem nenhum material adicional, além da maravalha das condições padrão. Adicionalmente, foram usados dois outros grupos onde a condição de alojamento enriquecida era trocada pela empobrecida (isolada socialmente), e vice-versa. Assim, camundongos enriquecidos-isolados (AE6IS2) foram primeiramente alojados durante 6 semanas em ambiente enriquecido e 2 semanas em isolamento social. Os animais isolados-enriquecidos (IS6AE2) foram alojados durante 6 semanas em isolamento social e 2 semanas em ambiente enriquecido. As caixas de todos os animais foram limpas três vezes por semana. Os grupos experimentais foram constituídos de animais escolhidos aleatoriamente nas ninhadas para evitar resultados tendenciosos. Os animais alojados em diferentes condições de alojamento foram testados no labirinto em cruz elevado, campo aberto e

no teste de suspensão pela cauda, sucessivamente, ao final do período de alojamento diferencial (Figura 3).

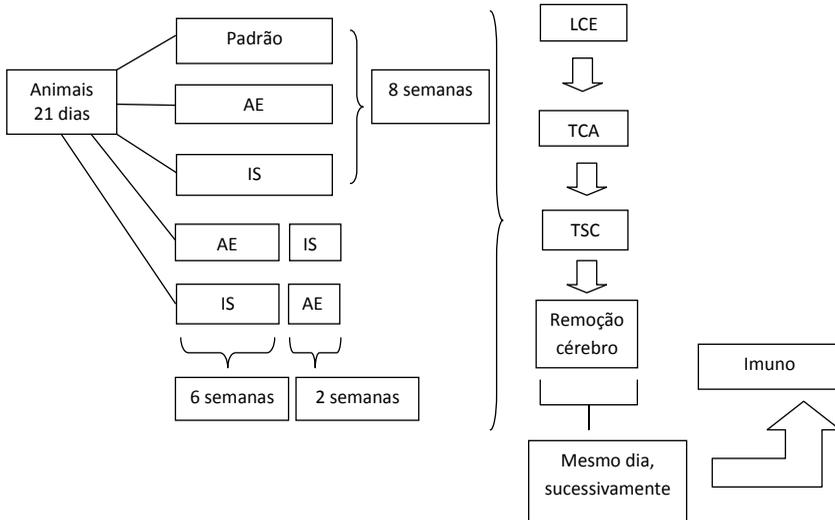


Figura 3 – Protocolo experimental usado na primeira parte dos experimentos. Animais com 21 dias, ao desmame, foram alojados por 8 semanas em ambiente padrão, enriquecido (AE) ou isolamento (IS) e a combinação do enriquecimento (6 semanas) com isolamento (2 semanas) e vice-versa. Após oito semanas, os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), teste do campo aberto (TCA) e teste da suspensão pela cauda (TSC) sucessivamente. No mesmo dia, os cérebros foram removidos para os experimentos de imunohistoquímica.

3.3. Testes comportamentais

3.3.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo que foi proposto inicialmente para ratos, por Pellow e colaboradores (1985) e posteriormente adaptado para camundongos (Lister, 1987) e é baseado na aversão natural de roedores por espaços abertos. Esse equipamento é feito de acrílico e consiste de dois braços abertos opostos (30×5 cm) e dois fechados (30×5×15 cm), também opostos, em forma de cruz grega. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5×5 cm). As paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. O LCE

está localizado numa sala com luz vermelha (15 W) e, após cada teste foi limpo com solução de etanol a 10 %.

Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 min (Pellow et al., 1985). As medidas comportamentais clássicas registradas no LCE foram: exploração dos braços abertos (entradas e o tempo gasto). A entrada foi registrada quando o animal entrava com as quatro patas em um dos braços abertos. A frequência total de entradas foi obtida pela soma simples das entradas nos braços abertos e nos fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos a percentagem de entradas no braço aberto foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a percentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos e fechados.

Também foram registrados parâmetros etológicos no LCE, medidas que aumentam a sensibilidade do teste, tais como o número de estiramentos corporais protegidos (quando o animal estica o corpo e retorna a posição original sem sair do lugar, no braço fechado) e o número de “imersões de cabeça” no braço aberto (quando o animal coloca a cabeça para fora do aparelho, em direção ao chão), como medidas do comportamento de “avaliação de risco”, bem como o número de comportamentos de levantar (comportamento exploratório vertical) e de auto-limpeza (Rodgers e Cole, 1993). Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos revela um efeito tipo ansiolítico (Pellow et al., 1985; Pellow e File, 1986).

3.3.2. Teste do campo aberto (TCA)

Com a finalidade de excluir a possibilidade de um eventual efeito comportamental ser devido a uma alteração motora, os camundongos foram submetidos a uma sessão no teste do campo aberto.

O teste foi realizado em uma arena feita de acrílico transparente (30 X 30 X 15 cm), sob iluminação vermelha (15 W). O piso, confeccionado de acrílico preto, é dividido em nove quadrados iguais (10 cm² área). Cada animal foi colocado no centro do aparelho e a ambulação foi registrada por 5 min. O número de quadrados cruzados com todas as patas por sessão e o número de levantamentos na arena foram os parâmetros usados para avaliar a atividade locomotora

(exploração horizontal e vertical, respectivamente). O aparato foi limpo com solução de etanol 10% entre as sessões.

3.3.3. Teste da suspensão pela cauda (TSC)

O teste foi conduzido de acordo com a metodologia modificada daquela proposta por Stéru e colaboradores (1985) e é uma ferramenta comumente utilizada na prática de laboratório para identificar novos compostos com atividade tipo antidepressiva (Bourin et al., 2005). Os camundongos foram suspensos aproximadamente 60 cm do piso por uma fita adesiva colocada a 1 cm da ponta da cauda. O tempo de imobilidade (s) foi considerado a quantidade total de tempo que cada animal permaneceu imóvel durante a sessão de 5 min. O teste é baseado no fato de que os animais sujeitos a um curto período de estresse inescapável, como a suspensão pela cauda, ficarão imóveis, uma vez que não podem sair da situação estressante. Várias medicações antidepressivas revertem a imobilidade e promovem a ocorrência de comportamentos de fuga (para revisão, ver Cryan e Holmes, 2005).

3.4. Imunohistoquímica

Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram anestesiados e sacrificados por perfusão transcardíaca (solução salina - NaCl 0,9%, seguida de solução de paraformaldeído 4%). Os cérebros foram removidos e fixados 24 h e foram mantidos em sacarose 20% até o momento do congelamento. Os cérebros foram congelados em gelo seco, incluídos em *Tissue Tek*[®] e, em seguida, cortados em criostato Leica CM 1850[®] (secções coronais de 50µm) e processados para a imunohistoquímica pelo método *free-floating*. As lavagens foram feitas com PBS 0,01 M à temperatura ambiente. As secções foram bloqueadas com BSA 1% (30 min) e incubadas com anticorpo primário anti-doublecortina (1:5000 µL, feito em coelho, DCX; Abcam, ab18723, 2 h, 37 °C). A atividade da peroxidase no tecido foi bloqueada através da incubação em metanol (10 min) As secções foram processadas pelo método da imunoperoxidase avidina-biotina (Vectastain ABC Kit[®]; Vector Lab, Burlingame, CA, USA) e reveladas pela adição do cromógeno diaminobenzidina (Sigma Co., St Louis, USA). Os controles negativo, que seguem todo o procedimento, exceto a adição do anticorpo secundário, também foram realizados. Os cortes foram então lavados com água destilada, montados sob lâmina, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínula para observação em microscópio. A marcação foi visualizada como um produto de reação cinza/azul no soma e protrusões das células da camada subgranular do giro denteado (GD) do

hipocampo. Para esses experimentos de imunohistoquímica foram utilizados de três a quatro cérebros de animais alojados em cada tipo de alojamento. Seis a 10 seções com 250 micrômetros de distância, foram fotografadas e as células marcadas de cada GD foram contadas com o auxílio do *software Image J*[®]. A contagem foi feita a partir das médias dos resultados das contagens bilaterais, porque em alguns animais a contagem foi realizada em apenas um lado do hipocampo. Para distinguir uma única célula, todas as contagens foram realizadas em uma ampliação de 400 x (objetiva de 40 x).

3.5. Análise estatística

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, quando apropriado. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram feitas através do programa Statistica versão 6.0. Todos os gráficos foram feitos utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 4.0[®].

4. Resultados – PARTE I

4.1. Influência das condições de alojamento (8 semanas) no comportamento avaliado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

As condições de alojamento modificaram significativamente o número de estiramentos corporais dos animais avaliados no LCE ($F_{(4,41)} = 6,77$; $p < 0,05$). Os animais AE8, IS8 e AE6IS2 apresentaram um número de estiramentos corporais significativamente menor que os animais alojados em condições padrão (Figura 4C). O comportamento de imersões de cabeça foi raramente observado nas diferentes condições de alojamento e foi ausente nos animais IS8. Os outros parâmetros comportamentais avaliados no LCE não foram alterados pelas condições de alojamento (Figuras 4E, 4F, 4G e 4H).

4.2. Influência das condições de alojamento (8 semanas) no comportamento avaliado no teste do campo aberto (TCA)

Os animais alojados em diferentes condições de alojamento (P8; AE8; IS8, AE6IS2 e IS6AE2) foram testados no campo aberto imediatamente após o teste do labirinto em cruz elevado. Os animais AE8 apresentaram um número significativamente menor de cruzamentos da arena em relação ao grupo IS8 ($F_{(4,42)} = 3,39$; $p = 0,01$) (Figura 5A). Nenhuma das condições de alojamento alterou de modo significativo o número de cruzamentos em relação à condição padrão. Deve-se notar que, como observado no LCE, os diferentes tipos de alojamento não afetaram o número de levantamentos no campo aberto (Figura 5B).

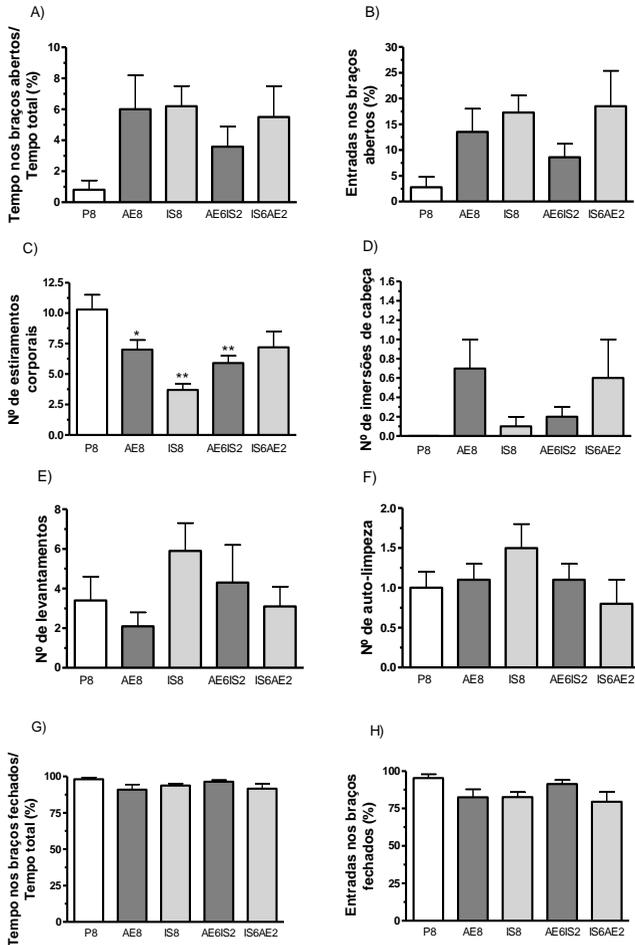


Figura 4. Influência dos diferentes tipos de alojamento (P8 - padrão; AE8 - ambiente enriquecido; IS8 - isolamento social - 8 semanas; AE6IS2 - ambiente enriquecido seis semanas, seguido de duas semanas de isolamento e IS6AE2 - isolamento social 6 semanas, seguido de duas semanas de ambiente enriquecido) sobre o comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado por 5 min. As seguintes medidas comportamentais foram avaliadas: (A) Tempo nos braços abertos/Tempo total (%) (B) Entradas nos braços abertos (%) (C) Nº de estiramentos corporais, (D) Nº de imersões de cabeça, (E) Nº de levantamentos, (F) Nº de auto-limpeza, (G) Tempo nos braços fechados/Tempo total (%), (H) Entradas nos braços fechados (%). Cada coluna representa a média + EPM. *P < 0,05 e **P < 0,01 quando comparado ao grupo alojado em condições padrão. N = 8-10 animais. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls).

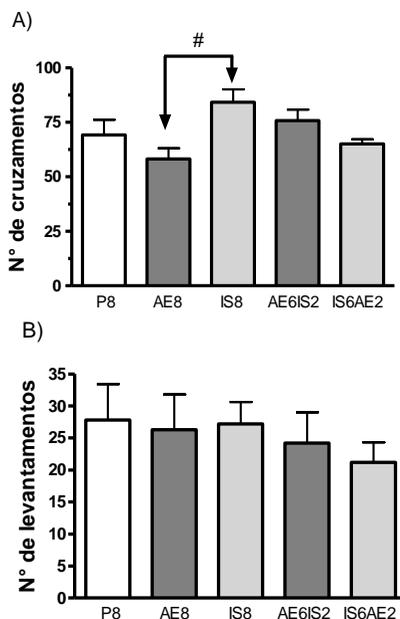


Figura 5. Influência dos diferentes tipos de alojamento (P8 - padrão; AE8 - ambiente enriquecido; IS8 - isolamento social - 8 semanas; AE6IS2 - ambiente enriquecido seis semanas, seguido de duas semanas de isolamento e IS6AE2 - isolamento social 6 semanas, seguido de duas semanas de ambiente enriquecido) na atividade locomotora de camundongos avaliados no campo aberto por 5 min. Os seguintes parâmetros comportamentais foram analisados: (A) N° de cruzamentos e (B) N° de levantamentos. Cada coluna representa a média + EPM. # $P < 0,05$, quando o grupo AE8 foi comparado ao IS8. $N = 8-10$ animais. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.3. Influência das condições de alojamento (8 semanas) no comportamento avaliado no teste de suspensão pela cauda (TSC)

Os animais alojados em diferentes condições de alojamento (P8; AE8; IS8, AE6IS2 e IS6AE2) foram testados no teste de suspensão pela cauda imediatamente após o teste do campo aberto. O tempo de imobilidade, o principal parâmetro usado para avaliar uma possível atividade antidepressiva, nos animais criados em diferentes condições de alojamento manteve-se inalterada ($F_{(4,42)} = 0,93$; $p > 0,05$) (Figura 6A). Quando comparado ao grupo P8, os animais AE6IS2 mostraram uma significativa redução da latência para a imobilidade ($F_{(4,40)} = 3,89$; $p < 0,05$) (dado não mostrado).

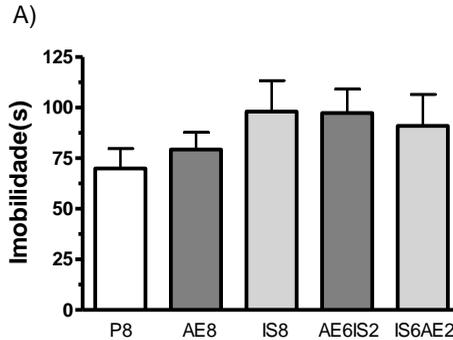


Figura 6. Influência dos diferentes tipos de alojamento (P8 - padrão; AE8 - ambiente enriquecido; IS8 - isolamento social - 8 semanas; AE6IS2 - ambiente enriquecido seis semanas, seguido de duas semanas de isolamento e IS6AE2 - isolamento social 6 semanas, seguido de duas semanas de ambiente enriquecido) no comportamento de camundongos avaliados no teste de suspensão pela cauda por 5 min. Os seguintes parâmetros comportamentais foram analisados: (A) Imobilidade (s). Cada coluna representa a média + EPM. N = 8-10 animais. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.4. Influência das condições de alojamento (8 semanas) na neurogênese hipocampal

Na Figura 7A são apresentadas fotomicrografias (400x) mostrando a distribuição das células doublecortina-positivas no giro dentado de camundongos Swiss alojados em diferentes condições (P8, AE8 e IS8). Os animais IS8, AE6IS2 e IS6AE2 apresentaram uma contagem do número de pericários imunorreativos para a DCX semelhante entre si, porém menor que os animais P8 e também menor que os animais AE8 ($F_{(4,14)} = 5,33$; $p < 0,05$) (Figura 7A e 7B).

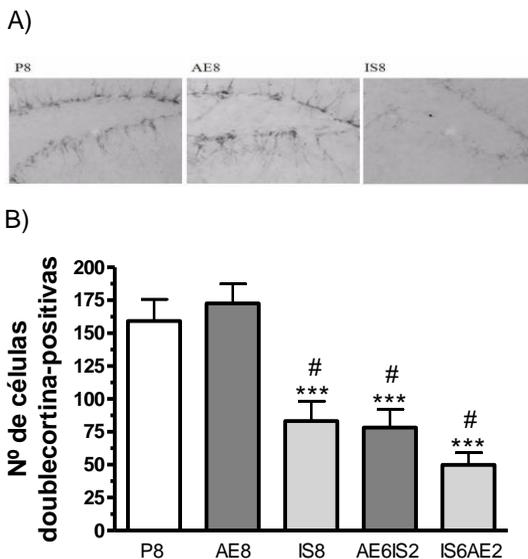


Figura 7. Influência dos diferentes tipos de alojamento (P8 - padrão; AE8 - ambiente enriquecido; IS8 - isolamento social - 8 semanas; AE6IS2 - ambiente enriquecido seis semanas, seguido de duas semanas de isolamento e IS6AE2 - isolamento social 6 semanas, seguido de duas semanas de ambiente enriquecido) na neurogênese hipocampal de camundongos. (A) Fotomicrografias representativas mostrando a distribuição de neurônios DCX-positivos no giro denteado de camundongos Swiss alojados em condições padrão (P8), enriquecimento (AE8) e isolamento (IS8). (B) Número total de pericários imunoreativos para doublecortina no giro denteado de camundongos. Cada coluna representa a média + EPM. *** $P < 0,001$ quando comparado ao padrão; # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo AE8. $N = 4$ animais. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls).

3. Material e Métodos – PARTE II

3.6. Animais

Camundongos Swiss machos adultos (peso médio de 35 g, 3 meses de idade), os quais foram mantidos sob iluminação (luzes acesas às 07:00h, ciclo claro-escuro de 12 h) e temperatura controladas ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), com livre acesso à comida e água. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e o seu uso foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (processo número CEUA 23080.027315/2010-37/UFSC).

3.7. Drogas e reagentes

Foram utilizados: solução salina (NaCl 0,9%, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), diazepam (DZP - Dienpax®, Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP, Brasil), imipramina (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), escopolamina (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), pentileno-tetrazol (PTZ, tetra-hidro-5H-tetrazolo - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) em doses eficazes, previamente testadas em nosso laboratório. Os grupos controles receberam solução salina (NaCl 0,9%). O diazepam (DZP), um agonista dos receptores benzodiazepínicos (GABAA; Hall et al., 2011), foi diluído em solução de propilenoglicol (10% em salina - CAQ Ltda, SP, Brasil). A imipramina, um tricíclico, inibidor da recaptação de monoaminas (Haenisch e Bönisch, 2011), a escopolamina, um antagonista colinérgico muscarínico (Blake et al., 2011), e o pentileno-tetrazol, um antagonista GABA (Rattka et al., 2011), foram dissolvidos em salina. Todas as drogas foram administradas nos camundongos pela via intraperitoneal (i.p.) num volume de 0,1ml para cada 10g de peso corporal, 30 min antes dos testes comportamentais. No caso das convulsões induzidas por PTZ, foi feito um pré-tratamento com salina ou DZP e, 30 min após o pré-tratamento, os animais foram tratados com PTZ e imediatamente submetidos ao teste.

3.8. Delineamento experimental para os testes comportamentais

Para verificar a influência das condições de alojamento durante a habituação comumente realizada nos laboratórios antes dos testes comportamentais (uma semana), os animais foram alojados, durante uma semana, em diferentes condições de alojamento (padrão, ambiente

enriquecido e isolamento social). Para cada teste comportamental (LCE, teste do nado forçado - TNF, esQUIVA passiva (*step down*) e convulsões induzidas por PTZ), 60 animais foram utilizados. O teste do nado forçado foi utilizado pois há mais dados na literatura usando este teste, o que nos permitiria relacionar com nossos resultados e verificar um possível efeito não detectado pelo teste da suspensão pela cauda. O teste da esQUIVA passiva (*step down*) foi utilizado para verificar se ocorrem alterações na memória em camundongos *Swiss*, nas condições de alojamento testadas, como relatadas em outros trabalhos que utilizam diferentes linhagens. O teste das convulsões induzidas por PTZ foi utilizado para se descartar a possibilidade de que o efeito verificado no LCE fosse devido a convulsões de baixa intensidade eletrográficas e não comportamentais.

Os animais submetidos aos diferentes testes foram alojados da seguinte maneira, uma semana antes dos testes comportamentais: os primeiros dois grupos de animais foram mantidos em caixas plásticas (42 × 34 × 17 cm) com 10 indivíduos cada, sob condições padrão (apenas forradas com maravalha), água e ração *ad libitum*; dois outros grupos foram mantidos em caixas plásticas (42 × 34 × 17 cm) com 10 indivíduos cada, em ambiente enriquecido. Nas caixas de ambiente enriquecido, além das condições padrão, foram adicionados um fundo de garrafa PET (*shelter*), um tubo de PVC (10 cm), um tubo de papel (10 cm, 1 por caixa) e toalhas de papel amassado (2 folhas de 20cm x 22 cm). Além dessas condições de alojamento, 20 animais foram mantidos em condição de empobrecimento, que consiste no isolamento social (um animal por caixa - 30 × 22 × 15 cm), em caixa com maravalha, água e ração à vontade.

Todos os grupos foram mantidos nas condições acima por uma semana. Os grupos experimentais foram constituídos de animais escolhidos aleatoriamente para evitar resultados tendenciosos. A metade dos animais de cada tipo de alojamento (padrão, ambiente enriquecido e isolamento) foi tratada com solução salina (0,9 %, i.p) e a outra metade foi tratada com a droga padrão comumente utilizada no respectivo teste (Figura 8). Os animais alojados em diferentes condições de alojamento foram testados no LCE, TNF, esQUIVA passiva (*step down*) e convulsões induzidas por PTZ.

Conforme explicado acima, os grupos experimentais ficaram organizados e tratados da seguinte forma:

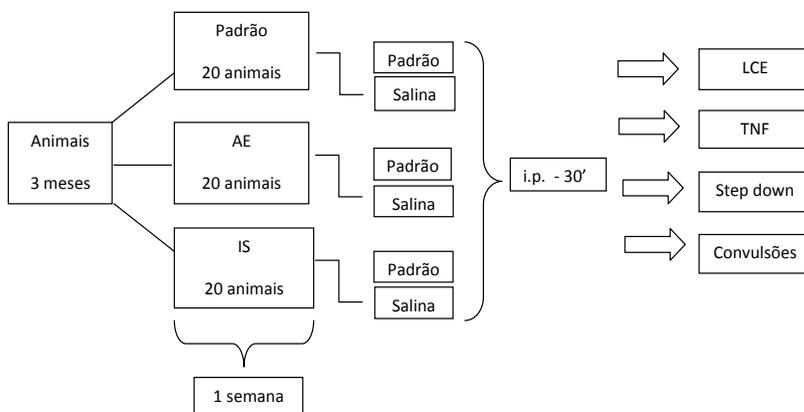


Figura 8 – Protocolo experimental usado na segunda parte dos experimentos. Animais com três meses de idade foram alojados nas diferentes condições de alojamento (padrão, AE – ambiente enriquecido ou IS – isolamento), em grupos de vinte animais, durante uma semana. No sétimo dia foram tratados com salina ou a droga padrão do teste utilizado. Após 30 min, os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE) ou ao teste do nado forçado (TNF) ou a esquiwa passiva inibitória tipo *step down* os ao teste das convulsões por pentilenotetrazol.

3.9. Testes comportamentais

3.9.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O protocolo do teste foi descrito anteriormente. Para esse experimento, metade dos animais alojados nas diferentes condições (padrão, ambiente enriquecido e isolamento) foram tratados com solução salina (0,9%, i.p) e a outra metade foi tratada com diazepam (1 mg/kg, i.p.), como controle positivo. Após 30 min os animais foram submetidos ao teste (Figuras 9 e 13).

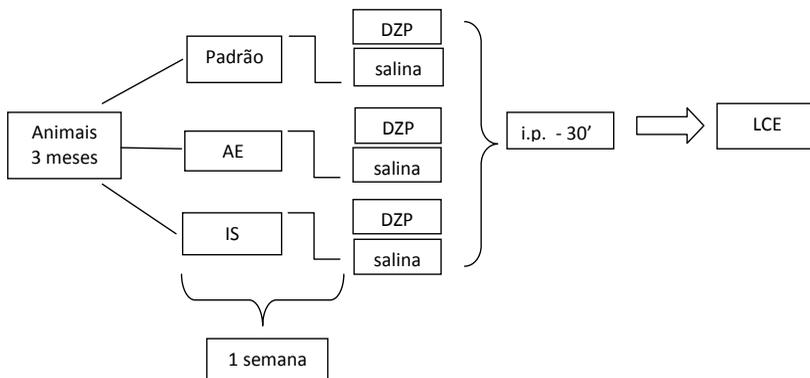


Figura 9 – Protocolo experimental usado no LCE na segunda parte dos experimentos. Animais com três meses de idade foram alojados nas diferentes condições de alojamento (padrão, AE – ambiente enriquecido ou IS – isolamento), em grupos de vinte animais, durante uma semana. No sétimo dia foram tratados com salina ou diazepam (i.p.). Após 30 min, os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE).

3.9.2. Teste do nado forçado (TNF)

O teste do nado forçado foi desenvolvido por Porsolt e colaboradores (1977), para auxiliar na pesquisa de drogas antidepressivas. O objetivo foi criar um modelo animal que reproduzisse um comportamento semelhante à depressão e que fosse sensível a drogas utilizadas clinicamente no tratamento desta patologia. O modelo foi baseado na observação de que ratos e camundongos quando forçados a nadar numa situação em que não poderiam escapar, após um curto período de agitação, adotam uma postura de imobilidade, flutuando ou fazendo apenas movimentos necessários para manter a sua cabeça acima da água. Os camundongos foram forçados a nadar individualmente, em um cilindro plástico aberto de 10 cm de diâmetro e 25 cm de altura, contendo 19 cm de água a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O tempo total de imobilidade, durante 5 min, foi medido conforme utilizado por Eckeli e col. (2000). Para esse experimento, metade dos animais alojados nas diferentes condições (padrão, ambiente enriquecido e isolamento) foram tratados com solução salina (0,9%, i.p) e a outra metade foi tratada com imipramina (15 mg/kg, i.p.), como controle positivo. Após 30 min os animais foram submetidos ao teste (Figuras 10 e 14).

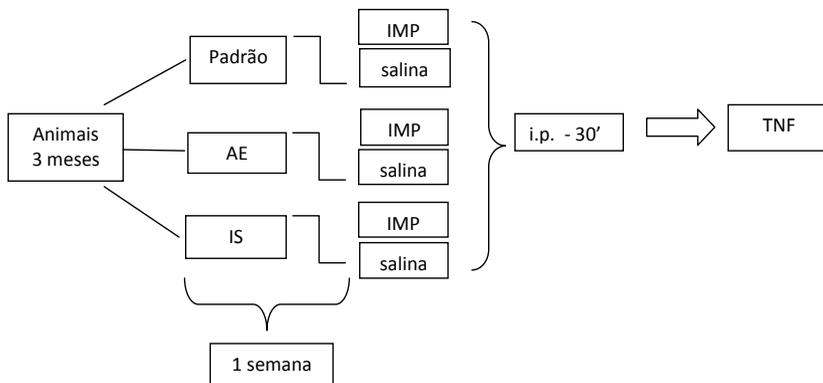


Figura 10 – Protocolo experimental usado no TNF na segunda parte dos experimentos. Animais com três meses de idade foram alojados nas diferentes condições de alojamento (padrão, AE – ambiente enriquecido ou IS – isolamento), em grupos de vinte animais, durante uma semana. No sétimo dia foram tratados com salina ou imipramina (i.p.). Após 30 min, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF).

3.9.3. Esquiva passiva inibitória (*Step-down*)

O comportamento de esquiva passiva (ou esquiva inibitória) é utilizado para avaliar a memória de trabalho (MT), de curta (MC) e longa duração (ML) (Barros et al., 2005). O aparelho consiste de uma caixa (30 x 20 x 20 cm) composta por três paredes de aço e uma de acrílico, no piso do aparelho temos uma plataforma (8,0 x 1,5 x 20 cm) na sua extremidade direita e uma base quadrada (grade metálica de 22 x 20 cm) do lado esquerdo. Essa grade contém uma série de barras de aço inoxidável (1 mm de diâmetro) separadas em 1 cm entre si e conectadas a um gerador de choque e a um *scrambler* (Insight Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

O comportamento dos animais foi avaliado em uma sessão treino e uma sessão teste. Para esse experimento, metade dos animais alojados nas diferentes condições (padrão, ambiente enriquecido e isolamento) foram tratados com solução salina (0,9%, i.p) e a outra metade foi tratada com escopolamina (1 mg/kg, i.p.), como controle positivo. Após 30 min os animais foram submetidos à sessão treino.

- Sessão treino: Durante essa sessão, cada camundongo foi colocado na plataforma registrando-se o período de latência para o animal colocar as quatro patas na grade metálica, quando então, um

choque (0,4 mA, 2 s) foi aplicado. Em seguida, o animal era removido para uma nova caixa, fora da sala de experimento.

- Sessão teste (retenção de memória): Cada animal foi colocado novamente na plataforma e a latência (s) para a descida foi registrada, porém, sem aplicação de choque. Utilizou-se um teto de 180 s. Para a avaliação das memórias de trabalho (MT), curta (MC) e de longa duração (ML), os animais foram submetidos à sessão teste aos 5 s (MT), 90 minutos (MC) e 24 h após a sessão treino (ML) (Figuras 11 e 15).

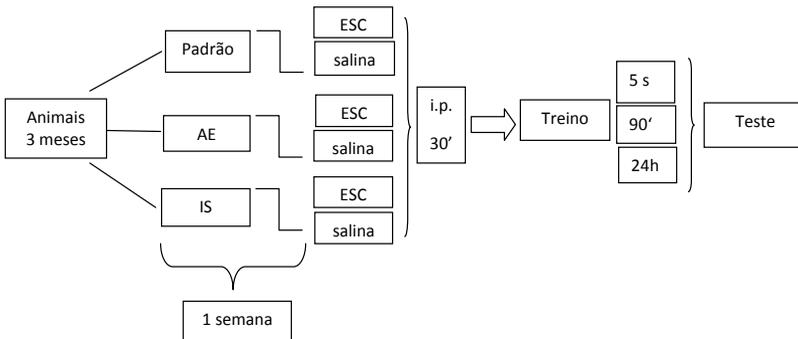


Figura 11 – Protocolo experimental usado no *step down* na segunda parte dos experimentos. Animais com três meses de idade foram alojados nas diferentes condições de alojamento (padrão, AE – ambiente enriquecido ou IS – isolamento), em grupos de vinte animais, durante uma semana. No sétimo dia foram tratados com salina ou escopolamina (i.p.). Após 30 min, os animais foram submetidos à sessão treino no teste da esquiwa passiva inibitória e testados após 5 s, 90 minutos e 24 horas da sessão treino.

3.9.4. Convulsões induzidas por PTZ

Para esse experimento, metade dos animais alojados nas diferentes condições (padrão, ambiente enriquecido e isolamento) foram tratados com solução salina (0,9%, i.p.) e a outra metade foi tratada com diazepam (1 mg/kg, i.p.) como controle positivo. Trinta minutos após esses pré-tratamentos, os animais foram tratados com PTZ (80 mg/kg, i.p.) e colocados em caixas plásticas (42 × 34 × 17 cm) para a observação (Figuras 12 e 16). O tempo para a manifestação da primeira convulsão (latência), assim como a duração e a severidade das convulsões foram observadas e registradas até 30 min após a injeção de PTZ. A severidade das convulsões foi avaliada pela escala de reatividade convulsiva proposta por Czuczwar e Frey (1986): (0) =

nenhum comportamento convulsivo, (1) abalos mioclônicos (*myoclonic jerks*), (2) crises clônicas sem perda do reflexo de endireitamento, (3) crises clônicas com perda do reflexo postural, (4) extensão tônica das patas posteriores e (5) extensão tônica com morte. O índice de severidade foi obtido pelo somatório total dos graus obtidos pela escala de reatividade.

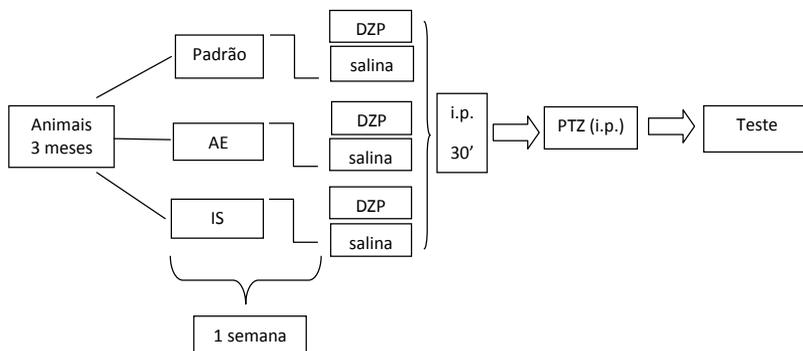


Figura 12 – Protocolo experimental usado nas convulsões induzidas por PTZ na segunda parte dos experimentos. Animais com três meses de idade foram alojados nas diferentes condições de alojamento (padrão, AE – ambiente enriquecido ou IS – isolamento), em grupos de vinte animais, durante uma semana. No sétimo dia foram tratados com salina ou diazepam (i.p.). Após 30 min, os animais foram tratados com pentilenotetrazol (PTZ) e imediatamente submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ.

3.10. Análise estatística

Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de pós hoc de Newman-Keuls, quando apropriado; exceto os dados da Esquiva passiva e no parâmetro severidade das convulsões, os quais foram analisados por Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn's. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram feitas através do programa *Statistica* versão 6.0[®]. Todos os gráficos foram feitos utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 4.0[®].

4. Resultados – PARTE II

4.5. Efeito das condições de alojamento (por uma semana) no comportamento avaliado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) – tratamento com diazepam

A Figura 13 mostra o efeito das condições de alojamento no comportamento e no efeito do diazepam (1 mg/kg, i.p.) no LCE. O isolamento diminuiu a % de tempo nos braços abertos em relação ao padrão e ao enriquecimento ($F_{(5,29)} = 55,9$; $p < 0,05$) (Figura 13A). Também reduziu o número de entradas nos braços abertos em relação ao enriquecimento (Figura 13B). O número de estiramentos corporais aumentou em relação ao padrão e ao enriquecimento ($F_{(5,32)} = 43,65$; $p < 0,05$) (Figura 13C).

O enriquecimento aumentou apenas o número de entradas nos braços abertos em relação ao padrão ($F_{(5,26)} = 30$; $p < 0,05$) (Figura 13B). Nenhuma das condições de alojamento teve influência sobre os comportamentos de imersão de cabeça (Figura 13D), levantar (Figura 13E), ou auto-limpeza (Figura 13F).

Em relação ao efeito do diazepam, tanto o enriquecimento quanto o isolamento aumentaram a exploração nos braços abertos (tempo e entradas – Figura 13 A e 13 B) em relação ao alojamento padrão. O enriquecimento também aumentou o número de imersões de cabeça em relação ao padrão ($F_{(5,38)} = 62,3$; $p < 0,05$) (Figura 13 D). Nos demais parâmetros avaliados as condições de alojamento não influenciaram o efeito do diazepam.

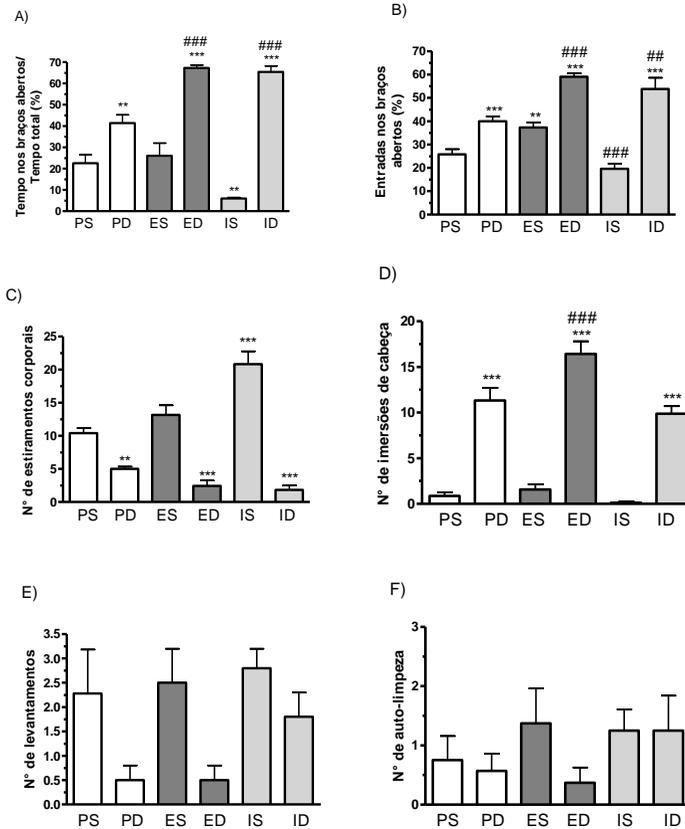


Figura 13. Influência dos diferentes tipos de alojamento (padrão, enriquecido ou isolamento) no comportamento de camundongos tratados com salina (0,9%, i.p.) ou diazepam (1 mg/kg, i.p.) (PS - ambiente padrão/salina; PD - ambiente padrão/diazepam; ES - ambiente enriquecido/salina; ED - ambiente enriquecido/diazepam; IS - isolamento/salina; ID - isolamento/ diazepam) e avaliados no labirinto em cruz elevado por 5 min. As seguintes medidas comportamentais foram avaliadas: (A) Tempo nos braços abertos/Tempo total (%) (B) Entradas nos braços abertos (%) (C) N° de estiramentos corporais, (D) N° de imersões de cabeça, (E) N° de levantamentos e (F) N° de auto-limpeza. Cada coluna representa a média + EPM. **P < 0,01 e ***P < 0,001 quando comparado ao grupo PS. ##P < 0,01 e ###P < 0,001 quando comparado ao grupo PD. N = 5-8 animais. (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.6. Efeito das condições de alojamento (por uma semana) no comportamento avaliado no teste do nado forçado (TNF) – tratamento com imipramina

A Figura 14 mostra o efeito das condições de alojamento no comportamento e no efeito da imipramina (15 mg/kg, i.p.) no TNF. As diferentes condições de alojamento não influenciaram o tempo de imobilidade nem o efeito da imipramina nos parâmetros analisados no TNF.

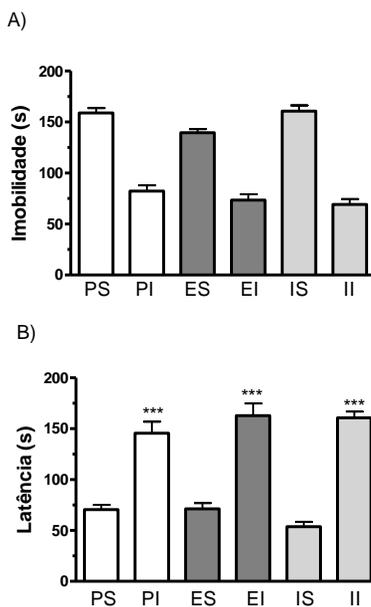


Figura 14. Influência dos diferentes tipos de alojamento (padrão, enriquecido ou isolamento) no comportamento de camundongos tratados com salina (0,9%, i.p.) ou imipramina (15 mg/kg, i.p.) (PS - ambiente padrão/salina; PI - ambiente padrão/imipramina; ES - ambiente enriquecido/salina; EI - enriquecido/imipramina; IS - isolamento/salina; II - isolamento/imipramina) e avaliados no teste do nado forçado por 6 min. Os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: (A) Imobilidade (s) e (B) Latência para imobilidade (s). Cada coluna representa a média + EPM. ***P<0,001 quando comparado ao grupo PS. N = 6-8 animais. (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.7. Efeito das condições de alojamento (por uma semana) no comportamento avaliado no teste da esquiwa passiva do tipo step-down – tratamento com escopolamina

A Figura 15 mostra o efeito das condições de alojamento no comportamento e no efeito da escopolamina (1 mg/kg, i.p.) no teste da esquiwa passiva tipo *step-down*. As diferentes condições de alojamento não influenciaram o comportamento nem o efeito da escopolamina no teste da esquiwa passiva. Cinco segundos e 90 min após a sessão treino, os animais isolados reduziram a latência para descer da plataforma em relação ao grupo enriquecido. O grupo enriquecido aumentou a latência para a descida da plataforma em relação ao isolado também 24 h após o treino em animais tratados com escopolamina.

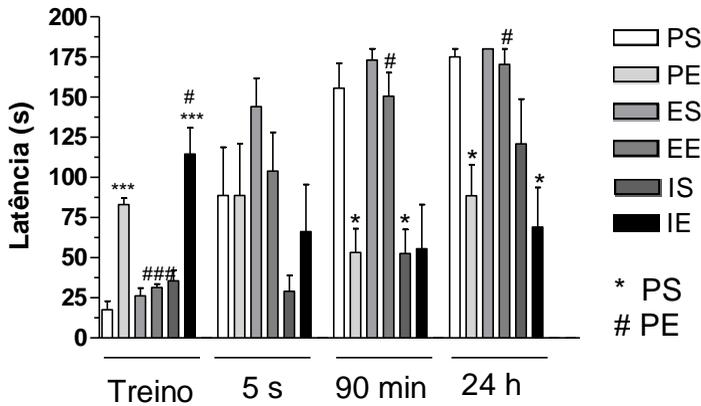


Figura 15. Influência dos diferentes tipos de alojamento (padrão, enriquecido ou isolamento) na latência para descida da plataforma em camundongos tratados com salina (0,9%, i.p.) ou escopolamina (1 mg/kg, i.p.) (PS - ambiente padrão/salina; PE - ambiente padrão/ escopolamina; ES - ambiente enriquecido/salina; EE - ambiente enriquecido/escopolamina; IS - isolamento/salina; IE - isolamento/ escopolamina) e avaliados na esquiwa passiva na sessão treino e 5s, 90 min e 24h após a sessão treino. Cada coluna representa a média + EPM. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo padrão/salina (PS). # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo PE. N = 6-8 animais. (Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn's).

4.8. Efeito das condições de alojamento (por uma semana) no comportamento avaliado nas convulsões induzidas por PTZ – tratamento com diazepam

A Figura 16 mostra o efeito das condições de alojamento sobre o comportamento e sobre o efeito do diazepam nas convulsões induzidas por PTZ. As diferentes condições de alojamento não influenciaram o comportamento dos animais nesse teste. Em relação ao tratamento com diazepam, tanto os animais de ambiente enriquecido, quanto de isolamento, mostraram uma redução da latência para a 1ª convulsão, um aumento na duração e não interferiram na severidade das convulsões.

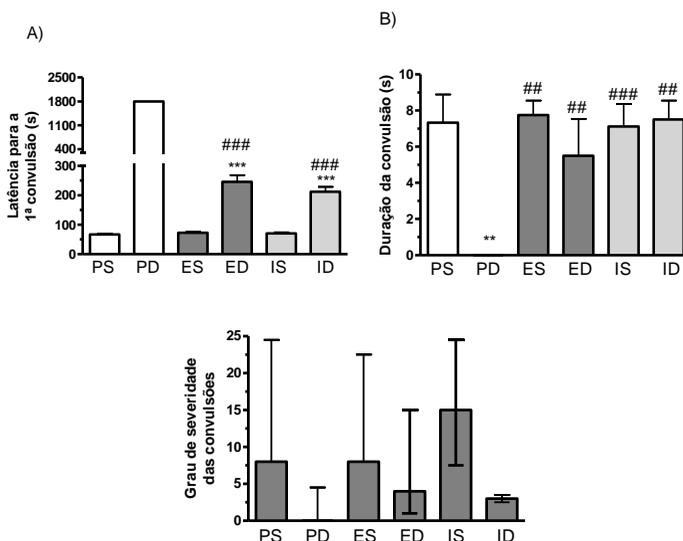


Figura 16. Influência dos diferentes tipos de alojamento (padrão, enriquecido ou isolamento) nas convulsões induzidas por PTZ em camundongos pré-tratados com salina (0,9%, i.p.) ou diazepam (1 mg/kg, i.p.) (PS - ambiente padrão/salina; PD - ambiente padrão/diazepam; ES - ambiente enriquecido/salina; ED - ambiente enriquecido/diazepam; IS - isolamento/salina; ID - isolamento/ diazepam), tratados com pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.) e avaliados por 30 min no teste. Os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: (A) Latência para a 1ª convulsão (s), (B) Duração da convulsão (s), (C) Grau de severidade das convulsões. Cada coluna representa a média + EPM. *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo PS. ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo PD. $N = 5-8$ animais. (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Newman-Keuls – A e B; Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn's - C).

5. Discussão

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os resultados do alojamento de oito semanas em diferentes condições de alojamento indicam que a exposição de camundongos *Swiss* ao isolamento social induz alterações em alguns parâmetros comportamentais e na neurogênese hipocampal do animal adulto que são mais acentuadas que aquelas produzidas pelo enriquecimento ambiental. Apesar de vários trabalhos mostrarem o efeito do ambiente enriquecido (AE) no comportamento e na neurogênese de várias linhagens de ratos e camundongos, nossos dados não encontraram essas alterações. Em nosso trabalho, o AE não induziu alterações no comportamento de camundongos da linhagem *Swiss* no campo aberto, suspensão pela cauda, e nem na neurogênese hipocampal. O AE apenas induziu alteração em um parâmetro analisado no labirinto em cruz elevado (estiramentos corporais), e as alterações comportamentais parecem não estar diretamente correlacionadas com a neurogênese hipocampal (Quadro 2).

8 semanas alojamento	LCE	AE8, IS8 e AE8IS2 ↑ nº estiramentos corporais
	TCA	AE8 ↑ nº cruzamentos / IS8
	TSC	SEM ALTERAÇÕES
	DCX	IS8, AE8IS2 e IS6AE2 ↓ DCX+ hipocampo
1 semana alojamento	LCE	AE (salina) = “tipo-ansiolítico” IS (salina) = “tipo-ansio gênico” IS e AE (diazepam) = “tipo-ansiolítico”
	TNF	SEM ALTERAÇÕES
	<i>Step down</i>	AE – impediu ↓ memória (escopolamina) IS ↓ memória similar a escopolamina
	Convulsões	AE e IS ↓ efeito protetor diazepam

Quadro 2. Resumo dos principais resultados da tese.

No teste do LCE, os animais AE8, IS8 e AE6IS2 apresentaram uma redução do número de estiramentos corporais, o que demonstra uma redução na avaliação de risco, ou seja, uma redução dos

comportamentos tipo-ansiofênicos, tanto para animais que foram mantidos em ambientes enriquecidos como empobrecidos, além do grupo enriquecido/empobrecido.

No campo aberto verificou-se um aumento no número de cruzamentos dos animais IS8 em relação aos animais AE8, o que sugere uma possível hiperlocomoção induzida pelo isolamento.

A avaliação da imunistoquímica revelou uma diminuição da imunorreatividade para DCX em todas as condições de isolamento, em relação ao alojamento padrão e enriquecido. Estes dados indicam redução da formação de novos neurônios no hipocampo dos camundongos adultos em isolamento social. O ambiente enriquecido, por outro lado, não alterou a imunorreatividade para DCX quando comparado às condições de alojamento padrão. Contrariando o esperado e descrito na literatura, que demonstra um aumento da neurogênese induzida pelo enriquecimento ambiental em outras linhagens de camundongos, esse é o único trabalho que investiga a neurogênese em camundongos *Swiss*, mostrando que o enriquecimento ambiental parece não induzir neurogênese nesta linhagem.

O resultado das diferentes condições de alojamento, uma semana antes dos testes comportamentais (período de habituação normal na maioria dos laboratórios) indica que o enriquecimento e o isolamento alteram o efeito do diazepam no LCE e nas convulsões induzidas por PTZ. Além disso, o enriquecimento parece melhorar a memória de longa duração. Uma suposição para explicar esse resultado seria que o ambiente enriquecido estaria induzindo um aumento da excitação glutamatérgica, hipótese que deve ser investigada em futuros experimentos, e nos alerta para o fato que tanto no caso do diazepam, quanto de testes que envolvam a memória, as condições de alojamento durante a habituação podem resultar em falso-positivos ou falso-negativos nos experimentos. Nenhuma das condições de alojamento causou alterações no teste do nado forçado ou da suspensão pela cauda, sugerindo que esses testes não são capazes de detectar alterações induzidas pelas condições de alojamento em camundongos *Swiss*, ou que as alterações no comportamento do tipo-depressivo não ocorrem nessa linhagem. Os resultados obtidos no presente estudo são específicos para camundongos *Swiss*, linhagem mais usada nos testes comportamentais e de neurogênese nas pesquisas no Brasil e no mundo, porém muito pouco estudada no que diz respeito ao enriquecimento ambiental.

ISOLAMENTO, ENRIQUECIMENTO E A LITERATURA COMPORTAMENTAL

No presente estudo, o AE8, IS8 e AE6IS2 reduziram a emissão de estiramentos corporais dos camundongos Swiss no LCE. A literatura acerca dos efeitos do AE no comportamento emocional de camundongos parece contraditória, em alguns estudos o enriquecimento reduz os comportamentos tipo ansioso/aversivo (Chapillon et al., 1999), enquanto em outros estes comportamentos estão aumentados (van de Weerd et al., 1994; Roy et al., 2001; Zhu et al., 2006).

Camundongos 129S6/SvEv, ao contrário dos C57Bl/6, apresentaram aumento no número de estiramentos corporais no LCE quando foram criados em AE por 7 semanas (Abramov et al., 2008) em comparação ao grupo padrão. Zhu e colaboradores (2006) também observaram que camundongos C57Bl/6 machos criados em AE por 16 semanas apresentavam aumento no número de estiramentos corporais no LCE quando comparados aos criados sob condições padrão pelo mesmo período. No entanto, o mesmo não ocorreu com as fêmeas desta mesma linhagem (Zhu et al., 2006). Estes efeitos podem ser dependentes do sexo e da linhagem, pois os camundongos NMRI, uma linhagem derivada do Swiss, quando em isolamento, exploraram menos os braços abertos do LCE do que os camundongos socialmente alojados (Bouet et al., 2011). Em conjunto, esses dados sugerem que o paradigma do LCE não consegue identificar qualquer influência da criação por 8 semanas em enriquecimento ou empobrecimento sobre o comportamento de camundongos *Swiss*. Uma sugestão para explicar esse resultado semelhante para condições de alojamento tão diferentes seria que os animais do ambiente enriquecido já estão acostumados com a novidade e não se sentem ameaçados com o novo (habituação), enquanto os isolados, em decorrência da total falta de estímulos, perderam o interesse em explorar as novidades. Ou ainda, possíveis alterações no funcionamento cerebral em camundongos isolados podem ter afetado o processamento de informações envolvido na avaliação de risco desses animais. Então, em ambas as condições (enriquecimento ou isolamento) os animais exploram o aparato sem inibição.

No campo aberto, os camundongos Swiss mantidos em isolamento exploraram mais a arena do que aqueles alojados em ambiente enriquecido. Estes dados são semelhantes a alguns dados já publicados em camundongos CD-1 (Haupt e Schaefer, 2010) ou NMRI (Bouet et al., 2011) e podem indicar que a criação em isolamento também aumenta a atividade motora em camundongos *Swiss* e camundongos provenientes de linhagens relacionadas a ele. Essa

hiperatividade também pode ajudar a explicar o efeito tipo-ansiolítico do isolamento no LCE e pode ser consequência da diminuição da avaliação de risco que faz com que os animais saiam explorando mais o aparato sem a inibição do medo, um resultado tipo-falso positivo promovido pelo isolamento. Assim, a variável linhagem parece ser crucial para as diferenças comportamentais observadas no LCE (e em outros testes comportamentais).

Além da linhagem, fatores como diferentes tempos de alojamento (Zhu et al., 2006, Abramov et al., 2008), sexo do animal (Prior e Sachser, 1994), a fase do ciclo claro-escuro que os testes são realizados ou as condições de iluminação do ambiente do teste (Roy et al., 2001) parecem também ter importância no resultado final observado em testes comportamentais.

O segundo teste em que os animais foram avaliados foi o do campo aberto, onde observamos que os animais expostos ao AE exploraram menos o aparato quando comparados aos animais isolados. Este achado está de acordo com outro estudo em ratos criados em AE que também apresentaram uma menor atividade no teste do campo aberto, quando comparados com animais criados em condições de empobrecimento, ou seja, com poucos estímulos sensoriais e/ou sociais (Huck e Price, 1975). Hattori e colaboradores (2007) interpretam este resultado como uma rápida habituação dos camundongos AE a um novo ambiente por estarem acostumados com a mudança de estímulos, realizada periodicamente com a troca dos objetos colocados na caixa de alojamento (Hattori et al., 2007). A ambulação dos animais do grupo IS no campo aberto, por sua vez, foi semelhante à apresentada pelo grupo P, porém, maior que a do grupo AE. Fica então a dúvida, os animais do grupo IS exploram mais o campo aberto porque, apesar de terem sido expostos ao LCE, não se sentem ameaçados pelo novo ambiente, ou este é um achado fortuito sem qualquer significância biológica? Assim, embora sejam difíceis de explicar, estes resultados no campo aberto foram observados em outros trabalhos feitos com camundongos e também com ratos (Kempermann et al., 2002; Leng et al., 2004; Zhu et al., 2006; Brenes et al., 2008). Um trabalho observou uma hiperatividade em animais isolados somente quando o teste era realizado sob luz vermelha (Hall et al., 1997). No presente trabalho, a iluminação da sala experimental, onde se encontrava o campo aberto, foi também vermelha, fato que poderia explicar o efeito do isolamento sobre a ambulação dos animais no campo aberto quando comparados aos animais do grupo AE. İyilikci e colaboradores (2009) demonstraram que a luz azul, mas não a vermelha, pode causar um efeito

antidepressivo no teste de nado forçado (TNF) em ratos Wistar. Isso se deve ao fato que as células da retina são mais sensíveis a ondas de luz de curto comprimento, como a azul (468 nm), do que à luz vermelha (654 nm). A luz vermelha, portanto, seria teoricamente menos aversiva, pois os animais sendo albinos e de hábitos noturnos não a percebem, o que poderia favorecer a hiperatividade nos animais isolados, mas esta hipótese precisa ser melhor investigada.

O teste de suspensão pela cauda (TSC) foi o terceiro teste consecutivo ao qual os animais foram submetidos. O enriquecimento, assim como o isolamento, não afetou de forma consistente os parâmetros medidos no TSC. Este resultado foi, de certa forma, inesperado, uma vez que o TSC é um teste preditivo da atividade antidepressiva, assim como o TNF, e este último, em camundongos, tem se mostrado sensível às condições de alojamento (Hilakivi et al., 1989, Yates et al., 1991). No presente trabalho, as condições de alojamento não causaram alterações no comportamento tipo-antidepressivo de camundongos *Swiss*, o que pode ser uma característica da linhagem. Assim, as comparações intra e interespecíficas indicam que os substratos biológicos que medeiam o desempenho no TNF e no TSC não são idênticos e dependem do *background* genético (Petit-Demouliere et al., 2005). Ainda há evidências de que a interação gene-ambiente poderia explicar algumas diferenças nos resultados experimentais entre os laboratórios (Wahlsten et al. 2003).

O TSC e o TNF são paradigmas de triagem amplamente utilizados e bem estabelecidos para antidepressivos (Bourin et al., 2005). Uma grande variedade de agentes antidepressivos reduz o tempo de imobilidade em ambos os testes. No entanto, a maioria dos antidepressivos diminui a duração da imobilidade no TSC com doses inferiores às necessárias para o TNF (Liu e Gershenfeld, 2001), e os inibidores seletivos da recaptação da serotonina são mais efetivos no TSC do que no TNF (Porsolt e Lenegre, 1992). O isolamento social em camundongos ao desmame (entre 24 h e 5 dias), pode reduzir o tempo de imobilidade (Hilakivi et al., 1989) ou não ter efeito (10 - 20 dias de isolamento) no TNF (Yates et al., 1991). Por outro lado, outros trabalhos mostram que 12 semanas de isolamento após o desmame não altera o comportamento de imobilidade ou fuga nas linhagens de rato Wistar ou Fawn-hooded em uma versão modificada do teste de nado forçado (Hall et al., 1998, 2001). O fato dos animais terem sido submetidos consecutivamente aos diferentes testes (LCE, TCA e TSC) poderia explicar a falta de efeito comportamental das condições de alojamento no presente estudo. Contudo, em vários outros estudos, camundongos

machos isolados também não apresentaram comportamentos diferentes dos co-específicos alojados em grupo em vários testes comportamentais (TCA, TNF, LCE e *hole board* modificado - Rodgers e Cole, 1993; Iso et al., 2007; Koike et al., 2009; Arndt et al., 2009). Nestes estudos, a ausência de um grupo controle mantido em condições padrão dificulta a comparação com os presentes dados. Por outro lado, o fato de usarmos camundongos Swiss pode ser um fator determinante para a falta de efeito no TSC. Parece que as condições de alojamento não induzem um efeito do tipo-antidepressivo nesses animais, pois se induzissem seriam detectadas, visto que os animais desta linhagem são sensíveis a todos os antidepressivos testados no TSC (Bourin et al., 2005).

Uma relação positiva entre a redução da imobilidade no TSC e um aumento da neurogênese no hipocampo já foi relatada (Xu et al., 2009; Leconte et al., 2011). A redução da neurogênese no hipocampo após o isolamento foi também observada em linhagens de camundongos derivadas da linhagem Swiss, a CD-1 ou a ICR (Ibi et al., 2008). No presente estudo, o ambiente enriquecido não conseguiu mudar o comportamento no TSC e o número de neurônios no giro dentado do hipocampo, o que indica que a neurogênese em camundongos Swiss adultos parece também insensível aos efeitos do enriquecimento ambiental. Em contrapartida, apesar da falta de efeito do isolamento no TSC, essa condição de alojamento reduziu o número de neurônios novos no GD de camundongos *Swiss* machos, indicando que não há correlação entre o comportamento e a neurogênese nesta linhagem de camundongos, nesta condição de alojamento. Até onde sabemos, não há relato na literatura de aumento do número de neurônios novos no hipocampo após alojamento em ambiente enriquecido em linhagens relacionadas à linhagem *Swiss*.

ISOLAMENTO, ENRIQUECIMENTO E A LITERATURA DA NEUROGÊNESE ADULTA

A literatura mostra que fatores ambientais, tais como condições de alojamento, além do estresse e do aprendizado podem afetar a taxa de nascimento, sobrevivência e estabelecimento de células granulares jovens do giro denteado (GD) de roedores (Kempermann et al., 1997; Leuner et al., 2004; Iso et al., 2007; Ibi et al., 2008; Snyder et al., 2009b). No presente trabalho, utilizamos a expressão de doublecortina (DCX) como marcador da presença de neurônios novos no hipocampo ventral dos camundongos adultos, área envolvida com o processamento de emoções (Loureiro et al., 2011). A DCX é expressa especificamente pelos neurônios jovens e precursores neuronais e desempenha um papel

no crescimento do axônio e dendritos (Kerjan et al., 2009; Tint et al., 2009). O GD do hipocampo foi a região neuroanatômica escolhida devido ao seu bem conhecido potencial para neurogênese em animais adultos (Kesner et al., 2000). O número de células expressando a DCX na camada subgranular do GD do hipocampo não foi alterado pelo enriquecimento, apesar da maioria dos trabalhos relatarem um aumento no número de neurônios novos no hipocampo de camundongos adultos quando comparados com animais criados em condições padrão (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999; Van Praag et al., 1999). Cabe ressaltar que a maioria destes trabalhos fazem a estimativa do número de neurônios novos baseados em complicados métodos de colocalização de BrdU com marcadores fenotípicos para neurônios e células gliais, fato que pode dificultar a quantificação. A expressão de DCX para a estimativa do número de neurônios novos também tem limitações, como o fato de ser expressa também em neurônios maduros em fase de rearranjo de microtúbulos (Nacher et al., 2001). No entanto, no GD do hipocampo encontra-se principalmente em neurônios recém-nascidos da camada subgranular (Couillard-Despres et al., 2005). Por estas razões não podemos atribuir as discrepâncias entre os resultados ao método de quantificação da neurogênese. Outros fatores, no entanto, como o tipo do enriquecimento e a linhagem usada podem ter contribuído para esta discrepância.

Por outro lado, o isolamento *per se* parece ser um potente inibidor da neurogênese no hipocampo do camundongo adulto (Ibi et al., 2008). No presente trabalho, o isolamento induziu uma redução significativa das células expressando DCX no GD, ou seja, houve uma diminuição no número de neurônios novos nesta estrutura e esta redução não foi prevenida (AE6IS2) ou revertida (IS6AE2) pela interação social. Estes achados reproduzem resultados de outros trabalhos que indicam que a sobrevivência e diferenciação das células recém-divididas no hipocampo são reduzidas pelo isolamento após o desmame em camundongos (Ibi et al., 2008), o que é consistente também com resultados de estudos anteriores em ratos e cobaias (Lu et al., 2003; Rizzi et al., 2007). Além disso, nossos dados também reproduzem os achados de Iso e colaboradores (2007) que encontraram, quantificando o número de células BrdU positivas, a redução da neurogênese hipocampal após 6 ou 8 semanas de isolamento em machos da linhagem C57Bl/6. Os mesmos autores observaram que 2 semanas de enriquecimento ambiental não foram capazes de prevenir o efeito inibidor da neurogênese, contudo, pode revertê-lo (Iso et al., 2007). É difícil explicar porque duas semanas de enriquecimento ambiental foram capazes de reverter as

consequências do isolamento sobre a neurogênese hipocampal em camundongos C57Bl/6, mas não em animais *Swiss*, porém esta diferença pode ser atribuída a uma característica específica da linhagem.

Nossa metodologia não permitiu determinar se a redução do número de novos neurônios no GD dos camundongos adultos isolados foi em virtude da redução da diferenciação dos progenitores, do aumento de sua diferenciação em neurônios maduros, ou ainda de um aumento na morte celular. Existem evidências que o isolamento induziria a morte celular das células recém-divididas (Rizzi et al., 2007) pela elevação dos níveis circulantes de corticosterona (Stranahan et al., 2006), o que induziria a liberação de glutamato no hipocampo (Venero e Borrell 1999; Karst et al., 2005). Essa liberação poderia induzir a morte celular das células-tronco e reduzir a sobrevivência das células recém-divididas no GD do hipocampo em camundongos isolados como encontrado no estudo realizado *in vitro* (Asahi et al., 1998; Tashiro et al., 2006). Além disso, Matsumoto e colaboradores (2007) mostraram que o isolamento dos camundongos após o desmame altera também a expressão das subunidades do receptor GABAA, levando a uma diminuição na resposta do receptor aos agonistas, e diminuindo a expressão do fator de transcrição NeuroD, um regulador positivo da diferenciação neuronal no GD (Tozuka et al., 2005).

As diferenças entre o número de neurônios novos no hipocampo dos animais AE e IS parecem não estar relacionadas à expressão comportamental destes animais nos diferentes testes, uma vez que o comportamento dos dois grupos foi muito semelhante no LCE e TSC. Isto sugere que a expressão do comportamento defensivo nestes contextos não está diretamente relacionada com a neurogênese no GD do hipocampo ventral, e outros fenômenos, como os envolvidos na expressão de receptores, podem ser mais importantes. Esta argumentação ganha força quando se leva em conta que os neurônios granulares novos são minimamente funcionais até pelo menos 6-8 semanas de idade e seria improvável que fossem capazes de contribuir para a expressão do comportamento (Ge et al., 2007; Toni et al., 2007; Kee et al., 2007). Os dados divergentes observados em outros trabalhos podem ser decorrentes do fato que neurônios novos apresentam funcionalidade precoce em ratos e são mais tardias em camundongos (Snyder et al., 2009a), realçando a necessidade de se tratar separadamente os dados obtidos em camundongos daqueles obtidos em ratos, neste aspecto.

Uma explicação para essa diferença na neurogênese em outros trabalhos poderia também ser explicada pela forma como vivem os

animais. Os animais do AE em outro trabalho apresentam vários tipos de movimento, como corrida, perseguição, agachamento e luta, se esconderam, escalaram e correram na roda de atividade (Iso et al., 2007). Por outro lado, os animais alojados em condições de empobrecimento raramente se movimentam. Estes dados apontam para o valor dos estímulos na indução da neurogênese (Iso et al., 2007).

De forma geral, a comparação com os dados da literatura é dificultada pela grande variação dos protocolos de alojamento aplicados às diferentes linhagens de camundongos que são avaliados em diversos aparatos experimentais, nos quais distintos parâmetros são analisados. Até onde pudemos averiguar, este é o primeiro trabalho envolvendo a avaliação comportamental e a neurogênese em camundongos da linhagem *Swiss*, comumente usada em nossa instituição e na maioria das instituições e pesquisas no Brasil e no mundo. A maioria dos dados da literatura foi obtida em outras linhagens de camundongos, gerando diferentes resultados na dependência da linhagem estudada (Van de Weerd et al., 1994; Roy et al., 2001; Zhu et al., 2006; Iso et al., 2007; Ibi et al., 2008; Snyder et al., 2009).

Diante dos nossos resultados no LCE, CA e TSC em animais alojados em diferentes condições ao desmame, por oito semanas, parece que os camundongos *Swiss* sofrem uma habituação com as condições de alojamento de longo prazo. Isso sugere que se o enriquecimento for o método de criação escolhido, ele deve fornecer novidades constantemente para estimular os animais a exibirem comportamentos típicos da espécie nos testes. Entretanto, quando pensamos em neurogênese vemos que ela é fortemente influenciada pelo isolamento. Assim sendo, esse tipo de alojamento deve ser evitado quando o objetivo for avaliar esse parâmetro.

AS CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E AS CONSEQUÊNCIAS PARA OS EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS

A espécie mais amplamente usada nas pesquisas biomédicas é o camundongo. Camundongos são sujeitos sociais e hierárquicos, e é geralmente recomendado que sejam alojados em grupos (*Code of Practice for the Housing and Care of Laboratory Mice - Austrália*). Sob condições de laboratório, o alojamento é normalmente organizado por gênero (Alleva et al., 1993), o que contrasta com a organização social dos camundongos (um macho dominante, muitas fêmeas, juvenis e machos subordinados) (Bartolomucci et al., 2004). Em condições de laboratório, vários machos adultos são muitas vezes obrigados a coabitar (Miczek e O'Donnell, 1978), o que resulta em frequentes e violentas

agressões (van Oortmerssen, 1971; Brain et al., 1990), as quais podem alterar os resultados dos experimentos comportamentais. Uma alternativa seria padronizar os protocolos de experimentação para os camundongos-fêmeas, diferente dos machos, que apresentam baixos níveis de agressão quando alojadas em grupo ou isoladas (Palanza et al., 1994). O inconveniente de se trabalhar com as fêmeas é o aumento no número de animais utilizados em consequência das variações impostas pelas diferentes fases do ciclo estral, o que pode se tornar uma vantagem se o objetivo for verificar estas diferenças comportamentais devido ao ciclo hormonal, por outro lado.

O isolamento social seria uma forma de eliminar a possibilidade de interações antagonísticas ou agressão entre os machos da mesma espécie. No entanto, o isolamento de camundongos machos leva a uma alteração da hierarquia, com estabelecimento de um comportamento agressivo, relacionado à territorialidade (Lasley e Thurmond, 1985). Este tipo de alojamento causa alterações na emocionalidade dos animais, tornando o comportamento agressivo mais intenso em diferentes linhagens de camundongos e também em ratos (Tóth et al., 2008). Em nossas condições, observamos que os camundongos isolados quando foram reagrupados (IS6AE2) apresentaram comportamentos agressivos extremos. O aumento da agressividade induzido pelo isolamento também poderia afetar os resultados de alguns experimentos comportamentais, e nas duas formas de alojamento mais comuns (isolamento ou em grupos do mesmo sexo) o bem estar dos camundongos machos parece estar ameaçado (por lesões decorrentes das agressões no ambiente padrão ou pelas alterações psicomotoras decorrentes do isolamento, a síndrome do isolamento). Os animais que sofrem da “síndrome do isolamento” são mais difíceis de manusear, tornam-se mais agressivos, algumas vezes apresentam padrões de comportamento estereotipados e podem ter convulsões (van Loo et al., 2003).

Assim, o enriquecimento ambiental, seria uma alternativa viável aos ambientes padrão ou ao isolamento. Este procedimento poderia ser aplicável às linhagens de camundongos aparentemente mais dóceis, e provavelmente mais suscetíveis aos efeitos anti-aversivos do AE, tais como ABG (Marashi et al., 2004) ou C57Bl/6 (Abramov et al., 2008). Em linhagens mais agressivas, como *Swiss*/CD-1 e FVB (Van Loo et al., 2003), alguns tipos de ambientes enriquecidos podem favorecer ainda mais os embates (McGregor e Ayling, 1990), como consequência do estresse envolvido na manutenção da hierarquia social. Uma vez que se tenha obtido um ambiente que seja mais adequado para a linhagem de

camundongos em estudo, resta ainda saber se esta forma de alojamento irá mudar/ou afetar as repostas esperadas das drogas testadas nos diferentes testes comportamentais.

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO NO COMPORTAMENTO E NO EFEITO DE DROGAS PADRÃO

Sabe-se que o isolamento social é capaz de induzir alterações comportamentais e neuroquímicas em roedores (Garattini e Valzelli, 1981). No presente trabalho, o isolamento de camundongos Swiss adultos, por uma semana (condição frequente nos laboratórios de pesquisa), apresentou um efeito do tipo ansiogênico no LCE. Em concordância com os nossos dados, da Silva e colaboradores (1996) demonstraram que o isolamento de ratos Wistar (60 dias de idade) induziu um efeito do tipo ansiogênico no LCE e, além desse trabalho, outros estudos confirmaram esses resultados em ratos (Morinan et al., 1985; Parker et al., 1986; Maissonette et al., 1993). Além disso, o isolamento social pós-desmame é quase sempre associado com o aumento do comportamento de ansiedade (Hall, 1998, Fone e Porkees, 2008). Em contrapartida, quando Brenes e colaboradores (2009) iniciaram o isolamento em uma idade mais avançada, onde ratos machos foram isolados da adolescência à idade adulta (PD28 a PD60), não encontraram efeito sobre o comportamento no LCE quando testado no PD62. Ainda, em contraposição aos nossos dados, Arakawa (2005, 2007) e Thorsell e colaboradores (2006) destacam um aparente efeito do tipo ansiolítico do isolamento social para ratos machos no LCE e campo aberto, quando o isolamento social é iniciado mais tarde, na adolescência (PD45). Voikar e colaboradores (2005) também observaram que camundongos DBA/2 e C57BL/6J machos alojados individualmente são menos “ansiosos” no LCE do que animais alojados em grupo.

Em nosso trabalho, quando avaliamos os animais alojados por uma semana em ambiente enriquecido (AE) observamos um efeito do tipo ansiolítico. A literatura acerca dos efeitos do AE no comportamento emocional de camundongos apresenta resultados contraditórios: em alguns estudos o AE reduz os comportamentos do tipo ansioso/aversivo (Chapillon et al., 1999), enquanto em outros, estes comportamentos estão aumentados (Van de Weerd et al., 1994; Roy et al., 2001; Zhu et al., 2006). Por exemplo, a linhagem “ansiosa” BALB/c apresenta mais comportamentos de esquiva após a exposição ao AE, enquanto os “não-ansiosos” C57BL/6 não mostram quaisquer alterações (Van de Weerd et al., 1994; Roy et al., 2001; Zhu et al., 2006). Vários trabalhos relatam

que animais criados em AE apresentam redução das medidas indicadoras de aversão, como a defecação e o congelamento (Klein et al., 1994). E ainda, em concordância com nossos resultados, camundongos alojados em AE apresentam um aumento no número de entradas e no tempo gasto nos braços abertos do LCE, indicando uma redução dos comportamentos aversivos ou de esquiva (Friske e Gammie, 2005), ou um efeito do tipo ansiolítico. Além disso, alguns pesquisadores observaram uma redução do comportamento de aversão/esquiva nos testes do campo aberto (Chapillon et al., 1999) e labirinto em O (Wolfer et al., 2004). Um estudo de análise fatorial das variáveis medidas no teste do campo aberto confirmou que o AE tem um efeito do tipo ansiolítico (Brenes et al., 2006). Em clara contradição com estes achados temos o trabalho de Zhu e colaboradores (2006) demonstrando um aumento da “ansiedade” no LCE pela exposição ao AE.

Como mencionado acima, os animais expostos ao AE, em comparação aos animais alojados em condições padrão, são conhecidos por apresentar uma diversidade de comportamentos exploratórios em testes controlados de exploração (Renner e Rosenzweig, 1987). Assim, embora o “bom senso” indique que o enriquecimento ambiental possa favorecer o bem-estar animal, os dados presentes na literatura são controversos em decorrência de diferentes fatores experimentais. A maioria dos estudos foi feita em roedores (Huck e Price, 1975; Fernandez-Teruel et al., 2002, Friske e Gammie, 2005; Martinez-Cue et al., 2005), enquanto alguns poucos estudaram estas condições em outras espécies (e.g. Aves: Melleu et al., 2009 - comunicação pessoal; suínos: Brodrick, 2006; primatas: Schapiro e Kessel, 1993). Além disso, o grau de complexidade dos ambientes enriquecidos contribui para a variação entre os resultados relatados por diferentes experimentadores (Van de Weerd et al., 2002). Os padrões (em termos de estímulos e/ou temporal) para o enriquecimento variam entre os estudos (Boinski et al., 1999) e aquilo que é referido como um super-enriquecimento em um estudo (Van de Weerd et al., 2002) pode ser definido como regular por outro (Ferchmin e Eterovic, 1986). Especialistas na área sugerem que o sucesso do enriquecimento varia entre espécies, sexo e idade (Galef, 1999) e, portanto, torna-se difícil a padronização da concepção e da composição do que é enriquecimento ambiental. Os objetos selecionados são outra fonte potencial de variação entre estudos porque diferentes objetos oferecem diferentes tipos de experiências (por exemplo, cognitivas, sociais, acrobáticas ou sensoriais). Alguns estudos usam brinquedos e/ou blocos (Friske e Gammie, 2005), enquanto outros

usam rodas, escadas, túneis (Naka et al., 2005). E nenhum estudo, até o momento, comparou ou testou os efeitos dos vários tipos de objetos.

Diferenças de procedimento nos protocolos do AE constituem outra fonte de confusão experimental. Em alguns estudos os brinquedos foram mudados uma vez por semana (Friske e Gammie, 2005), enquanto em outros foram mudados várias vezes na semana (Naka et al., 2005) ou mesmo todos os dias (Briones et al., 2004). Outras variáveis, tais como a duração do enriquecimento, o número de animais alojados em conjunto e a linhagem também variaram entre os estudos. A duração do tempo de enriquecimento variou de alguns minutos (Ferchmin e Eterovic, 1986) ou horas em cada dia (Lambert et al., 2005), até vários dias ou várias semanas de exposição contínua (Naka et al., 2005). O número de animais alojados em conjunto também variou entre os estudos de 5 a 14 animais por caixa (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Faherty et al., 2005). Finalmente, a espécie de roedores avaliada (ratos: Huck e Price, 1975; Fernandez-Teruel et al., 2002, camundongos: Friske e Gammie, 2005; Martinez-Cue et al., 2005) parece ser um fator determinante para os efeitos comportamentais do AE (Chapillon et al., 1999).

Na literatura, frequentemente é descrito que o enriquecimento reduz os comportamentos do tipo ansioso/aversivo em camundongos (Chapillon et al., 1999). Contudo, até no mesmo laboratório, a reprodutibilidade dos efeitos do enriquecimento sobre o comportamento avaliado no LCE foi limitada: Roy e colaboradores (2001) não observaram qualquer aumento no número de entradas, nem um maior tempo despendido nos braços abertos de camundongos BALB/c expostos ao AE, como descrito em um estudo anterior do mesmo laboratório utilizando a mesma linhagem de camundongos e o mesmo tipo de enriquecimento (Chapillon et al., 1999). Esta falta de reprodutibilidade foi atribuída a mudanças nas condições de iluminação do teste (Roy et al., 2001). Prior e Sachser (1995), por outro lado, descreveram diferenças sexo-específicas nos efeitos do enriquecimento no LCE. Camundongos machos NMRI expostos ao AE mostraram menos comportamentos do tipo ansioso/aversivo quando comparados aos animais em condições padrão, mas não foram observadas diferenças em fêmeas avaliadas de modo similar.

E tanto o enriquecimento quanto o isolamento aumentaram o efeito ansiolítico do diazepam em nosso estudo. Em relação ao enriquecimento esse resultado está de acordo com a literatura que afirma um efeito do tipo ansiolítico do enriquecimento, que poderia se somar ao efeito do benzodiazepínico em questão. Assim, este efeito é mais

pronunciado com a interação diazepam-enriquecimento. No entanto, o resultado também ansiolítico do isolamento nos causa estranheza, visto que os animais que receberam solução salina, e foram mantidos nas mesmas condições de isolamento, apresentaram um efeito do tipo ansiogênico. Além disso, Pinna e colaboradores (2006b) mostraram que o isolamento altera a expressão das subunidades do receptor GABAA, levando à diminuição do efeito sedativo induzido pelo agonista do receptor GABAA. Alguns trabalhos relacionam o envolvimento da 5-HT e do GABA com o aumento da ansiedade induzido pelo IS em ratos adultos (Maisonnette et al, 1993; Rex et al, 2004). Esse resultado merece estudos mais aprofundados para tentar desvendar os seus possíveis mecanismos de ação, visto que na literatura atual não há dados que o expliquem. A redução da neurogênese no GD poderia ser uma explicação plausível para o efeito ansiogênico do IS já que o isolamento altera a expressão das subunidades do receptor GABAA, levando a uma diminuição na resposta do receptor aos agonistas (Matsumoto et al., 2007), mas isto deve ser melhor estudado.

Assim, os resultados indicam que as condições de alojamento são capazes de interagir com os efeitos das drogas ansiolíticas e, portanto, deve ser dada cuidadosa consideração na concepção e interpretação de experimentos que envolvem a farmacologia da ansiedade.

A fim de verificar uma diferença na sensibilidade do TNF em comparação ao TSC no efeito das condições de alojamento, visto que eles podem detectar diferentes mecanismos de ação de drogas antidepressivas (Bourin et al., 2005), os animais alojados nas diferentes condições de alojamento foram avaliados no TNF. E, assim como observado no TSC, no TNF também não foram verificadas alterações induzidas pelas diferentes condições de alojamento. Diferentemente dos nossos resultados, Koike e colaboradores (2009) observaram que camundongos isolados eram vulneráveis ao estresse do nado forçado repetido, ou seja, aumentaram o tempo de imobilidade quando comparados aos animais alojados em grupo. Além deste dado, trabalhos anteriores mostraram dados contraditórios com o isolamento em roedores reduzindo o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Hall et al., 1998; Karolewicz e Paul, 2001). A discrepância no teste do nado forçado pode ser explicada pela diferença nos protocolos dos testes comportamentais. Na maioria dos trabalhos em que se observou um efeito das condições de alojamento, os camundongos foram submetidos ao teste de nado forçado uma ou duas vezes, enquanto no estudo de Koike e colaboradores (2009) o teste foi repetido em cinco dias consecutivos. E, na verdade, não houve diferença no tempo de

imobilidade aparente durante os dois primeiros dias do teste neste último estudo.

Há ainda um estudo onde os camundongos ddY, alojados por seis semanas em isolamento social, apresentaram um aumento da imobilidade no TSC, bem como no TNF, quando comparados com camundongos alojados em grupo (Ago et al., 2008). Em contraste, foi relatado que camundongos C57BL/6J, mantidos em um ambiente enriquecido durante 8 semanas, apresentaram redução da imobilidade no TSC e TNF (Xu et al., 2009). Essas evidências indicam que o uso de diferentes linhagens pode, mais uma vez, justificar as diferenças comportamentais encontradas no mesmo paradigma experimental. Assim, os presentes dados indicam que camundongos *Swiss* machos submetidos a uma situação de estresse inescapável podem ser mais insensíveis às variações ambientais, em termos de resposta comportamental, quando comparada a outras linhagens.

O teste da esquiwa passiva (*step down*), por sua vez, foi utilizado para verificar se ocorrem alterações na memória em camundongos da linhagem *Swiss*, nas condições de alojamento testadas, com o intuito de comparar os resultados com outros trabalhos que utilizam linhagens diferentes. Esse teste avalia o comportamento exploratório natural do animal e consiste na capacidade do animal em evitar uma punição condicionada reprimindo sua tendência de explorar além das áreas seguras (Rossato et al., 2006).

No presente trabalho, no teste da esquiwa passiva inibitória (*step down*), o enriquecimento aumentou a latência para a descida da plataforma (aos 90 min e 24 h) sugerindo uma melhora na memória de curta e longa duração. Essa aprendizagem motivada pelo medo é uma tarefa dependente do hipocampo e amígdala (Vianna et al., 2004). Apesar de no presente trabalho não ter sido encontrado um efeito do enriquecimento sobre a neurogênese de camundongos *Swiss* que justificasse a melhora na memória observada, outras alterações podem ter ocorrido que justifiquem esta melhora na memória. Piazza e colaboradores (2011) mostraram que o AE diminuiu os déficits de memória em ratos diabéticos e, embora a proliferação celular na GD tenha sido menor nos ratos diabéticos, o ambiente enriquecido não interferiu neste parâmetro. No entanto, apoiando estes últimos resultados outro estudo mostrou que a exposição ao AE aumenta a sobrevivência das células recém-nascidas no GD do hipocampo de camundongos adultos, sem afetar a proliferação celular (Van Praag et al., 1999). Esse fato não foi verificado no presente trabalho, mas pode explicar nossos resultados. Além disso, parece que os efeitos do

enriquecimento ambiental e de experiências sensório-motoras no comportamento são correlacionadas com o desenvolvimento das estruturas nervosas (por exemplo, dendritos das células granulares olfativas e do núcleo coclear), que estão reduzidas em ambientes empobrecidos (Coleman et al., 1982; Rehn et al., 1988) e aumentadas em ambientes enriquecidos (Cummins et al., 1973; Uylings et al., 1978; Black et al., 1987; Wainwright et al., 1993).

Em oposição aos efeitos do enriquecimento, trabalhos demonstraram que ratos criados sob condições de isolamento social demonstraram prejuízos de aprendizagem e memória, as quais estão de acordo com trabalhos anteriores (Nilsson et al., 1999; Varty et al., 1999). Um estudo demonstrou que a taxa de neurogênese no GD do rato diminui com a idade (Kuhn et al., 1996), e que o aparecimento de novos neurônios nesta área foram inibidos pelo estresse pré-natal (Lemaire et al., 2000). Na verdade, o estresse pré-natal e em adultos reduz a neurogênese no giro dentado de jovens e adultos (Lemaire et al., 2000). O GD do hipocampo é importante devido ao seu bem conhecido potencial para neurogênese em animais jovens, além da sua circuitaria e seu papel nos processos de aprendizagem e memória (Kesner et al., 2000). Quan e colaboradores (2010) demonstraram que ratos, isolados ao desmame por 8 semanas, apresentaram diminuição na cognição espacial no labirinto aquático. Esses dados estão em acordo com os obtidos no presente estudo, pois o isolamento de camundongos Swiss por uma semana reduziu a latência para descer da plataforma em relação ao grupo enriquecido, o que confirma uma diminuição da cognição induzida por este tipo de alojamento.

Quando os animais são expostos a novas experiências, a informação adquirida pode ser armazenada e, eventualmente, produzir modificações comportamentais. Uma vez adquiridas, as informações precisam ser progressivamente fortalecidas, ao longo do tempo, através de um processo de consolidação, durante o qual a memória é estabilizada (McGaugh, 1966; 2000). Se o processamento de informação for perturbado, enquanto a consolidação está acontecendo, o armazenamento pode ser afetado e, como consequência, a formação do traço de memória pode ser melhorada ou prejudicada (Blake et al., 2011). Em condições fisiológicas, a consolidação da memória pode ser alterada com a apresentação de novas situações de aprendizagem (Netto et al., 1985; Izquierdo et al., 1999; Boccia et al., 2005) ou por privação do sono (Walker, 2005). A interferência pode ser também produzida por meio de manipulações farmacológicas, onde as drogas administradas exercem suas ações através da modulação de processos endógenos.

Nesse sentido, a administração de agonistas ou antagonistas de neurotransmissores ou receptores hormonais (Izquierdo e McGaugh, 2000), os inibidores da síntese de proteínas (Davis e Squire, 1984), os fatores de transcrição e seus bloqueadores (Freudenthal et al., 2005) ou inibidores de proteína quinase (Bernabeu et al., 1997), podem produzir tanto o aumento quanto a diminuição da consolidação da memória. Em primatas, a exposição a diferentes tipos de novidade tem sido relacionada à ativação do hipocampo e regiões próximas do lobo temporal medial e córtex pré-frontal (Nyberg, 2005). As áreas ativadas correspondem a conexões que modulam o núcleo basal de Meynert, um dos principais núcleos de projeção colinérgica que modula a atividade cortical envolvida na aprendizagem e memória (Mesulam e Mufson, 1984). Em roedores, os sistemas colinérgicos são preferencialmente ativados por estímulos novos (Giovannini et al., 2001) e são necessários para a consolidação de memórias em diferentes espécies (Boccia et al., 2003; 2004; Hasselmo, 1999). Tem sido sugerido que altos níveis de acetilcolina (ACh) são necessários para a aquisição de novas informações, enquanto baixos níveis deste neurotransmissor causam prejuízos na memória (Hasselmo e Stern, 2006). Assim, a redução dos níveis de ACh ou a administração de antagonistas colinérgicos muscarínicos como a escopolamina (ESCOP), podem prejudicar a aquisição, e também a consolidação e a recuperação da tarefa aprendida. Na verdade, quando a ESCOP é dada após o treinamento, a retenção é afetada somente pelas altas doses (mais de 4 mg / kg), mas não quando baixas doses são administradas (Roldán et al., 1997). No entanto, quando a ESCOP é administrada antes de um teste de aprendizagem, o processo de retenção é prejudicado, mesmo em baixas doses (Decker e McGaugh, 1989; Ohno e Watanabe, 1996). Se dois novos testes de aprendizagem são realizados sequencialmente, baixas doses de ESCOP poderiam ser usadas como uma ferramenta farmacológica para seletivamente prejudicar a aquisição da segunda situação de aprendizagem, embora sem afetar a consolidação ou reconsolidação da memória do primeiro (Blake et al., 2011).

A ACh também aumenta a resposta cortical aos estímulos sensoriais, isto é, melhora a atenção aos estímulos sensoriais para o ambiente, por otimizar o processamento de entrada (*input*) em regiões sensoriais (Parikh e Sarter, 2008), e aumentar a codificação da memória para esses estímulos (Hasselmo, 1999). Ao mesmo tempo, este neurotransmissor evita as influências sobre esta nova codificação, causada por memórias prévias, pela supressão das sinapses reforçadas pelo aprendizado anterior (Sevilla et al., 2002; Linster et al., 2003;

Hasselmo e Giocomo, 2006). O bloqueio dos receptores muscarínicos usando ESCOP impede os efeitos fisiológicos da ACh. Esse bloqueio resulta nas seguintes ações: redução da resposta cortical a novos estímulos sensoriais, onde a codificação da informação nova é comprometida, e as informações aprendidas previamente não são reprimidas (Sevilla et al., 2002; Linster et al., 2003; Hasselmo et al., 2006). Ou seja, o bloqueio do sistema colinérgico pela ESCOP prejudica a aquisição, mas afeta menos a consolidação da memória (Blake et al., 2011).

Todos os trabalhos que observam a relação da memória com o isolamento relatam que o efeito comportamental é relacionado com a neurogênese (Dong et al., 2004; Kosten et al., 2007). Entretanto, existem poucos trabalhos com isolamento, pois a grande maioria dos trabalhos utiliza o enriquecimento ambiental como forma de melhorar a memória. Na verdade, a melhora da aprendizagem e da memória induzidas pelo enriquecimento ambiental é um dos achados mais consistentes na literatura (Van Waas e Soffié, 1996; Pham et al., 1999; 2002; Van Praag et al., 2000; Veena et al., 2009). No entanto, as bases celulares e moleculares para as modificações induzidas pelo enriquecimento nas funções cognitivas permanecem indefinidas. A fim de identificar os possíveis responsáveis pelos efeitos do enriquecimento sobre a memória, muitas condições são testadas. Por exemplo, foi demonstrado que diferentes tipos de enriquecimento ambiental, tais como a estimulação cognitiva, o exercício voluntário e treinamento acrobático, demonstraram efeitos distintos sobre a memória espacial e a expressão de uma proteína pré-sináptica, a sinaptofisina (Lambert et al., 2005). A roda de atividade, mas não a estimulação cognitiva ou o treinamento acrobático, melhora a memória de trabalho espacial em relação aos controles, apesar de, tanto os exercícios, quanto a estimulação cognitiva aumentarem os níveis de sinaptofisina no neocórtex e no hipocampo (Lambert et al., 2005). Trabalhos anteriores demonstraram que roedores alojados em ambientes enriquecidos com brinquedos, rodas de exercício e um aumento da interação social com os companheiros de alojamento, apresentaram alterações significativas na morfologia sináptica e na função neuronal em comparação com animais alojados em condições padrão (Van Praag et al., 2000). Essas alterações podem influenciar a formação da potenciação hipocampal de longa duração (LTP), que é uma atividade dependente do aumento da transmissão sináptica, a qual é atribuída como o mecanismo celular para alguns tipos de memória no cérebro de mamíferos (para revisão, ver Bliss e Lomo, 1973; Micheau e Riedel 1999; Martin et al., 2000). Em

roedores e seres humanos, a área CA1 do hipocampo é crítica para o processamento de informações ligadas a determinadas formas de memória (Zola-Morgan et al., 1986; Tsien et al., 1996). A exploração de ambientes enriquecidos provoca um padrão de atividade elétrica nos neurônios hipocampais da área CA1 que são semelhantes aos padrões de estimulação elétrica utilizados para induzir a LTP em fatias hipocampais (O'Keefe, 1979, Otto et al., 1991). Isto sugere que a exposição a ambientes enriquecidos pode modificar a fisiologia sináptica em neurônios do hipocampo (Foster et al., 1996; Van Praag et al., 1999).

Diante desses aspectos, fica a pergunta: quais são os aspectos específicos de um ambiente enriquecido que causam as mudanças na plasticidade sináptica aqui relatadas? Essa é uma questão difícil, pois pode ser impossível dissociar claramente as contribuições para a plasticidade induzidas pela experiência da atividade motora em si, ou do aumento da estimulação sensorial que ocorre durante a exploração de objetos inanimados em um ambiente enriquecido. Temos que a exploração de um ambiente espacialmente enriquecido quase invariavelmente envolve alguma atividade física, e essa atividade estimula os receptores sensoriais musculares e aumenta a síntese e a liberação de fatores neurotróficos (Neeper et al., 1995; Torasdotter et al., 1998). Estes fatores neurotróficos poderiam, então, modular a atividade e a plasticidade dos neurônios (Kang e Schuman, 1996; Boulanger e Poo, 1999), como os do hipocampo, e com isso modificar a formação de memória.

Numerosos estudos têm demonstrado que a exposição de roedores a ambientes enriquecidos pode melhorar processos de aprendizagem e memória (para revisão, ver Rosenzweig e Bennett, 1996; Kempermann et al., 1997; Van Praag et al., 1999; Rampon et al., 2000). Steven e colaboradores (2001) demonstraram que experimentos comportamentais revelaram uma melhora significativa na memória para o condicionamento do medo contextual em camundongos mantidos em condições enriquecidas, em contraste com a memória do medo condicionado, que não foi afetada nos camundongos nestas mesmas condições. As bases neurais para os dois tipos de medo condicionado já foram identificadas: o medo contextual condicionado depende do hipocampo e da amígdala, enquanto o do medo condicionado depende da amígdala isoladamente (Phillips e LeDoux, 1992; Kim et al., 1993, Holand e Bolton, 1999). Isso sugere que o enriquecimento pode ter modificado os processos dependentes do hipocampo que contribuem para essas alterações comportamentais.

No presente trabalho, quando os animais foram tratados com ESCOP, o enriquecimento aumentou a latência para a descida da plataforma (24 h) em relação ao isolamento, sugerindo um efeito antiaminésico do enriquecimento. Os dados da literatura mostram que a ESCOP diminui a orientação da atenção para alvos visuais em macacos (Brandeis et al., 1992) e altera as capacidades de atenção em seres humanos (Meador et al., 1993; Davidson et al., 1999). Assim, no presente trabalho o enriquecimento causou uma reversão desses déficits causados pela escopolamina, que poderia ser explicada por alterações induzidas pelo enriquecimento nas estruturas cerebrais, bem como, nos sistemas sensoriais como o sistema visual (Sale et al., 2004).

Os animais foram também avaliados no teste das convulsões induzidas por PTZ e tanto o enriquecimento quanto o isolamento diminuíram o efeito protetor do diazepam no surgimento e manutenção das convulsões. Esse resultado já era esperado para o isolamento devido às alterações induzidas pelo isolamento nas subunidades $\alpha 5$ - e $\alpha 4$ - do receptor GABAA que alteram a resposta de fármacos (Matsumoto et al., 2007). Para o enriquecimento, entretanto, isso se constitui em uma novidade, visto que, na maioria dos trabalhos nessa área, o enriquecimento apresenta um efeito protetor, impedindo o surgimento das convulsões (Young et al., 1999; Auvergne et al., 2002). As células granulares do GD são glutamatérgicas e enviam seus axônios para a área CA3 do hipocampo fazendo sinapse com neurônios piramidais glutamatérgicos e interneurônios gabaérgicos (Amaral e Witter, 1995; Vizi e Kiss, 1998). Assim, uma possível explicação para o resultado aqui obtido seria que o enriquecimento estaria induzindo uma alteração do circuito na área CA3 e causando mudanças nos níveis de glutamato e GABA. Em acordo com essa visão, alguns trabalhos demonstram que após o enriquecimento ambiental ocorre um aumento dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Bredy et al., 2004), enquanto os do tipo AMPA aumenta (Naka et al., 2005) ou fica inalterado (Gagne et al., 1998). Um aumento na transmissão excitatória glutamatérgica poderia, então, ser uma explicação para o resultado visto com o enriquecimento neste estudo.

Em oposição aos nossos dados com o enriquecimento que são diferentes aos da literatura, os resultados do isolamento são bem fundamentados. Há um interesse crescente no papel potencial das deficiências na transmissão GABAérgica cerebral na fisiopatologia da ansiedade, do pânico, da esquizofrenia e dos transtornos bipolares e depressivos (Pinna et al., 2006a). Camundongos isolados, usados como modelo das anomalias na arquitetura molecular dos receptores GABAA,

apresentam níveis mais elevados de medo (Pinna et al., 2006b), aumento da suscetibilidade a convulsões (Matsumoto et al., 2003), agressão (Pinna et al., 2003), e menor sensibilidade aos benzodiazepínicos (Guidotti et al., 2001), do que os camundongos alojados em grupo. Consistente com esta ideia, a infusão de corticosterona, hormônio liberado pelo estresse, acelera o *kindling* (Karst et al., 1999). Assim, nos ratos alojados em condições de isolamento, observou-se um agravamento da epileptogênese (Matsumoto et al., 2003), e dados de experimentos usando modelos de convulsão devem ser interpretados com cuidado, levando-se em conta a maneira pela qual os animais foram mantidos e alimentados. A este respeito, foi demonstrado que o isolamento social de camundongos durante 7 semanas antes dos experimentos causaram um aumento significativo da susceptibilidade para convulsões induzidas por picrotoxina, um antagonista do receptor GABAA, mas não por estricnina, um antagonista do receptor de glicina, ou por ácido caínico, um agonista do receptor de glutamato (Matsumoto et al., 2003).

Os receptores GABAA medeiam a rápida inibição no sistema nervoso central de mamíferos adultos. Os receptores GABAA são canais iônicos pentaméricos, com a maioria contendo duas subunidades α , duas β , e uma γ (Barnard et al., 1998; Sieghart e Ernst, 2005). Esses receptores são alvos de muitas drogas importantes clinicamente (Rudolph e Möhler, 2006), incluindo os benzodiazepínicos (Rudolph e Möhler, 2004), barbitúricos, neuroesteróides (Belelli e Lambert, 2005), e os anestésicos gerais (Rudolph e Antkowiak, 2004). A união dos benzodiazepínicos aos receptores GABAA modula os estados de vigília e ansiedade e uma gama de funções cognitivas e sensorio-motoras. Vale ressaltar que o diazepam, através da ativação do receptor $\alpha 1$ -GABAA, pode promover sedação, como medida pela sua ação depressora motora (Rudolph et al., 1999; McKernan et al., 2000), amnésia anterógrada, e propriedades anticonvulsivantes (Rudolph et al., 1999). A expressão das subunidades $\alpha 5$ e $\alpha 4$ do receptor GABAA está aumentada no córtex e no hipocampo de camundongos isolados socialmente, enquanto que a expressão das subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, e $\gamma 2$ está diminuída. Como a ação sedativa aguda do diazepam é mediada através de receptores $\alpha 1$ -GABAA, essa diminuição seletiva da expressão de genes que codificam as subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ nos dendritos das células piramidais corticais tem sido associada com a tolerância à ação anticonvulsivante do diazepam (Costa et al., 2002). Essa diminuição da atividade anticonvulsivante do diazepam em decorrência

da alteração das subunidades do receptor GABA induzida pelo isolamento poderia explicar nossos resultados. Isto ocorre porque uma pequena redução na eficácia da inibição mediada pelos receptores GABAA (~10%) pode aumentar consideravelmente a excitação cortical (Chagnac-Amitai e Connors, 1989), com a liberação de glutamato, o que induziria o surgimento de convulsões.

Em contrapartida, os ambientes enriquecidos aumentam muitos fatores neuroquímicos conhecidos por atenuar a suscetibilidade a crises epiléticas (Mc Namara, 1999), incluindo a expressão de neuromediadores e neuromoduladores como a noradrenalina (Naka et al., 2002), somatostatina (Nilsson et al., 1993), o receptor 5-HT1A da serotonina (Rasmuson et al., 1998) e a atividade da acetilcolinesterase (Rosenzweig et al., 1993). Além disso, um ambiente estimulante tem efeitos positivos sobre a saúde cerebral e pode fornecer alguma resiliência às lesões cerebrais. Young e colaboradores (1999) mostraram que, além de seus efeitos sobre a neurogênese, a exposição a um ambiente enriquecido (3 semanas) reduz a morte celular espontânea por apoptose no hipocampo de ratos Wistar adultos em 45%, em relação aos animais alojados em condições padrão. Essas condições ambientais protegem também contra convulsões induzidas por cainato, assim como a excitotoxicidade (Young et al., 1999). O ambiente enriquecido também induz a expressão do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e aumenta a fosforilação do fator de transcrição CREB (*cyclic-AMP response element binding*), indicando que a influência do ambiente sobre a apoptose espontânea e a resistência aos danos cerebrais pode ser mediada através da ativação do fator de transcrição e da indução da expressão de fatores de crescimento (Young et al., 1999). No presente trabalho, o enriquecimento não apresentou essa característica protetora, o que pode ser uma questão ligada a como a linhagem *Swiss* é afetada pelas condições ambientais. Não há dados na literatura para subsidiar o mecanismo envolvido nesse efeito, mas podemos especular que a novidade do enriquecimento gere em camundongos *Swiss* um aumento discreto nos níveis de corticosterona, os quais levam a alterações na arquitetura cerebral que propiciam o surgimento das convulsões. Mas como essas mudanças são discretas, não causam alterações comportamentais detectáveis nos testes aqui utilizados. No entanto, esta hipótese deve ainda ser testada.

REFLEXÕES PARA QUEM ESTUDA COMPORTAMENTO

Diante desses dados podemos repensar nossos experimentos e resultados onde os animais ficam isolados por breves ou longos períodos e começar a ver o enriquecimento como uma opção de alojamento, pois, o seu objetivo principal é dar ao animal de cativeiro condições que estimulem seu comportamento natural, favorecendo seu bem-estar e, conseqüentemente, melhorando a ciência que produzimos. Ao mesmo tempo, as condições enriquecidas não devem levar a mudanças radicais nas medidas básicas nos diferentes testes comportamentais.

Ratos e camundongos têm hábitos noturnos, porém, no laboratório não dispõem de espaço para que possam esconder-se da luz artificial e até mesmo da presença dos humanos, vistos por eles como predadores ou ameaças a sua segurança, o que pode ser proporcionado por alguns tipos de enriquecimento.

Estudos prévios têm relatado que o enriquecimento ambiental pode melhorar as funções cognitivas de animais experimentais, tais como aprendizagem e memória, enquanto que a exposição aguda ou crônica a eventos estressantes prejudica suas funções cognitivas, causando comportamentos anormais (Zhao et al., 2009). Tomando em conta a experiência humana, os estados mentais negativos, tais como medo, ansiedade e frustração, podem ser esperados se o alojamento padrão implica em um ambiente onde os animais não são capazes de realizar comportamentos para os quais eles estão motivados (Olsson e Sherwin, 2006). Estados como a ansiedade e o medo afetam as respostas fisiológicas e comportamentais dos animais em diversas situações experimentais, ameaçando a validade científica da pesquisa. A validade científica também pode ser comprometida quando um ambiente inadequado resulta em efeitos mais duradouros sobre os animais, tais como, o desenvolvimento de transtornos comportamentais, como estereotípias (Garner e Mason, 2002; Garner, 2005).

Os paradigmas experimentais geralmente aceitos apóiam a noção de que ampliando as opções de um animal para a expressão de comportamentos específicos da espécie, isso pode influenciar positivamente o seu bem-estar psicológico e fisiológico. (Hutchinson et al., 2005). Entretanto, a relevância biológica do ambiente enriquecido está longe de ser clara. Há infinitas possibilidades para enriquecer o ambiente em roedores, mas há poucas evidências sobre a contribuição dos objetos específicos ou as combinações de objetos para o desenvolvimento de comportamentos específicos. Portanto, tirar conclusões de longo alcance a partir de estudos utilizando enriquecimento ambiental parece atualmente impossível, embora isto

não diminua a importância destes estudos para um melhor entendimento das condições de bem-estar animal e, quiçá, de alguns distúrbios, como o estresse pós-traumático.

Uma objeção levantada para a sugestão de que o enriquecimento ambiental deva ser mais amplamente utilizado em modelos pré-clínicos de doenças humanas, é a do espaço, custo e a variabilidade experimental do enriquecimento ambiental (Wolfer et al., 2004). No caso de uma intervenção pré-clínica (por exemplo, um novo agente farmacológico ou celular) mostrar eficácia em condições de alojamento padrão, o ideal seria que os experimentos fossem repetidos em animais que estão alojados continuamente em condições de enriquecimento, para avaliar se a intervenção exibe eficácia mesmo diante das variáveis ambientais. O argumento implícito aqui é que as condições em que os roedores de laboratório são mantidos estão bem abaixo, em termos de estímulos, daquelas que qualquer animal selvagem em seu ambiente natural possa experimentar. Não podemos ignorar a possibilidade de que algum nível de estimulação basal (como um camundongo com níveis mínimos de enriquecimento) possa predispor o animal a responder de forma diferente aos fármacos que estão sendo testados em ensaios pré-clínicos, quando comparados a camundongos alojados em condições padrão (Burrows et al., 2010).

No entanto, quando a utilidade e necessidade do delineamento experimental contar apenas com animais alojados em condições padrão, os resultados não devem ser subestimados, o importante é colocá-los no devido contexto. As condições padrão de experimentação podem ser úteis em prover informações sobre o que um determinado gene/proteína é capaz de fazer e de sua provável contribuição para o funcionamento do cérebro. No entanto, para verificar a importância dessa informação *in vivo*, um cérebro “enriquecido” seria uma forma mais apropriada (Burrows et al., 2010).

Estudos sobre o efeito do enriquecimento em vários distúrbios cerebrais têm usado uma variedade de condições metodológicas e, enquanto não há um consenso sobre qual enriquecimento ambiental é ideal em relação aos efeitos benéficos sobre o cérebro e o comportamento, um aspecto fundamental parece ser a oferta de uma complexidade ambiental e de novidade (Nithianantharajah e Hannan, 2006).

Por outro lado, embora concordemos que o alojamento individual deve ser evitado em espécies sociais, sempre que possível, as características específicas da espécie e os possíveis benefícios do alojamento individual têm que ser levados em conta. Mesmo em

linhagens de camundongos não-agressivas, o alojamento social pode afetar os resultados experimentais pela sequência de testes a que os animais são submetidos, o que pode ter um impacto relacionado à experiência prévia dos animais (Arndt et al., 2009). Isso só pode ser evitado por meio de testes de um animal por grupo social, o que leva a um aumento indesejável do número de animais necessários por experimento. Aparentemente, o alojamento individual não estressante de camundongos machos e fêmeas poderia fornecer uma solução para este problema. Nesse tipo de alojamento o animal manteria o contato visual, auditivo e olfativo com seus con-específicos, mas não teria os confrontos e a hierarquia provenientes do contato corporal. A hierarquia seria assim estabelecida, mas sem a ocorrência de agressão física.

Em qualquer caso, ao decidir sobre uma condição de alojamento, uma análise entre os possíveis estressores a que os animais estarão expostos deve ser realizada. Algumas linhagens de camundongos podem experimentar estresse devido ao alojamento individual, dependendo, por exemplo, da duração do alojamento em uma determinada condição. Assim, a decisão sobre uma determinada condição de alojamento tem que ser feita considerando a linhagem e os testes comportamentais a serem utilizados.

6. Conclusões

É importante salientar que os efeitos do ambiente enriquecido no comportamento e na neurogênese de camundongos adultos são especialmente condicionados ao tipo de linhagem usada, ao sexo, e ao tempo do alojamento experimental e o teste usado. Na linhagem *Swiss*, a criação em condições de enriquecimento ambiental parece não ter efeito sobre a neurogênese hipocampal e não induz alterações comportamentais que possam ser detectadas pelos testes do labirinto em cruz elevado, campo aberto, natação forçada e suspensão pela cauda.

As condições de alojamento ao desmame basicamente não causaram alterações comportamentais no testes avaliados, então, concluímos que a condição de alojamento, padrão ou enriquecida, mas não o isolamento, poderia ser utilizada para a criação dos animais que forem testados no LCE, CA, TNF ou TSC. Em outros testes comportamentais, ou testes que envolvam a neurogênese no hipocampo, o ideal seria fazer uma padronização e o isolamento social deve ser evitado, devido aos prejuízos causados por essa condição de alojamento. No entanto, como relatado ao longo deste trabalho, a tendência é o uso de condições de enriquecimento, o qual traz um bem estar para o animal, sem alterar seu comportamento nos testes. Como o tipo de enriquecimento aqui estudado utilizou materiais de baixo custo, além de acessíveis (cano PVC, papel toalha, fundo de garrafa PET, canos de papel), esse tipo de enriquecimento pode ser indicado na rotina de criação e manutenção dos animais usados nas pesquisas.

Além disso, os resultados aqui apresentados mostraram que tanto o enriquecimento, quando o isolamento, no período de habituação rotineiro dos laboratórios (uma semana) antes dos testes comportamentais causa profundas mudanças que podem alterar o efeito dos fármacos padrão testados. Então, uma atenção especial deve ser dada para a condição de alojamento no período de habituação de animais no laboratório. Camundongos *Swiss* poderiam ser criados em condições de enriquecimento, como a utilizada no presente trabalho, mas o alojamento deve ser planejado de acordo com os objetivos do teste a ser utilizado para se evitar problemas experimentais, como resultados falso-positivos ou falso-negativos.

7. Referências Bibliográficas

Abramov U, Puusaar T, Raud S, Kurrikoff K, Vasar E. Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neurosci Lett.* 443:223-227, 2008.

Adamec R e Young B. Neuroplasticity in specific limbic system circuits may mediate specific kindling induced changes in animal affect—implications for understanding anxiety associated with epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* 24:705-723, 2000.

Adams KM. Refinement in the literature: Searching for environmental enrichment. AATEX 14, Special Issue, 307-312. Proc. 6th World Congress on the Alternatives & Animal Use in the Life Science. August 21-25, 2007, Tóquio/Japan. Disponível em <http://altweb.jhsph.edu/wc6/paper307.pdf>.

Alleva E. Assessment of aggressive behavior in rodents. In: Conn MP, editor. *Methods in neurosciences: paradigms for the study of behavior.* New York: Acad. Press. 111-137, 1993.

Amaral DG e Witter MP. Hippocampal formation. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System.* Academic Press, Sydney, 443-492, 1995.

Arakawa H. Interaction between isolation rearing and social development on exploratory behavior in male rats. *Behav Processes.* 70:223-234, 2005.

Arakawa H. Ontogenetic interaction between social relationships and defensive burying behavior in the rat. *Physiol Behav.* 90:751-759, 2007.

Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM, Potter H. Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *NeuroReport.* 15:1751-1754, 2004.

Arndt SS, Laarakker MC, van Lith HA, van der Staay FJ, Gieling E, Salomons AR, van't Klooster J, Ohl F. Individual housing of mice

impact on behaviour and stress responses. *Physiol Behav.* 97:385-393, 2009.

Asahi M, Hoshimaru M, Hojo M, Matsuura N, Kikuchi H, Hashimoto N. Induction of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in the immortalized neuronal progenitor cell line HC2S2 during differentiation into neurons. *J Neurosci Res.* 52:699-708, 1998.

Auvergne R, Lere C, El Bahh B, Arthaud S, Lespinet V, Rougier A, Le Gal La Salle G. Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. *Brain Res.* 954: 277–285, 2002.

Banasr M, Duman RS. Regulation of neurogenesis and gliogenesis by stress and antidepressant treatment. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 6:311-320, 2007.

Banbury Conference on genetic background in mice. Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Neuron.* 19:755-759, 1997.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Möhler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of aminobutyric acid receptors: classification on the basis of subunit structure and function. *Pharmacol Rev.* 50:291-313, 1998.

Barros DM, Ramirez MR, Izquierdo I. Modulation of working, short- and long-term memory by nicotinic receptors in the basolateral amygdala in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 83:113-118, 2005.

Bartolomucci A, Chirieleison A, Gioiosa L, Ceresini G, Parmigiani S, Palanza P. Age at group formation alters behavior and physiology in male but not female CD-1 mice. *Physiol Behav.* 82:425-434, 2004.

Bartolomucci A, Parmigiani S, Gioiosa L, Ceresini G, Palanza P. Effects of housing social context on emotional behaviour and physiological responses in female mice. *Scand J Lab Anim Sci.* 36:87-95, 2009.

Belelli D e Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABAA receptor. *Nat Rev Neurosci* 6:565-575, 2005.

Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses, and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci.* 20:1341-1347, 2004.

Bernabeu R, Schroder N, Quevedo J, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. *NeuroReport.* 8:2221-2224, 1997.

Black JE, Greenough WT, Anderson BJ, Isaacs KR. Environment and the aging brain. *Can J Psychol.* 41:111-130, 1987.

Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav.* 73:261-271, 2001.

Blake MG, Boccia MM, Krawczyk MC, Baratti CM. Scopolamine prevents retrograde memory interference between two different learning tasks. *Physiol Behav.* 102: 332 – 337, 2001.

Bliss TVP e Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232: 331-356, 1973.

Blake MG, Boccia MM, Krawczyk MC, Baratti CM. Scopolamine prevents retrograde memory interference between two different learning tasks. *Physiol Behav.* 102:332-337, 2011.

Boccia MM, Blake MG, Acosta GB, Baratti CM. Atropine, an anticholinergic drug, impairs memory retrieval of a high consolidated avoidance response in mice. *Neuroscience Lett.* 345:97-100, 2003.

Boccia MM, Blake MG, Acosta GB, Baratti CM. Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice. Effects of a new different learning task. *Neuroscience.* 135:19-29, 2005.

Boccia MM, Blake MG, Acosta GB, Baratti CM. Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice. Effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neurosci* 124:735-741, 2004.

Bond TL, Neumann PE, Mathieson WB, Brown RE. Nest building in nulligravid, primigravid and primiparous C57BL/6J and DBA/2J mice (*Mus musculus*). *Physiol Behav* 75:551-555, 2002.

Boseret G, Ball G, Balthazart J. The microtubule-associated protein doublecortin is broadly expressed in the telencephalon of adult canaries. *J Chem Neuroanat Sci*. 33: 140-154, 2007.

Boucher AA, Arnold JC, Duffy L, Schofield PR, Micheau J, Karl T. Heterozygous neuregulin 1 mice are more sensitive to the behavioral effects of Delta9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology*. 192:325-336, 2007.

Bouet V, Lecrux B, Tran G, Freret T. Effect of pre- versus post-weaning environmental disturbances on social behaviour in mice. *Neurosci Lett*. 488:221-224, 2011.

Boulanger L e Poo MM. Gating of BDNF-induced synaptic potentiation by cAMP. *Science*. 284:1982-1984, 1999.

Bourin M, Chenu F, Ripoll N, David DJ. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. *Behav Brain Res*. 164:266-269, 2005.

Brain PF, Parmigiani S, Variation I. Aggressiveness in house mouse populations. *Biol J Linn Soc Lond*. 41:257-269, 1990.

Brandeis D, Naylor H, Halliday R, Callaway E, Yano L. Scopolamine effects on visual information processing, attention, and event-related potential map latencies. *Psychophysiology*. 29:315-336, 1992.

Bredy TW, Zhang TY, Grant RJ, Diorio J, Meaney MJ. Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *Eur J Neurosci*. 20:1355-1362, 2004.

Brenes JC, Rodríguez O, Fornaguera J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav.* 89:85-93, 2008.

Brenes Saenz JC, Villagra OR, Fornaguera Trias J. Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behav Brain Res.* 169:57-65, 2006.

Briones TL, Klintsova AY, Greenough WT. Stability of synaptic plasticity in the adult rat visual cortex induced by complex environment exposure. *Brain Res.* 1018:130-135, 2004.

Brodrick T. Environmental enrichment for pigs. *Vet Rec.* 158:312, 2006.

Burgess HA e Reiner O: Doublecortin-like kinase is associated with microtubules in neuronal growth cones. *Mol Cell Neurosci.* 16:529-541, 2000.

Burrows EL, McOmish CE, Hannan AJ. Gene–environment interactions and construct validity in preclinical models of psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010.

Cai Y, Xiong K, Chu Y, Luo D, Luo X, Yuan X, Struble RG, Clough RW, Spencer DD, Williamson A, Kordower JH, Patrylo PR, Yan X. Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups. *Exp Neurol.* 216:342-356, 2009.

Cayre M, Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Strambi C, Strambi A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp Biochem Physiol.* 132:1-15, 2002.

Chagnac-Amitai Y e Connors BW. Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol.* 61:747-758, 1989.

Chapillon P, Manneche C, Belzung C, Caston J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice. 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet.* 29:41-46, 1999.

Cilia J, Reavill C, Hagan JJ, Jones DN. Long-term evaluation of isolation-rearing induced prepulse inhibition deficits in rats. *Psychopharmacology.* 156:327-337, 2001.

Chourbaji S, Brandwein C, Vogt MA, Dormann C, Hellweg R, Gass P. Nature vs. nurture: can enrichment rescue the behavioral phenotype of BDNF heterozygous mice? *Behav Brain Res*192:254-258, 2008.

Chourbaji S, Zacher C, Sanchis-Segura C, Spanagel R, Gass P. Social and structural housing conditions influence the development of a depressive-like phenotype in the learned helplessness paradigm in male mice. *Behav Brain Res.* 164:100-106, 2005.

Code of Practice for the Housing and Care of Laboratory Mice, Rats, Guinea Pigs and Rabbits, Published by the Victorian Government Department of Primary Industries, The State of Victoria, Austrália, Department of Primary Industries, ISBN 1 74146 288 6; 2004. <http://www.dpi.vic.gov.au/animalwelfare>.

Coleman J, Blatchley BJ, Williams JE. Development of the dorsal and ventral cochlear nucleoli in rat and effect of acoustic deprivation. *Dev Brain Res.* 4:119-123, 1982.

Colucci-D'Amato L e di Porzio U. Neurogenesis in adult CNS: from denial to opportunities and challenges for therapy. *Bio Essays.* 30:135-145, 2008.

Costa E, Auta J, Grayson DR, Matsumoto K, Pappas GD, Zhang X, Guidotti A GABAA receptors and benzodiazepines: a role for dendritic resident subunit mRNAs. *Neuropharmacology.* 43:925-937, 2002.

Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 21:1–14, 2005.

Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R. Behavioral phenotypes of inbred mousestrains: Implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology*. 132:107-124, 1997.

Cryan JF e Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*. 4:775-790, 2005.

Cummins RA, Walsh RN, Budtz-Olsen OE, Konstantinos T, Horsfall CR. Environmentally-induced changes in the brains of elderly rats. *Nature*. 243:516-518, 1973.

Czuczwar SJ e Frey HH. Effect of morphine and morphine-like analgesics on susceptibility to seizures in mice. *Neuropharmacology*. 25:465-469, 1986.

Dahlqvist P, Ronnback A, Bergstrom SA, Soderstrom I, Olsson T. Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Neurosci*. 19: 2288-2298, 2004.

Dai H, Okuda T, Sakurai E, Kuramasu A, Kato M, Jia F, et al. Blockage of histamine H1 receptor attenuates social isolation-induced disruption of prepulse inhibition: a study in H1 receptor gene knockout mice. *Psychopharmacology*. 183:285-293, 2005.

Da Silva NL, Ferreira VM, Carobrez A de P, Morato GS. Individual housing from rearing modifies the performance of young rats on the elevated plus-maze apparatus. *Physiol Behav*. 60:1391-1396, 1996.

Davidson MC, Cutrell EB, Marrocco RT. Scopolamine slows the orienting of attention in primates to cued visual targets. *Psychopharmacology*. 142:1-8, 1999.

Davis HP e Squire LR. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull*. 96:518-559, 1984.

Deacon RM. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. *Nat Protoc*. 1:936-946, 2006.

Decker MW e McGaugh JL. Effects of concurrent manipulations of cholinergic and noradrenergic function on learning and retention in mice. *Brain Res.* 477:29-37, 1989.

Des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrié A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala C, Kahn A, Beldjord C, Chelly J Identification of a novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell.* 92:51-61,1998.

Domeney A e Feldon J. The disruption of prepulse inhibition by social isolation in the Wistar rat: how robust is the effect? *Pharmacol Biochem Behav.* 59:883-890, 1998.

Dong H, Goico B, Martin M, Csernansky CA, Bertchume A, Csernansky JG. Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience.* 127: 601-609, 2004.

Duan X, Kang E, Liu CY, Ming G, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol.* 18:108-115, 2008.

Dudek BC, Adams N, Boice R, Abbott ME. Genetic influences on digging behaviors in mice (*Mus musculus*) in laboratory and seminatural settings. *J Comp Psychology.* 97:249-259, 1983.

Eckeli AL, Dach F, Rodrigues ALS. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effect in mice. *NeuroReport.* 11: 839-843, 2000.

Eells JB, Misler JA, Nikodem VM. Early postnatal isolation reduces dopamine levels, elevates dopamine turnover and specifically disrupts prepulse inhibition in *Nurr1*-null heterozygous mice. *Neuroscience.* 140:1117-1126, 2006.

Einon DF e Morgan MJ. A critical period for social isolation in the rat. *Dev Psychobiol.* 10:123-132, 1977.

Faherty CJ, Shepherd KR, Herasimtschuk A, Smeyne RJ. Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. *Mol Brain Res.* 134: 170-179, 2005.

Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience*. 124:71-79, 2004.

Ferchmin PA e Eterović VA. Forty minutes of experience increase the weight and RNA content of cerebral cortex in periadolescent rats. *Dev Psychobiology*. 19:511-519, 1986.

Fernández-Teruel A, Driscoll P, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Escorihuela RM. Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav*. 73:225-231, 2002.

Fernandez V, Fernandez B, Adaro L. Early polysensorial enrichment: Specific experience-induced structural changes in the parietooccipital cortex of the rat. *Growth Dev Aging*. 67:3-10, 2003.

Ferrari PF, Palanza P, Parmigiani S, Rodgers RJ. Interindividual variability in Swiss male mice: relationship between social factors, aggression, and anxiety. *Physiol Behav*. 63:821-827, 1998.

Ferrari PF, Palanza P, Rodgers RJ, Mainardi M, Parmigiani S. Comparing different forms of male and female aggression in wild and laboratory mice: an ethopharmacological study. *Physiol Behav*. 60:549-553, 1996.

Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*. 447:178-182, 2007.

Fone KC e Porkess MV. Behavioral and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 32:1087-1102, 2008.

Foster TC, Gagne J, Massicotte G. Mechanism of altered synaptic strength due to experience: Relation to long-term potentiation. *Brain Res*. 736:243-250, 1996.

Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, et al. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*. 23:247-256, 1999.

Freudenthal R, Boccia MM, Acosta GB, Blake MG, Merlo E, Baratti CM, et al. NF- κ B transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur J Neurosci*. 21:2845-2852, 2005.

Frick KM e Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiology*. 24:615-626, 2003.

Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, Francis F. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cerebral Cortex*. 13: 620-626, 2003.

Friske JE e Gammie SC. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. *Physiol Behav*. 85:187-194, 2005.

Gagne J, Gelinas S, Martinoli MG, Foster TC, Ohayon M, Thompson RF, Baudry M, Massicotte G. AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment. *Brain Res*. 799:16-25, 1998.

Galef BG Jr. Environmental enrichment for laboratory rodents: animal welfare and the methods of science. *J Appl Anim Welf Sci*. 2:267-280, 1999.

Garattini S e Valzelli L. Is the isolated animal a possible model for phobia and anxiety? *Prog Neuro-Psychopharmacol*. 5:159-165, 1981.

García-Verdugo JM, Ferrón S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: A comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bulletin*. 57:765-775, 2002.

Garner JP e Mason G. Evidence for a relationship between cage stereotypies and behavioural disinhibition in laboratory rodents. *Behav Brain Res.* 136:83-92, 2002.

Garner JP. Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. *ILAR J.* 46:106-117, 2005.

Gentsch C, Lichtsteiner M, Feer H. Different reaction patterns in individually and socially reared rats during exposures to novel environment. *Behav Brain Res.* 4:45-54, 1982.

Gentsch C, Lichtsteiner M, Feer H. Individually housed rats exceed group-housed animals in rotational movements when exposed to a novel environment. *Experientia.* 39:1412-1414, 1983.

Ge S, Sailor KA, Ming GL, Song H. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol.* 586:3759-365, 2008.

Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron.* 54:559-566, 2007.

Giovannini MG, Rakovska A, Benton RS, Pazzagli M, Bianchi L, Pepeu G. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience.* 106:43-53, 2001.

Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell.* 92:63-72, 1998.

Gould E e Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neuroscience.* 22:619-623, 2002.

Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science.* 286:548-552, 1999.

Gould E e Tanapat P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci.* 80:427-436, 1997.

Guidotti A, Dong E, Matsumoto K, Pinna G, Rasmusson AM, Costa E. *Brain Res Rev.* 37:110-115, 2001.

Guilarte TR, Toscano CD, McGlothan JL, Weaver SA. Environmental enrichment reverses cognitive and molecular deficits induced by developmental lead exposure. *Ann Neurol.* 53:50-56, 2003.

Guo M, Wu CF, Liu W, Yang JY, Chen D. Sex difference in psychological behavior changes induced by long-term social isolation in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 28:115-121, 2004.

Haenisch B e Bönisch H. Depression and antidepressants: insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. *Pharmacol Ther.* 129:352-368, 2011.

Hall FS, Humby T, Wilkinson LS, Robbins TW. The effects of isolation rearing on preference by rats for a novel environment. *Physiol Behav.* 62:299-303, 1997.

Hall FS, Huang S, Fong GF, Pert A. The effects of social isolation on the forced swim test in Fawn hooded and Wistar rats. *J Neurosci Methods.* 79:47-51, 1998.

Hall FS, Sundstrom JM, Lerner J, Perth A. Enhanced corticosterone release after a modified forced swim test in Fawn hooded rats is independent of rearing experience. *Pharmacol Biochem Behav.* 69:629-634, 2001.

Hall SD, Stanford IM, Yamawaki N, McAllister CJ, Rönqvist KC, Woodhall GL, Furlong PL. The role of GABAergic modulation in motor function related neuronal network activity. *Neuroimage.* 2011.

Hanmer LA, Riddell PM, Williams CM. Using a runway paradigm to assess the relative strength of rats' motivations for enrichment objects. *Behav Res Methods.* 42:517-524, 2010.

Hannan AJ. Novel therapeutic targets for Huntington's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 9:639-650, 2005.

Hasselmo ME e Giocomo LM. Cholinergic modulation of cortical function. *J Mol Neurosci*. 30:133-135, 2006.

Hasselmo ME. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci*. 3:351-359, 1999.

Hasselmo ME e Stern CE. Mechanisms underlying working memory for novel information. *Trends Cogn Sci*. 10:487-493, 2006.

Hattori S, Hashimoto R, Miyakawa T, Yamanaka H, Maeno H, Wada K, Kunugi H. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behav Brain Res*. 180:69-76, 2007.

Haupt M e Schaefers ATU. Effects of postweaning social and physical deprivation on locomotor activity patterns and explorative behavior in female CD-1 mice. *Dev Psychobiology*. 52:383-393, 2010.

Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, Feldon J, Moran MC, Nelson P. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience*. 100:749-768, 2000.

Hediger H. *Wild Animals in Captivity*. Dover Publications. New York. 1964.

Hilakivi LA, Ota M, Lister RG. Effect of isolation on brain monoamines and the behavior of mice in tests of exploration, locomotion, anxiety and behavioral despair. *Pharmacol Biochem Behav*. 33:371-374, 1989.

Hockly E, Cordery PM, Woodman B, Mahal A, van Dellen A, Blakemore C, Lewis CM, Hannan AJ, Bates GP. Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. *Ann Neurol*. 51:235-242, 2002.

Holland PC e Bolton ME. Hippocampus and context in classical conditioning. *Curr Opin Neurobiol*. 9:195-202, 1999.

Huck UW e Price EO. Differential effects of environmental enrichment on the open-field behavior of wild and domestic Norway rats. *J Compar Physiol Psychol.* 89:892-898, 1975.

Hutchinson E, Avery A, Woude SV. Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR J.* 46:148-161, 2005.

Ibi D, Takuma K, Koike H, Mizoguchi H, Tsuritani K, Kuwahara Y, Kamei H, Nagai T, Yoneda Y, Nabeshima T, Yamada K. Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J Neurochem.* 105:921-932, 2008.

Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol.* 164:45-52, 2000.

Iso H, Simoda S, Matsuyama T. Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. *Behav Brain Res.* 179:90-98, 2007.

Iyyilikci O, Aydin E, Canbeyli R. Blue but not red light stimulation in the dark has antidepressant effect in behavioral despair. *Behav Brain Res.* 203:65-68, 2009.

Izquierdo I e McGaugh JL. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol.* 11:517-34, 2000.

Izquierdo I, Schroder N, Netto CA, Medina JH. Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance in rats through NMDA receptor- and CaMKII-dependent mechanisms in the hippocampus. *Eur J Neurosci.* 11:3323-3328, 1999.

Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, Younkin LH, Younkin SG, Borchelt DR, Savonenko AV. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 25:5217-5224, 2005.

Jennings M, Batchelor GR, Brain PF, Dick A, Elliott H, Francis RJ, Hubrecht RC, Hurst JL, Morton DB, Peters AG, Raymond R, Sales GD, Sherwin CM, West C. Refining rodent husbandry: The mouse. Report of the Rodent Refinement Working Party. *Lab Anim.* 32:233-259, 1998.

Kang H e Schuman EM. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science.* 273:1402-1406, 1996.

Karolewicz B e Paul IA. Group housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swim and tail suspension tests. *Eur J Pharmacol.* 415:197-201, 2001.

Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:19204-19207, 2005.

Karst H, de Kloet ER, Joëls M. Episodic corticosterone treatment accelerates kindling epileptogenesis and triggers long-term changes in hippocampal CA1 cells, in the fully kindled state. *Eur J Neurosci.* 11:889-898, 1999.

Kas MJ e Van Ree JM. Dissecting complex behaviors in the post-genomic era. *Trends Neurosci.* 27:366-369, 2004.

Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 10:355-362, 2007.

Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol.* 52:135-143, 2002.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 386:493-495, 1997.

Kerjan G, Koizumi H, Han EB, Dube´ CM, Djakovic SN, Patrick GN, Baram TZ, Heinemann SF, Gleeson JG. Mice lacking doublecortin and doublecortin-like kinase 2 display altered hippocampal neuronal

maturation and spontaneous seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:6766-6771, 2009.

Kesner RP, Gilbert PE, Wallenstein GV. Testing neural network models of memory with behavioral experiments. *Curr Opin Neurobiol.* 10:260-265, 2000.

Kim JJ, Rison RA, Fanselow MS. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav. Neurosci.* 107:1093-1098, 1993.

Kim MH, Cierpicki T, Derewenda U, Krowarsch D, Feng Y, Devedjiev Y, Dauter Z, Walsh CA, Otlewski J, Bushweller JH, Derewenda ZS. The DCX-domain tandems of doublecortin and doublecortin-like kinase. *Nat Struct Biol.* 10:324-333, 2003.

Klein SL, Lambert KG, Durr D, Schaefer T, Waring RE. Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. *Physiol Behav.* 56:291-297, 1994.

Knight J e Abbot A. Full house. *Nature.* 417:785-786, 2002.

Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K, Nabeshima T, Yoneda Y, Yamada K. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav Brain Res.* 202:114-121, 2009.

Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and stroke: *J Am Heart Assoc.* 36:1278-1282, 2005.

Kondo M, Gray LJ, Pelka GJ, Christodoulou J, Tam PPL, Hannan AJ. Environmental enrichment ameliorates a motor coordination deficit in a mouse model of Rett syndrome — *Mecp2* gene dosage effects and BDNF expression. *Eur J Neurosci.* 27:3342-350, 2008.

Kosten TA, Karanian DA, Yeh J, Haile CN, Kim JJ, Kehoe P, Bahr BA. Memory impairments and hippocampal modifications in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Neurobiol Learn Mem.* 88:167-176, 2007.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 16:2027-2033, 1996.

Kwak C, Lee SH, Kaang BK. Social Isolation Selectively Increases Anxiety in Mice without Affecting Depression-like Behavior. *Korean J Physiol Pharmacol*. 13:357-360, 2009.

Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem*. 83:206-216, 2005.

Lasley SM e Thurmond JB. Interaction of dietary tryptophan and social isolation on territorial aggression, motor activity, and neurochemistry in mice. *Psychopharmacology*. 87:313-321, 1985.

Laviola G, Hannan AJ, Macri S, Solinas M, Jaber M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis*. 31:159-168, 2008.

Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*. 120:701-713, 2005.

Leconte C, Bihel E, Lepelletier FX, Bouët V, Saulnier R, Petit E, Boulouard M, Bernaudin M, Schumann-Bard P. Comparison of the effects of erythropoietin and its carbamylated derivative on behaviour and hippocampal neurogenesis in mice *Neuropharmacology*. 60:354-364, 2011.

Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:11032-11027, 2000.

Leng A, Feldon J, Ferger B. Long-term social isolation and medial prefrontal cortex: dopaminergic and cholinergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav*. 77:371-379, 2004.

Leuner B e Gould E. Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol.* 61:111-140, 2010.

Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Kozorovitskiy Y, Samburg D; Gould E, Shors TJ. Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci.* 24:7477-7481, 2004.

Lindsey BW e Tropepe V. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Prog Neurobiol.* 80:281-307, 2006.

Linster C, Maloney M, Patil M, Hasselmo ME. Enhanced cholinergic suppression of previously strengthened synapses enables the formation of self organized representations in olfactory cortex. *Neurobiol Learn Mem.* 80:302-314, 2003.

Lister R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* 92:180-185, 1987.

Li S, Tian X, Hartley DM, Feig LA. The environment versus genetics in controlling the contribution of MAP kinases to synaptic plasticity. *Curr Biol.* 16:2303-2313, 2006.

Liu X e Gershenfeld HK. Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice. *Biol Psychiatry.* 49:575-581, 2001.

Lodge DJ e Lawrence AJ. The neurochemical effects of anxiolytic drugs are dependent on rearing conditions in Fawn-Hooded rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27:451-458, 2003.

Loureiro M, Lecourtier L, Engeln M, Lopez J, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A. The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Struct Funct.* 2011. In press.

Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol.* 183:600-609, 2003.

Lynch CJ. The so-called Swiss mouse. *Lab. Anim. Care* 19:214-220, 1969.

Mackay TF e Anholt RR. Ain't misbehavin'? Genotype–environment interactions and the genetics of behavior. *Trends Genet.* 23:311-314, 2007.

Maisonnette S, Morato S, Brarrdifo ML. Role of resocialization and of 5-HT₄receptoractivationon the anxiogerriceffects induced by isolationin the elevatedplus-mazetest. *Physiol Behav.* 54:753-758, 1993.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 20:9104-9110, 2000.

Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav.* 43:281-292, 2003.

Marashi V, Barnekow A, Sachser N. Effects of environmental enrichment on males of a docile inbred strain of mice. *Physiol Behav.* 82:765-776, 2004.

Martin B, Ji S, Maudsley S, Mattson MP. “Control” laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:6127-633, 2010.

Martínez-Cué C, Rueda N, García E, Davisson MT, Schmidt C, Flórez J. Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behav Brain Res.* 163:174-185, 2005.

Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM. Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 23:649-711, 2000.

Matsumoto K, Puia G, Dong E, Pinna G. GABA(A) receptor neurotransmission dysfunction in a mouse model of social isolation-

induced stress: possible insights into a non-serotonergic mechanism of action of SSRIs in mood and anxiety disorders. *Stress*. 10:3-12, 2007.

Mattson MP e Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci*. 7:278-294, 2006.

Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem*. 16:129-137, 2005.

Mattson MP e Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci*. 7:278-294, 2006.

Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*. 26:81-104, 2003.

McGaugh JL. Memory-a century of consolidation. *Science*. 287:248-251, 2000.

McGaugh JL. Time-dependent process in memory storage. *Science*. 153:1351, 1966.

McGregor PK e Ayling SJ. Varied cages result in more aggression in male C57BL/6 mice. *Appl Anim Behav Sci*. 26:277-281, 1990.

McHugh TJ, Jones MW, Quinn JJ, Balthasar N, Coppari R, Elmquist JK, Lowell BB, Fanselow MS, Wilson MA, Tonegawa S. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science*. 317:94-99, 2007.

McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A receptor 1 subtype. *Nat Neurosci*. 3:587-592, 2000.

Mc Namara O. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature*. 399:A15-A22, 1999.

McOmish CE, Burrows E, Howard M, Scarr E, Kim D, Shin H, et al. Phospholipase C-beta1 knockout mice exhibit endophenotypes

modeling schizophrenia which are rescued by environmental enrichment and clozapine administration. *Mol Psychiatry*. 13:661-672, 2008.

McOmish CE, Hannan AJ. Enviromimetics: exploring gene environment interactions to identify therapeutic targets for brain disorders. *Expert Opin Ther Targets*. 11:899-913, 2007.

Meador KJ, Moore EE, Nicholsd ME, Abney OL, Taylor HS, Zamrini EY. The role of cholinergic systems in visuospatial processing and memory. *J Clin Exp Neuropsychol*. 15:835-42, 1993.

Melleu FF. Distribuição da imunorreatividade à doublecortina no prosencéfalo de pombos adultos (*columba livia*): avaliação dos efeitos de diferentes condições de alojamento. Comunicação pessoal. 2009.

Mesulam MM e Mufson EJ. Neural inputs into the nucleus basalis of the substantia innominata (Ch4) in the rhesus monkey. *Brain*. 107:253-274, 1984.

Micheau J e Riedel G. Protein kinases: Which one is the memory molecule? *Cell Mol Life Sci*. 55:534-548, 1999.

Miczek KA e O'Donnell JM. Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. *Psychopharmacology*. 57:47-55, 1978.

Millstein RA e Holmes A. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev*. 31:3-317, 2007.

Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond MC, Eriksson PS, Bogdanovic N. Environmental enrichment and the brain. *Progr Brain Res*. 109-133, 2002.

Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol*.16:423-431, 2004.

Morgan MJ. Effects of post-weaning environment on learning in the rat. *Anim Behav*. 21:429-442, 1973.

Morinan A e Parker V. Are socially isolated rats anxious? *Br J Pharmacol.* 86:460P, 1985.

Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behavior and HPA axis reactivity in rats. *Eur. J. Neurosci.* 18:3367-3374, 2003.

Myhrer T. Adverse psychological impact, glutamatergic dysfunction, and risk factors for Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 23:131-139, 1998.

Nacher J, Crespo C, McEwen BS. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci.* 14:629-644, 2001.

Nag N, Moriuchi JM, Peitzman CG, Ward BC, Kolodny NH, Berger-Sweeney JE. Environmental enrichment alters locomotor behavior and ventricular volume in *Mecp2* *fllox* mice. *Behav Brain Res.* 196:44-48, 2009.

Naka F, Shiga T, Yaguchi M, Okado N. An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Res.* 924:124-126, 2002.

Naka F, Narita N, Okado N, Narita M. Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain Develop.* 27:275-278, 2005.

Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature.* 373:109, 1995.

Netto CA, Dias RD, Izquierdo I. Interaction between consecutive learnings: inhibitory avoidance and habituation. *Behav Neural Biol.* 44:515-520, 1985.

Nilsson L, Mohammed AK, Henriksson BG, Folkesson R, Winblad B, Bergstrom L. Environmental influence on somatostatin levels and gene expression in the rat brain. *Brain Res.* 628:93-98, 1993.

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol.* 39:569-578, 1999.

Nithianantharajah J e Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 7:697-709, 2006.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol.* 89:369-382, 2009.

Nyberg L. Any novelty in hippocampal formation and memory? *Curr Opin Neurol.* 18:424-428, 2005.

Ohno M e Watanabe S. Interactive processing between glutamatergic and cholinergic systems involved in inhibitory avoidance learning of rats. *Eur J Pharmacol.* 312:145-147, 1996.

O'Keefe J. A review of hippocampal place cells. *Prog Neurobiol.* 13:419-439, 1979.

Olsson AS e Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Anim.* 36:243-270, 2002.

Olsson IA e Sherwin CM. Behaviour of laboratory mice in different housing conditions when allowed to self-administer an anxiolytic. *Lab Anim.* 40:392-399, 2006.

Otto T, Eichenbaum H, Wiener SI, Wible CG. Learning-related patterns of CA1 spike trains parallel stimulation parameters optimal for inducing hippocampal LTP. *Hippocampus.* 1:181-192, 1991.

O'Tuathaigh CM, Hryniewiecka M, Behan A, Tighe O, Coughlan C, Desbonnet L, et al. Chronic adolescent exposure to Delta-9-tetrahydrocannabinol in COMT mutant mice: impact on psychosis-related and other phenotypes. *Neuropsychopharmacology.* 35:2262-2273, 2010.

Palanza P, Parmigiani S, vom Saal FS. Male urinary cues stimulate intra-sexual aggression and urine-marking in wild female mice, *Mus musculus domesticus*. *Anim Behav.* 1:245-247, 1994.

Pang TY, Du X, Zajac MS, Howard ML, Hannan AJ. Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 18:753-766, 2009.

Parikh V e Sarter M. Cholinergic mediation of attention. Contributions of phasic and tonic increases in prefrontal cholinergic activity. *Ann NY Acad Sci.* 1129:225-235, 2008.

Parker V e Morinan A. The socially isolated rat as a model for anxiety. *Neuropharmacology.* 25:663-664, 1986.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 14:149-167, 1985.

Pellow S e File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 24: 525-529, 1986.

Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology.* 177:245-255, 2005.

Pham TM, Soderstrom S, Winblad B, Mohammed AH. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. *Behav Brain Res.* 103:63-70, 1999.

Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharm Biochem Behav.* 73:167-175, 2002.

Phillips RG e LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neuroscience.* 106:274-285, 1992.

Piazza FV, Pinto GV, Trott G, Marcuzzo S, Gomez R, Fernandes Mda C. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behav Brain Res.* 217:16-20, 2011.

Pinna G, Agis-Balboa RC, Zhubi A, Matsumoto K, Grayson DR, Costa E, Guidotti A. Imidazenil and diazepam increase locomotor activity in mice exposed to protracted social isolation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:4275-4280, 2006.b

Pinna G, Costa E, Guidotti A. Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Psychopharmacology.* 186:362-372, 2006a

Pinna G, Dong E, Matsumoto K, Costa E, Guidotti A. In socially isolated mice, the reversal of brain allopregnanolone down-regulation mediates the anti-aggressive action of fluoxetine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:2035-2040, 2003.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 229:327-336, 1977.

Porsolt RD e Lenégre A. Behavioral models of depression. In *Experimental approaches to anxiety and depression* (eds. J.M. Elliot, D.J. Heal, and C.A. Marsden), Wiley, Chichester, United Kingdom. 73-87, 1992.

Prior H e Sachser N. Effects of enriched housing environment on the behaviour of young male and female mice in four exploratory tasks. *J Exp Anim Sci.* 37:57-68, 1995.

Pryce CR, Bettschen D, Nanz-Bahr NI, Feldon J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on conditioned stimulus, context, and spatial learning and memory in adult rats. *Behav Neurosci.* 117:883-893, 2003.

Pryce CR, Ruedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav Rev.* 29:649-674, 2005.

Quan MN, Tian YT, Xu KH, Zhang T, Yang Z. Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats. *Neuroscience*. 169:214-222, 2010.

Rakic P. Limits of neurogenesis in primates. *Science*. 227:1054-1056, 1985.

Rakic P. Neurogenesis in adult primates. *Prog Brain Res*. 138:3-14, 2002.

Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA. Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci*. 26:12237-12241, 2006.

Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci*. 3:238-244, 2000.

Rao MS e Shetty AK. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 19:234-246, 2004.

Rasmuson S, Olsson T, Henriksson BG, Kelly PA, Holmes MC, Seckl JR, Mohammed AH. Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Mol Brain Res*. 53:285-290, 1998.

Rattka M, Brandt C, Bankstahl M, Bröer S, Löscher W. Enhanced susceptibility to the GABA antagonist pentylentetrazole during the latent period following a pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Neuropharmacology*. 60:505-512, 2011.

Rehn B, Panhuber H, Laing DG, Breipohl W. Spine density on olfactory granule cell dendrites is reduced in rats reared in a restricted olfactory environment. *Dev Brain Res*. 40:143-147, 1988.

Reiner O, Coquelle FM, Peter B, Levy T, Kaplan A, Sapir T, Orr I, Barkai N, Eichele G, Bergmann S. The evolving doublecortin (DCX) superfamily. *BMC Genomics*. 188:1-16, 2006.

Renner MJ e Rosenzweig MR. Enriched and impoverished environments. New York: Springer-Verlag, 1987.

Restivo L, Ferrari F, Passino E, Sgobio C, Bock J, Oostra BA, et al. Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:11557-11562, 2005.

Rex A, Voigt JP, Gustedt C, Beckett S, Fink H. Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague-Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology*. 177:23-34, 2004.

Rice MC e O'Brien SJ. Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice. *Nature*. 283:157-161, 1980.

Richter SH, Garner JP, Würbel H. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat Methods*. 6:257-261, 2009.

Rizzi S, Bianchi P, Guidi S, Ciani E, Bartesaghi R. Neonatal isolation impairs neurogenesis in the dentate gyrus of the guinea pig. *Hippocampus*. 17:78-91, 2007.

Rodgers RJ e Cole JC. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol Behav*. 54:729-736, 1993.

Roldán G, Bolaños-Badillo E, González-Sánchez H, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. Selective M1 muscarinic receptor antagonists disrupt memory consolidation of inhibitory avoidance in rats. *Neurosci Lett*. 18:93-96, 1997.

Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res*. 153:563-576, 1978.

Rosenzweig MR e Bennett EL. Psychobiology of plasticity: Effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res*. 78:57-65, 1996.

Rossato JI, Zinn CG, Furini C, Bevilaqua LR, Medina JH, Cammarota M, Izquierdo I. A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. *Acad Bras Cienc.* 78:515-523, 2006.

Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci.* 24:1850-1856, 2006.

Roy V, Belzung C, Delarue C, Chapillon P. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol Behav.* 74:313-320, 2001.

Rudolph U e Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* 5:709-720, 2004.

Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, and Möhler H. Benzodiazepine actions mediated by specific aminobutyric acid receptor subtypes. *Nature.* 401:796-800. 1999.

Rudolph U e Möhler H. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44:475-498, 2004.

Rudolph U e Möhler H. GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol.* 6:18-23, 2006.

Sadananda M. Adult neurogenesis in the brain of higher vertebrates: implications of the paradigm shift. *Curr Sci.* 3:297-307, 2004.

Sáenz JCB, Villagra OR, Trías. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats *Behav Brain Res.* 169:57-65, 2006.

Sahakian BJ, Robbins TW, Morgan MJ, Iversen SD. The effects of psychomotor stimulants on stereotypy and locomotor activity in sociallydeprived and control rats. *Brain Res.* 84:195-205, 1975.

Sahay A e Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci.* 10:1110-1115, 2007.

Sale A, Berardi N, Maffei L. Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci.* 32:233-239, 2009.

Sale A, Putignano E, Cancedda L, Landi S, Cirulli F, Berardi N, et al. Enriched environment and acceleration of visual system development. *Neuropharmacology.* 47:649-660, 2004.

Sapir T, Horesh D, Caspi M, Atlas R, Burgess HA, Wolf SG, Francis F, Chelly J, Elbaum M, Pietrokovski S, Reiner O. Doublecortin mutations cluster in evolutionarily conserved functional domains. *Hum Mol Genet.* 9:703-712, 2000.

Schapiro SJ e Kessel AL. Weight gain among juvenile rhesus macaques: a comparison of enriched and control groups. *Lab Anim Sci.* 43:315-318, 1993.

Smith JK, Neill JC, Costall B. Post-weaning housing conditions influence the behavioral effects of cocaine and d-amphetamine, *Psychopharmacology.* 131:23-33, 1997.

Sevilla DF, Cabezas C, de Prada AN, Sanchez-Jimenez A, Bruno W. Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol.* 545:51-63, 2002.

Sieghart W e Ernst M. Heterogeneity of GABAA receptors: revived interest in the development of subtype-selective drugs. *Curr Med Chem.* 5:217-242, 2005.

Simonetti T, Lee H, Bourke M, Leamey CA, Sawatari A. Enrichment from birth accelerates the functional and cellular development of a motor control area in the mouse. *PLoS ONE* 4: e6780, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0006780

Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Cameron HA. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci.* 29:14484-14495, 2009a.

Snyder JS, Glover LR, Sanzone KM, Kamhi JF, Cameron HA. The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult generated granule cells. *Hippocampus*. 19:898-906, 2009b.

Solinas M, Chauvet C, Thiriet N, El Rawas R, Jaber M. Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:17145-1750, 2008.

Solinas M, Thiriet N, El Rawas R, Lardeux V, Jaber M. Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. *Neuropsychopharmacology*. 34:1102-1111, 2009.

Spires TL, Grote HE, Varshney NK, Cordery PM, van Dellen A, Blakemore C, et al. Environmental enrichment rescues protein deficits in amouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *J Neurosci*. 24:2270-2276, 2004.

Spires TL e Hannan AJ. Nature, nurture and neurology: gene-environment interactions in neurodegenerative disease. *FEBS J*. 272:2347-2361, 2005.

Spolidoro M, Sale A, Berardi N, Maffei L. Plasticity in the adult brain: lessons from the visual system. *Exp Brain Res*. 192:335-341, 2009.

Starkey NJ, Normington G, Bridges N J. The effects of individual housing on 'anxious' behaviour in male and female gerbils. *Physiol Behav*. 90:545-552, 2007.

Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia*. 46:41-52, 2004.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. 85:367-370, 1985.

Steven ND, Kenneth JC, Ted A, Peter VN. Environmental enrichment modifies the pka-dependence of hippocampal ltp and improves hippocampus-dependent Memory. *Learn Mem*. 8:26-34, 2001.

Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nat Neurosci.* 9:526-533, 2006.

Suckow MA, Danneman P, Brayton C. *The Laboratory Mouse*. Boca Raton: CRC Press. 2001.

Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature.* 442:929-933, 2006.

Thorsell A, Slawecki CJ, El Khoury A, Mathe AA, Ehlers CL. The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 83:28-34, 2006.

Tint I, Jean D, Baas PW, Black MM. Doublecortin associates with microtubules preferentially in regions of the axon displaying actin-rich protrusive structures. *J Neurosci.* 29:10995-11010, 2009.

Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci.* 10:727-734, 2007.

Torasdotter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed AH. Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav Brain Res.* 93:83-90, 1998.

Tóth M, Halász J, Mikics E, Barsy B, Haller J. Early social deprivation induces disturbed social communication and violent aggression in adulthood. *Behav Neurosci.* 122:849-854, 2008.

Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron.* 47:803-815, 2005.

Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell.* 87:1327-1338, 1996.

Uylings HBM, Kuypers K, Diamond MC, Veltman WAM. Effects of differential environments in plasticity of dendrites of cortical pyramidal neurons in adult rats. *Exp Neurol.* 62:658-677, 1978.

Van Dellen A, Blakemore C, Deacon R, York D, Hannan AJ. Delaying the onset of Huntington's in mice. *Nature.* 404:721-722, 2000.

Van den Buuse M, Garner B, Koch M. Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. *Curr Mol Med.* 3:459-471, 2003.

Van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V, et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med.* 7:e1000245, 2010.

Van de Weerd HA, Aarsen EL, Mulder A, Kruitwagen CL, Hendriksen CF, Baumans V. Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. *J Appl Anim Welf Sci.* 5:87-109, 2002.

Van de Weerd HA, Baumans V, Koolhaas JM, Van Zutphen LF. Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *J Exp Anim Sci.* 36:117-127, 1994.

Van de Weerd HA, Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Strength of preference for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Appl Anim Behav Sci.* 55:369-382, 1998.

Van Loo PLP, Van de Weerd HA, Van Zutphen LFM. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Lab Anim.* 38:178-188, 2004.

Van Loo PL, Van Zutphen LF, Baumans V. Male management: coping with aggression problems in male laboratory mice. *Lab Anim.* 37:300-313, 2003.

Van Oortmerssen GA. Biological significance, genetics and evolutionary origin of variability in behavior within and between inbred strains of mice (*Mus musculus*): a behaviour genetic study. *Behaviour.* 38:1-91, 1971.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci.* 1:191-198, 2000.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 2:266-270, 1999.

Van Wass M e Soffie M. Differential environmental modulations on locomotor activity, exploration and spatial behaviour in young and old rats. *Physiol Behav.* 59:265-271, 1996.

Varty GB, Marsden CA, Higgins GA. Reduced synaptophysin immunoreactivity in the dentate gyrus of prepulse inhibition-impaired isolation-reared rats. *Brain Res.* 824:197-203, 1999.

Veena J, Srikumar BN, Mahati K, Bhagya V, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS. Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats. *J Neurosci Res.* 87:831-843, 2009.

Venero C e Borrell J. Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur J Neurosci.* 11:2465-2473, 1999.

Vianna MR, Coitinho AS, Izquierdo I. Role of the hippocampus and amygdala in the extinction of fear-motivated learning. *Curr Neurovasc Res.* 1: 191, 2004.

Vizi ES e Kiss JP. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus* 8:566-607, 1998.

Võikar V, Polus A, Vasar E, Rauvala H. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav.* 4:240-252, 2005.

Von Bohlen e Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tis Res.* 329:409-420, 2007.

Wahlsten D, Metten P, Phillips TJ, Boehm SL II, Burkhart-Kasch S, Dorow J, Doerksen S, Downing C, Fogarty J, Rodd-Henricks K, Hen R,

McKinnon CS, Merrill CM, Nolte C, Schalomon M, Schlumbohm JP, Sibert JR, Wenger CD, Dudek BC, Crabbe JC. Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol.* 54:283-311, 2003.

Wainwright PE, Levesque S, Krempulec L, Bulman-Fleming B, McCutcheon D. Effects of environmental enrichment on cortical depth and Morris-maze performance in BGD2F2 mice exposed prenatally to ethanol. *Neurotoxicol Teratol.* 15:11-20, 1993.

Walker MP. A refined model of sleep and the time course of memory formation. *Behav Brain Sci.* 28:51-64, 2005.

Whitaker-Azmitia P, Zhou F, Hobin J, Borella A. Isolation-rearing of rats produces deficits as adults in the serotonergic innervation of hippocampus. *Peptides.* 21:1755-1759, 2000.

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioral-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* 52:90-110, 2005.

Wolfer DP, Litvin O, Morf S, Nitsch RM, Lipp HP, Wurbel H. Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour. *Nature.* 432:821-822, 2004.

Wood NI, Carta V, Milde S, Skillings EA, McAllister CJ, Ang YL, Duguid A, Wijesuriya N, Afzal SM, Fernandes JX, Leong TW, Morton AJ. Responses to environmental enrichment differ with sex and genotype in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *PLoS One.* 5:e9077, 2010.

Woods BT. Is schizophrenia a progressive neurodevelopmental disorder? Toward a unitary pathogenetic mechanism. *Am J Psychiatry.* 155:1661-1670, 1998.

Wright IK, Upton N, Marsden CA. Resocialization of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. *Physiol Behav.* 50:1129-1132, 1991.

Xerri C, Zennou-Azougui Y, Coq J-O. Neuroprotective effects on somatotopic maps resulting from piracetam treatment and environmental enrichment after focal cortical injury. *ILAR J.* 44:110-124, 2003.

Xu Z, Hou B, Zhang Y, Gao Y, Wu Y, Zhao S, Zhang C. Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. *Eur Neuropsychopharmacol.* 19:868-875, 2009.

Yates G, Panksepp J, Ikemoto S, Nelson E, Conner R. Social-isolation effects on the behavioral despair forced swimming test-effect of age and duration of testing. *Physiol Behav.* 49:347-353, 1991.

Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Medicine.* 4:448-453, 1999.

Yukio Ago, Shinsuke Arikawa, Miyuki Yata, Koji Yano, Michikazu Abe, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Antidepressant-like effects of the glucocorticoid receptor antagonist RU-43044 are associated with changes in prefrontal dopamine in mouse models of depression. *Neuropharmacology.* 55:1355-1363, 2008.

Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice. *Science.* 276:248-250, 1997.

Zhao MG, Toyoda H, Wang YK, Zhuo M. Enhanced synaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of adult wild mice as compared with that in laboratory mice. *Mol Brain.* 2:11, 2009.

Zhu SW, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res.* 169:10-20, 2006.

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of hippocampus. *J Neurosci.* 6:2950-2967, 1986.