

RAFAELA COSTA

Efeitos da estimulação tátil em ratos adultos jovens, submetidos ou não ao modelo de estresse crônico.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia área de concentração Fisiologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Piracicaba
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C823e Costa, Rafaela.
Efeitos da estimulação tátil em ratos adultos jovens, submetidos ou não ao modelo de estresse crônico. / Rafaela Costa. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Fernanda Klein Marcondes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Rato - Comportamento. I. Marcondes, Fernanda Klein. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Effects of handling in young-adult rats, submitted or not to chronic stress

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Rat - Behavior

Área de Concentração: Fisiologia Oral

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Fernanda Klein Marcondes, Ana Paula Tanno, Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Data da Defesa: 24-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata RAFAELA COSTA aprovada.

Fernanda Klein Marcondes

Profª. Dra. FERNANDA KLEIN MARCONDES

Ana Paula Tanno

Profª. Dra. ANA PAULA TANNO

Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Profª. Dra. ELENICE APARECIDA DE MORAES FERRARI

Agradecimentos Especiais

À Deus por sempre guiar e iluminar meu caminho.

*Meu eterno agradecimento à minha orientadora **Profa. Fernanda Klein Marcondes**, pela dedicação a esse trabalho, ensinamentos, confiança e respeito.*

*Aos meus pais **Fernando e Nádia** pelo amor incondicional, dedicação e por sempre me apoiar.*

*Aos meus irmãos **Luis Fernando e Gabriela** pelo amor e carinho.*

*À minha **Avó Nair** pelos ensinamentos de vida e por sempre rezar por mim.*

*Ao meu amigo **Sturion** pela amizade, pelo carinho, conselhos e incentivo.*

*Às minhas criaturinhas mais fofas do mundo por me fazerem companhia na fase de redação desse trabalho e por encherem a minha vida e minha casa de ternura e alegria: **Estrela, Pérola, Luna, Pandora, Penélope e Senninha**.*

*Ao amor da minha vida **Maurício** por sempre estar ao meu lado apoiando e estimulando a realização dos meus sonhos; por toda cumplicidade, sinceridade, amizade, carinho, respeito e paciência.*

Agradecimentos

“Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado o nosso caminho. Cada pessoa que passa em nossa vida é única, sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso”.

*Aos Professores **Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury, Dra. Maria Cecília de Arruda Veiga e Dra. Maria José da Costa Sampaio Moura** pelo aceite e colaborações como componentes da banca de qualificação desse trabalho.*

*Aos Professores **Dra. Ana Paula Tanno e Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari** pelo aceite e colaborações como componentes da banca dessa defesa.*

*Aos Professores **Dra. Maria Cristina Volpato e Dra. Tatiana de Sousa Cunha** pelo aceite e colaborações como componentes da banca suplente dessa defesa.*

*Aos meus melhores amigos Biólogos **Daniel, Elaine, Erica, George, Renata Rufino, Renata Fernandes**, pela amizade, companheirismo e cumplicidade que continuaram e ficaram cada vez mais forte após a Faculdade.*

*Aos amigos **Elaine Fernandes, Carlos, Eduardo, Luis e Roseleine** pelo carinho e pela amizade.*

*Às colegas de trabalho e acima de tudo grandes amigas **Rosemary e Mariana**, pela cumplicidade, amizade, paciência, compreensão e por estarem comigo desde o começo desta jornada.*

*Aos amigos do Laboratório de Estresse **Patrícia, Gabriela, Vinícius, Larissa, Vander, Eduardo, Bruna** pela amizade e companheirismo.*

*Aos amigos da Fisiologia **Mariana Arthuri, Luana, Karla, Juliana, Nádia, Ana Paula, Monaliza, Letícia e Ivan** pela amizade e pelos bons momentos de descontração.*

*Ao técnico **Carlos Alberto Feliciano**, pela essencial colaboração e suporte técnico no laboratório da Fisiologia.*

*As secretárias **Eliete, Elisa e Eliane**, sempre prestativas e atenciosas.*

*À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas** pelas condições oferecidas para realização deste trabalho.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa na concessão da Bolsa de Mestrado.*

*À **Fundação de Desenvolvimento da Unicamp – FUNCAMP e Fundo de Apoio ao ensino, à pesquisa, e à extensão – FAEPEX** aos auxílios concedidos.*

*Aos **animais de pesquisa** devemos nosso eterno reconhecimento e respeito, porque seu sacrifício está nos ajudando a desvendar os mistérios da Ciência.*

“O desenvolvimento da ciência a favor do homem não pode nem deve servir de alicerce para o uso indiscriminado e o desrespeito com os animais. É necessária uma postura ética frente à necessidade do desenvolvimento da ciência e a adoção de medidas que diminuam o sofrimento dos animais e favoreçam seu bem-estar.”

Marcel Frajblat - Sociedade Brasileira em Ciências de Animais de Laboratório – SBCAL.

“O que o bem-estar animal precisa é de pessoas educadas com cabeças frias e corações quentes preparados para ver o sofrimento dos animais e procurando meio prático de aliviá-los.”

Charles Hume - Universities Federation for Animal Welfare – UFAW.

RESUMO

Problemas emocionais como ansiedade e depressão, relacionados ao estresse, estão cada vez mais presentes na sociedade moderna, e o suporte social, mais especificadamente suporte familiar, pode exercer um importante papel em atenuar os efeitos de diversos estressores. Em modelos animais o enriquecimento ambiental tem sido utilizado para melhora do bem estar animal. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental por meio da estimulação tátil em ratos submetidos ou não a estresse crônico. No Capítulo I, foi evidenciado que a estimulação tátil diminuiu a ansiedade e aumentou as respostas indicadoras de aprendizado e memória em ratos jovens-adultos. No Capítulo II, foram avaliados os efeitos do estresse crônico moderado e imprevisível e da estimulação tátil sobre respostas comportamentais (ansiedade, anedonia, aprendizado e memória) e sobre o perfil lipídico. O estresse aumentou a secreção de corticosterona avaliada quinze dias após o fim do estresse; induziu anedonia evidenciada pela diminuição da preferência pela sacarose 1%; aumentou a atividade locomotora; teve efeito negativo sobre o aprendizado e memória; e aumentou a concentração sérica de triglicérides, colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL). A manipulação diminuiu a ansiedade em animais submetidos ou não ao estresse crônico; diminuiu a secreção de corticosterona induzida pelo estresse e cancelou a redução do aprendizado e retenção de memória induzida pelo estresse crônico. Os resultados obtidos mostram que a estimulação tátil de ratos adultos jovens produziu efeitos comportamentais positivos que podem melhorar o bem –estar animal e diminuir efeitos deletérios induzidos pelo estresse crônico.

Palavras-chave: estresse crônico, estimulação tátil, ansiedade, memória, anedonia.

ABSTRACT

Emotional problems such as stress related anxiety and depression, are becoming increasingly present in modern society, and social support, more specifically familiar support, can play an important role in attenuating the effects of various stressors. In animal models environmental enrichment has been used to improve animal welfare. The aim of this study was to evaluate the effects of environmental enrichment by handling, in rats submitted and those not submitted to chronic stress. In chapter 1 it was shown that handling diminished anxiety, and enhanced learning abilities and memory indicating response in young-adult rats. In chapter 2 the effects of handling on behavioral (anxiety, anhedonia, learning and memory) and metabolic responses induced by chronic mild unpredictable stress. Whereas stress raised the corticosterone secretion evaluated fifteen days after the end of stress; induced anhedonia evidenced by a 1% decrease in sucrose preference; increased locomotor activity; had negative effects on learning and memory; and raised the serum concentration of triglycerides, total cholesterol and low density lipoprotein (LDL). Handling reduced the anxiety in animals both when they were and were not submitted to chronic stress; diminished the corticosterone secretion induced by the stress and cancelled the reduction of learning and memory retention induced by the chronic stress. The results obtained showed that the handling of young-adult rats produced positive behavioral effects capable of improving the animal's welfare and diminishing the deleterious effects induced by chronic stress.

Keywords: chronic stress, handling, anxiety, memory, anhedonia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. CAPÍTULO I: <i>Handling improves spatial memory and decreases anxiety in young-adult rats</i>	5
3. CAPÍTULO II: <i>Efeito da estimulação tátil sobre as respostas comportamentais e metabólicas induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível, em ratos</i>	21
4. CONCLUSÃO.....	45
5. REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS	
Certificado de aprovação pelo comitê de ética na experimentação animal.....	49
Confirmação de envio do artigo para publicação – Capítulo I.....	50

1. INTRODUÇÃO

Problemas emocionais relacionados ao estresse, como a ansiedade e a depressão, estão cada vez mais presentes na sociedade moderna. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), nos próximos 20 anos a depressão se tornará a doença mais comum, afetando maior número de pessoas comparado a outros problemas de saúde, incluindo câncer e AIDS. Ao longo da vida, a prevalência de depressão varia de 10 a 25% para mulheres e 5 a 12% para os homens (Weissman *et al.*, 1996; Dam *et al.*, 2000).

Complementando estudos clínicos e epidemiológicos, modelos animais têm sido muito úteis no estudo dos efeitos deletérios desencadeados pelo estresse crônico. Apesar de estar bem estabelecido que roedores adaptam-se à aplicação repetida de estímulos estressores, esta adaptação não ocorre nos protocolos de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) (Moreau *et al.*, 1993; Willner, 2005), nos quais a exposição a diferentes estressores alternadamente induz elevação mantida dos níveis de corticosterona e estado de anedonia, evidenciado pela diminuição no consumo e preferência por solução doce. Como estes efeitos são cancelados por antidepressivos tricíclicos e agonistas de receptores 5HT_{1c}, a indução de anedonia por ECMI constitui um modelo com validade preditiva para estudos de mecanismos envolvidos na depressão humana (Moreau *et al.*, 1993; Moreau, 1997; Willner, 2005).

Em resposta ao estresse crônico também ocorrem alterações no processo cognitivo. O estresse crônico causa diminuição do aprendizado e memória espacial em camundongos avaliados no labirinto aquático “Morris water maze test” (Song *et al.*, 2006) e déficit de memória de reconhecimento (Orsetti *et al.*, 2007). Além disso, estudo realizado por Henningsen *et al.* (2009) demonstrou que ratos submetidos ao modelo de estresse crônico moderado apresentaram redução nas respostas indicadoras do desempenho cognitivo avaliado no teste de comportamento espontâneo no labirinto em Y. Esses efeitos podem estar relacionados a alterações na regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) associadas a alterações patológicas no córtex pré-frontal e hipocampo. Os elevados níveis de glicocorticóides podem levar à atrofia do hipocampo (Lupien *et al.*, 1998) e alterações no tamanho dos neurônios hipocampais (Stockmeier *et al.*, 2004). As alterações na função do hipocampo contribuem para alterar a emocionalidade (Jaako-Movits *et al.*,

2005), ocorrência de déficit cognitivo (Witgen *et al.*, 2005) e distúrbio de memória (Orsetti *et al.*, 2007).

Contudo os organismos podem expressar diferentes respostas adaptativas de acordo com o ambiente em que vivem. Em humanos, o suporte social está diretamente relacionado com o desenvolvimento e manutenção de diversos aspectos psicológicos do ser humano tal como a auto-estima. Além disso, o suporte social, mais especificadamente suporte familiar, pode exercer um importante papel em atenuar os efeitos de diversos estressores na vida das pessoas (Baptista, 2005).

Trabalhos em humanos têm relacionado o abraço ou suporte social com alterações neuroendócrinas. O suporte social diminui a concentração de cortisol salivar (Kirschbaum *et al.*, 1995) e a reatividade cardiovascular (Uchino & Garvey, 1997) em resposta ao estresse agudo realizado em laboratório. Holt-Lunstad *et al.* (2008) observaram que o abraço realizado entre casais resulta em efeitos fisiológicos benéficos, casais que se abraçavam apresentaram maior concentração de ocitocina salivar e menor concentração de cortisol salivar tanto em homens quanto em mulheres (marido e esposa). Neste estudo, os homens (maridos) também apresentaram redução na pressão sistólica, mostrando que a interação pessoal através do abraço é um importante fator para doenças relacionadas ao estresse. Além disso, a terapia através do toque também representa um método efetivo em aumentar o bem estar psicológico em pacientes com problemas emocionais (Weze *et al.*, 2007).

Em roedores, a manipulação neonatal realizada nos primeiros 21 dias de vida do animal diminui a resposta ao medo e a ansiedade dos filhotes quando estes tornam-se adultos (Francis & Meaney, 1999; Meaney, 2001). Na fase neonatal, o sistema nervoso está em processo de maturação e apresenta-se menos sensível à ativação pelo estresse. Nessa fase, interferência externas sobre o comportamento maternal e a manipulação dos filhotes pode ocasionar alterações permanentes no comportamento do animal quando adulto (Levine, 2000), tendo sido observado que a manipulação neonatal pode alterar a habilidade do organismo em responder e adaptar-se a estímulos estressores (Levine, 2005).

Animais adultos que haviam sido submetidos à manipulação neonatal apresentam alteração na atividade do eixo HPA, com menor liberação na quantidade do

hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio corticotrófico (ACTH) e corticosterona frente a estímulos estressores (Meaney *et al.*, 1991; Plotsky *et al.*, 1993; Bhatnagar *et al.*, 1995). Esse efeito parece estar relacionado ao aumento da população de receptores de glicocorticóides tipo II no hipocampo e cortex pré-frontal aumentando a efetividade do feedback negativo (Meaney, 1996). Além disso, a manipulação diminuiu a expressão do gene CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo e no núcleo central da amígdala (Francis & Meaney, 1999).

No período pós desmame ou em ratos jovens e adultos, também tem sido demonstrado que a manipulação influencia a exploração e a emocionalidade de roedores. Rebouças & Schmidek (1997) observaram que animais adultos (180 dias de vida) submetidos à manipulação durante o período de pós-desmame, período juvenil e adulto (manipulados de 21 a 180 dias de vida) também apresentam alterações comportamentais. No teste de campo aberto, animais manipulados tiveram melhor desempenho e, no teste exploratório de ambientes complexos, tiveram maior comportamento exploratório, deixando o compartimento seguro mais rapidamente, explorando o ambiente por mais tempo e percorrendo maior distância quando comparados a animais não manipulados (Rebouças & Schmidek, 1997).

A manipulação do animal adulto também reflete positivamente no bem estar animal e pode interferir na resposta do animal a determinado experimento. O bem-estar animal é baseado no princípio do cuidado e uso dos animais pelo homem, sendo também importante para qualidade e confiabilidade da pesquisa (Poole, 1996). Hemsworth & Barnett (1987) demonstraram que porcos manipulados de forma cuidadosa e gentil com aproximação amigável do tratador apresentaram maior taxa de crescimento e maior sucesso reprodutivo. Outro estudo, realizado em fazendas, demonstrou que a criação de gado, de forma cuidadosa e amigável onde ocorre interação do criador com os animais, pode resultar no aumento da produção de leite quando comparado aos animais criados de forma adequada, mas sem interação ou relacionamento entre o criador e os animais (Seabrook, 1984).

Na literatura, alterações nos processos de aprendizado e memória, assim como alterações no comportamento de ansiedade, também têm sido observadas em respostas ao

enriquecimento ambiental, que consiste na combinação de interação social e objetos (brinquedos) colocados nas gaiolas dos animais (Hoffman, 2009).

Nesse contexto, em ratos Wistar, a exposição ao ambiente enriquecido foi capaz de prevenir déficit na memória de reconhecimento causado pela idade e reduzir a ansiedade em novo ambiente. Ao mesmo tempo foi capaz de aumentar a neurogênese e a expressão de marcadores sinápticos no hipocampo sugerindo um efeito favorável na memória e emocionalidade relacionados à elevação da taxa de produção de neurônios e aumento na plasticidade sináptica que pode contribuir com o aumento da função neuronal no hipocampo (Leal-Galicia *et al.*, 2008). Além disso, ratos expostos ao ambiente enriquecido também apresentaram maior número de quadrantes percorridos no teste de campo aberto e maior tempo de exploração dos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado demonstrando um efeito ansiolítico do ambiente enriquecido (Leal-Galicia *et al.*, 2007).

Considerando que existem mecanismos neurológicos e fisiológicos envolvidos no comportamento e resposta ao estresse que podem ser afetados pela manipulação neonatal e pelo enriquecimento ambiental, e que há poucos dados sobre os possíveis efeitos da estimulação tátil em animais adultos, nossa proposta é estudar o efeito da estimulação tátil como forma de enriquecimento ambiental em ratos adultos jovens submetidos ou não ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível.

Com esta finalidade foram realizados dois experimentos que serão apresentados nos Capítulos I e II desta dissertação.

2. CAPÍTULO I

O objetivo do Capítulo I foi avaliar os efeitos da estimulação tátil sobre o nível de ansiedade, aprendizado e memória de ratos adultos jovens. A metodologia utilizada e os resultados obtidos serão apresentados na forma de manuscrito, o qual foi submetido para publicação no periódico *Physiology & Behavior* (ANEXO). Desta forma, o Capítulo I corresponde ao artigo “Handling improves spatial memory and decreases anxiety in young-adult rats”, de autoria de Rafaela Costa, Mariana Leite Tamascia e Fernanda Klein Marcondes.

Handling improves spatial memory and decreases anxiety in young-adult rats.

Rafaela Costa, Mariana Leite Tamascia and Fernanda Klein Marcondes*

*¹Laboratory of Stress, Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School,
University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba - SP, Brazil.*

* Author for correspondence:

Departamento de Ciências Fisiológicas

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Universidade Estadual de Campinas

Av. Limeira, 901 - Vila Areião

13414-903. Piracicaba -SP, Brazil

E-mail: fklein@fop.unicamp.br

Phone/Fax: + 55 19 2106 5380/ 2106 5212

Running head: Handling and memory

Abstract

COSTA R, TAMASCIA ML, MARCONDES FK. *Handling improves spatial memory and decreases anxiety in young-adult rats*. *PHYSIOL BEHAV* 00(0) 000-000, 2009 – In young-adult rodents the handling procedure has been reported to influence exploration and emotionality. The aim of this study was to examine the effects of handling on memory and anxiety levels of young-adult rats and for this purpose, the animals were divided into Control and Handling groups. The handling procedure was applied for five weeks, five days a week. In the 6th week, animals' anxiety level was evaluated in the elevated plus maze (EPM) test. Learning and spatial long-term memory, were evaluated 48h later, by measuring the transfer latency in the EPM. In the EPM test, the handling group presented significant increase in the percentage of time spent in the open arms, percentage of entries into open arms and number of visits to the end of the open arms, without difference in the number of entries into the closed arms in comparison with the control group. In both groups, transfer latency in EPM was shorter in the second trial than in the first trial. The handling group showed lower transfer latency in the first and second trial when compared with Control one. The data obtained suggest that handling decreases anxiety levels and seems to improve learning skills and memory in young-adult animals. These effects on behavior are similar to those observed in animals submitted to enriched environment or neonatal handling.

KEYWORDS: handling, anxiety, learning, memory, elevated plus-maze, rats.

1. Introduction

The quality of family life influences the development of individual differences in vulnerability to illness throughout life¹. Recently, researches on human behavior and child development have been conducted in order to clarify the relationship between the environment of the child or adolescent and their health and development². The social, emotional and economic context appears to have an impact on the quality of the parent-child relationship and scientists have recognized a positive relationship between social support and health. Social support has been defined in the literature as the assistance and protection given to others and emotional support involves the provision of caring, empathy, love and trust³. Moreover, clinical studies have shown that children and adolescents who suffer stressful events may be prone to emotional and behavioral disorders such as anxiety and depression in adulthood^{4,5,6}.

In rats, neonatal handling (brief periods of handling during the postnatal periods – 1st to 21st days of life) affects the development resulting in physiological and behavioral changes that continue into adulthood^{7,8,9}. Neonatal handling increased curiosity, decreased emotionality in a novel environment^{10,11}, anxiety levels and reduced stress responses^{12,13,14,15} in adulthood. Neonatal handling also affects cognitive behavior in adulthood^{16,17,18}. This procedure can induce plastic changes in the central nervous system reducing the number of cells in the paraventricular nucleus of hypothalamus¹⁹ and the locus coeruleus²⁰ and may improve hippocampal-dependent memory²¹.

There are few studies about the effect of the handling procedure applied in post weaning periods or in young-adults animals. REBOUÇAS and SCHMIDEK²² observed that adult rats (180 days old) submitted to handling (from 21st to 180th days of life) had better performance in the open field (they crossed more sections and had more rearings) and exploration test (they left the safe compartment faster, remained more time in the “environment” and traveled longer distances) indicating that handled rats show less fearful and more exploratory behavior.

Anxiety is the emotion related to risk-assessment behavior that is evoked in situations when the danger is uncertain; either because the context is novel or because the danger stimulus had been present in the past but is no longer in the environment²³. In

addition to clinical studies, animal models have been used to clarify the neurobiological and genetic bases of anxiety disorders²⁴ as well as to understand the influence of environmental factors on behavior.

One of the widely used anxiety paradigms is the elevated plus maze (EPM) test, which is based on the conflict displayed by rodents between the drive to explore a new environment and the fear of open surroundings, and was validated by PELLOW *et al.*²⁵. Moreover, it was found that the cognitive process could also be studied using EPM. ITOH *et al.*²⁶ have proposed that transfer latency - the time in which the animal moves from the open arms to the closed arm with all four legs - in EPM could be used as a measure of learning and memory in mice. These authors showed that learning and memory impairment induced by post-training administration of scopolamine or electro-convulsive shock could be detected in EPM. Moreover, administration of scopolamine in rats resulted in impairment of learning ability and memory when tested in EPM and in the water maze, when compared with the control group²⁷. Therefore, EPM can be used in to evaluate anxiety, as well as cognitive behavior.

Based on the fact that neonatal handling can influence anxiety and cognitive behavior and can promote neurological change, and that little is known about handling in the juvenile or adult developmental periods, the purpose of this study was to analyze the effects of handling on young-adult animals (2 months old) with regard to anxiety, learning and memory evaluated in the EPM.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Twenty-four Specific Pathogen Free (SPF) male Sprague-Dawley rats (2 months old, weighing about 300-320g) were obtained from Multidisciplinary Center for Biological Investigation of the University of Campinas (CEMIB). In order to maintain (SPF) status only researchers had access to animal facilities, wearing lab coat, gloves, respiratory protection and foot protection. The rats had access to filtered water and food *ad libitum* and were housed in individual home cages (65 x 25 x 15cm) with the floor covered by autoclaved sawdust, in a temperature-controlled room (22°C ± 2°C) for 5 weeks. The

light phase of 12 h light, 12 h dark cycle was between 6 a.m. and 6 p.m. All animal procedures were approved by the Institutional Committee on Animal Research Ethics (CEEA–UNICAMP/Protocol Number 1361-1) and carried out in accordance with the norms of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). After 1 week of adaptation in animal facilities prior to beginning the experiment, the rats were randomly divided into two groups: Control and Handling. Initial and final body weights were monitored.

2.2. Handling

The animals were handled during the young-adult developmental period (60 days old). The procedure was applied five days a week, between 4 and 6 p.m., during 5 weeks. It consisted of periods of 5 minutes, during which the animal was removed from its cage, placed on the experimenter's lap, or on a table top and had its neck and back gently stroked by the experimenter's fingers^{7,22}. Control group was left undisturbed during the entire protocol, except for regular cage cleaning, which was done for all animals.

2.3. Apparatus

The plus-maze apparatus used in these experiments was made of plywood and consisted of two open arms (50 cm long \times 10 cm wide) and two closed arms (50 cm long \times 10 cm wide, with 40 cm high walls) that extended from a central platform elevated 50 cm above the floor. The open arms had no walls, only a surrounding ledge (1mm broad and 5mm high) to prevent rats from falling off the arms^{28,29}. A video-camera was located above the center of the maze for monitoring the rats and all data were analyzed by the EthoVision® XT 4.1 Software Leesburg, VA - U.S.A by Noldus, Netherlands— licensed to the University of Campinas.

2.4. Anxiety Test

Two days after the last handling session the anxiety level was evaluated in the EPM test. The rats were transferred to the experimental room and thirty minutes later, each rat was placed in the central square facing a closed arm, and allowed to explore the elevated

plus-maze for 5 minutes^{25,28}. The apparatus was cleaned before each animal was introduced^{28,29}.

Each rat was tested only once. In this test, the following measures were evaluated: percentage of entries into the open arms ($100 \times \text{open}/\text{total}$), percentage of time spent in the open arms ($100 \times \text{open}/\text{total}$), number of entries into the close arms and number of visit to the end of the open arms. The percentage of time spent in the open arms was interpreted as an index of fear and anxiety, while the number of closed-arm entries was an index of general activity^{25,30}. The percentage of open-arm entries is related to both anxiety and general activity^{28,30}.

2.5. Transfer Latency in the Elevated Plus-Maze

Forty-eight hours after the anxiety analysis, cognitive behavior was evaluated by using the elevated plus-maze learning task. In order to record transfer latency in the first trial (training), each rat was placed at the end of one open arm facing away from the central platform and the transfer latency was recorded. In the second trial (retention test), 24 hours later, transfer latency was again recorded³¹.

2.6. Statistical Analyses

Data obtained in the elevated plus-maze test were analyzed by the Student's-*t* test. Two-way Anova followed by Tukey post hoc test for multiple comparisons of means was used to test the effects of trial, handling, and their interaction, on data obtained at the transfer latency in the elevated plus-maze. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The results are presented as means \pm SEM.

3. Results

There were no differences in the number of entries into the closed arms between the control and handling groups ($p > 0.05$; Fig 1A). Rats submitted to handling showed significant increase in the percentage of time spent in the open arms (11.1 ± 2.8 vs. 4.3 ± 1.4 %; $p < 0.05$; Fig 1B), in the percentage of entries into open arms (39.0 ± 5.2 vs.

22.0 ± 5.7 %; $p < 0.05$; Fig 1C) and in the number of visits to the end of the open arms (4.0 ± 1.4 vs. 0.18 ± 0.1 ; $p < 0.05$; Fig. 1D) in comparison with the control group.

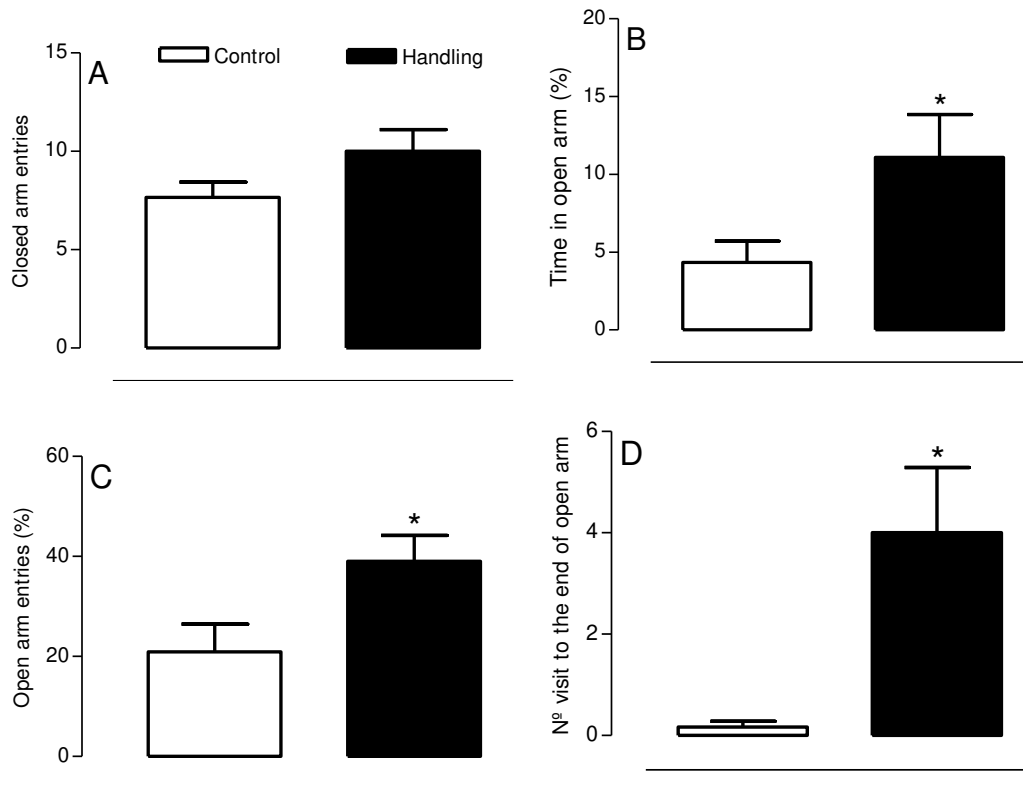


Figure 1 - Number of entries into the closed arm (A), percentage of time spent (B), and of entries (C) into the open arms, and number of visits to the end of the open arms (D) during the elevated plus-maze test of control and handling groups (N=12/group). *statistically different from control group ($p < 0.05$; Student's-*t* test).

In both groups the transfer latency in the elevated plus-maze was shorter in the second trial than in the first trial. The handled group showed lower transfer latency in both the first (3.81 ± 0.40 vs. 7.22 ± 1.25 s; $p < 0.05$; Fig 2) and second trial (1.33 ± 0.24 vs. 2.73 ± 0.67 s; $p < 0.05$; Fig. 2) when compared with the control group.

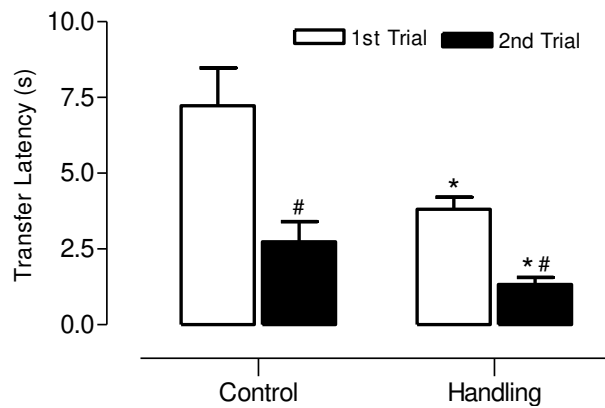


Figure 2 - Transfer latency to the closed arm in the elevated plus maze of the control and handling groups. *statistically different from control group. #statistically different from the first trial ($p < 0.05$; bifactorial ANOVA and Tukey test, $N = 12/\text{group}$).

4. Discussion

The present study showed that handling decreased anxiety levels and improved cognitive behavior in young-adult Sprague-Dawley rats. The anxiolytic effect of handling was shown by the increase in the percentage of open arm entries and percentage of time spent in the open arms of the EPM. The lack of difference between the control and handled groups in the number of closed arm entries indicates that locomotor activity seems to have remained unchanged. Therefore the increase in the open arm exploration can not be explained by reduced activity and seems to be associated with the anxiolytic effects of handling.

The results of this study are in agreement with those of SCHMITT and HIEMKE³² who reported that daily handling of adult male Sprague-Dawley rats for one week before the EPM test enhanced the percentage of time and entries into open arms. In the open field test the handling group increased the time spent moving about in the inner zone, the time spent in the center field and decreased the latency to reach the center field. Moreover, female rats (128 days old), submitted to daily handling during the post weaning, juvenile and young adult developmental periods (28th to 128th days of life) presented reduced emotionality and increased performance in the open field test, shown by a higher number of crossing sections and rearings³³.

Moreover, AULICH *et al.*³⁴ reported that daily handling for seven consecutive days during the juvenile period (30 days old), reduced the time spent in the dark compartment of the box in the light/dark test. These authors concluded that handling decreases emotionality in rats and one could suppose that handled animals are habituated to being seized by experimenter.

In rats and mice neonatal handling decreased the fear and anxiety of pups in adulthood^{1,35}, and this effect may be related to the increase in brain benzodiazepine and γ -amino-butyric acid (GABA_A) receptors³⁶ induced by neonatal handling¹⁴. Handled animals also present lower hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) activity characterized by a lower level of release of corticotropin-releasing hormone (CRH), adrenocorticotropin hormone (ACTH) and corticosterone in response to stressors^{37,38,39,40}. These effects seem to be related to earlier maturation of adrenocortical response as well as to the increase in the population of glucocorticoid receptors in the hippocampus and frontal cortex induced by handling⁴¹. Furthermore, neonatal handling decreases CRH gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and central nucleus of the amygdala resulting in lower CRH mRNA and CRH content in the hypothalamus in basal conditions³⁵. Therefore, all these alterations seem to improve negative feedback sensitivity of HPA axis. It also contributes to decreasing the magnitude of behavioral and endocrine response to stressors in adulthood.

In the present study handling also affected the cognitive behavior of young-adult rats. The prolongation of the transfer latency in the 2nd trial (retention) indicates an impairment of the learning and memory processes, since the administration of scopolamine or electro-convulsive shock prolonged the transfer latency in EPM in comparison with the saline-treated animals²⁶. Differences in the 1st trial (training) did not directly influence the transfer latency in the retention test⁴². Therefore the lower transfer latency in the second compared with first trial, observed in both control and handling groups suggest that the animals remembered the escape behavior to the enclosed arms, reflecting retention of information or memory. In addition, the lower transfer latency of handled rats in comparison with control animals in the first trial, indicated that the handling procedure also enhanced learning and memory processes in adult rats.

Although all the animals in the present study had previous knowledge of EPM, because the anxiety test was performed before transfer latency evaluation, the reduction of latency time from the first to second session shows that this contact did not interfere with the memory test. Moreover, TREIT *et al.*⁴³ reported that exposure to EPM for 18 consecutive days did not increase avoidance of open arms, showing that the animals were not habituated to the EPM. In the present study all the tests were done in the same individuals in order to reduce the number of animals used, in compliance with the ethics in animal experimentation.

In the literature, most studies have related anxiety, fear behavior, learning and memory processes to an environmental enrichment protocol that consisted of large cages, with several types of objects such as toys, climbing and nesting material, which are frequently changed⁴⁴. Rats maintained in an enriched environment spent more time in the open arms⁴⁵ and had higher percentages of open arms entries in the EPM⁴⁶ than non-handled controls, indicating that environmental enrichment decreases the anxiety level. BENAROYA-MILSHTEIN *et al.*⁴⁷ also showed that environmental enrichment reduced anxiety behavior in the elevated plus maze, and attenuated the behavioral and physiological responses to an electrical shock in mice. These authors also demonstrated that enriched conditions increased natural killer cell activity. LEAL-GALICIA *et al.*⁴⁸ showed that the enriched environment was able to prevent age-related recognition memory deficit, reduce anxiety in a novel environment, and increase neurogenesis and synaptic markers in the hippocampus. These authors suggested that the favorable effect of an enriched environment on memory and emotionality are related to the elevated level of newly generated neurons and the increased synaptic plasticity that may contribute to the enhancement of neuronal function in the hippocampus.

Although handling is also an enrichment protocol, there are no studies about its effect on young adult rats, since the studies are generally performed in the neonatal period. In this context the present study shows that the effects of handling also seem to be positive in adult animals since it seems to improve animal welfare. Animal welfare is based in the principle of care in the use of animals by man, and is important to the quality and reliability of research⁴⁹.

In conclusion the results of the present study suggest that the effect of handling is not restricted to an early period of life but that the procedure is effective even when applied to young-adult rats, since handled young-adult animals showed a lower anxiety level and improvement in learning and memory ability. However further studies are necessary to investigate the neurological mechanism involved in these effects. Moreover, the behavioral alterations caused by manipulation showed that it is necessary to pay attention so that all the experimental groups are manipulated with the same frequency, to assure more consistent results in research.

5. Acknowledgements

The authors thanks FAPESP for its support (FKM 05/59483-4) and Margery Galbraith for English editing. RC and MLT were recipients of FAPESP fellowships.

6. References*

1. Meaney, M.J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* 2001, 24:1161-1192.
2. Martins, M.F.D.; Costa, J.S.D. da; Saforcada, E.T.; Cunha, M.D.C. Qualidade do ambiente e fatores associados: um estudo em crianças de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 2004, 20(3):710-718.
3. Langford, C.P.; Bowsher, J.; Maloney, J.P.; Lillis, P.P. Social support: a conceptual analysis. *J Adv Nurs.* 1997, 25(1):95-100.
4. Lau, B.W.K. Does the stress in childhood and adolescence matter? A psychological perspective. *J R Soc Health.* 2002, 122(4):238-244.
5. Pine, D.S.; Cohen, J.A. Trauma in children and adolescents: risk and treatment of psychiatric sequelae. *Biol Psychiatry.* 2002, 51(7):519-531.
6. Penza, K.M.; Heim, C.; Nemeroff, C.B. Neurobiological effects os childhood abuse: implications for pathophyof depression and ansiety. *Arch Womens Ment Health.* 2006, 6:15-22.
7. Weininger, O. Physiological damage under emotional stress as a function of early experience. *Science.* 1954, Feb 26;119(3087):285-286.

*Apresentada de acordo com as exigências do periódico *Physiology & Behavior*

8. Levine, S. Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science*. 1967, Apr 14;156(772):258-60.
9. Costela, C.; Tejedor-Real, P.; Mico, J.A.; Gibert-Rahola, J. Effect of neonatal handling on learned helplessness model of depression. *Physiol Behav*. 1995, 57(2):407-410.
10. Meerlo, P.; Horvath K.M.; Nagy, G.M.; Bohus, B.; Koolhaas, J.M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol*. 1999, 11(12):925-933.
11. Papaioannou, A.; Gerozissis, K.; Prokopiou, A.; Bolaris, S.; Stylianopoulou, F. Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and the vulnerability for depressive behaviour. *Behav Brain Res*. 2002 1;129(1-2):131-139.
12. Vallée, M.; Mayo, W.; Maccari, S.; Le Moal, M.; Simon H. Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. *Brain Res*. 1996,18;712(2):287-292.
13. Vallée, M.; Mayo, W.; Dellu, F.; Le Moal, M.; Simon, H.; Maccari, S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci*. 1997, 17 (7):2626-2636.
14. Caldji, C.; Francis, D.; Sharma, S.; Plotsky, P.M.; Meaney, M.J. The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 2000, 22(3):219-229.
15. Padoin, M.J.; Cadore, L.P.; Gomes, C.M.; Barros, H.M.; Lucion, A.B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci*. 2001, 115(6):1332-1340.
16. Meaney, M.J.; Aitken, D.H.; van Berkel, C.; Bhatnagar, S.; Sapolsky, R.M. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science*. 1988, Feb 12;239(4841 Pt 1):766-768.
17. Bredy, T.W.; Lee, A.W.; Meaney, M.J.; Brown, R.E. Effect of neonatal handling and paternal care on offspring cognitive development in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). *Horm Behav*. 2004, 46(1):30-38.
18. Kosten, T.A.; Lee, H.J.; Kim, J.J. Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain Res*. 2007, 18;1154:144-153.
19. Winkelmann-Duarte, E.C.; Todeschin, A.S.; Fernandes, M.C.; Bittencourt, L.C.; Pereira, G.A.; Samios, V.N.; Schuh, A.F.; Achaval, M.E.; Xavier, L.L.; Sanvitto, G.L.; Mandarim-de-Lacerda, C.A.; Lucion, A.B. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Res*. 2007,19;1170:20-30.

20. Lucion, A.B.; Pereira, F.M.; Winkelman, E.C.; Sanvitto, G.L.; Anselmo-Franci J.A. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behav Neurosci.* 2003, 117(5):894-903.
21. Tang, A.C. Neonatal exposure to novel environment enhances hippocampal-dependent memory function during infancy and adulthood. *Learn Mem.* 2001, 8(5):257-264.
22. Rebouças, R.C.; Schmidek, W.R. Handling and isolation in three strains of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. *Physiol Behav.* 1997, 62(5):1159-1164.
23. Graeff, F.G. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis *Rev Bras Psiquiatr.* 2007, 29 Suppl 1:S3-6.
24. Green, S.; Hodges, H. Animal models of anxiety. In: Willner P, editor. Behavioural models in psychopharmacology. Cambridge: Cambridge University Press. 1991, 21-49.
25. Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rats. *J. Neurosci. Meth.* 1985, 14(3):149-167.
26. Itoh, J.; Nabeshima, T.; Kameyama, T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology (Berl).* 1990,101(1):27-33.
27. Parle, M.; Singh, N.; Reversal of memory deficits by Atorvastatin and Simvastatin in rats. *Yakugaku Zasshi.* 2007, 127(7):1125-1137.
28. Marcondes, F.K.; Miguel, K.J.; Melo, L.L.; Spadari-Bratfisch, R.C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav.* 2001, 74(4-5): 435-440.
29. Rocha, V.M.; Calil, C.M.; Ferreira, R.; Moura, M.J.; Marcondes, F.K. Influence of anabolic steroid on anxiety levels in sedentary male rats. *Stress.* 2007, 10(4):326-331.
30. Cruz, A.P.M.; Frei, F.; Graeff, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994, 49: 171-176.
31. Raghavendra, V.; Chopra, K.; Kulkarni, S.K. Brain renin angiotensin system (RAS) in stress-induced analgesia and impaired retention. *Peptides.* 1999, 20:335-342.
32. Schmitt. U.; Hiemke, C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998, 59(4):807-811.
33. Genaro, G.; Schmidek, W.R. The influence of handling and isolation postweaning on open field, exploratory and maternal behavior of female rats. *Physiol Behav.* 2002, 75(5):681-8.

34. Aulich, D.; Spielhofen, J.; Raaijmakers, G.M. The influence of adult handling and social isolation on dark preference in albino rats. *Anim. Behav.* 1974, 22:987-990.
35. Francis, D.D.; Meaney, M. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol.* 1999, 9(1):128-134.
36. Escorihuela, R.M.; Fernández-Teruel, A.; Núñez, F.J.; Zapata, A.; Tobeña, A. Infantile stimulation and the role of the benzodiazepine receptor system in adult acquisition of two-way avoidance behavior. *Psychopharmacology (Berl).* 1992, 106(2):282-284.
37. Meaney, M.J.; Aitken, D.H.; Bhatnagar, S.; Sapolsky, R.M. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol Aging.* 1991, 12 (1):31-38.
38. Plotsky, P.M.; Meaney, M.J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor(CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993, 18(3):195-200.
39. Bhatnagar S, Meaney MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J Neuroendocrinol.* 1995 Feb;7(2):97-108.
40. Levine, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2005, 30(10):939-946.
41. Meaney, M.J.; Diorio, J.; Francis, D.; Widdowson, J.; LaPlante, P.; Caldji, C.; Sharma, S.; Seckl, J.R.; Plotsky, P.M. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci.* 1996, 18(1-2):49-72.
42. Itoh, J.; Nabeshima, T.; Kameyama, T.; Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur J Pharmacol.* 1991, 26;194(1):71-76.
43. Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993, 44(2):463-469.
44. Fernández-Teruel, A.; Giménez-Llort, L.; Escorihuela, R.M.; Gil, L.; Aguilar, R.; Steimer, T.; Tobeña, A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav.* 2002,73(1):233-45.
45. Leal-Galicia, P.; Saldívar-González, A.; Morimoto, S.; Arias, C. Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: Role of individual responsiveness to anxiety. *Developmental Neurobiology.* 2007, 67, 395-405.
46. Peña, Y.; Prunell, M.; Dimitantos, V.; Nadal, R.; Escorihuela, R.M. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behav Brain Res.* 2006, 1;174(1):181-187.

47. Benaroya-Milshtein, N.; Hollander, N.; Apter, A.; Kukulansky, T.; Raz, N.; Wilf, A.; Yaniv, I.; Pick, C.G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci.* 2004, 20(5):1341-7.
48. Leal-Galicia, P.; Castañeda-Bueno, M.; Quiroz-Baez, R.; Arias, C. Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiol Learn Mem.* 2008, 90(3):511-518.
49. Poole, T. Happy animals make good science. *Lab Anim.* 1997, 31(2):116-124.

3. CAPÍTULO II

O Capítulo II corresponde ao artigo, em fase de redação, “Efeito da estimulação tátil sobre as respostas comportamentais induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível, em ratos”, de autoria de Rafaela Costa, Mariana Leite Tamascia, Gabriela Lopreti Guarda, Larissa Briet, Bruna Santos, Fernanda Klein Marcondes. O objetivo deste capítulo foi estudar os efeitos da estimulação tátil sobre as alterações comportamentais e metabólicas induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível, em ratos adultos jovens. Este artigo será submetido para publicação em periódico internacional indexado, após as sugestões da banca examinadora e tradução do texto para a língua inglesa.

Efeito da estimulação tátil sobre as respostas comportamentais e metabólicas induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível, em ratos

Rafaela Costa, Mariana Leite Tamascia, Gabriela Lopreti Guarda, Larissa

Briet, Bruna Santos, Fernanda Klein Marcondes*

Laboratório de Estresse, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas

*Autor para correspondência

Departamento de Ciências Fisiológicas

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Av. Limeira, 901 - Vila Areião

13414-903. Piracicaba -SP, Brazil

E-mail: fklein@fop.unicamp.br

Phone/Fax: + 55 19 2106 5380/ 2106 5212

Resumo

O estresse crônico presente na sociedade moderna pode estar relacionado com o desenvolvimento de problemas emocionais como ansiedade e depressão e demandam estudos para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações fisiológicas deles decorrentes. Além disso, o contexto ambiental pode influenciar as respostas aos estímulos estressores, assim nossa proposta foi estudar os efeitos da estimulação tátil sobre as alterações comportamentais e metabólicas induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível, em ratos adultos jovens. Foram utilizados ratos Sprague-Dawley com 2 meses de idade, no início do experimento, divididos em 4 grupos experimentais: Controle (C), Controle Manipulado (CM), Estresse (E) e Estresse Manipulado (EM). Nos grupos submetidos à manipulação, as sessões de estimulação tátil foram realizadas cinco dias por semana, durante 7 semanas. Nos grupos submetidos ao estresse crônico, a aplicação dos estímulos estressores foi realizada nas semanas 3, 4 e 5, segundo o modelo de estresse moderado crônico e imprevisível. Na 6^a semana os animais foram submetidos a testes comportamentais, para avaliação da ansiedade, aprendizado e memória. Quinze dias após o final do estresse os animais foram sacrificados por decapitação para determinação das concentrações sanguíneas de lipídios e corticosterona. Os grupos E ($45,4 \pm 8,6$) e EM ($25,9 \pm 3,6$) apresentaram maior concentração de corticosterona (ng/mL) comparados aos grupos C ($2,0 \pm 0,6$) e CM ($1,9 \pm 0,6$) respectivamente. No grupo EM a concentração de corticosterona foi menor comparado ao E. No teste do labirinto em cruz elevado (LCE), os grupos submetidos ao estresse apresentaram aumento no número de entradas nos braços fechados (E = $13,3 \pm 0,9$ vs. C = $7,5 \pm 0,8$; EM = $12,9 \pm 0,9$ vs. CM = $10,0 \pm 1,1$). A manipulação aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos (CM = $39,0 \pm 5,2$ vs. C = $22,0 \pm 5,7$; E = $30,3 \pm 5,0$ vs. EM = $41,5 \pm 4,4$).e tanto estresse quanto a manipulação aumentaram a porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos (E = $12,4 \pm 2,5$; C = $4,3 \pm 1,4$; EM = $17,2 \pm 2,7$; CM = $11,1 \pm 2,8$). No teste de latência de transferência sobre o LCE os 4 grupos apresentaram redução no tempo de latência (s) na 2^a sessão em relação à 1^a sessão. Os grupos submetidos ao estresse apresentaram maior tempo de latência na 1^a (E = $11,9 \pm 3,1$ vs. C = $7,2 \pm 1,2$; EM = $6,5 \pm 1,5$ vs. CM = $3,8 \pm 0,4$) e na 2^a sessão (E = $6,9 \pm 1,4$ vs. C = $2,7 \pm 0,7$; EM = $2,8 \pm 0,6$ vs. CM = $1,3 \pm 0,2$) em relação ao controle. A manipulação causou redução no

tempo de latência na 1ª e na 2ª sessão em relação aos grupos não manipulados. Além disso, o estresse causou aumento nas concentrações séricas de triglicérides, colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL) em animais submetidos ou não a estimulação tátil. Nossos dados sugerem que o estresse altera a atividade locomotora e tem efeito negativo sobre o aprendizado e memória. A manipulação diminui a ansiedade, a secreção de corticosterona e cancela a redução do aprendizado e retenção de memória, induzidos pelo estresse.

1. Introdução

A reação de estresse que ocorre frente a um estímulo aversivo, denominado estressor, irá resultar em um conjunto de respostas adaptativas que tem como objetivo a manutenção da homeostase do organismo (Cannon *et al.*, 1927; Selye, 1936). A persistência e a intensidade exagerada do estresse podem deixar o organismo suscetível a disfunções e patologias devido ao déficit das reservas de energia onde o organismo começa a falhar nos mecanismos de adaptação (Tanno & Marcondes, 2002). Na sociedade atual o estresse parece ser um dos principais fatores ambientais que predispõem um indivíduo à depressão. Na maioria dos casos, os episódios de depressão são atribuídos à ocorrência de eventos estressantes, principalmente de origem psicossociais (Post, 1992).

No entanto, existem diferenças individuais em resposta a estímulos estressores, o organismo pode responder de forma diferente ao estresse, dependendo do ambiente em que vive. Investigações sobre o comportamento humano e o desenvolvimento infantil através de estudos em diversas áreas têm tentado esclarecer a relação entre o ambiente da criança ou adolescente, sua saúde e seu desenvolvimento (Martins *et al.*, 2004), famílias negligentes ou que não demonstram carinho produzem efeitos emocionais negativos em crianças (Repetti *et al.*, 2002). Alguns desses efeitos são identificados em estruturas e funções cerebrais sendo fatores de risco para transtornos emocionais como depressão e estresse pós-traumático (Kaufman *et al.*, 2000; Vermetten *et al.*, 2006).

Em roedores o modelo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) é utilizado como um modelo para estudos de mecanismos envolvidos na depressão humana, este modelo envolve uma exposição do animal a diferentes estímulos estressores durante

um período crônico e tem sido validado como modelo de depressão por induzir elevação mantida dos níveis de corticosterona e estado de anedonia, evidenciado pela diminuição no consumo e preferência por solução doce e pela diminuição no desempenho da auto-estimulação do hipotálamo ventrolateral. Além disso, esses efeitos induzidos pelo ECMI são cancelados por antidepressivos tricíclicos e agonistas de receptores 5HT_{1c}, (Moreau *et al.*, 1993; Moreau, 1997; Willner, 2005).

Nesse contexto, para entender as influências do ambiente em resposta ao estresse crônico em roedores são utilizadas formas de enriquecimento ambiental ou manipulação relacionada aos cuidados maternos. O cuidado maternal em roedores é determinante na reação emocional e na resposta ao estresse (Francis *et al.*, 1999) e a manipulação neonatal, realizada nos primeiros 21 dias de vida do animal, aumenta o cuidado maternal e diminui a resposta ao medo e a ansiedade dos filhotes quando estes tornam-se adultos (Francis & Meaney, 1999; Meaney, 2001). Vallé *et al.* (1997) demonstraram que a manipulação induz redução na ansiedade, caracterizada pelo aumento na porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Além disso esses autores observaram que em resposta ao estresse por restrição não houve diferença na concentração de corticosterona imediatamente após o estresse entre os grupos, no entanto, os animais manipulados apresentaram menor concentração de corticosterona 90 min após o final do estresse em relação ao controle mostrando uma maior efetividade do feedback negativo.

Uma forma de enriquecimento ambiental, que consiste na combinação de interação social e objetos (brinquedos) colocados nas gaiolas dos animais, tem demonstrado que diferentes condições ambientais desencadeiam alterações neurobiológicas e comportamentais positivas em animais (Hoffman, 2009). O ambiente enriquecido diminui a ansiedade, aumentando o número de entrada e tempo gasto nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (Fernandez-Teruel *et al.*, 1997; Chapillon *et al.*, 1999) e aumentando a performance no campo aberto (Brenes *et al.*, 2006). Alguns estudos sugerem que o enriquecimento ambiental torna o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) mais adaptativo e eficiente (Mohammed *et al.*, 1993; Larsoon *et al.*, 2002) diminuindo o nível de corticosterona em resposta ao estresse (Francis *et al.*, 2002; Welberg *et al.*, 2006).

Além disso, Nerem *et al* (1979) estudaram a influência do ambiente social em coelhos alimentados com dieta para indução de aterosclerose. Como forma de enriquecimento ambiental esses autores utilizaram interação entre o animal e o pesquisador onde os animais foram manipulados (acariciados) diariamente e observaram uma redução na área com lesões indicativas de aterosclerose nesses animais em relação ao controle. Esses dados sugerem que o enriquecimento ambiental melhora o bem estar animal e pode diminuir os efeitos negativos do estresse sobre o sistema cardiovascular.

O teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) esta baseado no conflito gerado pela tendência natural dos roedores de explorar ambientes novos e evitar situações potencialmente perigosas e foi validado por Pellow *et al.* (1985) como uma ferramenta útil para avaliar ansiedade em ratos, no entanto estudos na literatura têm demonstrado que alteração no processo cognitivo também pode ser avaliada utilizando o LCE. Itoh *et al.* (1990) propuseram que o tempo de latência de transferência sobre o LCE (tempo em que o animal se move da ponta de um dos braços abertos até um dos braços fechados) pode ser utilizado para avaliar aprendizado e memória espacial em roedores. Esses autores mostraram que a diminuição no aprendizado e memória induzida pela administração de escopolamina ou choque eletro-convulsivo pode ser detectado por esse método. Além disso, a administração de escopolamina resultou na diminuição da memória em ratos avaliados no labirinto aquático e também no teste de latência de transferência sobre o LCE (Parle & Singh, 2007). Assim, o LCE pode ser utilizado para avaliação da ansiedade assim como para avaliação de aprendizado e memória.

Considerando que o organismo pode responder de maneira diferente dependendo do ambiente em que vive e que existem mecanismos neurológicos e fisiológicos envolvidos no comportamento e resposta ao estresse que são afetados pela manipulação neonatal e ambiente enriquecido, e que há poucos dados sobre os possíveis efeitos da estimulação tátil em animais adultos, nossa proposta é estudar o efeito da estimulação tátil, como forma de enriquecimento ambiental, sobre as respostas induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível, em ratos adultos jovens.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados 24 ratos Sprague-Dawley SPF ("specific pathogen free") com 2 meses de idade no início do período experimental, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, foram alojados em gaiolas individuais com maravalha autoclavada, em estante ventilada para ratos Alesco[®], em sala climatizada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), e com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 6:00h). Durante todo o protocolo os animais receberam ração e água filtrada *ad libitum*, com exceção do período de jejum para realização do teste de preferência à sacarose. A entrada no biotério foi rigorosamente controlada, permitida apenas para o experimentador responsável pelo projeto, vestido adequadamente com avental, luvas, máscara e proteção para os pés. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – Protocolo CEEA nº 1361-1 – de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL).

2.2. Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) Controle, 2) Controle + Manipulação, 3) Estresse, 4) Estresse + Manipulação. Após uma semana de adaptação ao biotério, os animais foram analisados durante 7 semanas. O peso corporal foi registrado no início e no final do protocolo.

Nos grupos submetidos à manipulação (2 e 4) as sessões de estimulação tátil foram aplicadas da 1^a a 7^a semana, cinco dias por semana. Nos grupos submetidos ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível (Grupos 3 e 4), a aplicação dos estímulos estressores foi realizada nas semanas 3, 4 e 5 de acordo com o protocolo mostrado na Tabela 1. Este modelo animal foi validado farmacologicamente e é muito utilizado para avaliar o estado de anedonia, que corresponde a um dos principais sintomas de depressão humana (Moreau *et al.*, 1993).

Na 6^a semana os animais foram submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e ao teste de Latência de Transferência sobre o LCE. Na 8^a semana os

animais foram sacrificados por decapitação, para coleta de sangue e posterior dosagens sanguíneas de corticosterona e lipídeos.

2.3. Sessão de Estimulação Tátil

Durante todo o período experimental (7 semanas), os animais foram submetidos, de segunda a sexta-feira, entre 16 e 18 horas à sessão de manipulação. A experimentadora manipulou cada animal durante 5 minutos. A manipulação consiste em tocar no animal cuidadosamente, onde a experimentadora acaricia e interage com o animal fazendo movimentos suaves e delicados na região do pescoço e das costas (Rebouças & Schimidek, 1997). A experimentadora, com o polegar, realizou movimentos no sentido da cabeça a cauda na região dorsal do animal, acariciando-os lenta e suavemente (Weininger, 1954) com luvas nitrílicas, para evitar influência dos odores de outros materiais, (p. ex. látex), no comportamento do animal. A manipulação não foi realizada no dia anterior ao Teste de Labirinto em Cruz Elevado e teste de Latência de Transferência sobre o Labirinto em Cruz Elevado.

2.4. Sessão de Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (ECMI)

Na 3^a, 4^a e 5^a semanas, os animais dos grupos 3) Estresse e 4) Estresse + Manipulação foram submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível mostrado na Tabela 1 (Moreau *et al.*, 1993, Moreau, 1997). O protocolo de ECMI consiste em vários períodos de imobilização dos animais, um período com iluminação contínua durante uma noite, um período de pernoite sob privação de comida e água, um período de pernoite sob privação de água, imediatamente seguido por 2 horas de exposição à garrafa de água vazia, um período de pernoite de alojamento em gaiola com maravalha úmida (100mL de água distribuída na maravalha), e manutenção em ciclo claro/escuro invertido por 2,5 dias.

A imobilização foi realizada em tubos de polietileno por período de 1 hora, durante o qual os animais foram privados de água, alimento e deslocamento (Al-Mohaisen *et al.*, 2000). Com os tubos de polietileno existe a possibilidade de ajuste do diâmetro do

tubo ao animal, de forma a garantir sua imobilização, e não somente restrição de movimentos.

Tabela 1 - Procedimento do estresse crônico moderado e imprevisível.

	Manhã	Tarde
Segunda-Feira	8:00 – 9:00 imobilização	13:00 – 14:00 imobilização 18:00 Iluminação contínua durante a noite.
Terça-Feira	8:00 – 9:00 imobilização	14:00 – 15:00 imobilização seguido de privação de água e comida por 20 horas.
Quarta-Feira	10:00 – 11:00 Teste de preferência à solução de frutose	13:00 – 14:00 imobilização seguido de privação de água por 18 horas.
Quinta-Feira	8:00 – 10:00: Exposição à garrafa de água vazia. 11:00 – 12:00 imobilização	14:00 – 15:00 imobilização seguido de alojamento em gaiolas com maravalha úmida por 18 horas.
Sexta-Feira	8:00 – 9:00 imobilização	18:00 Ciclo Claro/Escuro invertido.

2.5. Teste de preferência à solução de Sacarose 1%

A preferência à sacarose em ratos foi testada semanalmente durante o protocolo experimental, com o objetivo de avaliar se houve o desenvolvimento de anedonia. No dia do teste, todos os animais ficaram privados de água e comida durante 20 horas. Os ratos receberam duas garrafas de água, uma contendo uma solução de sacarose 1% e outra contendo apenas água filtrada. A posição das garrafas foi determinada aleatoriamente. Após 1 hora de exposição às garrafas, a quantidade consumida de cada solução foi determinada por meio da pesagem das garrafas e a preferência pela sacarose foi calculada (100 x consumo de sacarose/consumo total de líquido) (Grippe *et al.*, 2005).

2.6. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Na 6ª semana, os animais foram submetidos ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Os animais foram colocados no centro do LCE, que apresenta dois braços abertos e opostos, e observados durante 5 minutos (Pellow *et al.*, 1985; Marcondes *et al.*, 2001). Cada animal foi submetido somente uma vez a este teste comportamental. O comportamento de cada animal foi analisado pelo programa Etho Vision® XT 4.1 Software Leesburg, VA - U.S.A . Foram registrados o tempo de exploração dos braços abertos e

fechados e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Os resultados foram convertidos posteriormente em porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos ($100 \times \text{tempo (s) nos braços abertos} / \text{tempo total (s) de observação}$), porcentagem de entradas feitas nos braços abertos ($100 \times \text{n}^\circ \text{ de entradas nos braços abertos} / \text{n}^\circ \text{ total de entradas}$) e n° de entradas feitas nos braços fechados. A porcentagem de tempo nos braços abertos é um índice de medo e ansiedade, enquanto o número de entradas nos braços fechados corresponde a um índice de atividade locomotora (Pellow *et al.*, 1985; Cruz *et al.*, 1994). A porcentagem de entradas nos braços abertos está relacionada tanto à atividade locomotora quanto à ansiedade (Cruz *et al.*, 1994; Marcondes *et al.*, 2001).

2.7. Latência de Transferência sobre o Labirinto em Cruz Elevado.

Quarenta e oito horas após o teste LCE, o comportamento cognitivo foi avaliado através do uso de tarefas de aprendizagem no LCE, as quais medem memória espacial. Cada animal foi colocado na extremidade de um dos braços abertos e foi registrado o tempo no qual o animal se move para um dos braços fechados. Este tempo, denominado de latência de transferência, foi utilizado como índice de aprendizagem e memória (Raghavendra *et al.*, 1999). Após 24 h o procedimento foi repetido e a latência de transferência foi novamente avaliada. Na segunda avaliação menor ou maior período de latência para atingir o braço fechado indica respectivamente maior ou menor retenção de memória e aprendizagem (Raghavendra *et al.*, 1999).

2.8. Coleta das amostras e dosagens bioquímicas

Ao final da 7^a semana, os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue foi coletado em tubos com e sem anticoagulante, e centrifugado em seguida. A concentração plasmática de corticosterona foi realizada por ensaio enzimático colorimétrico, utilizando-se o kit comercial produzido pela Assay Designs[®]. As concentrações séricas de triglicerídeos (TGL), colesterol total (CT) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram determinadas pelo mesmo método utilizando-se kits comerciais LaborLab[®]. A concentração sérica de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi determinada pela fórmula de Friedewald: $\text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - (\text{TGL} \times 0,2)$ (Friedewald *et al.*, 1972).

2.9. Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado Análise de Variância Bifatorial (ANOVA) + Teste de Tukey para comparações múltiplas de média. Os dados referentes à avaliação do teste de Latência de Transferência sobre o Labirinto em Cruz Elevado foram analisados por Análise de Variância Multifatorial + Teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Os resultados foram apresentados como médias \pm erros-padrões das médias

3. Resultados

Não houve diferença no peso inicial entre os grupos estudados. Os grupos submetidos a estresse apresentaram menor peso corporal final em relação aos grupos controle e controle manipulado ($p < 0,01$; Tabela 2).

Tabela 2 - Peso corporal inicial e final de ratos submetidos ou não à manipulação e ao estresse crônico moderado e imprevisível.

	<i>Controle</i>	<i>Controle Manipulado</i>	<i>Estresse</i>	<i>Estresse Manipulado</i>
Peso inicial (g)	320.5 \pm 2.4	315.7 \pm 2.4	316,8 \pm 2,5	318,8 \pm 2,5
Peso final (g)	432.8 \pm 4.9	437.0 \pm 6.9	408,1 \pm 5,3*	413,2 \pm 6,4*

Os valores estão indicados como média \pm erro-padrão da média (n=12/grupo). *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo não submetido a estresse ($p < 0,05$; ANOVA bifatorial + Tukey).

Embora o estresse tenha induzido aumento da concentração plasmática de corticosterona, em relação aos grupos controle e controle manipulado, este aumento foi menor no grupo estresse manipulado quando comparado ao grupo estresse ($p < 0,05$; Figura 1A). No teste de preferência à sacarose 1% não houve diferença entre os valores basais entre os grupos estudados, dez dias após o início do estresse, os grupos E e EM apresentaram redução na preferência pela sacarose 1% em relação aos grupos C e CM e em relação aos seus valores basais. Dez dias após o final do protocolo de estresse os animais submetidos ao estresse (E e EM) apresentaram redução na preferência do consumo de sacarose em relação aos grupos controles e em relação aos seus valores basais ($p < 0,05$; Fig. 1B).

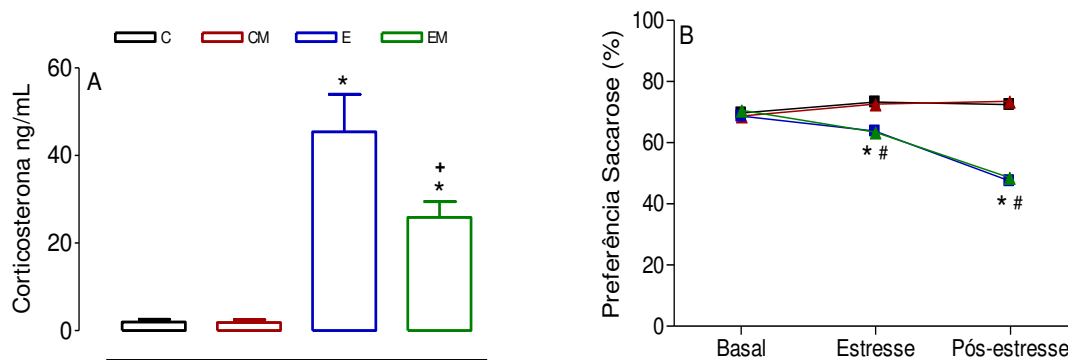


Figura 1 - Efeito da manipulação e do estresse crônico moderado e imprevisível sobre a concentração plasmática de corticosterona (A) ($n=12/\text{grupo}$) e resposta ao teste de preferência à solução de sacarose (B) ($N = 10/\text{grupo}$). C = Controle; CM = Controle + Manipulação; E = Estresse; EM = Estresse + Manipulação. Os valores estão apresentados em média \pm erro padrão. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo não submetido a estresse. ⁺Diferença estatística em relação ao grupo estresse. [#]Diferença estatística em relação ao valor basal, no mesmo grupo. ANOVA bifatorial + Tukey ($p < 0,05$).

No teste do labirinto em cruz elevado, animais submetidos ao estresse crônico moderado e imprevisível apresentaram aumento no número de entradas nos braços fechados ($E = 13,3 \pm 0,9$ vs. $C = 7,5 \pm 0,8$; $EM = 12,9 \pm 0,9$ vs. $CM = 10,0 \pm 1,1$; $p < 0,05$; Fig. 2A) e aumento na porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos ($E = 12,4 \pm 2,5$ vs. $C = 4,3 \pm 1,4$; $EM = 17,2 \pm 2,7$ vs. $CM = 11,1 \pm 2,8$ %; $p < 0,05$; Fig. 2B). Tanto em animais controle como em animais submetidos a estresse, a manipulação aumentou a porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos ($p < 0,05$; Fig. 2B), a porcentagem de entradas nos braços abertos ($CM = 39,0 \pm 5,2$ vs. $C = 22,0 \pm 5,7$; $E = 30,3 \pm 5,0$ vs. $EM = 41,5 \pm 4,4$; $p < 0,05$; Fig. 2C), sem alterar o número de entradas nos braços fechados ($p > 0,05$; Fig. 2A).

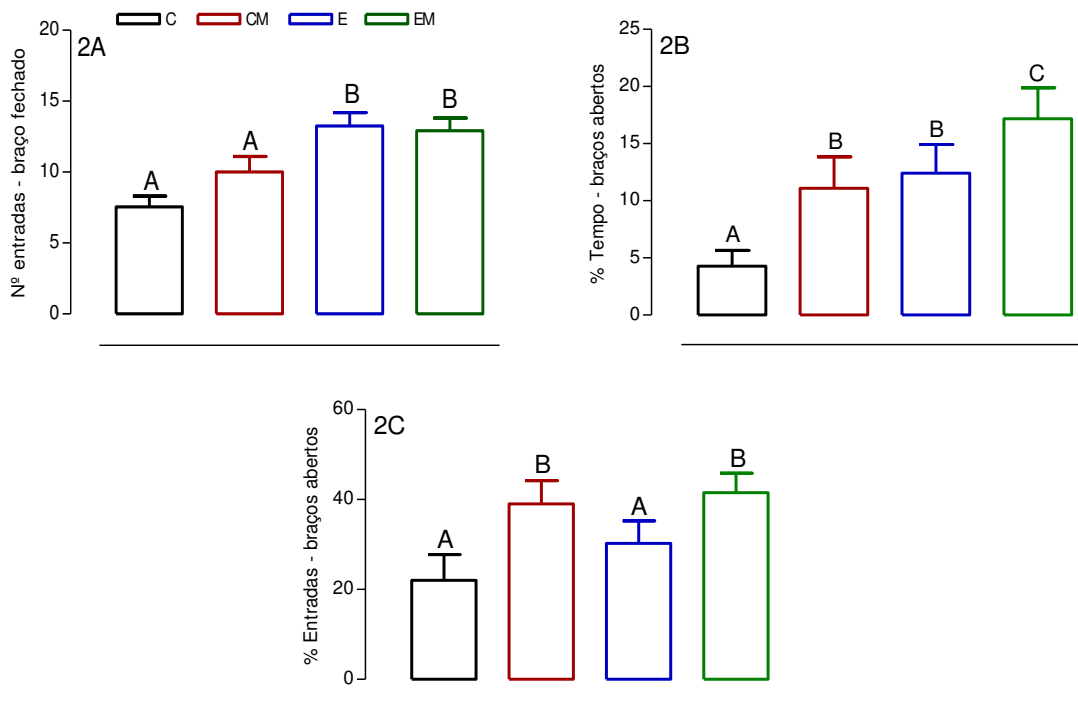


Figura 2 - Efeito da manipulação e do estresse crônico moderado e imprevisível nas repostas comportamentais ao Teste de Labirinto em Cruz Elevado (N = 12/grupo). C = Controle; CM = Controle + Manipulação; E = Estresse; EM = Estresse + Manipulação. Os valores estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam grupos diferentes entre si ($p < 0,05$; ANOVA bifatorial + Tukey).

Na avaliação da latência de transferência no labirinto em cruz elevado, os quatro grupos experimentais apresentaram redução no tempo de latência na 2ª sessão em relação à 1ª sessão (Fig. 3, $p < 0,05$). Os grupos submetidos ao estresse apresentaram maior tempo de latência (s) na 1ª (E = $11,9 \pm 3,1$ vs. C = $7,2 \pm 1,2$; EM = $6,5 \pm 1,5$ vs. CM = $3,8 \pm 0,4$; $p < 0,05$; Fig. 3) e na 2ª sessão (E = $6,9 \pm 1,4$ vs. C = $2,7 \pm 0,7$; EM = $2,8 \pm 0,6$ vs. CM = $1,3 \pm 0,2$; $p < 0,05$; Fig. 3) em relação aos grupos controle. A manipulação reduziu o tempo de latência na 1ª e na 2ª sessão em relação aos grupos não manipulados ($p < 0,05$; Fig. 3).

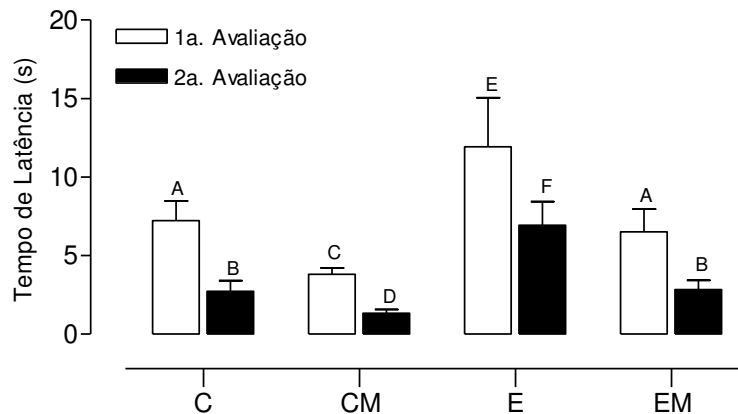


Figura 3 - Efeito da manipulação e do estresse crônico moderado e imprevisível sobre a latência de transferência no Labirinto em Cruz Elevado (N = 12/grupo). A segunda avaliação foi realizada 24h após a primeira avaliação. C = Controle; CM = Controle + Manipulação; E = Estresse; EM = Estresse + Manipulação. Os valores estão apresentados em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam grupos diferentes entre si ($p < 0,05$; ANOVA multifatorial + Tukey).

Os grupos submetidos a estresse apresentaram aumento na concentração sérica de triglicerídeos (E = $1,9 \pm 0,2$ vs. C = $1,3 \pm 0,1$; EM = $2,0 \pm 0,1$ vs. CM = $1,6 \pm 0,5$ mmol/L; $p < 0,05$; Fig. 4A), colesterol total (E = $2,2 \pm 0,1$ vs. C = $1,9 \pm 0,2$; EM = $2,2 \pm 0,1$ vs. CM = $1,9 \pm 0,1$ mmol/L; $p < 0,05$; Fig. 4B) e LDL (E = $1,3 \pm 0,2$ vs. C = $1,1 \pm 0,1$; EM = $1,3 \pm 0,1$ vs. CM = $1,1 \pm 0,1$ mmol/L; $p < 0,05$; Fig. 4C) em relação aos grupos controle e controle manipulado, sem diferença na concentração sérica de HDL ($p > 0,05$; Fig. 4D).

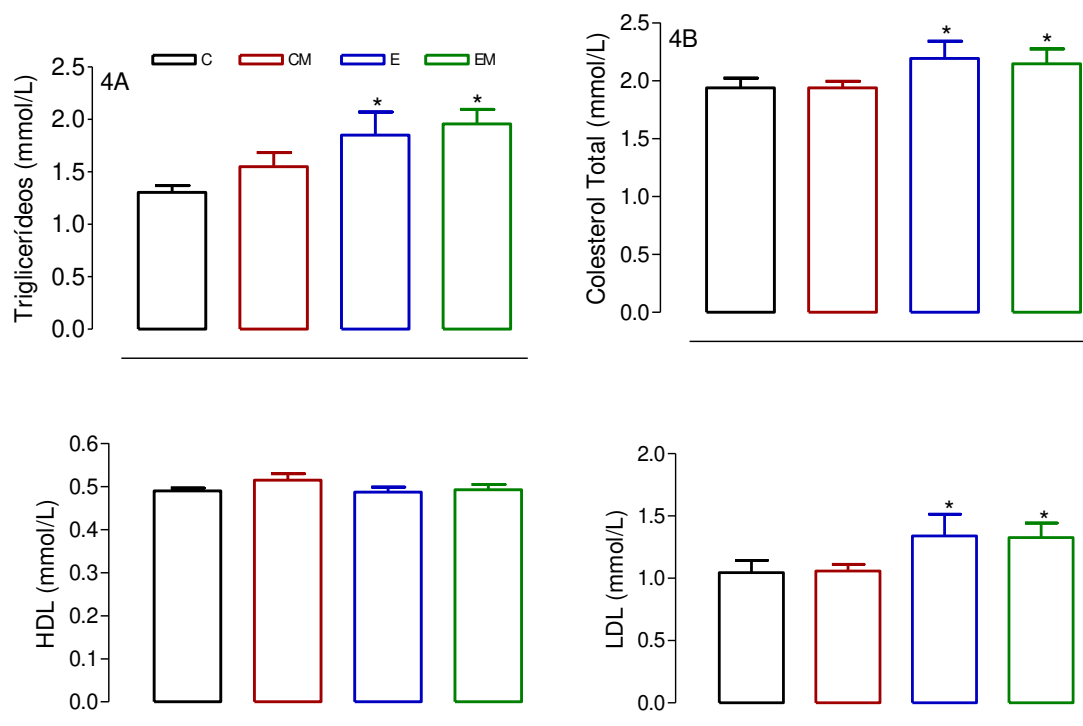


Figura 4 - Efeito da manipulação e do estresse crônico moderado e imprevisível sobre a concentração plasmática de triglicerídeos (A); colesterol total (B) lipoproteína de alta densidade (C) e lipoproteína de alta densidade (D) (n=12/grupo). C = Controle; CM = Controle + Manipulação; E = Estresse; EM = Estresse + Manipulação. Os valores estão apresentados em média \pm erro padrão. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo não submetido a estresse ($p < 0,05$; ANOVA bifatorial + Tukey).

4. Discussão

Os dados obtidos neste estudo mostram que a estimulação tátil cancelou ou diminuiu os efeitos do estresse crônico moderado imprevisível sobre o comportamento e ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), em ratos adultos jovens.

Assim, como já havia sido observado em outros estudos (Wilner,1997; Marin *et al.*, 2007), animais submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) apresentaram maior concentração plasmática de corticosterona e menor peso corporal final após o estresse, mostrando que não houve adaptação dos animais aos estressores. Desta forma, o protocolo utilizado foi confirmado no presente estudo como protocolo de estresse crônico. E, como o ECMI também diminuiu a preferência pelo

consumo de solução doce em relação ao controle, e em relação aos valores basais, nossos resultados mostram que o modelo de ECMI utilizado nesse estudo foi eficaz em desenvolver anedonia nos animais, e esta de acordo com outros estudos (Grippe *et al.*, 2002; Grippe *et al.*, 2003; Gronli *et al.*, 2007).

No entanto, os animais submetidos ao ECMI e que foram manipulados apresentaram menor concentração de corticosterona em relação aos animais estressados não manipulados. Estudos demonstram que animais adultos que foram submetidos à manipulação neonatal (do 1º ao 21º dias de vida) apresentam alteração na atividade do eixo HPA, com menor liberação na quantidade do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio corticotrófico (ACTH) e corticosterona frente a estímulos estressores (Bhatnagar *et al.*, 1995; Plotsky *et al.*, 1993; Meaney *et al.*, 1991). Essa alteração no eixo HPA parece estar relacionada com o aumento da população de receptores de glicocorticóides tipo II no hipocampo e cortex pré-frontal aumentando a efetividade do feedback negativo (Meaney 1996). Além disso, a manipulação diminuiu a expressão do gene CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo e no núcleo central da Amígdala (Francis & Meaney, 1990). Portanto nossos dados sugerem que a estimulação tátil em animais adulto-jovem também pode resultar em alterações no eixo HPA, porém mecanismos neurais envolvidos ainda precisam ser investigados. E, considerando que os efeitos negativos do estresse crônico são em grande parte decorrentes da manutenção de concentrações elevadas de glicocorticóides este resultado sugere que a manipulação poderia ter algum efeito benéfico contrabalançando os efeitos negativos desencadeados pelo estresse.

Esta hipótese parece ser reforçada pelos resultados obtidos na análise dos níveis de ansiedade, aprendizado e memória obtidos no presente estudo. No teste de labirinto em cruz elevado, a manipulação dos animais adultos jovens promoveu respostas ansiolíticas evidenciadas pelo aumento da porcentagem de tempo de exploração nos braços abertos e aumento na porcentagem de entradas nos braços, sem alteração do número de entradas nos braços fechados. Aulich *et al.* (1974) observaram que a manipulação durante 7 dias consecutivos em animais com 30 dias de idade teve efeito ansiolítico da manipulação evidenciado pela redução do tempo de exploração do compartimento escuro no teste “light/dark box” em relação a animais não manipulados. Esses autores concluíram que a

manipulação em ratos jovem-adultos promove redução do comportamento de medo e ansiedade; e aumento do comportamento exploratório. Imanaka *et al.* (2008) estudaram ratos Sprague-Dawley jovens (60 dias de idade) submetidos à estimulação tátil neonatal ou isolamento neonatal (separação materna). No teste de labirinto em cruz elevado, esses autores observaram um aumento da ansiedade nos ratos submetidos ao isolamento neonatal e diminuição da ansiedade nos animais submetidos à estimulação tátil neonatal em relação ao controle.

No presente estudo, o estresse crônico aumentou a porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos e do número de entrada nos braços fechados, sem alteração na porcentagem de entrada nos braços abertos. Estes dados indicam que a maior exploração dos braços abertos deve-se a um aumento da atividade locomotora induzida pelo ECMI, e não a um efeito ansiolítico como aquele induzido pela manipulação em animais controle. Na literatura há dados conflitantes relacionados ao estresse e ansiedade avaliados no LCE. Matuszewich *et al.* (2007) não observaram efeito ansiogênico nos testes do LCE e no teste “light/dark box” em ratos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível durante dez dias. O estresse por imobilização ou estresse crônico variável também não alterou o comportamento de ratas avaliadas no teste do LCE (Mitra *et al.* 2005). Por outro lado, Kompagne *et al.* (2008), demonstraram que animais submetidos a um protocolo de estresse crônico durante três semanas apresentaram maior tempo de exploração no braços abertos, no teste do LCE, em relação ao grupo controle .

O teste de latência de transferência sobre o LCE é utilizado como um índice de aprendizado e memória. O fato de que, na segunda avaliação, o tempo de latência foi menor em relação à primeira avaliação nos quatro grupos estudados, evidencia a habilidade do animal em ter aprendido a orientação espacial em busca de um ambiente com menor iluminação e com paredes verticais (braços fechados do LCE), bem como a sua capacidade em lembrar a orientação aprendida na primeira avaliação (Raghavendra & Kulkarni, 2001). Porém nossos dados também evidenciam que estas capacidades parecem ter sido incrementadas e diminuídas pela manipulação e pelo estresse respectivamente. Esta interpretação baseia-se no fato de que em animais controle, a latência de transferência foi menor em animais manipulados do que em animais não submetidos à manipulação; e no

fato de que animais estressados apresentaram aumento deste parâmetro em relação ao grupo controle. Além disso, no grupo submetido ao estresse e à manipulação, o efeito do ECMI sobre a latência de transferência foi cancelado, evidenciando-se neste grupo respostas semelhantes às aquelas observadas em ratos controle não manipulados. Estes dados mostram, portanto, o efeito benéfico da manipulação sobre processos cognitivos e complementam resultados obtidos por outros autores (Liu *et al.*, 2000; Bredy *et al.*, 2004) e mostram que este efeito não é restrito à manipulação neonatal.

O hipocampo é uma área cerebral importante para funções cognitivas como aprendizado e memória e pode sofrer alterações adaptativas em resposta ao estresse. Níveis elevados de glicocorticóides podem causar alterações plásticas no hipocampo, as quais incluem o remodelamento dendrítico causado pela retração e simplificação dos dendritos dos neurônios na região CA3 do hipocampo (Mc Ewen, 1999; Sousa *et al.*, 2000), e inibição da neurogênese no giro dentado (Gould *et al.*, 1997). Diferentes tipos de estressores como estresse diário por restrição, exposição ao odor de predador ou estresse por rotação de membros do grupo afetam o desempenho de memória espacial em ratos no labirinto em Y (Conrad *et al.*, 1996; Diamond *et al.*, 1999; Bodnoff *et al.*, 1995), teste validado para avaliação de memória dependente do hipocampo (Conrad, 2006). O ambiente enriquecido também pode alterar estruturas e funções do encéfalo de roedores (Krech *et al.*, 1970) e pode atenuar as respostas comportamentais e fisiológicas desencadeadas pelo estresse (Fernández-Teruel *et al.* 2002; Fox *et al.* 2006).

Além das respostas comportamentais, no presente estudo avaliamos o efeito da manipulação e do estresse crônico sobre o perfil lipídico de ratos adultos jovens, porque estes podem estar relacionados com respostas hormonais e comportamentais induzidas pelo estresse. Os altos níveis séricos de lipídios acompanhados do menor peso corporal final podem estar relacionados com hormônios do estresse que modulam a quebra de proteína, glicogênio e triglicerídeos em moléculas que são rapidamente metabolizadas para gerar energia (Black *et al.* 2002) e os glicocorticóides e catecolaminas aumentados durante o estresse podem diminuir a ligação e degradação de LDL no fígado. Neves *et al.* (2009) demonstraram que o estresse crônico aumenta a resposta vasoconstritora em aorta torácica isolada e induz hipertrofia na parede vascular, por mecanismos possivelmente relacionados

ao aumento nos níveis de LDL, aumento do índice aterogênico e inibição na síntese de óxido nítrico endotelial, mostrando que o estresse crônico induz efeitos pró-ateroscleróticos.

A elevação da concentração sanguínea de colesterol total pode estar associada a alterações na memória. Animais alimentados com dieta hipercalórica durante 90 dias apresentaram aumento no colesterol total e diminuição no aprendizado e memória avaliados no labirinto aquático (“Morris water maze”) e no tempo de latência de transferência sobre o LCE (Parle and Singh, 2007). A elevação de colesterol, além de ser um fator de risco para aterosclerose, parece contribuir para o surgimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, já que aumenta a produção da proteína beta amilóide e de apolipoproteína E, resultando no aumento de placas neuríticas no cérebro (Haley and Dietschy, 2000).

Considerando que na literatura há evidências de que a manipulação neonatal e o enriquecimento ambiental afetam mecanismos neurológicos e fisiológicos envolvidos no controle do comportamento e na resposta ao estresse, os dados obtidos sugerem que estes efeitos também podem ser observados em animais jovem-adultos. Considerando que o estresse faz parte da rotina diária do ser humano, na sociedade atual, torna-se importante investigar os mecanismos, bem como os potenciais usos terapêuticos da estimulação tátil na fase adulta.

5. Referências Bibliográficas*

- Aulich D, Spielhofen J & Raaijmakers GM. The influence of adult handling and social isolation on dark preference in albino rats. *Anim. Behav.* 1974, 22: 987-990.
- Bhatnagar S, Meaney MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J Neuroendocrinol.* 1995, 7(2):97-108.
- Black PH. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun.* 2002; 16:622-653.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci.* 1995,15(1 Pt 1):61-69.
- Bredy TW, Lee AW, Meaney MJ, Brown RE. Effect of neonatal handling and paternal care on offspring cognitive development in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). *Horm Behav.* 2004, 46(1):30-38.
- Brenes Sáenz JC, Villagra OR, Fornaguera Trías J. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behav Brain Res.* 2006, 169(1):57-65.
- Cannon WB, Querido S, Britton SW, Bright EM. Studies on the conditions of activity in endocrine glands. The role of adrenal excretion in the chemical control of body temperature. *Am. J. Physiol.* 1927, Bethesda, 79: 466-506.
- Chapillon P, Manneché C, Belzung C, Caston J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet.* 1999, 29(1):41-46.
- Conrad CD. What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? *Behav Cogn Neurosci Rev.* 2006, 5(1):41-60.
- Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci.* 1996, 110(6):1321-1334.
- Cruz APM, Frei F & Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994, 49:171 – 176.
- Diamond DM, Park CR, Heman KL, Rose GM. Exposing rats to a predator impairs spatial working memory in the radial arm water maze. *Hippocampus.* 1999, 9(5):542-552.
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, González B, Tobeña A. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet.* 1997, 27(6):513-26.
- Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobeña A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav.* 2002, 73(1):233-245.
- Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972, 18:499-502.
- Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci.* 2002, 22(18):7840-3.

- Francis DD & Meaney M. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol.* 1999, 9(1):128-134.
- Francis DD, Champagne FA, Liu D, Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann N Y Acad Sci.* 1999, 896:66-84.
- Fox C, Merali Z, Harrison C (2006) Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res* 175:1–8
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 1997, 17(7):2492-2498.
- Grippe AJ, Sullivan NR, Damjanoska KJ, Crane JW, Carrasco GA, Shi J, Chen Z, Garcia F, Muma NA, Van de Kar LD. Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling female rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2005,179(4):769-780.
- Grippe AJ, Beltz TG, Johnson AK. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiol Behav.* 2003, 78(4-5):703-710.
- Grippe A, Johnson AK. Biological mechanisms in the relationship between depression and heart disease. *Neurosci. Rev.* 2002, 26:941-962.
- Grønli J, Fiske E, Murison R, Bjorvatn B, Sørensen E, Ursin R, Portas CM. Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. *Behav Brain Res.* 2007 Jul 19;181(1):42-51. Epub 2007 Mar 19.
- Haley RW, Dietschy JM. Is there a connection between the concentration of cholesterol circulating in plasma and the rate of neuritic plaque formation in Alzheimer disease? *Arch Neurol.* 2000, 57(10):1410-1412.
- Henningsen K, Andreasen JT, Bouzinova EV, Jayatissa MN, Jensen MS, Redrobe JP, Wiborg O. Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: relation to anhedonic-like responses. *Behav Brain Res.* 2009, 198(1):136-141.
- Hoffmann LC, Schütte SR, Koch M, Schwabe K. Effect of "enriched environment" during development on adult rat behavior and response to the dopamine receptor agonist apomorphine. *Neuroscience.* 2009, 158(4):1589-1598
- Imanaka A, Morinobu S, Toki S, Yamamoto S, Matsuki A, Kozuru T, Yamawaki S. Neonatal tactile stimulation reverses the effect of neonatal isolation on open-field and anxiety-like behavior, and pain sensitivity in male and female adult Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res.* 2008, 186(1):91-97.
- Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology (Berl).* 1990, 101(1):27-33.

- Kaufman J, Plotsky PM, Nemeroff CB, Charney DS. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biol Psychiatry*. 2000, 48(8):778-790.
- Krech D, Rosenzweig Mr, Bennett El. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *J Comp Physiol Psychol*. 1960, 53:509-19.
- Kompagne H, Bárdos G, Szénási G, Gacsályi I, Hársing LG, Lévy G. Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. *Behav Brain Res*. 2008, 193(2):311-314.
- Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002, 73(1):193-207.
- Leal-Galicia P, Saldívar-González A, Morimoto S, Arias C. Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: Role of individual responsiveness to anxiety. *Developmental Neurobiology*. 2007. 67, 395–405.
- Leal-Galicia P, Castañeda-Bueno M, Quiroz-Baez R, Arias C. Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiol Learn Mem*. 2008, 90(3):511-518.
- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci*. 2000, 3(8):799-806.
- Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*. 2001, 74(4-5):435-440.
- Marin MT, Cruz FC, Planeta CS. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav*. 2007, 90:29-35.
- Martins MFD, Costa JSD da, Saforcada ET, Cunha, MDC. Qualidade do ambiente e fatores associados: um estudo em crianças de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2004, 20(3):710-718.
- Matuszewich L, Karney JJ, Carter SR, Janasik SP, O'Brien JL, Friedman RD. The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures. *Physiol Behav*. 2007, 90(4):674-81.
- McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 1999, 22:105-122.
- Meaney MJ, Aitken DH, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol Aging*. 1991,12(1):31-38.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene

- expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci.* 1996,18(1-2):49-72.
- Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* 2001, 24:1161-1192.
- Mitra R, Vyas A, Chatterjee G, Chattarji S. Chronic stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats. *Neurosci Letters.* 2005, 383: 278-283.
- Mohammed AH, Henriksson BG, Söderström S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR. Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res.* 1993, 57(2):183-91.
- Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Perrin S, Haefely WE. Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT_{1C} receptor activation in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1993, 110(1-2): 140-144.
- Moreau JL. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale.* 1997, 23(4): 280-289.
- Neves VJ, Moura MJ, Tamascia ML, Ferreira R, Silva NS, Costa R, Montemor PL, Narvaes EA, Bernardes CF, Novaes PD, Marcondes FK. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress.* 2009, 12:320-327.
- Orsetti M, Colella L, Dellarole A, Canonico PL, Ghi P. Modification of spatial recognition memory and object discrimination after chronic administration of haloperidol, amitriptyline, sodium valproate or olanzapine in normal and anhedonic rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2007,10(3):345-357.
- Parle M, Singh N. Reversal of memory deficits by Atorvastatin and Simvastatin in rats. *Yakugaku Zasshi.* 2007, 127(7):1125-1137.
- 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 rats. *J. Neurosci. Meth.* 1985, 14:149-167.
- Post RM. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psychiatry.* 1992,149(8):999-1010.
- Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993, 18(3):195-200.
- Raghavendra V, Chopra K, Kulkarni SK. Brain renin angiotensin system (RAS) in stress-induced analgesia and impaired retention. *Peptides.* 1999, 20:335-342.
- Rebouças RC, Schmidek WR. Handling and isolation in three strains of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. *Physiol Behav.* 1997, 62(5):1159-1164.
- Repetti RL, Taylor SE, Seeman TE. Risky families: family social environments and the mental and physical health of offspring. *Psychol Bull.* 2002, 128(2):330-366.

- Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936, London, 138(1):32.
- Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K. Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006, 83(2):186-193.
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. 2000, 97(2):253-266.
- Tanno AP, Marcondes FK. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. *RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2002, 38(3):273-289.
- Vallée M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosc*. 1997, 17 (7): 2626-2636.
- Vermetten E, Schmahl C, Lindner S, Loewenstein RJ, Bremner JD. Hippocampal and amygdalar volumes in dissociative identity disorder. *Am J Psychiatry*. 2006, 163(4):630-6.
- Weininger O. Physiological damage under emotional stress as a function of early experience. *Science*. 1954 Feb 26;119(3087):285-286.
- Welberg L, Thirvikraman KV, Plotsky PM. Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2006, 31(5):553-564.
- Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005, 52:90-110.
- Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997, 134:319-329.

4. CONCLUSÃO

1. O efeito da estimulação tátil não é restrito ao período neonatal de desenvolvimento. Esse procedimento também é efetivo quando realizado em animais jovens ou adultos resultando em diminuição da ansiedade e aumento da habilidade de aprendizado e memória. No entanto, mecanismos envolvidos nessas alterações precisam ser investigados.

2. Nossos dados sugerem que o estresse crônico altera a atividade locomotora e tem efeito negativo sobre o aprendizado e memória. A manipulação diminui a ansiedade, a secreção de corticosterona e cancela a redução do aprendizado e retenção de memória, induzidos pelo estresse crônico.

5. REFERÊNCIAS*

- Baptista MN. Desenvolvimento do Inventário de Percepção de Suporte Familiar (IPSF): estudos psicométricos preliminares. *Psico-USF*. 2005 10(1):11-19.
- Bhatnagar S, Meaney MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J Neuroendocrinol*. 1995, 7(2):97-108.
- Dan G, Blazer II MD. Mood disorders epidemiology in kaplan e sadock comprehensive textbook of psychiatry. Vol. 1. 7th ed. Baltimore: Lippincott Williams e Wilkins. 2000, 1298-1302.
- Francis DD, Champagne FA, Liu D, Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann N Y Acad Sci*. 1999, 896:66-84.
- Hemsworth PH & Barnett JL. Human-animal interactions. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1987, 3(2):339-356.
- Henningsen K, Andreasen JT, Bouzinova EV, Jayatissa MN, Jensen MS, Redrobe JP, Wiborg O. Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: relation to anhedonic-like responses. *Behav Brain Res*. 2009, 198(1):136-141.
- Hoffmann LC, Schütte SR, Koch M, Schwabe K. Effect of "enriched environment" during development on adult rat behavior and response to the dopamine receptor agonist apomorphine. *Neuroscience*. 2009, 158(4):1589-1598
- Holt-Lunstad J, Birmingham WA, Light KC. Influence of a "warm touch" support enhancement intervention among married couples on ambulatory blood pressure, oxytocin, alpha amylase, and cortisol. *Psychosom Med*. 2008 Nov;70(9):976-85. Epub 2008 Oct 8.
- Jaako-Movits K, Zharkovsky A. Impaired fear memory and decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy in rats. *Eur J Neurosci*. 2005, 22:2871–2878.
- Kirschbaum C, Klauer T, Filipp SH, Hellhammer DH. Sex-specific effects of social support on cortisol and subjective responses to acute psychological stress. *Psychosom Med*. 1995 Jan-Feb; 57(1):23-31.
- Leal-Galicia P, Saldívar-González A, Morimoto S, Arias C. Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: Role of individual responsiveness to anxiety. *Developmental Neurobiology*. 2007. 67, 395–405.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Leal-Galicia P, Castañeda-Bueno M, Quiroz-Baez R, Arias C. Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiol Learn Mem.* 2008, 90(3):511-518.
- Levine S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol.* 2000, 405(1-3):149-60.
- Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NP, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci.* 1998, 1(1):69-73.
- Meaney MJ, Aitken DH, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol Aging.* 1991,12(1):31-38.
- Moreau JL. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale.* 1997, 23(4): 280-289.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci.* 1996,18(1-2):49-72.
- Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* 2001, 24:1161-1192.
- Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Perrin S, Haefely WE. Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT_{1C} receptor activation in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1993, 110(1-2): 140-144.
- Orsetti M, Colella L, Dellarole A, Canonico PL, Ghi P. Modification of spatial recognition memory and object discrimination after chronic administration of haloperidol, amitriptyline, sodium valproate or olanzapine in normal and anhedonic rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2007,10(3):345-357.
- Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993, 18(3):195-200.
- Poole T. Happy animals make good science. *Lab Anim.* 1997, 31(2):116-124.
- Rebouças RC, Schmidek WR. Handling and isolation in three strains of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. *Physiol Behav.* 1997, 62(5):1159-1164.
- Seabrook MF. The psychological interaction between the stockman and his animals and its influence on performance of pigs and dairy cows. *Vet Rec.* 1984, 28;115(4):84-87.
- Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K. Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006, 83(2):186-193.

- Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HB, Friedman L, Rajkowska G. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry*. 2004, 1;56(9):640-50.
- Uchino BN, Garvey TS. The availability of social support reduces cardiovascular reactivity to acute psychological stress. *J Behav Med*. 1997 Feb;20(1):15-27.
- Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, et al. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA* 1996, 276(4):293-299.
- Weze C, Leathard HL, Grange J, Tiplady P, Stevens G. Healing by Gentle Touch Ameliorates Stress and Other Symptoms in People Suffering with Mental Health Disorders or Psychological Stress. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007, 4(1):115-123.
- Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005, 52:90-110.
- Witgen BM, Lifshitz J, Smith ML, Schwarzbach E, Liang SL, Grady MS. Regional hippocampal alteration associated with cognitive deficit following experimental brain injury: a systems, network and cellular evaluation. *Neuroscience*. 2005,133:1-15.

ANEXOS

Certificado de aprovação pelo comitê de ética na experimentação animal



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

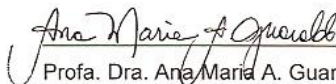
CERTIFICADO

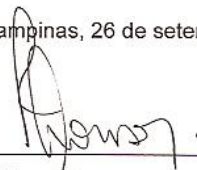
Certificamos que o Protocolo nº 1361-1, sobre "Efeito da estimulação tátil sobre respostas comportamentais, metabólicas e cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível, em ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes / Rafaela Costa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 26 de setembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1361-1, entitled "Handling effect on chronic mild stress-induced behavioral, metabolic and cardiovascular responses", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 26, 2007.

Campinas, 26 de setembro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6366
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

ANEXOS

Confirmação de envio do artigo para publicação – Capítulo I 04/12/2009

Ms. Ref. No.: PHB-D-09-00576

Title: Handling improves spatial memory and decreases anxiety in young-adult rats.
Physiology & Behavior

Dear Professor Marcondes,

Your submission, referenced above, has been assigned the manuscript number PHB-D-09-00576 and has been assigned to an Editor who will handle peer review.

Please note that in most cases at least two reviews may be required before a decision on a manuscript is made. You will be notified by e-mail each time a reviewer agrees to review your manuscript.

To track the progress of your manuscript, please log in to <http://ees.elsevier.com/phb/> and click on the "Submissions Being Processed" folder.

Your username is: fklein

Thank you for submitting your manuscript to Physiology & Behavior.

Kind regards,

Physiology & Behavior