



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA

ROXANA PATRÍCIA BEZERRA DA SILVA

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PÓS-
DESMAME SOBRE COMPORTAMENTOS EMOCIONAIS E COMPONENTES DO
SISTEMA SEROTONINÉRGICO EM PROLE DE RATOS**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO, ATIVIDADE FÍSICA E
PLASTICIDADE FENOTÍPICA

ROXANA PATRÍCIA BEZERRA DA SILVA

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PÓS-
DESMAME SOBRE COMPORTAMENTOS EMOCIONAIS E COMPONENTES DO
SISTEMA SEROTONINÉRGICO EM PROLE DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lígia Cristina Monteiro Galindo

Coorientadora: Prof^a Dr^a Isabeli Lins Pinheiro

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2023

Catálogo na Fonte
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecário Jonatan Cândido, CRB-4/2292

S586e Silva, Roxana Patrícia Bezerra da.
Efeitos do isolamento social e enriquecimento ambiental pós-desmame sobre comportamentos emocionais e componentes do sistema serotoninérgico em prole de ratos / Roxana Patrícia Bezerra da Silva. - Vitória de Santo Antão, 2022.
116 f.; il., tab.

Orientadora: Lígia Cristina Monteiro Galindo.
Coorientadora: Isabeli Lins Pinheiro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica - PPGNAFPF, 2023.
Inclui referências e anexos.

1. Isolamento social. 2. Serotoninérgicos. 3. Enriquecimento ambiental. I. Galindo, Lígia Cristina Monteiro (Orientadora). II. Pinheiro, Isabeli Lins (Coorientadora). III. Título.

615 CDD (23. ed.) BIBCAV/UFPE - 012/2023

ROXANA PATRÍCIA BEZERRA DA SILVA

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PÓS-
DESMAME SOBRE COMPORTAMENTOS EMOCIONAIS E COMPONENTES DO
SISTEMA SEROTONINÉRGICO EM PROLE DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica.

Aprovado em: 24/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Kelli Nogueira Ferraz P. Althoff (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Lígia Cristina Monteiro Galindo (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Eduarda Correia Moreira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Alagoas

Aos meus pais, Raimundo Bezerra da Silva e Maria José Bezerra da Silva, por todo amor, incentivo e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me abençoar todos os dias, por colocar pessoas especiais em minha vida e por conceder as oportunidades que me levam a realização dos meus sonhos.

Às minhas irmãs, Regina Katiuska e Raphaella Kathiane, por todo amor e companheirismo. Obrigada por serem minhas melhores amigas e por estarem presentes em todas as etapas da minha vida. Sou grata por cada sorriso, pelos gestos de carinho, pelas conversas compartilhadas e por todo incentivo. Vocês fazem parte de mim e tornam minha vida mais colorida. Amo vocês!

À minha pequena sementinha do amor, Isabelly Kathiane, por alegrar e iluminar minha vida. Cada sorriso seu desperta em mim o que tenho de melhor. Obrigada por cada abraço, pelas vezes que você entendeu e liberou tia das brincadeiras para escrever o artigo e a dissertação. Eu te amo!

Aos meus pais, Raimundo e Maria José, deixo um agradecimento especial por todo amor, carinho e bons momentos. Vocês sempre foram grandes incentivadores da educação e deram o melhor que podiam. Vocês são meu alicerce e responsáveis pelas minhas conquistas. Eu tenho um amor e imensa gratidão a vocês.

Ao meu noivo, Amaury Alyson, por preencher os meus dias com amor e alegria. Obrigada pelos gestos de carinho, por ser meu companheiro de todas as horas, por acreditar em mim e por me incentivar na realização dos meus sonhos. Obrigada por saber me fazer feliz e por todas as outras atitudes que o faz merecedor do meu amor.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lígia Galindo, pelo qual tenho um enorme carinho e admiração. Obrigada pela confiança, por toda compreensão e valiosas contribuições. Obrigada por acreditar no meu trabalho e por me incentivar a continuar sonhando. Obrigada por estar sempre disponível e preocupada com o bem-estar dos seus orientandos. Você é “peça” importante na realização desse sonho. Serei imensamente grata por tudo. Você é muito mais que minha orientadora: é uma pessoa amiga que estará sempre em meu coração.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Isabeli Pinheiro, pelo qual tenho enorme respeito e admiração. Obrigada pelo acolhimento, dedicação extraordinária em acompanhar o desenvolvimento deste trabalho, pela solicitude e por todas as palavras de incentivo. Levarei seus ensinamentos e otimismo para a vida. Obrigada por defender esse trabalho comigo.

À CAPES, órgão de fomento que financiou este projeto.

“Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, é fundamental.

Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas é mais preciso ainda”.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O isolamento social (IS) está relacionado a efeitos neurocomportamentais adversos e alterações neuroquímicas, particularmente quando ocorrem em estágios iniciais do desenvolvimento. Por outro lado, o enriquecimento ambiental (EA) parece reduzir os comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão, bem como aumentar os níveis de serotonina no córtex pré-frontal e hipocampo em roedores. O objetivo deste estudo foi revisar sistematicamente os efeitos do IS e EA sobre comportamentos emocionais e alguns componentes do sistema serotoninérgico em ratos após o desmame. Dois autores realizaram busca independente nas bases de dados eletrônicas Medline/PubMed, LILACS, *Scopus*, *Web of Science*, EMBASE e *Sigle* via *Open Gray*. A primeira etapa do processo de seleção dos artigos consistiu da leitura dos artigos pelo título e resumo. Posteriormente foi realizada a leitura dos artigos na íntegra. Foram incluídos nesta revisão, estudos experimentais primários que submeteram ratos ao IS, EA e condição social normal após o desmame. O risco de viés dos estudos selecionados foi avaliado considerando as recomendações do *SYRCLE's Risk of Bias*. O índice Kappa foi calculado para medir o grau de concordância entre os revisores durante a etapa de seleção dos artigos, bem como na etapa de avaliação do risco de viés. Foram incluídos 11 artigos na presente revisão sistemática. Os resultados apontaram que os animais expostos ao IS apresentaram menor índice comportamental de habituação e menor resposta de enfrentamento a situações de estresse incontrolável. Por outro lado, o EA promoveu redução do comportamento semelhante à depressão e aumento na quantidade de serotonina no hipocampo e córtex pré-frontal dos roedores. Desta forma, os estímulos ambientais durante o período crítico do desenvolvimento foram associados à melhor resposta emocional bem como a maiores níveis de serotonina em regiões encefálicas a longo prazo.

Palavras-chave: enriquecimento ambiental; sistema serotoninérgico; isolamento social; ansiedade; depressão.

ABSTRACT

Social isolation (SI) is related to adverse neurobehavioral effects and neurochemical changes, particularly when they occur in early stages of development. On the other hand, environmental enrichment (EE) appears to reduce anxiety and depression-like behaviors and increase serotonin levels in the prefrontal cortex and hippocampus in rodents. The objective of this study was to systematically review the effects of SI and EE on emotional behaviors and some components of the serotonergic system in rats after weaning. Two authors independently searched the electronic databases Medline/PubMed, LILACS, Scopus, Web of Science, EMBASE, and Sigle via Open Gray. The first stage of the article selection process consisted of reading the articles by title and abstract. Subsequently, the full-text articles were read. Primary experimental studies that subjected rats to SI, EE, and normal social condition after weaning were included in this review. The risk of bias of the selected studies was evaluated considering the recommendations of SYRCLE's Risk of Bias. The Kappa index was calculated to measure the degree of agreement between reviewers during the article selection stage, as well as during the bias risk assessment stage. Eleven articles were included in this systematic review. The results showed that animals exposed to SI presented a lower behavioral index of habituation and a lower coping response to uncontrollable stress situations. On the other hand, EE promoted a reduction in depression-like behavior and an increase in serotonin levels in the hippocampus and prefrontal cortex of rodents. Thus, environmental stimuli during the critical period of development were associated with better emotional response as well as higher long-term levels of serotonin in brain regions.

Keywords: environmental enrichment; serotonergic system; social isolation; anxiety; depression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Síntese de serotonina.	19
Figura 2 -	Fluxograma do processo de seleção de estudos baseado no PRISMA.	34
Figura 3 -	Avaliação do risco de viés, seguindo as recomendações da ferramenta SYRCLE. A) Risco de viés dos estudos com seus respectivos resultados. B) Risco de viés dos estudos incluídos na revisão e suas respectivas porcentagens em cada item da avaliação.	37
Quadro 1 -	Critérios de elegibilidade dos estudos	28
Quadro 2 -	Estratégias de buscas utilizadas no DeCS, MESH e Emtree	30
Quadro 3 -	Características gerais dos estudos incluídos na revisão sistemática	35
Quadro 4 -	Efeito do isolamento social e enriquecimento ambiental sobre os comportamentos emocionais de ratos	40
Quadro 5 -	Avaliação dos componentes serotoninérgicos identificados nos estudos	46
Quadro 6-	Características gerais do ambiente enriquecido nos estudos incluídos	47

LISTA DE ABREVIACES

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

CPF: Córtex pré-frontal

DPN: Dia pós-natal

EA: Enriquecimento ambiental

EV: Estriado ventral

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

IS: Isolamento social

MAO-A: Monoamina oxidase

NI: Nenhuma informao

ND: Sem diferena

SERT: Transportador de serotonina

SARS-CoV-2: Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

TPH: Triptofano hidroxilase

VMAT: Transportador de monoamina vesicular

5-HT: Serotonina ou 5-hidroxitriptamina

5-HT₁: Receptor 1 da serotonina

5-HT_{1A}: Receptor 1A da serotonina

5-HT_{1B}: Receptor 1B da serotonina

5-HT_{2A}: Receptor 2A da serotonina

5-HT_{2C}: Receptor 2C da serotonina

5-HT_{3A}: Receptor 3A da serotonina

5-HT₆: Receptor 6 da serotonina

5-HT₇: Receptor 7 da serotonina

5-HTP: 5-hidroxitriptofano

5-HIAA: 5-hidroxiindolacético

5-HTt: Turnover de serotonina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Fatores Ambientais e Plasticidade Fenotípica	17
2.2 Serotonina e Desenvolvimento	18
2.3 Isolamento Social, Serotonina e Comportamentos Emocionais.....	21
2.4 Enriquecimento Ambiental e Comportamentos Emocionais	22
3 HIPÓTESE	26
4 OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo Geral.....	27
4.2 Objetivos Específicos	27
5 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 Tipo de Estudo	28
5.2 Critérios de Elegibilidade	28
5.3 Estratégias de Busca	29
5.4 Extração de dados	31
5.5 Risco de viés	31
5.6 Tratamento de dados	32
6 RESULTADOS.....	33
6.1 Principais Características dos Estudos	35
6.2 Avaliação do Risco de Viés dos Estudos.....	36
6.3 Comportamentos emocionais	38
6.4 Resultados Relacionados a Serotonina	46
7 DISCUSSÃO	50
8 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO A – PROTOCOLO ENVIADO À PLATAFORMA PROSPERO.....	64
ANEXO B – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO do PROSPERO	80
ANEXO C – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	81

1 INTRODUÇÃO

O isolamento social (IS) é uma condição ambiental adversa que repercute sobre os comportamentos sociais, especialmente quando ocorre nos períodos iniciais do desenvolvimento (BEGNI *et al.*, 2020). No entanto, deve-se considerar que o IS a longo prazo também pode causar impactos negativos na plasticidade encefálica, bem como em diferentes contextos do desenvolvimento cognitivo e emocional (FONES; PORKESS, 2008).

O período de crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso é caracterizado por uma série de eventos biológicos como proliferação e diferenciação celular, migração de neurônios, proliferação de axônios, glicogênese, mielinização e sinaptogênese (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Em roedores, o período de desenvolvimento do sistema nervoso ocorre desde a gestação até as três primeiras semanas pós-natais (RICE e BARONE, 2000). Durante os períodos críticos, os organismos ficam vulneráveis à exposição de estímulos ambientais adversos (CAMERON; DEMERATH, 2002). Assim, o modelo de criação em IS no início da vida e adolescência é considerado uma exposição ambiental ao estresse (YORGASON *et al.*, 2016) que pode resultar em alterações neurocomportamentais (FONES; PORKESS, 2008; BRENES; FORNAGUERA; SEQUEIRA, 2020), moleculares, estruturais e funcionais em diferentes áreas do encéfalo (BIGGIO *et al.*, 2019).

Do ponto de vista neuroquímico, a serotonina (5-HT) é uma monoamina que participa de muitos processos fisiológicos (ŻMUDZKA *et al.*, 2018), incluindo a regulação das emoções e comportamentos (ŻMUDZKA *et al.*, 2018; MUCHIMAPURA; MARSDEN, 2004). Além disso, os fatores ambientais repercutem diretamente na disponibilidade de 5-HT (BONNIN e LEVITT, 2012). Como a 5-HT é um importante sinalizador no encéfalo fetal durante os períodos críticos do desenvolvimento (VOLPICELLI *et al.*, 2014), mudanças em sua disponibilidade podem levar à distúrbios na sinalização dos receptores serotoninérgicos (BONNIN; LEVITT, 2012; BRUMMLETE *et al.*, 2017) e alterações neurocomportamentais (VELASQUEZ; GOEDEN; BONNIN, 2013).

Em termos neurocomportamentais, o IS foi associado a comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão (IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016), bem como a alterações no metabolismo da serotonina (BRENES; FORNAGUERA;

SEQUEIRA, 2020). Assim, o IS parece alterar o *turnover* de 5-HT (BRENES *et al.*, 2008a; BRENES *et al.*, 2009) e influenciar na responsividade dos receptores serotoninérgicos (MARSDEN, KING e FONE, 2011). Adicionalmente, estudos ainda demonstraram que roedores submetidos ao IS apresentaram redução na transcrição gênica dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{3A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ no córtex pré-frontal; redução na expressão dos receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} no hipotálamo e mesencéfalo; aumento na expressão do receptor 5-HT₆ no hipocampo (BIBANCOS *et al.*, 2007; GRIGORYAN, PAVLOVA e ZAICENKO, 2022) e redução nos níveis de 5-HT na amígdala (KANEDA *et al.*, 2020). Desta forma, as diferenças nos níveis de serotonina podem ocorrer em função de mudanças na sensibilidade dos seus receptores no encéfalo (WALKER *et al.*, 2019).

O enriquecimento ambiental (EA) é uma estratégia de modificação ambiental que expõe animais de laboratório a novidades e potencializa estímulos sensoriais, físicos e cognitivos (GIRBOVAN; PLAMONDON, 2013). Esses estímulos ambientais são potentes indutores de neurogênese e neuroplasticidade (DAVIM; SILVA; VIEIRA, 2021). Assim, o EA parece reduzir comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão (PENA *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2009), bem como aumentar os níveis de 5-HT no córtex pré-frontal e hipocampo (BRENES *et al.*, 2008b; BRENES *et al.*, 2009) em roedores. Esses dados sugerem que o EA pode ser uma intervenção não farmacológica (REDOLAT *et al.*, 2021) capaz de atenuar os efeitos causados pelo IS. Assim, este trabalho utilizará uma busca sistemática da literatura como ferramenta para investigar os efeitos do IS e EA após o desmame sobre os comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão e componentes do sistema serotoninérgico em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fatores Ambientais e Plasticidade Fenotípica

O período de crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso é caracterizado por uma série de eventos biológicos (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002) que devem estabelecer sistemas corticais eficientes e especializados (TOOLEY; BASSETT; MACKEY, 2021). Em roedores, o período crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso ocorre desde a gestação e se estende até as três primeiras semanas pós-natais. Em humanos, a maturação neural ocorre, principalmente, na fase pré-natal (RICE; BARONE, 2000). Na fase de desenvolvimento, ocorre o aumento da proliferação das células neuroepiteliais, gliais e basais para que ocorra uma adequada formação de órgãos e tecidos (HARDWICK *et al.*, 2015). Simultaneamente, ocorre a migração das células para seus destinos finais e diferenciação celular para originar os neurônios funcionais (HARDWICK *et al.*, 2015). Essas etapas são altamente reguladas e envolvidas na neurogênese (SHOHAYEB *et al.*, 2018).

A formação de conexões neuronais também é importante durante a fase de desenvolvimento (BUDDAY; STEINMANN; KUHL, 2015). Durante a sinaptogênese, ocorrem processos bioquímicos e modificações morfológicas nos elementos pré e pós-sinápticos (RICE; BARONE, 2000). Os primeiros dendritos aparecem como pequenas protuberâncias neuronais e, quando maduros, aumentam a possibilidade de conexões sinápticas com axônios vizinhos (TIERNEY; NELSON, 2009). Assim, com a expansão da conectividade, os axônios organizam e multiplicam seus ramos (BUDDAY; STEINMANN; KUHL, 2015) para conectar neurônios em diferentes regiões encefálicas (FORBES; GALLO, 2017).

A mielinização é o processo final envolvido no desenvolvimento do encéfalo (TIERNEY; NELSON, 2009). Entretanto, em humanos e roedores, a mielinização progride até a adolescência (RICE; BARONE, 2000). Nesse processo, células gliais denominadas oligodendrócitos, envolvem os axônios dos neurônios para formar bainhas de mielina no sistema nervoso central (RICE; BARONE, 2000; WILLIAMSON; LYONS, 2018). Por outro lado, as células de *Schwann* mielinizam as células no sistema nervoso periférico (RICE; BARONE, 2000). Com isso, os axônios mielinizados transmitem informações rápidas e sincronizadas (TAU; PETERSON,

2010; WILLIAMSON; LYONS, 2018) que são essenciais para desenvolver habilidades motoras, sensoriais e cognitivas (GOLDSTEIN *et al.*, 2021).

Durante os períodos críticos de desenvolvimento do sistema nervoso, os organismos ficam vulneráveis aos estímulos ambientais (CAMERON; DEMERATH, 2002; VOSS *et al.*, 2017). Assim, os fatores ambientais adversos podem interferir na cascata dos processos de desenvolvimento (RICE; BARONE, 2000). Tais repercussões, por vezes, não podem ser revertidas em período posterior (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

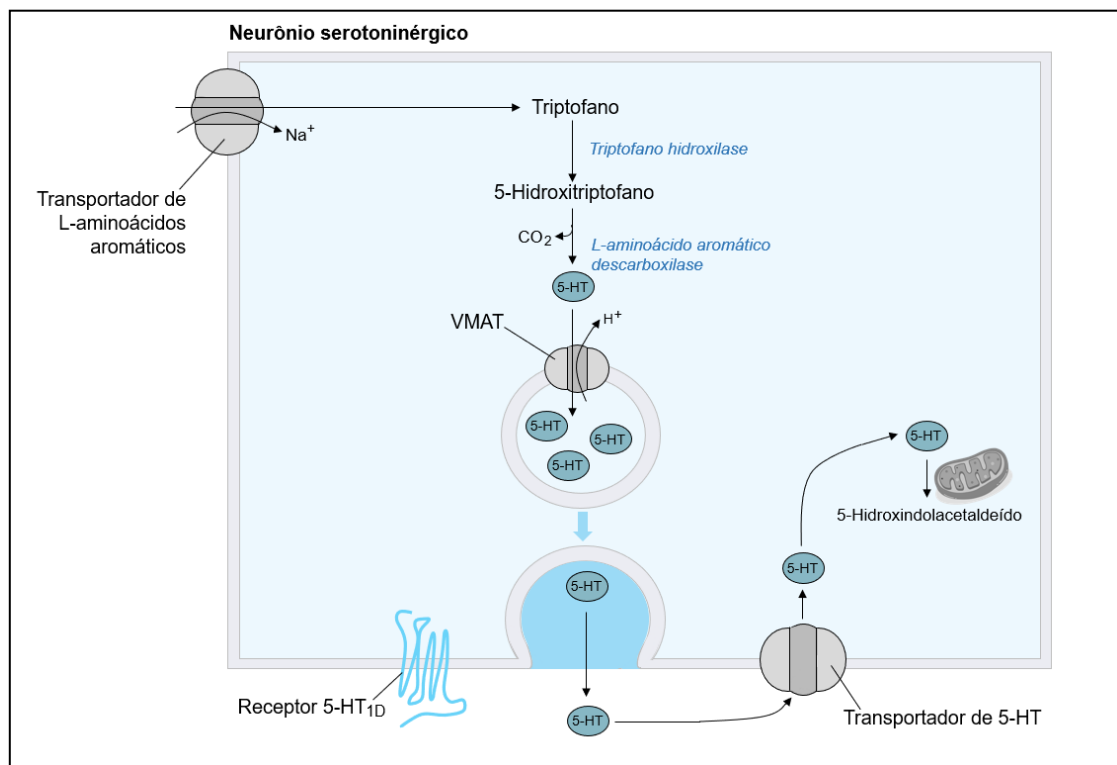
O IS constitui um estímulo ambiental de estresse que pode provocar alterações neurocomportamentais (FONES; PORKESS, 2008; MATSUMOTO *et al.*, 2019; BRENES; FORNAGUERA; SEQUEIRA, 2020). O início da vida e a pré-adolescência em roedores são considerados períodos críticos para os efeitos do IS (LUKKES *et al.*, 2012) por serem fases do desenvolvimento onde ocorrem maturação encefálica e organização dos circuitos neuroquímicos (GOGTAY *et al.*, 2004). Curiosamente, o IS parece reduzir a atividade do receptor serotoninérgico pré-sináptico (5-HT_{1B}) no hipocampo de roedores avaliados após o desmame (MUSHIMAPURA; MASON; MARSDEN, 2003). Neste sentido, modificações na sinalização de 5-HT parecem determinar uma suscetibilidade às alterações sociais e comportamentais (BRUMMELTE *et al.*, 2017). Portanto, alterações na disponibilidade de 5-HT durante os períodos críticos parecem repercutir no desenvolvimento encefálico (BRUMMELTE *et al.*, 2017, SODHI; SANDERS-BUSH, 2004) e oferecem uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento humano (BRUMMELTE *et al.*, 2017).

2.2 Serotonina e Desenvolvimento

A 5-HT é uma monoamina sintetizada a partir da enzima triptofano hidroxilase (TPH), responsável em converter o aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (PAWLUSKI, LI e LONSTEIN, 2019). Este produto é descarboxilado pela L-aminoácido descarboxilase aromático e convertido em 5-HT (LAM *et al.*, 2008) nos neurônios serotoninérgicos presentes nos núcleos da rafe do tronco encefálico (HANSWIJK *et al.*, 2020). Após ser armazenada nas vesículas sinápticas, a 5-HT é liberada no espaço extracelular e, posteriormente, ligada aos seus receptores pós-sinápticos (Figura 1) (HANSWIJK *et al.*, 2020). A sinalização de 5-HT é encerrada

pela sua recaptação através do transportador de serotonina (SERT) (LAM *et al.*, 2008). De volta à célula pré-sináptica, a 5-HT é metabolizada pela enzima monoamina oxidase (MAO-A) (AZMITIA, 2012; PAWLUSKI, LI e LONSTEIN 2019; LAM *et al.*, 2008) e, posteriormente, oxidada em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (LAM *et al.*, 2008). No entanto, quando a recaptação é bloqueada, a 5-HT pode permanecer biodisponível no espaço extracelular (AZMITIA, 2012).

Figura 1 - Síntese de serotonina.



Abreviaturas: 5-HT = serotonina; VMAT = transportador de monoamina vesicular.
Fonte: adaptado de Golan (2009).

A 5-HT interage com 7 classes (5-HT₁ a 5-HT₇) de receptores que incluem 15 subtipos (PUNDA *et al.*, 2021) em várias regiões do encéfalo e, assim, participa de muitos processos fisiológicos (ŽMUDZKA *et al.*, 2018), incluindo a regulação das emoções e comportamentos (ŽMUDZKA *et al.*, 2018; MUCHIMAPURA; MARSDEN, 2004). Além disso, durante o desenvolvimento, essa monoamina participa de processos como proliferação, migração, diferenciação e sinaptogênese (BONNIN e LEVITT, 2012), bem como atua na autorregulação de neurônios no sistema

serotoninérgico e em outros circuitos neuronais encefálicos (BORUE; CHEN; CONDRON, 2007).

Nos mamíferos, a 5-HT também desempenha papel no desenvolvimento encefálico devido ao aparecimento precoce dos neurônios serotoninérgicos e sua ampla distribuição nas regiões terminais (WHITAKER-AZMITIA, 2001). Em humanos, os neurônios serotoninérgicos são evidentes a partir da quinta semana gestacional (SUNDSTROM *et al.*, 1993). Os níveis de 5-HT aumentam até os 2 anos de idade e reduzem para atingir os níveis encontrados em adultos durante o quinto ano de vida (SODHI; SANDERS-BUSH, 2004). Por outro lado, em roedores, os neurônios serotoninérgicos surgem a partir do décimo dia de gestação (LEVITT; RAKIC, 1982).

A plasticidade durante o período de gestação e lactação é importante para que o encéfalo em desenvolvimento se adapte às mudanças ambientais (SHAH *et al.*, 2018). No entanto, estas fases abrem uma lacuna para que fatores externos eventualmente comprometam os circuitos neuronais (SHAH *et al.*, 2018). Como a 5-HT é um importante sinalizador no encéfalo fetal durante os períodos críticos do desenvolvimento (VOLPICELLI *et al.*, 2014), sua disponibilidade alterada pode levar à interrupção na sinalização de seus receptores (BONNIN; LEVITT 2012, BRUMMLETE *et al.*, 2017), bem como influenciar a expressão ou função de SERT com repercussões a longo prazo (DAWS; GOUKD, 2011). Assim, a disponibilidade de 5-HT pode ser afetada por distúrbios genéticos ou fatores ambientais (BONNIN; LEVITT, 2012) que resultam em uma série de distúrbios neuropsiquiátricos de origens no desenvolvimento (VELASQUEZ; GOEDEN; BONNIN, 2013).

Inicialmente, postulava-se que a 5-HT se originava do sangue materno (DAYER, 2014). Entretanto, já é conhecido que o precursor de triptofano, originado da mãe gestante, é convertido em 5-HT na placenta e, posteriormente, entregue à circulação fetal (BONNIN; LEVITT, 2012). Como o triptofano não pode ser sintetizado de forma endógena, dietas com baixo teor de triptofano podem diminuir a síntese de 5-HT durante a gestação e lactação, bem como induzir comportamentos desadaptativos, incluindo sintomas semelhantes à ansiedade e depressão (SHAH *et al.*, 2018). Estudo realizado com camundongos CD1 identificou que a prole de mães expostas a uma dieta deficiente de triptofano associada à ingestão de corticosterona apresentou aumento significativo de comportamentos relacionados à ansiedade, redução de serotonina no córtex pré-frontal e redução de seu *turnover* no hipocampo

(ZORATTO *et al.*, 2013). Assim, a depleção de triptofano na dieta promove lesões nos circuitos serotoninérgicos, altera a transmissão e produção de neurotransmissores, bem como promove alterações plásticas a longo prazo nos neurônios piramidais do córtex pré-frontal durante o desenvolvimento (SODHI; SANDERS-BUSH, 2004).

Adicionalmente, o eixo de serotonina fetal é altamente influenciado pela dieta materna (YE *et al.*, 2021), por exposições ambientais (MIGLIARINI *et al.*, 2013) e pela administração de fármacos que inibem seletivamente a recaptação da serotonina (DAYER, 2014). Com isso, fatores que interfiram na disponibilidade pré-natal de serotonina, podem retardar a neurogênese (SODHI; SANDERS-BUSH, 2004) e levar a mudanças duradouras que podem acarretar distúrbios neurocomportamentais (MIGLIARINI *et al.*, 2013).

2.3 Isolamento Social, Serotonina e Comportamentos Emocionais

O IS é uma condição estressante que promove efeitos neurocomportamentais antagônicos em humanos, primatas não-humanos e roedores (HARLOW *et al.*, 1965; PERSKY *et al.*, 1966; FONE; PORKESS, 2008). O processo de criação de roedores isolados em laboratórios envolve o alojamento em gaiolas individuais com contato visual, auditivo e olfativo com outros animais na mesma condição (FONE; PORKESS, 2008). No entanto, esses roedores não possuem a interação social com animais da mesma ou de outra ninhada e são manuseados apenas na troca de material de cama (FONE; PORKESS, 2008). Assim, o IS age como um estressor ambiental e pode afetar negativamente o sistema serotoninérgico (BOOIJ *et al.*, 2015). Com isso, é provável que o desenvolvimento de sistemas envolvidos na regulação de humor e ansiedade seja suscetível a perturbações na vida adulta em decorrência de experiências adversas no início da vida (LUKKES *et al.*, 2009).

A associação entre o IS durante o período inicial de desenvolvimento e os comportamentos emocionais tem sido descrita. Por exemplo, ratos machos (*Sprague-Dawley*) isolados após o desmame e mantidos nessa condição por 84 dias apresentaram comportamentos semelhantes à ansiedade observados pelo aumento do consumo de sacarose (BRENES, 2008b). Outro estudo evidenciou que ratos machos *Sprague-Dawley* isolados do DPN22 ao DPN32 também apresentaram comportamentos relacionados à ansiedade com menor entrada nos braços abertos

do labirinto em cruz (PASCUAL *et al.*, 2013). De fato, roedores imediatamente após o desmame requerem informações sensoriais, como o contato social e estímulos ambientais (MUCHIMAPURA; MARSDEN, 2004). No entanto, quando estas informações são insuficientes para o adequado desenvolvimento do hipocampo podem ocorrer alterações permanentes na função dos neurotransmissores, como a serotonina, o que resulta em alterações estruturais e comportamentais a longo prazo (MUCHIMAPURA; MARSDEN, 2004). Estudo em roedores *Sprague-Dawley* machos evidenciou que os animais isolados por 30 dias apresentaram uma desregulação emocional e comportamental evidenciada pelo aumento da locomoção no teste de campo aberto, aumento da mobilidade no teste de nado forçado e aumento do consumo de sacarose (BRENES; FORNAGUERA; SEQUEIRA-CARDOSO, 2020). Além disso, esses animais apresentaram uma redução na concentração de 5-HT, aumento dos níveis de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), bem como aumento no *turnover* de 5-HT no hipocampo (BRENES; FORNAGUERA; SEQUEIRA-CARDOSO, 2020).

Adicionalmente, estudo com camundongos C57BL/6J isolados socialmente após o desmame evidenciou redução na transcrição dos receptores 5-HT₇ no córtex pré-frontal e 5-HT₆ no hipocampo (BIBANCOS *et al.*, 2006). Houve ainda, redução na transcrição dos receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} no hipotálamo e mesencéfalo (BIBANCOS *et al.*, 2006). Esses resultados indicam uma importante interação entre o ambiente social e desinibição comportamental (BIBANCOS *et al.*, 2006). Assim, o IS pode interferir diretamente na disponibilidade de serotonina, na transmissão serotoninérgica que poderia modificar a plasticidade do organismo, além de promover alterações morfológicas, fisiológicas e funcionais duradouras (GALINDO *et al.*, 2015; DAUBERT; CONDRON, 2010).

2.4 Enriquecimento Ambiental e Comportamentos Emocionais

O EA é uma estratégia de modificação ambiental que expõe animais de laboratórios a novidades que potencializam o estímulo sensorial (GIRBOVAN; PLAMONDON, 2013; BROWNE; FLETCHER; ZEEB, 2016; SPARLING *et al.*, 2010), físico e cognitivo (GIRBOVAN; PLAMONDON, 2013; SPARLING *et al.*, 2010). No geral, os animais são mantidos em gaiolas maiores e coletivas com objetos coloridos de diferentes formas e texturas, bem como são expostos a atividades físicas através

das rodas de corrida, túneis e plataformas (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000; SPARLING *et al.*, 2010). Assim, a substituição rotineira dos objetos presentes nas gaiolas é um componente essencial da condição enriquecida (DIAMOND, 2001). Por outro lado, a idade, o tempo em que os animais são expostos ao enriquecimento e os testes utilizados podem influenciar as respostas comportamentais a curto e longo prazo (GIRBOVAN; PLAMONDON, 2013).

O EA promove modificações anatômicas e moleculares no encéfalo de roedores (ALWIS; RAJAN, 2013). Do ponto de vista anatômico, o EA aumenta a espessura do córtex cerebral (DIAMOND, 2001) pelo aumento das células nervosas e aumento no número e comprimento dos dendritos e espinhas dendríticas (DIAMOND *et al.*, 1964). Adicionalmente, as alterações moleculares incluem o aumento nos níveis dos fatores de crescimento nervoso e endotelial, bem como do fator neurotrófico derivado do cérebro (BNDF) (ICKES *et al.* 2000; BALL; MERCADO; ORDUÑA, 2019). Estudo mostrou que os efeitos positivos na cognição, memória e plasticidade neuronal de ratos expostos ao EA podem estar associados ao aumento dos níveis centrais de mBNDF (GIACOBBO *et al.*, 2019). Desta forma, sugere-se que o BNDF é um mediador molecular da plasticidade sináptica (CAO *et al.*, 2014) que assume papel importante na maturação dos neurônios (ICKES *et al.*, 2000; BALL; MERCADO; ORDUÑA, 2019), na neurogênese (LIU; NUSSLOCK, 2018) e está associado com as interações comportamentais entre o organismo e ambiente (TYLER *et al.*, 2002; LIU; NUSSLOCK, 2018).

A neurogênese do hipocampo que ocorre no giro denteado é um processo plástico regulado por inúmeros sinais químicos e fatores ambientais (BENARROCH, 2013). Embora a neurogênese do hipocampo esteja comprometida com o envelhecimento, a exposição ao EA parece intensificar esse processo independente da idade (SPEISMAN *et al.*, 2013). Estudo evidenciou que uma exposição de no mínimo 3 semanas ao EA pode induzir modificações na neurogênese em camundongos adultos (LEGER *et al.*, 2015). Adicionalmente, foi relatado que uma rápida exposição diária ao EA em ratos adultos, resultou em aumento das células recém-geradas no giro denteado, bem como melhora da memória de reconhecimento a longo prazo (BRUEL-JUNGGERMAN *et al.*, 2005). Esses resultados podem ser explicados pela variação de objetos e brinquedos ofertados no EA, proporcionando maior exploração do animal e melhora na capacidade de memorizar (BRUEL-JUNGGERMAN *et al.*, 2005). Neste sentido, embora não existam evidências

concretas sobre as vias moleculares envolvidas nos precursores neurogênicos iniciais, sugere-se que o EA possa atuar na via de sinalização do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) para aumentar a neurogênese do hipocampo adulto (GRÓŃSKA-PĘSKI; GONÇALVES; HÉBERT, 2021).

Do ponto de vista neuroquímico, existe uma associação entre o EA e o sistema serotoninérgico. Ratos machos *Sprague-Dawley* submetidos ao EA após o desmame apresentaram aumento dos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal (DPN114) (BRENES *et al.*, 2008b) e no hipocampo (DPN70) (BRENES *et al.*, 2009). Vale salientar que os efeitos nas concentrações de monoaminas podem variar de acordo com a duração do EA (LEGER *et al.*, 2015), bem como pela variação no tamanho da gaiola, idade e espécie do animal (SIMPSON; KELLY, 2011). Além disso, os mecanismos compensatórios de normalização dos níveis serotoninérgicos no córtex aparecem após períodos prolongados de EA (LEGER *et al.*, 2015). Isso poderia explicar a ausência de alterações no sistema serotoninérgico observadas em camundongos expostos ao EA durante 5 semanas (LEGER *et al.*, 2015). Os mecanismos regulatórios envolvidos no aumento da 5-HT em roedores expostos ao EA ainda não são elucidados (BRENES *et al.*, 2008b). De fato, parece haver um aumento de serotonina pelos terminais axônicos, bem como um aumento das fibras que inervam o córtex dos animais (BRENES *et al.*, 2008b). Outra suposição, seria a relação entre aumento de 5-HT e uma maior expressão do BDNF, demonstrando que o BDNF é capaz de manter a sobrevivência dos neurônios serotoninérgicos (BRENES *et al.*, 2008b).

Alterações decorrentes do IS podem ser atenuadas ou revertidas após modificações no ambiente de roedores (BRENES; FORNAGUERA; SEQUEIRA, 2020). Estudos demonstraram que o EA reduziu comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão (PENA *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2009), bem como promoveu melhorias na estrutura neural (PENA *et al.*, 2006). Animais idosos que foram expostos ao EA logo após o desmame apresentaram uma diminuição de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão, observados pelo maior tempo no braço aberto do labirinto em cruz (MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018) e movimentos vigorosos com as patas dianteiras no teste de nado forçado (SAENZ *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2008b; MOSAFERI *et al.*, 2015). Dessa forma, animais inseridos em ambientes com poucos estímulos sensoriais parecem apresentar comprometimento no desenvolvimento cognitivo e emocional (DAVIM; SILVA;

VIEIRA, 2021). Sendo assim, o EA pode ser uma estratégia utilizada para reduzir a expressão fenotípica de comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão, bem como aumentar os níveis encefálicos de 5-HT em ratos após o desmame.

3 HIPÓTESE

O isolamento social aumenta a expressão fenotípica de comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão, bem como reduz a disponibilidade sináptica encefálica de serotonina em ratos. Por outro lado, o enriquecimento ambiental parece ser uma estratégia de intervenção ambiental que promove redução nos comportamentos emocionais e aumenta a disponibilidade de serotonina em várias regiões encefálicas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Identificar os efeitos do isolamento social e do enriquecimento ambiental sobre comportamentos emocionais e componentes do sistema serotoninérgico em ratos após o desmame.

4.2 Objetivos Específicos

Em prole de ratos submetida ao isolamento social e ao enriquecimento ambiental:

- Verificar a expressão fenotípica de comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão;
- Identificar efeitos sobre componentes do sistema serotoninérgico encefálico (conteúdo de serotonina, transportador de serotonina, receptores do sistema serotoninérgico);
- Avaliar o risco de viés dos estudos;
- Reunir os protocolos de enriquecimento ambiental utilizados nos estudos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Tipo de Estudo

Trata-se de uma revisão sistemática de estudos primários submetida e protocolada na plataforma *International Prospective Register of Systematic Reviews* – PROSPERO sob o número CRD42020200881 (ANEXO 1) e descrita segundo as recomendações *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* - PRISMA (PAGE *et al.*, 2021).

5.2 Critérios de Elegibilidade

Foram considerados elegíveis os estudos experimentais primários que avaliaram grupos de ratos submetidos ao IS, EA e condição social normal após o desmame. Por outro lado, foram inelegíveis os estudos que utilizaram roedores transgênicos, estudos *ex-vivo*, estudos *in vitro* ou em estudos *in silico*. Além disso, foram desconsiderados os trabalhos que não utilizaram ambiente controle. Os artigos selecionados com base em leitura integral foram incluídos de acordo com as características determinadas para o PICO (população, intervenção, comparação e desfechos) (Quadro 1).

Quadro 1 - Critérios de elegibilidade dos estudos

	Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
População (P)	Ratos	Estudos com roedores transgênicos e camundongos.
Intervenção (I)	Animais expostos ao isolamento social (1 animal por gaiola) ou enriquecimento ambiental (mais de 2 animais por gaiola + objetos estimulantes) após o desmame.	Estudos que utilizaram estresse, restrição alimentar, interferência de agentes externos no ambiente enriquecido e estudos que não realizaram o experimento após o desmame.

Comparação (C)	Ambiente controle (gaiola de tamanho normal contendo de 2-5 animais por gaiola)	Estudos que não utilizaram ambiente controle.
Desfechos (O)	Desfechos primários: comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão. Desfechos secundários: avaliação dos componentes do sistema serotoninérgico no cérebro (conteúdo, transportador e receptores de serotonina).	Nenhum.
Parâmetros de publicação	Não houve restrição de data e idioma dos artigos.	Nenhum.

Fonte: A autora (2023).

5.3 Estratégias de Busca

As buscas bibliográficas foram realizadas em abril de 2021 e atualizadas em julho de 2022 nas seguintes bases de dados eletrônicas, sem restrições de idioma e ano de publicação: MEDLINE/PubMed, LILACS, *Scopus*, *Web of Science*, EMBASE e *Sigle* via *open gray*. Para cada uma das bases de dados utilizadas, foram criadas estratégias de buscas específicas. Os termos “*social isolation*”, “*behavior*” e “*rat*” foram utilizados de acordo com a descrição do *Health Sciences Descriptors* (DeCS) e *Medical Subject Headings* (MESH). Os termos “*environmental enrichment*”, “*enriched environment*”, “*anxiety*” e “*depression*” foram utilizados de acordo com os descritores e *Emtree* para a plataforma EMBASE e como termos independentes, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 - Estratégias de buscas utilizadas no DeCS, MESH e Emtree

Base de dados	Estratégias de buscas
MEDLINE/ <i>PubMed</i>	((("environmental enrichment") OR ("enriched environment")) AND (behavior))
LILACS	("environmental enrichment") OR ("enriched environment") AND (behavior)
<i>Web of Science</i>	((TS=(environmental enrichment)) OR TS=(enriched environment)) AND TS=(social isolation)) AND TS=(rat)
EMBASE	((('environmental enrichment'/exp OR 'environmental enrichment' OR 'enriched environment') AND behavior OR anxiety OR depression) AND 'social isolation' NOT human)
SCOPUS	(TITLE-ABS-KEY ("environmental enrichment") OR TITLE-ABS-KEY ("enriched environment") AND TITLE-ABS-KEY (behavior) AND TITLE-ABS-KEY ("social isolation") AND NOT TITLE-ABS-KEY (human))
SIGLE via <i>open gray</i>	"environmental enrichment" OR "enriched environment" AND "social isolation"

Fonte: A autora (2023).

Dois revisores (RPBS e ILP) realizaram as buscas independentemente. Na primeira fase, os estudos foram selecionados por meio de seus títulos e resumos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Na segunda fase, os estudos selecionados foram lidos na íntegra para inclusão ou exclusão definitiva, conforme resultado da revisão sistemática. Após a seleção dos artigos, os dois revisores se reuniram para comparar os achados. O terceiro revisor (LCMG) foi consultado em casos de divergências que não foram resolvidas em reunião de consenso.

5.4 Extração de dados

Foram obtidas informações referentes a título, autoria, revista e ano de publicação dos artigos selecionados por pesquisadores independentes através de formulário padronizado. Posteriormente, foram extraídos dados referentes à metodologia: espécie utilizada; número de grupos experimentais; tamanho das gaiolas utilizadas para compor os grupos; duração do isolamento social e da exposição ao ambiente enriquecido; elementos utilizados para enriquecer o ambiente e condições padrão de biotério. Os dados primários referentes ao comportamento semelhante à ansiedade e depressão foram avaliados por estudos que utilizaram testes como labirinto elevado em cruz, campo aberto, teste do nado forçado ou qualquer outro teste usado para avaliar esses comportamentos. O sistema serotoninérgico foi avaliado pelos estudos que utilizaram imunorreatividade ou expressão gênica de componentes do sistema serotoninérgico (expressão gênica em uma certa quantidade de proteína cerebral em relação a um conteúdo conhecido de proteína - geralmente -actina) ou expressão proteica (dada pelo tamanho das bandas reativas em uma membrana de nitrocelulose) ou o conteúdo total de serotonina no orifício ou parte do encéfalo (quantificado em nanogramas/contéudo total de proteína encefálica).

Os dados foram extraídos dos textos, gráficos e tabelas e progressivamente arquivados em tabelas destinadas a descrever as características, variáveis analisadas/resultados e avaliação do risco de viés. Em todas as tabelas estão descritos os nomes dos autores e ano de publicação dos artigos. Para esquematização dos resultados foram usadas 3 tabelas: a primeira tabela descreve informações referentes ao início e duração das condições de alojamento; a segunda tabela mostra os dados dos testes comportamentais e dos achados emocionais; a terceira tabela apresenta os dados referentes à concentração de serotonina.

5.5 Risco de viés

O risco de viés dos estudos incluídos para revisão foi avaliado conforme ferramenta *SYRCLE's Risk of Bias* (HOOIJMANS *et al.*, 2014) que classifica o risco de viés como “alto”, “baixo” ou “incerto”. Dois revisores (RPBS e RKBS) avaliaram de forma independente os seguintes domínios: randomização, características basais

similares entre os grupos, sigilo de alocação, alojamento aleatório, cegamento de participantes e pessoal, avaliação de resultados aleatórios, cegamento de avaliação de resultados, dados de resultados incompletos, descrição seletiva do desfecho e outras fontes de viés. As divergências foram resolvidas em uma reunião de consenso.

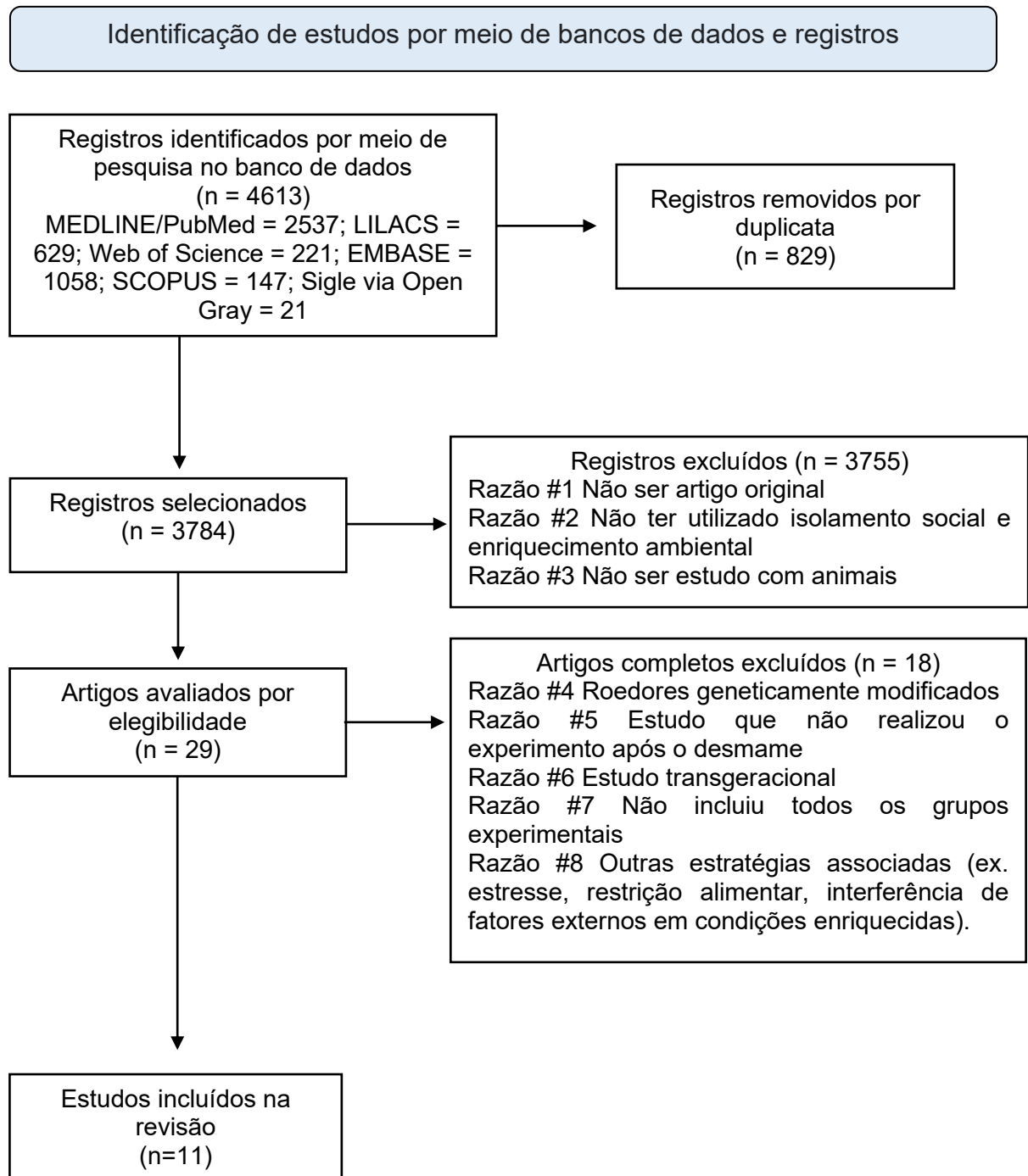
5.6 Tratamento de dados

Os resultados foram apresentados na forma de síntese descritiva, utilizando valores absolutos e relativos (porcentagens) para o risco de viés. Para avaliar o grau de concordância entre os revisores, foi aplicado o índice Kappa durante a seleção dos artigos, bem como na etapa de avaliação do risco de viés. O quadro resumo da avaliação do risco de viés foi realizado no software Review Manager® versão 5.3. Os autores dos trabalhos incluídos foram consultados para esclarecimento sobre dados quantitativos ou para detalhes adicionais. No entanto, devido à ausência de retorno por parte dos mesmos, tornou-se inviável a possibilidade de aplicar metanálise na presente revisão.

6 RESULTADOS

A pesquisa realizada nas bases de dados eletrônicas identificou 4613 estudos no MEDLINE/PubMed, LILACS, *Web of Science*, EMBASE, SCOPUS e Sigle via Open Gray. Destes, 829 artigos foram removidos por duplicata nas bases. Após a análise do título e resumo, 3755 artigos foram excluídos por não estarem em concordância com os critérios de elegibilidade. Posteriormente, após a leitura completa dos 29 artigos selecionados, 11 foram incluídos como resultados desta revisão por atenderem aos critérios de inclusão (Figura 2) (Kappa = 0,71; indica concordância substancial).

Figura 2 - Fluxograma do processo de seleção de estudos baseado no PRISMA 2020.



Fonte: A autora (2023).

6.1 Principais Características dos Estudos

Os dados gerais referentes às condições de ambiente estão descritos na Quadro 3. Dos onze artigos selecionados, a maioria utilizou ratos Sprague-Dawley machos (SAENZ *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2008a; BRENES *et al.*, 2008b; BRENES *et al.*, 2009; PASCUAL *et al.*, 2013; ARNDT *et al.*, 2015; MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018), um artigo avaliou ratos machos *Long-Evans* (HELLEMANS *et al.*, 2004), dois estudos utilizaram ratos machos *Wistar* (MOSAFERI *et al.*, 2015 e TANÁS *et al.*, 2015) e um avaliou ratos *Wistar* de ambos os sexos (YILDIRIM *et al.*, 2012). Os animais foram distribuídos em diferentes condições de alojamento (controle, isolamento e enriquecimento) entre a idade do desmame e o período de adaptação que correspondeu ao 21º e o 30º dia pós-natal.

Quadro 3 - Características gerais dos estudos incluídos na revisão sistemática

Autor (ano)	População	Condições gerais de IS e EA	
		Início das condições sociais	Duração
Hellemans <i>et al.</i> (2004)	Long-Evans (Machos)	DPN21	12 semanas
Saenz <i>et al.</i> (2006)	Sprague-Dawley (Machos)	DPN22-24	11 semanas
Brenes <i>et al.</i> (2008)a	Sprague-Dawley (Machos)	DPN30	84 dias
Brenes <i>et al.</i> (2008)b	Sprague-Dawley (Machos)	DPN30	84 dias
Brenes <i>et al.</i> (2009)	Sprague-Dawley (Machos)	DPN28	42 dias
Yildirim <i>et al.</i> (2012)	Wistar (Machos e fêmeas)	DPN21	6 semanas
Pascual <i>et al.</i> (2013)	Sprague-Dawley (Machos)	DPN22	10 dias
Mosaferi <i>et al.</i> (2015)	Wistar (Machos)	DPN21	73 dias
Arndt <i>et al.</i> (2015)	Sprague-Dawley (Machos)	DPN21	30 dias
Tanás <i>et al.</i> (2015)	Wistar (Machos)	DPN24	73 dias
Mora-Gallegos <i>et al.</i> (2018)	Sprague-Dawley (Machos)	DPN30	72 dias

DPN= dia pós-natal; EA= enriquecimento ambiental; IS= isolamento social.

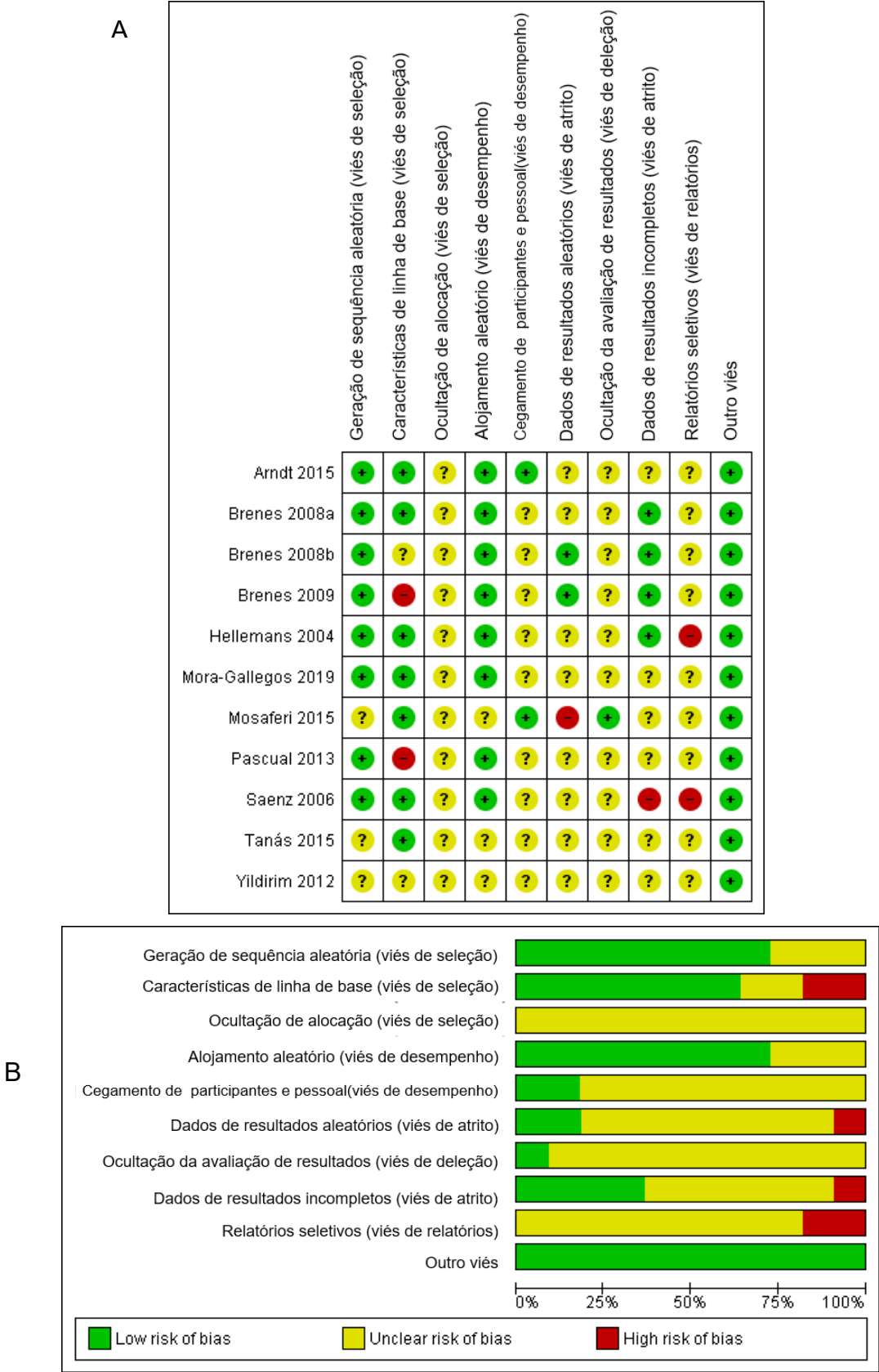
Fonte: A autora (2023).

A duração das condições de alojamento variou entre 10 a 42 dias (BRENES *et al.*, 2009; YILDIRIM *et al.*, 2012; PASCUAL *et al.*, 2013; ARNDT *et al.*, 2015) e 72 a 84 dias (HELLEMANS *et al.*, 2004; SAENZ *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2008a; BRENES *et al.*, 2008b; MOSAFERI *et al.*, 2015; TANÁS *et al.*, 2015; MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018). O período em que os animais foram expostos aos testes experimentais variou entre 1 a 6 dias (BRENES *et al.*, 2009; YILDIRIM *et al.*, 2012; PASCUAL *et al.*, 2013; TANÁS *et al.*, 2015; MOSAFERI *et al.*, 2015; ARNDT *et al.*, 2015) e de 42 a 69 dias (BRENES *et al.*, 2008a; BRENES *et al.*, 2008b; SAENZ *et al.*, 2006; MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018). Apenas um dos artigos não mencionou a idade que iniciou os testes comportamentais (HELLEMANS *et al.*, 2004).

6.2 Avaliação do Risco de Viés dos Estudos

Os dados referentes à avaliação do risco de viés dos artigos selecionados estão apresentados na Figura 3 (Kappa = 0,98; indica concordância quase perfeita). A maioria dos estudos randomizaram os animais dos grupos experimentais (HELLEMANS *et al.*, 2004; SAENZ *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2008a; BRENES *et al.*, 2008b; BRENES *et al.*, 2009; PASCUAL *et al.*, 2013; ARNDT *et al.*, 2015; MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018), relataram informações das características basais similares entre os grupos (HELLEMANS *et al.*, 2004; SAENZ *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2008a; ARNDT *et al.*, 2015; MOSAFERI *et al.*, 2015; TANÁS *et al.*, 2015; MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018) e alojamento aleatório (HELLEMANS *et al.*, 2004; SAENZ *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2008a; BRENES *et al.*, 2008b; BRENES *et al.*, 2009; PASCUAL *et al.*, 2013; ARNDT *et al.*, 2015 e MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018). Nenhum dos estudos mencionou sobre o sigilo de alocação dos animais. Apenas Arndt *et al.* (2015) e Mosaféri *et al.* (2015) relataram cegamento do investigador durante as intervenções. Por outro lado, somente Mosaféri *et al.* (2015) relatou cegamento do investigador na avaliação dos resultados. Por fim, a maioria dos estudos (81,8%) foram classificados com risco de viés incerto na descrição dos desfechos encontrados (BRENES *et al.*, 2008a; BRENES *et al.*, 2008b; BRENES *et al.*, 2009; YILDIRIM *et al.*, 2012; PASCUAL *et al.*, 2013; ARNDT *et al.*, 2015; MOSAFERI *et al.*, 2015; TANÁS *et al.*, 2015; MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018).

Figura 3 - Avaliação do risco de viés, seguindo as recomendações da ferramenta SYRCLE. A) Risco de viés dos estudos com seus respectivos resultados. B) Risco de viés dos estudos e suas respectivas porcentagens em cada item da avaliação.



6.3 Comportamentos emocionais

Para compreender o impacto das condições ambientais sobre os aspectos emocionais, os artigos realizaram alguns testes comportamentais que estão descritos na Quadro 4. Para identificar comportamentos semelhantes à ansiedade, foram utilizados o teste de labirinto em cruz elevado (HELLEMANS *et al.*, 2004; PASCUAL *et al.*, 2013; YILDIRIM *et al.*, 2012; MOSAFERI *et al.*, 2015; TANÁS *et al.*, 2015; MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018; BRENES *et al.*, 2009), teste do campo aberto (BRENES *et al.*, 2008b; TANÁS *et al.*, 2015; MOSAFERI *et al.*, 2015; MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018; BRENES *et al.*, 2009), condicionamento do medo (MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018), caixa preta-branca (HELLEMANS *et al.*, 2004) e teste de interação social (TANÁS *et al.*, 2015). Para avaliar comportamentos semelhantes à depressão, foram realizados testes de nado forçado (SAENZ *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2008b; BRENES *et al.*, 2009; YILDIRIM *et al.*, 2012; MOSAFERI *et al.*, 2015; ARNDT *et al.*, 2015) e teste de preferência à sacarose (SAENZ *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2008a; YILDIRIM *et al.*, 2012).

Os Testes de Labirinto em Cruz foram realizados entre o DPN33 e DPN103. Houve aumento do comportamento semelhante à ansiedade no grupo IS no estudo de Pascual *et al.* (2013). Por outro lado, Brenes *et al.* (2009), encontrou aumento do comportamento semelhante à ansiedade no grupo EA no DPN60 (maior número de entradas nos braços fechados e de cruzamentos nos braços). Ao contrário, dois estudos evidenciaram parâmetros para o efeito ansiolítico nos animais submetidos ao EA (HELLEMANS *et al.*, 2004; MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018). Dois artigos não encontraram diferenças entre os grupos estudados (TANÁS *et al.*, 2015; YILDIRIM *et al.*, 2012). Quando avaliado o *Stretch-Attend Posture* (SAP), Mora-Gallegos *et al.* (2018) não encontrou diferença entre os animais em IS ou EA. Um estudo associou os resultados do labirinto em cruz apenas com o comportamento exploratório sem especificar comportamento semelhante à ansiedade (MOSAFERI *et al.*, 2015).

Em relação ao Teste do Campo Aberto, estudos observaram uma melhor habituação ao ambiente dos testes nos animais submetidos ao EA, através da redução de frequência do cruzamento do campo (*crossing*) e do comportamento exploratório (*rearing*), bem como pelo aumento da duração de autolimpeza (*grooming*) (BRENES *et al.*, 2008b; MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018). Adicionalmente, Brenes *et al.* (2009), também identificou uma melhor habituação ao

ambiente nos animais do grupo EA através do aumento no tempo de *grooming* no DPN62.

Dois artigos não encontraram diferenças entre as condições de ambiente e comportamentos semelhantes à ansiedade através do Teste da Caixa Preta e Branca (HELLEMANS *et al.*, 2004), Teste de Campo Aberto e Teste de Interação Social (TANÁS *et al.*, 2015). Por outro lado, foi observado comportamento semelhante à ansiedade e menor adaptação a situações de perigo em animais IS no DPN90 através do teste de condicionamento do medo (MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018).

Dos estudos que utilizaram o Teste de Preferência à Sacarose, um identificou comportamentos semelhantes à depressão pelo aumento da ingestão de solução de sacarose (ml) (BRENES *et al.*, 2008a) e água (ml) (BRENES *et al.*, 2008a; YILDIRIM *et al.*, 2012) em animais expostos ao IS. Por outro lado, comportamento depressivo através do aumento da ingestão de sacarose foi observado tanto no grupo IS quanto no EA (YILDIRIM *et al.*, 2012). Em contrapartida, um efeito antidepressivo foi encontrado no DPN94 em animais expostos ao EA, através da redução no percentual de preferência à sacarose (BRENES *et al.*, 2008a).

O Teste de Nado Forçado demonstrou resultados homogêneos. Estudos identificaram comportamentos depressivos em animais IS, através do aumento da imobilidade (BRENES *et al.*, 2008a; MOSAFERI *et al.*, 2015) e pela redução do mergulho (*diving*) e esforço (*struggling*) (YILDIRIM *et al.*, 2012). Além disso, Yildirim *et al.* (2012) também encontrou comportamento semelhante à depressão no grupo AE e IS pelo aumento da imobilidade. Por outro lado, efeitos antidepressivos foram percebidos nos animais submetidos ao EA através dos comportamentos analisados no Teste de Nado Forçado, sendo eles: aumento do nado (*swimming*), (BRENES *et al.*, 2008b; BRENES *et al.*, 2009) aumento do mergulho (*diving*) (BRENES *et al.*, 2008b; SAENZ *et al.*, 2006) e aumento da escalada (*climbing*) (BRENES *et al.*, 2008b; SAENZ *et al.*, 2006; ARNDT *et al.*, 2015).

Quadro 4 - Efeito do isolamento social e enriquecimento ambiental sobre os comportamentos emocionais de ratos

TESTE DE CAMPO ABERTO				
Autor (ano)	Parâmetros avaliados	Idade dos experimentos	Resultados analisados	Interpretação dos resultados
Brenes <i>et al.</i> (2008)b	<i>Grooming</i>	DPN37	↑ duração no grupo EA	Melhor habituação
		DPN65	↑ duração no grupo EA	Melhor habituação
		DPN93	↑ duração no grupo EA	Melhor habituação
		DPN107	ND	-
	<i>Crossing</i>	DPN37	↓ frequência no grupo EA	Melhor habituação
		DPN65	↓ frequência no grupo EA	Melhor habituação
		DPN93	↓ frequência no grupo EA	Melhor habituação
		DPN107	↓ frequência no grupo EA	Melhor habituação
	<i>Rearing</i>	DPN37	↓ frequência no grupo EA	Melhor habituação
		DPN65	ND	-
		DPN93	ND	-
		DPN107	↑ frequência no grupo IS	Efeito do estresse na natação (PND106)
Brenes <i>et al.</i> 2009	<i>Crossing</i>	DPN62	↑ frequência no grupo IS	Menor habituação
	<i>Rearing</i>	DPN62	ND	-
	<i>Grooming</i>	DPN62	↑ tempo no grupo EA	Melhor habituação
Tanás <i>et al.</i> (2015)	Locomoção	DPN104	ND	-
	<i>Rearing</i>	DPN104	ND	-
Mora-Gallegos <i>et al.</i> (2018)	Locomoção	DPN28	ND	-
		DPN58	↓ distância ao longo do campo aberto no grupo EA	Melhor habituação
		DPN88	↓ distância ao longo do campo	Melhor habituação

			aberto no grupo EA	
	<i>Rearing</i>	DPN28	ND	-
		DPN58	↓ frequência e tempo de <i>rearing</i> no grupo EA	Melhor habituação
		DPN88	ND	-
	Grooming	DPN28	ND	-
		DPN58	↑ no grupo EA	Melhor habituação
		DPN88	↑ no grupo EA	Melhor habituação
	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO			
Autor, ano	Parâmetros avaliados	Idade dos experimentos	Resultados analisados	Interpretação dos resultados
Hellemans <i>et al.</i> (2004)	Tempo em braços abertos (%)	NI	↑ nos grupos EA e IS+EA	↓ comportamento semelhante à ansiedade
	Número de entradas em braços abertos	NI	↑ nos grupos IS+EA e EA	↓ comportamento semelhante à ansiedade
Brenes <i>et al.</i> 2009	Tempo gasto nos braços abertos (%)	DPN60	ND	-
	Tempo gasto nos braços fechados (%)	DPN60	ND	-
	Tempo gasto na área central (%)	DPN60	ND	-
	Número de entrada nos braços abertos (frequência)	DPN60	ND	-
	Número de entrada nos	DPN60	↑ no grupo EA	↑ comportamento semelhante à ansiedade

	braços fechados (frequência)			
	Total de cruzamento os braços (frequência)	DPN60	↑ no grupo EA	↑ comportamento semelhante à ansiedade
Yildirim <i>et al.</i> (2012)	Tempo gasto nos braços abertos	DPN70	ND	-
	Frequência de entrada nos braços	DPN70	ND	-
Pascual <i>et al.</i> (2013)	Entrada nos braços abertos (%)	DPN33-34	↓ no grupo IS	↑ comportamento semelhante à ansiedade
Tanás <i>et al.</i> (2015)	Tempo total gasto nos braços abertos e fechados	DPN103	ND	-
	Número de entradas nos braços abertos e fechados	DPN103	ND	-
Mosaferi <i>et al.</i> (2015)	Tempo nos braços abertos	DPN93	↑ no grupo IS em relação ao grupo controle	Comportamento exploratório
	% Entrada nos braços abertos	DPN93	↑ nos grupos IS e EA	Comportamento exploratório
	Total de entrada nos braços	DPN93	↑ no grupo controle	Maior atividade locomotora
Mora-Gallegos <i>et al.</i> (2018)	<i>Stretch -Attend Posture (SAP)</i>	DPN29	ND	-
		DPN89	↑ no grupo controle	↑ comportamento semelhante à ansiedade
	<i>Head-Dipping (HD)</i>	DPN29	ND	-
		DPN89	↑ no grupo EA	↓ comportamento semelhante à ansiedade
	Tempo nos braços abertos	DPN29	ND	-
		DPN89	ND	-
	Tempo nos braços fechados	DPN29	ND	-

		DPN89	ND	-
	CONDICIONAMENTO DO MEDO			
Autor, ano	Parâmetros avaliados	Idade dos experimentos	Resultados analisados	Interpretação dos resultados
Mora-Gallegos <i>et al.</i> (2018)	<i>Rearing</i>	DPN90	↑ no grupo IS	↑ Resposta ansiosa e reativa
	<i>Grooming</i>	DPN90	ND	-
	<i>Freezing</i>	DPN90	↓ no grupo IS	↓ Adaptação à situações perigosas
	CAIXA PRETA/BRANCA			
Autor, ano	Parâmetros avaliados	Idade dos experimentos	Resultados analisados	Interpretação dos resultados
Hellemans <i>et al.</i> (2004)	Tempo gasto em cada compartimento	NI	ND	-
	Número de entradas no compartimento branco	NI	ND	-
	TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE			
Autor, ano	Parâmetros avaliados	Idade dos experimentos	Resultados analisados	Interpretação dos resultados
Saenz <i>et al.</i> (2006)	Ingestão de água (ml)	Semanas (6 e 10)	↑ no grupo EA	↑ comportamento semelhante à depressão
Brenes <i>et al.</i> (2008)a	Consumo de sacarose (ml)	DPN66	↑ no grupo IS em relação ao grupo EA	↑ comportamento semelhante à depressão
		DPN94	↑ no grupo IS em relação ao	↑ comportamento semelhante à depressão

	Ingestão de água (ml)		grupo controle	
		DPN109	ND	-
		DPN66	ND	-
		DPN94	ND	-
	Preferência à sacarose (%)	DPN109	↑ no grupo IS em relação ao grupo EA	↑ comportamento semelhante à depressão
		DPN66	ND	-
		DPN94	↓ no grupo EA	↓ comportamento semelhante à depressão
		DPN109	ND	-
Yildirim <i>et al.</i> (2012)	Consumo de sacarose (ml)	DPN70	↑ no grupo IS e EA	Resposta de enfrentamento alterada em situação de estresse
	Ingestão de água (ml)	DPN70	↑ no grupo IS e ↓ no grupo EA	Resposta de enfrentamento alterada em situação de estresse
	Preferência à sacarose (%)	DPN70	ND	-
	TESTE DE NADO FORÇADO			
Autor, ano	Parâmetros avaliados	Idade dos experimentos	Resultados analisados	Interpretação dos resultados
Saenz <i>et al.</i> (2006)	<i>Climbing</i>	Semana (11)	↑ no grupo EA	↓ comportamento semelhante à depressão
	<i>Diving</i>	Semana (11)	↑ no grupo EA	↓ comportamento semelhante à depressão
Brenes <i>et al.</i> (2008)b	Imobilidade	DPN106	↑ tempo no grupo IS	↑ comportamento semelhante à depressão
	<i>Swimming and climbing</i>	DPN106	↑ tempo no grupo EA	↓ comportamento semelhante à depressão
	<i>Diving</i>	DPN106	↑ tempo no grupo EA	↓ comportamento semelhante à depressão
Brenes <i>et al.</i> 2009	Imobilidade	DPN64-65	↓ tempo no grupo EA (PND65)	Resposta de enfrentamento diante de uma situação de estresse incontrolável

	<i>Swimming</i>	DPN64-65	↑ tempo no grupo EA (DPN64-65)	↓ comportamento semelhante à depressão
	<i>Climbing</i>	DPN64-65	↑ tempo em todos os grupos	↓ comportamento semelhante à depressão
Yildirim <i>et al.</i> (2012)	<i>Diving</i>	DPN70	↓ no grupo IS	↑ comportamento semelhante à depressão
	<i>Struggling</i>	DPN70	↓ no grupo IS	↑ comportamento semelhante à depressão
	Imobilidade	DPN70	↑ nos grupos EA e IS	↑ comportamento semelhante à depressão
Arndt <i>et al.</i> (2015)	Imobilidade – pré teste (Exp. II)	DPN56-61	ND	-
	<i>Swimming</i> – pré teste (Exp. II)	DPN56-61	↑ no grupo controle em relação ao grupo IS	↑ comportamento de fuga
	<i>Climbing</i> – pré teste (Exp. II)	DPN56-61	↑ no grupo EA	↓ comportamento semelhante à depressão
	<i>Swimming</i> – pré teste (Exp. II)	DPN56-61	ND	-
	Imobilidade – pré teste (Exp. III)	DPN56-61	ND	-
	<i>Swimming</i> – pré teste (Exp. III)	DPN56-61	ND	-
	<i>Climbing</i> – pré teste (Exp. III)	DPN56-61	↑ no grupo EA em relação ao grupo controle	↓ comportamento semelhante à depressão

NI = nenhuma informação; ND = sem diferença; DPN = dia pós-natal; EA = enriquecimento ambiental; IS = isolamento social
 Fonte: A autora (2023).

6.4 Resultados Relacionados a Serotonina

Apenas dois artigos avaliaram os níveis de serotonina nos experimentos (BRENES *et al.*, 2008b; BRENES *et al.*, 2009). Os estudos avaliaram as concentrações de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) e *turnover* de serotonina (5-HTt) no córtex pré-frontal (CPF) e estriado ventral (EV) (BRENES *et al.*, 2008b), bem como no hipocampo (BRENES *et al.*, 2009) (Quadro 5). As concentrações de 5-HT estiveram aumentadas no córtex e hipocampo em animais expostos ao EA (BRENES *et al.*, 2008b e BRENES *et al.*, 2009). Ratos submetidos ao IS apresentaram aumento nas concentrações de 5-HTt no córtex (BRENES *et al.*, 2008b) e hipocampo (BRENES *et al.*, 2009). Além disso, houve redução na concentração de 5-HT no EV em animais nas mesmas condições de IS (BRENES *et al.*, 2008b).

Quadro 5 - Avaliação de componentes serotoninérgicos identificados nos estudos

Autor, ano	Técnica utilizada	Parâmetros avaliados	Região avaliada	Resultados
Brenes et al. (2008)b	HPLC-EC	5-HT	Córtex pré-frontal	↑ no grupo EA
			Estriado ventral	ND
		5-HIAA	Córtex pré-frontal	ND
			Estriado ventral	ND
		5-HIAA/5-HT	Córtex pré-frontal	↑ no grupo IS
			Estriado ventral	↓ no grupo EA
Brenes et al. (2009)	HPLC-EC	5-HT	Hipocampo	↑ no grupo EA
		5-HIAA	Hipocampo	ND
		5-HTt	Hipocampo	↑ no grupo IS

HPLC-EC = cromatografia líquida acoplada com detecção eletroquímica; 5-HT = serotonina; 5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético; 5-HTt = turnover de 5-HT; EA = enriquecimento ambiental; IS = isolamento social; ND = nenhuma diferença.

Fonte: A autora (2023).

Quadro 6 - Características gerais do ambiente enriquecido nos estudos incluídos

Ator (ano)	Tamanho da gaiola	Número de animais por gaiola	Características	Frequência de trocas de objetos
Hellemans <i>et al.</i> (2004)	75x75x180 cm altura	12	Três níveis ligados por rampas com várias rodas e brinquedos.	Quinzenal
Saenz <i>et al.</i> (2006)	120x70x70 cm altura	15	Piso retangular de aço inox com níveis de árvores, paredes e teto cobertos com tela metálica (furos de 2,54 cm). Objetos de plástico não mastigáveis, dois tubos de PVC e roda de corrida.	A cada 2 dias
Brenes <i>et al.</i> (2008)a	120x70x100 cm altura	15	Objetos de plástico não mastigáveis e dois tubos de PVC, cinco comedouros e duas garrafas de água.	1 ou 2 dias
Brenes <i>et al.</i> (2008)b	120x70x100 cm altura	15	Objetos de plástico não mastigáveis e dois tubos de PVC, cinco comedouros e duas garrafas de água.	1 ou 2 dias
Brenes <i>et al.</i> (2009)	120x70x100 cm altura	15	Objetos de plástico não mastigáveis e dois tubos de PVC, cinco comedouros e duas garrafas de água.	1 ou 2 dias

Yildirim <i>et al.</i> (2012)	Três grandes caixas de acrílico (30×30×50 cm)	6	Três grandes caixas de acrílico foram conectadas entre si por meio de túneis rearranjados. As caixas continham diferentes comedouros, garrafas de água, duas rodas de corrida, escadas para subir e uma variedade de objetos estimulantes.	3 vezes por semana
Pascual <i>et al.</i> (2013)	100x100x100 cm altura	14	Rampas, túneis, rodas e cordas para escalar.	-
Mosaferi <i>et al.</i> (2015)	63x88x82 cm altura	5	Duas rodas de corrida, dois comedouros, duas garrafas de água e com vários brinquedos, vários tipos de escadas e tubos de PVC, objetos (bolas, argolas e um bloco de prato com furos) de plástico não mastigável.	Semanalmente
Arndt <i>et al.</i> (2015)	60×120×45 cm altura	10	Equipado com 14 objetos não tóxicos (brinquedos infantis, canos de PVC, etc.)	Sete dos objetos eram trocados diariamente e os brinquedos eram trocados semanalmente.

Tanás <i>et al.</i> (2015)	61×41×21 cm altura	Criado em pares	Vários objetos (pequena escada de metal, bola de pingue-pongue padrão de 40 mm, tijolo de madeira, ratos de pelúcia em tamanho natural).	Quando necessário
Mora-Gallegos <i>et al.</i> (2018)	120x70x100 cm altura	15	Objetos de plástico não mastigáveis, tubos de PVC, dispensadores de alimentos e garrafinhas de água.	Pelo menos duas vezes por semana

Fonte: A autora (2023).

7 DISCUSSÃO

Os principais resultados encontrados nesta revisão sistemática apontam os efeitos de diferentes condições de alojamento (ambiente controle, isolamento social e enriquecimento ambiental) após o desmame sobre os comportamentos emocionais e a expressão de componentes do sistema serotoninérgico.

Em relação aos testes comportamentais, os resultados relacionados ao comportamento exploratório e de ansiedade mostraram que os animais expostos ao EA apresentaram melhor índice comportamental de habituação em comparação com os animais controle e IS. O EA após o desmame reduziu a atividade locomotora, diminuiu os comportamentos de *rearing* e *crossing*, bem como aumentou o comportamento de *grooming* no campo aberto. A rápida habituação observada em animais submetidos ao EA também foi observada em outros estudos (SCHRIJVER *et al.*, 2002; ROJAS-CARVAJAL *et al.*, 2018). Adicionalmente, os efeitos comportamentais são evidentes quando a habituação acontece nos estágios iniciais do desenvolvimento (MORA-GALLEGOS *et al.*, 2018), devido maior interação ao novo ambiente nos animais submetidos ao EA (VARTY *et al.*, 2000). Embora animais submetidos ao IS expressem hiperatividade em novos ambientes e demorem mais tempo para se habituar (FONES; PORKESS, 2008), Tanás *et al.* (2015) não encontraram diferenças na habituação e no comportamento de ansiedade em roedores, independentemente das condições de criação. Os autores alegaram que os seus experimentos não produziram efeitos por duas situações, sendo elas: devido à pequena amostra de animais (n=6 por grupo) ou devido ao fato da gaiola enriquecida possuir pouca variedade de objetos e terem sido trocados com menor frequência (TANÁS *et al.*, 2015) (Ver Tabela suplementar).

Existem discordâncias sobre o efeito da condição de alojamento no comportamento de ansiedade avaliado pelo labirinto em cruz elevado. Parker e Morinan (1986) relataram que a manutenção de animais em diferentes condições de alojamento (IS ou EA), por períodos curtos de até 3 semanas, pode estar diretamente relacionada ao aumento do comportamento semelhante à ansiedade. No entanto, deve-se considerar que o comportamento semelhante à ansiedade também pode aparecer em consequência de manter os roedores em condições adversas durante a janela crítica de desenvolvimento (LUKKES *et al.*, 2009). Um estudo demonstrou efeito ansiolítico pelo maior tempo gasto nos braços abertos do

labirinto em animais submetidos ao EA desde o desmame (HELLEMANS *et al.*, 2004). Por outro lado, Mosaféri *et al.* (2015) encontraram efeitos ansiolíticos demonstrados pelo aumento do tempo gasto nos braços abertos em animais expostos ao IS (DPN93). Um ponto que deve ser considerado é que o tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz pode não ser um determinante do comportamento ansiogênico, uma vez que animais isolados podem apresentar maior tempo gasto na área aberta como uma tentativa de fuga das pequenas gaiolas onde foram alojados (MOSAFERI *et al.*, 2015).

Ao analisar outros parâmetros do labirinto em cruz, Brenes *et al.* (2009) descreveram maior comportamento semelhante à ansiedade no grupo submetido ao EA, devido à maior frequência de entrada dos animais nos braços fechados e maior número de cruzamento entre os braços (DPN60). No entanto, respostas de ansiedade observadas em animais EA também podem ser indicativas de uma maior capacidade em detectar perigos e ameaças no ambiente (MOSAFERI *et al.*, 2015). Questões metodológicas também podem ter influenciado nesses resultados. Por exemplo, estudo demonstrou que a intensidade de luz ambiental interfere no comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz elevado (BECERRA; PARRA; MORATO, 2005). Os mesmos autores relataram que roedores testados sob níveis baixos de iluminação (0 e 1 lux), apresentaram maior exploração no ambiente pelo aumento de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (BECERRA; PARRA; MORATO, 2005). Nesta revisão, apenas dois estudos informaram o tipo e intensidade da luz utilizada (BRENES *et al.*, 2009; TANAS *et al.*, 2015). Brenes *et al.* (2009) utilizaram duas lâmpadas vermelhas de 25W (aproximadamente 200 luxes), enquanto Tanás *et al.* (2015) utilizaram uma luz vermelha (100 lux). Ambos os estudos não encontraram diferenças nas condições de criação e exploração pela entrada dos braços abertos. Os dados sugerem que a intensidade de luz pode ter interferido na visão do animal e, conseqüentemente, na possível evitação dos braços abertos (BECERRA; PARRA; MORATO, 2005).

A duração do IS pode ser determinante para a expressão fenotípica do comportamento semelhante à depressão (BRENES *et al.*, 2020). No entanto, em todos os estudos revisados, o tempo de duração do IS foi suficiente para produzir esses efeitos. No teste de nado forçado o animal apresenta um intenso comportamento de nado e escalada na tentativa de fuga e, posteriormente, reduz consideravelmente os movimentos apenas para manter a cabeça acima da água

(SLATERRY; CRYAN, 2012; BELOVICOVA *et al.*, 2017). Desta forma, o aumento da imobilidade no teste de nado forçado é um forte indicador de sintomas semelhantes a depressão em roedores (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015). Nos estudos avaliados, as condições de habituação afetaram os parâmetros de imobilidade, natação, escalada e mergulho. Observou-se maior imobilidade nos animais expostos ao IS (BRENES *et al.*, 2008b; MOSAFERI *et al.*, 2015), sugerindo um desespero comportamental e prejuízo na tentativa de fuga devido a sintomas semelhantes a depressão. Por outro lado, a escalada e o mergulho são considerados comportamentos eficazes na tentativa de fuga (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015). Assim, a maioria dos estudos incluídos identificaram aumento do comportamento de escalada (SAENZ *et al.*, 2006; BRENES *et al.*, 2008b; MOSAFERI *et al.* 2015; ARDNT *et al.*, 2015) e mergulho em ratos expostos ao EA (BRENES *et al.*, 2008b). Os achados confirmam que o EA contribui para uma melhor resposta de enfrentamento em situação de estresse. Adicionalmente, o EA parece estar envolvido com uma maior plasticidade neural e neurogênese em animais (KOH *et al.*, 2007), bem como com a redução de estados semelhantes a depressão por aumentar os níveis de serotonina no hipocampo (BRENES *et al.*, 2009).

Animais submetidos ao IS apresentaram desregulação emocional no Teste de preferência a Sacarose (BRENES *et al.*, 2008a; YILDIRIM *et al.*, 2012). A ingestão de sacarose foi maior nos animais IS (BRENES *et al.*, 2008a), o que indica uma alteração no limiar de recompensa devido maior necessidade em experimentar sensações gratificantes (BRENES *et al.*, 2020; ACERO-CASTILLO *et al.*, 2021). Em contrapartida, Yildirim *et al.* (2012) observaram maior consumo de sacarose em animais IS e EA, indicando que o estresse causado por outros testes comportamentais afetou diretamente o resultado nos animais submetidos ao EA.

Em nível neuroquímico, o EA aumentou a concentração de 5-HT no hipocampo (BRENES *et al.*, 2009) e no córtex pré-frontal (BRENES *et al.*, 2008b). No entanto, ainda não está bem esclarecido qual o mecanismo regulatório envolvido no aumento da quantidade de 5-HT nos animais expostos ao AE (BRENES *et al.*, 2008b). Por outro lado, o IS é considerado um agente estressor que consegue reduzir as concentrações de 5-HT e, ao mesmo tempo, aumentar sua taxa de renovação no hipocampo (BRENES *et al.*, 2020; KRUPINA *et al.*, 2020) e córtex pré-frontal (BRENES *et al.*, 2008b). Uma alteração no *turnover* de 5-HT e em seu metabólito 5-HIAA, pode sugerir que animais IS apresentam maior utilização de 5-HT e,

consequentemente, não pode ser compensada pelo aumento de sua biossíntese (BRENES *et al.*, 2009). Isto acontece devido à disfunção na atividade pré-sináptica de 5-HT ou redução nas fibras de 5-HT no hipocampo (BRENES *et al.*, 2009). Por outro lado, estudo de Krupina *et al.* (2020), não encontrou diferença nos valores de 5H-T e no *turnover* de 5-HT no córtex pré-frontal e corpo estriado de animais expostos ao IS. Assim, o desenvolvimento dos sistemas neuroquímicos envolvidos na regulação do humor, estresse e ansiedade pode ser suscetível a alterações provenientes de eventos adversos no início da vida (FONE; PORKEES, 2008; LUKKES *et al.*, 2009). Porém, são necessários mais estudos que avaliem os efeitos das diferentes condições ambientais sobre os mecanismos envolvidos nas alterações neuroquímicas.

Em relação ao risco de viés, todos os estudos foram classificados como “incertos” em 50% ou mais dos quesitos avaliados. Isso significa que os estudos não descreveram todas as informações suficientes. Fatores como horário, iluminação, tempo e a ordem em que os testes são realizados podem influenciar na interpretação dos resultados comportamentais (GULINELLO *et al.*, 2019). No estudo de Yildirim *et al.* (2012) foi relatado mais de um teste realizado no DPN70, porém os autores não descreveram se os mesmos animais foram utilizados em ambos os testes. Adicionalmente, Hellemans *et al.* (2004), foi o único estudo que não relatou o dia em que os testes foram realizados. Com isso, sugere-se que exista uma padronização e melhor detalhamento das metodologias de artigos que envolvam comportamentos emocionais para minimizar os vieses e proporcionar uma melhor reprodutibilidade.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o isolamento social induziu fenótipo relacionado à ansiedade e depressão em ratos, o qual foi inferido através da redução do comportamento exploratório e menor resposta de enfrentamento às situações adversas. Por outro lado, o ambiente enriquecido promoveu redução do comportamento semelhante à depressão e aumento da concentração de 5-HT no hipocampo e córtex pré-frontal em roedores. Assim, os estímulos ambientais durante o período crítico de desenvolvimento parecem interferir nos comportamentos emocionais e nas atividades de neurotransmissores na prole adulta.

REFERÊNCIAS

- ACERO-CASTILLO, M. C.; ARDILA-FIGUEROA, M. C.; BOTELHO DE OLIVEIRA, S. Anhedonic Type Behavior and Anxiety Profile of Wistar-UIS Rats Subjected to Chronic Social Isolation. **Front Behav Neuroscience**, Lausanne, v. 15, p. 663761, 2021.
- ALWIS, D. S.; RAJAN, R. Environmental enrichment causes a global potentiation of neuronal responses across stimulus complexity and lamina of sensory cortex. **Front Cell Neurosci**, Lausanne, v.7, n.124, p. 1-18, 2013.
- ARNDT, D. L.; PETERSON, C. J.; CAIN, M. E. Differential Rearing Alters Forced Swim Test Behavior, Fluoxetine Efficacy, and Post-Test Weight Gain in Male Rats. **PLoS one**, San Francisco, v.10, n.7, p.e0131709, 2015.
- AZMITIA, E. C. **Serotonin**. Chichester: John Wiley e Sons, 2012.
- BALL, N. J.; MERCADO, E.; ORDUÑA, G. Enriched Environments as a Potential Treatment for Developmental Disorders: A Critical Assessment. **Front Psychol**, Pully, v.10, n.466, p. 1-12, 2019.
- BECERRA, A. M.; PARRA, F.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiol Behav**, Oxford, v. 85, n. 3, p. 265-270, 2005.
- BEGNI, V.; SANSON, A.; PFEIFFER, N.; BRANDWEIN, C.; INTA, D.; TALBOT, S. R.; RIVA, M. A.; GASS, P.; MALLIEN, A. S. Social isolation in rats: Effects on animal welfare and molecular markers for neuroplasticity. **PLoS One**, San Francisco, v. 15, n. 10, p. e0240439, 2020.
- BELOVICOVA, K.; BOGI, E.; CSATLOSOVA, K.; DUBOVICKY, M. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. **Interdiscip Toxicol**, Bratislava, v.10, n.1, p.40-43, 2017.
- BENARROCH, E. E. Adult neurogenesis in the dentate gyrus General concepts and potential implications. **Neurology**, Minneapolis, v.81, n.16, p.1443-1452, 2013.
- BIBANCOS, T.; JARDIM, D. L.; ANEAS, I.; CHIAVEGATTO, S. Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. **Genes Brain Behav**, Oxford, v.6, n.6, p.529-539, 2007.
- BIGGIO, F.; MOSTALLINO, M.C.; TALANI, G.; LOCCI, V.; MOSTALLINO, R.; CALANDRA, G.; SANNA, E.; BIGGIO G. Social enrichment reverses the isolation-induced deficits of neuronal plasticity in the hippocampus of male rats. **Neuropharmacology**, New York, n.151, p.45-54, 2019.
- BONNIN, A.; LEVITT, P. Placental Source for 5-HT that Tunes Fetal Brain Development. **Neuropsychopharmacol**, New York, v.37, p. 299-300, 2012.

BOOIJ, L.; TREMBLAY, R. E.; SZYF, M.; BENKELFAT, C. Genetic and early environmental influences on the serotonin system: consequences for brain development and risk for psychopathology. **J Psychiatry Neurosci**, Ottawa, v.40, n.1, p.5-18, 2015.

BORUE, X.; CHEN, J.; CONDRON, B. G. Developmental Effects of SSRI's - Lessons learned from Animal Studies. **Int J Dev Neurosci**. New York, v.25, n;6, p.341-347, 2007.

BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J. Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v.436, n.2, p.278-282, 2008.

BRENES, J. C.; RODRÍGUEZ, O.; FORNAGUERA J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v.89, n.1, p.85-93, 2008.

BRENES, J. C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v.197, n.1, p.125-137, 2009.

BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J.; SEQUEIRA-CORDERO, A. Environmental Enrichment and Physical Exercise Attenuate the Depressive-Like Effects Induced by Social Isolation Stress in Rats. **Front Pharmacol**, Lausanne, v.11, n.804, p. 1-12, 2020.

BROWNE, C. J.; FLETCHER, P. J.; ZEEB, F. D. Responding for a conditioned reinforcer or unconditioned sensory reinforcer in mice: interactions with environmental enrichment, social isolation, and monoamine reuptake inhibitors. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 233, n.6, p. 983-993, 2016.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, United Kingdom, v.11, p. 513-521, 2005.

BRUMMELTE S.; GLANAGHY, E. MC.; BONNIN, A.; OBERLANDER, T. F. Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. **Neuroscience**, Oxford, n.342, p.212-231, 2017.

BUDDAY, S.; STEINMANN, P.; KUL, E. Physical biology of human brain development. **Front Cell Neuroscience**, Lausanne, v. 9, p. 1-17, 2015.

CAMERON, N.; DEMERATH, E. W. Critical Periods in Human Growth and Their Relationship to Diseases of Aging. **Yearbook Of Physical Anthropology**, Hoboken, v.45, p.159-184, 2002.

CAO, W.; DUAN, J.; WANG, X.; ZHONG, X.; HU, Z.; HUANG, F.; WANG, H.; ZHANG, J.; LI, F.; ZHANG, J.; LUO, X.; LI, C.Q. Early enriched environment induces an increased conversion of proBDNF to BDNF in the adult rat's hippocampus. **Behav Brain Res.**, Amsterdam, n. 265, p. 76-83, 2014.

DAUBERT, E.A.; CONDRON, B.G. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. **Trends Neurosci**, Amsterdam, v.33, p.424-434, 2010.

DAVIM, A.; TRINDADE DA SILVA, L.; VIEIRA, P. Environmental Enrichment as a Strategy to Confront Social Isolation Under the COVID-19 Pandemic. **Front Behav Neurosci.**, Lausanne, v.14, n.564184, 2021.

DAYER, A. Serotonin-related pathways and developmental plasticity: relevance for psychiatric disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, Neuilly-sur-Seine, v.16, n.1, 2014.

DAWS, L. C.; GOULD, G. G. Ontogeny and regulation of the serotonin transporter: providing insights into human disorders. **Pharmacol Ther**, Elmsford, v.131, n.1, p.61-79, 2011.

DIAMOND, M. C. Response of the brain to enrichment. **Biomedical and Medical Sciences**, Rio de Janeiro, v.73, n. 2, p. 1-10, 2001.

DIAMOND, M. C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R. The effects of an enriched environment on the rat cerebral cortex. **J Comp Neurol**, Philadelphia, v. 123, p.111-119, 1964.

FONE, K. C.; PORKESS, M. V. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, Fayetteville, v.32, n.6, p.1087-1102, 2008.

FORBES, T.A.; GALLO, V. All Wrapped Up: Environmental Effects on Myelination. **Trends Neurosci**, Amsterdam, v.40, n.9, p.572-587, 2017.

GALINDO, L. C. M.; BARROS, M. DA L.; PINHEIRO, I. L.; SANTANA, R. V.; DE MATOS, R. J.; LEANDRO, C. G.; DE SOUZA, S. L.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. **Int J Dev Neurosci**, Oxford, v.46, p.76-81, 2015.

GIACOBBO, B. L.; FREITAS, B. S. VEDOVELLI, K. SCHLEMMER, L. M.; PPIRES, V. N.; ANTONIAZZI, V.; SANTOS, C. S.; PALUDO, L.; BORGES, J. V.; LIMA, D. B.; SCHRODER, N.; VRIES, E. F. J.; BROMBERG, E. Long-term environmental modifications affect BDNF concentrations in rat hippocampus, but not in serum. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v.372, p. 1-9, 2019.

GIRBOVAN, C.; PLAMONDON, H. Environmental enrichment in female rodents: Considerations in the effects on behavior and biochemical markers. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, n. 253, p.178-190, 2013.

GOGTAY, N.; GIEDD, J. N.; LUSK, L.; HAYASHI, K. M.; GREENSTEIN, D.; VAITUZIS, A. C.; THOMPSON, P. M. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.101, n.21, p.8174-8179, 2004.

GOLDSTEIN, E.Z.; PERTSOVSKAYA, V.; FORBES, T.A.; DUPREE, J.L.; GALLO, V. Prolonged Environmental Enrichment Promotes Developmental Myelination. **Front Cell Dev Biol**, Lausanne, v.9, p. 665409, 2021.

GRIGORYAN, G. A.; PAVLOVA, I. V.; ZAICENKO, M. I. Effects of Social Isolation on the Development of Anxiety and Depression-Like Behavior in Model Experiments in Animals. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, Washington, v. 52, n. 5, p. 1-17, 2022.

GROŃSKA-PĘSKI, M.; GONÇALVES, J.T.; HÉBERT, J.M. Enriched Environment Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis through FGFRs. **J Neurosci**, Baltimore, v.41, n.13, p.2899-2910, 2021.

GULINELLO, M.; MITCHELL, H. A.; CHANG, Q.; TIMOTHY O'BRIEN, W.; ZHOU, Z.; ABEL, T.; WANG, L.; CORBIN, J. G.; VEERARAGAVAN, S.; SAMACO, R. C.; ANDREWS, N. A.; FAGIOLINI, M.; COLE, T. B.; BURBACHER, T. M.; CRAWLEY, J. N. Rigor and reproducibility in rodent behavioral research. **Neurobiol Learn Mem**, San Diego, v.165, p.106780, 2019.

HANSWIJK, S.I.; SPOELDER, M.; SHAN, L.; VERHEIJ, M.M.M.; MUILWIJK, O.G.; LI, W.; LIU, C.; KOLK, S.M.; HOMBERG, J.R. Gestational Factors throughout Fetal Neurodevelopment: The Serotonin Link. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 21, p. 5850, 2020.

HARDWICK, L. J.; ALI, F. R.; AZZARELLI, R.; PHILPOTT, A. Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. **Cell Tissue Res**, Berlin, v. 359, n. 1, p.187-200, 2015.

HARLOW, H. F.; DODSWORTH, R. O.; HARLOW, M. K. Total social isolation in monkeys. **Proc Natl Acad Sci**, Washington, v.54, n.1, p.90-97, 1965.

HELLEMANS, K. G.; BENGE, L. C.; OLMSTEAD, M. C. Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. **Brain Res Dev Brain Res**, Amsterdam, v.150, n.2, p.103-115, 2004.

HOOIJMANS, C. R.; ROVERS, M. M.; DE VRIES, R. B. M.; LEENAARS, M.; RITSKES-HOITINGA, M.; LANGENDAM, M. W. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies, **BMC Med. Res. Methodol**, London, v.14, n.43, p.1-9, 2014.

ICKES B. R.; PHAM, T.M.; SANDERS, L.A.; ALBECK, D.S.; MOHAMMED, A.H.; GRANHOLM, A.C. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Exp Neurol**, New York, v.164, p.45-52, 2000.

IERACI, A.; MALLEI, A.; POPOLI, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. **Neural Plasticity**, Patrinton, p.1-13, 2016.

KANEDA, Y.; KAWATA, A.; SUZUKI, K.; MATSUNAGA, D.; YASUMATSU, M.; ISHIWATA, T. Comparison of neurotransmitter levels, physiological conditions, and emotional behavior between isolation-housed rats with group-housed rats. **Dev Psychobiol**, Cambridge, p.1-9, 2020.

KOH, S.; MAGID, R.; CHUNG, H.; STINE, C. D.; WILSON, D. N. Depressive behavior and selective downregulation of serotonin receptor expression after early-life seizures: reversal by environmental enrichment. **Epilepsy Behav**, San Diego, v.10, n.1, p. 26-31, 2007.

KRUPINA, N. A.; SHIRENOVA, S. D.; KHLEBNIKOVA, N. N. Prolonged Social Isolation, Started Early in Life, Impairs Cognitive Abilities in Rats Depending on Sex. **Brain Science**, Basel, v.10, n. 799, p. 1-29, 2020.

LAM, D. D.; PRZYDZIAL, M. J.; RIDLEY, S.H.; YEO, G. S. H.; ROCHFORD, J. J.; O'RAHILLY, S.; HEISLER, L. K. Serotonin 5-HT_{2C} Receptor Agonist Promotes Hypophagia via Downstream Activation of Melanocortin 4 Receptors. **Endocrinology**, Los Angeles, v.149, n.3, p.1323-1328, 2008.

LEGER, M.; PAIZANIS, E.; DZAHINI, K.; QUIEDEVILLE, A.; BOUET, V.; CASSEL, J. C.; FRERET, T.; SCHUMANN-BARD, P.; BOULOUARD, M. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. **Cereb Cortex**, New York, v.25, n.11, p.4048-4061, 2015.

LEVITT, P.; RAKIC, P. The time of genesis, embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neurons in the rhesus monkey. **Brain Res**, Amsterdam, v.256, p.35-57, 1982.

LIU, P. Z.; NUSSLOCK, R. Exercise-mediated neurogenesis in the hippocampus via BDNF. **Front Neurosci**, Lausanne, v.12, n.52, p. 1-6, 2018.

LUKKES, J. L.; WATT, M. J.; LOWRY, C. A.; FORSTER, G. L. Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, Lausanne, v.3, n.18, p. 1-12, 2009.

LUKKES, J. L.; ENGELMAN, G. H.; ZELIN, N. S.; HALE, M. W.; LOWRY, C. A. Post-weaning social isolation of female rats, anxiety-related behavior, and serotonergic systems. **Brain Res**, Amsterdam, n.1443, p.1-17, 2012.

MARSDEN, C. A.; KING, M V.; FONE, K. C. F. Influence of social isolation in the rat on serotonergic function and memory e Relevance to models of schizophrenia and the role of 5-HT₆ receptors. **Neuropharmacology**, Oxford, v.61, p.400-407, 2011.

MATSUMOTO, K.; FUJIWARA, H.; ARAKI, R.; YABE, T. Post-weaning social isolation of mice: A putative animal model of developmental disorders. **Journal of Pharmacological Sciences**, Kyoto, v.141, n.3, p.111-118, 2019.

MIGLIARINI, S.; PACINI, G.; PELOSI, B.; LUNARDI, G.; PASQUALETTI, M. Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation. **Mol Psychiatry**, Hampshire, v.18, p.1106-1118, 2013.

MORA-GALLEGOS, A.; FORNAGUERA, J. The effects of environmental enrichment and social isolation and their reversion on anxiety and fear conditioning. **Behav Processes**, Amsterdam, v.158, p. 59-69, 2019.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Fayetteville, v.26, n.4, p.471–483, 2002.

MOSAFERI, B.; BABRI, S.; EBRAHIMI, H.; MOHADDES, G. Enduring effects of post-weaning rearing condition on depressive- and anxiety-like behaviors and motor activity in male rats. **Physiol Behav**, Oxford, v.142, p.131-6, Apr, 2015.

MUCHIMAPURA, S.; MARSDEN, C. The effect of creating social isolation on the development of the hippocampus and the serotonergic function. **Thai J Physiol Sei**. Khon Kaen, v.17, p.1-8, 2004.

PAGE, M. J.; MCKENZIE, J. E.; BOSSUYT, P. M.; BUTRON, I.; HOFFMANN, T. C.; MULROW, C. D.; SHAMSEER, L.; TETZLAFF, J M.; MOHER, D. Updating guidance for reporting systematic reviews: development of the PRISMA 2020 statement. **J Clin Epidemiol**, Oxford, v. 134, p. S0895-4356, 2021.

PARKER, V.; MORINAN, A. The socially-isolated rat as a model for anxiety. **Neuropharmacology**, United Kingdom, v.25, n.6, p.663-664, 1986.

PASCUAL, R.; BUSTAMANTE, C. Early postweaning social isolation but not environmental enrichment modifies vermal Purkinje cell dendritic outgrowth in rats. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, Warsaw, v.73, n.3, p.387-393, 2013.

PAWLUSKI, J. L.; LI, M.; LONSTEIN, J. S. Serotonin and motherhood: From molecules to mood. **Front Neuroendocrinol**, New York, v.53, p.100742, 2019.

PENA, Y; PRUNELL, M.; DIMITSANTOS, V.; NADAL R.; ESCORIHUELA, R. M. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v.174, n.1, p.181-187, 2006.

PERSKY, H.; ZUCKERMAN, M.; BASU, G. K.; THORNTON, D. Psycho-endocrine effects of perceptual and social isolation. **Arch Gen Psychiatry**, Chicago, v.15, n.5, p.499-505, 1966.

PUNDA, H.; MARDESIC, S.; FILIPOVIC, N.; KOSOVIC, I.; BENZON, B.; OGOREVC, M.; BOCINA, I.; KOLIC, K.; VUKOJEVIC, K.; SARAGA-BABIC, M. Expression Pattern of 5-HT (Serotonin) Receptors during Normal Development of the Human Spinal Cord and Ganglia and in Fetus with Cervical Spina Bifida. **Int J Mol Sci**, Basel, v.22, n.14, p.7320, 2021.

REDOLAT, R.; MESA-GRESA, P.; SAMPEDRO-PIQUERO, P.; CUTULI D. Editorial: Environmental Enrichment as a Treatment? Epigenetic Mechanisms, Challenges and Limitations. **Front Pharmacol**, Lausanne, v.12, p. 658970, 2021.

RICE, D., BARONE JUNIOR, S. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v.108, Suppl.3, p.511-533, 2000.

ROJAS-CARVAJAL, M.; FORNAGUERA, J.; MORA-GALLEGOS, A.; BRENES, J. C. Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour in rats. **Animal Behaviour**, United Kingdom, v.137, p.225-235, 2018.

SÁENZ, B. J. C.; VILLAGRA, O. R.; FORNAGUERA, T. J. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v.169, n.1, p.57-65, 2006.

SCHRIJVER, N. C. A.; BAHR, N. I.; WEISS, I. C.; WÜRBEL, H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 73, p.209-224, 2002.

SHAH, R.; COURTIOL, E.; CASTELLANOS, F. X.; TEIXEIRA, C. M. Abnormal Serotonin Levels During Perinatal Development Lead to Behavioral Deficits in Adulthood. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, Lausanne, v.12, n.114, p. 1-10, 2018.

SHOHAYEB, B.; DIAB, M., AHMED, M.; HIUNG, D. C. N. Factors that influence adult neurogenesis as potential therapy. **Transl Neurodegener**, London, v.7, n.4, p. 1-19, 2018.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats-Behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v.222, n.1, p.246-264, 2011.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, London, v.6, p.1009-1014, 2012.

SODHI, M. S.; SANDERS-BUSH, E. Serotonin and brain development. In: SMYTHIES, J. (ed.). **Disorders of Synaptic Plasticity and Schizophrenia**. [S. l.]: Elsevier, p.111-174, 2004.

SPARLING, J. E.; MAHONEY, M.; BAKER, S.; BIELAJEW, C. The effects of gestational and postpartum environmental enrichment on the mother rat: A preliminary investigation. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 208, n.1, p. 213-223, 2010.

SPEISMAN, R. B.; KUMAR, A.; RANI, A.; PASTORIZA, J. M.; SEVERANCE, J. E.; FOSTER, T. C.; ORMEROD, B. K. Environmental enrichment restores neurogenesis

and rapid acquisition in aged rats. **Neurobiol Aging**, Fayetteville, v.34, n.1, p.263-274, 2013.

SUNDSTRÖM, E.; KÖLARE, S.; SOUVERBIE, F.; SAMUELSSON, E. B.; PSCHERA, H.; LUNELL, N. O.; SEIGER, A. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. **Brain Res Dev Brain Res**, Amsterdam, v.75, n.1, p.1-12, 1993.

TANAS, L.; OSTASZEWSKI, P.; IWAN, A. Effects of post-weaning social isolation and environmental enrichment on exploratory behavior and anxiety in Wistar rats. **Acta Neurobiol Exp**, Warsaw, v. 75, p.72-79, 2015.

TAU, G.Z.; PETERSON, B.S. Normal development of brain circuits. **Neuropsychopharmacology**, New York, v.35, n.1, p.147-168, 2010.

TIERNEY, A.L; NELSON, C.A. Brain Development and the Role of Experience in the Early Years. **Zero Three**, Washington, v. 30, n. 2, p. 9-13, 2009.

TOOLEY, U. A.; BASSETT, D. S.; MACKEY, A. P. Environmental influences on the pace of brain development. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 22, p. 372-384, 2021.

TYLER, W.J.; ALONSO, M.; BRAMHAM, C.R.; POZZO-MILLER, L.D. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. **Learn Mem**, New York, v.9, n.5, p.224-237, 2002.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat Rev Neurosci**, London, v.1, p.191-198, 2000.

VARTY G. B.; PAULUS M. P.; BRAFF D. L.; GEYER M. A. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. **Biol Psychiatry**, New York, v.47, n.10, p 864-873, 2000.

VELASQUEZ, J. C.; GOEDEN, N.; BONNIN, A. Placental serotonin: implications for the developmental effects of SSRIs and maternal depression. **Front Cell Neurosci**, Lausanne, v.7, n.47, p. 1-7, 2013.

VOLPICELLI, F.; SPERANZA, L.; DI PORZIO, U.; CRISPINO, M.; PERRONE-CAPANO, C. The serotonin receptor 7 and the structural plasticity of brain circuits. **Front Behav Neurosci**, Lausanne, v.8, p.1-6, 2014.

VOSS, P.; THOMAS, M. E.; CISNEROS-FRANCO, J. M.; DE VILLERS-SIDANI. E. Dynamic Brains and the Changing Rules of Neuroplasticity: Implications for Learning and Recovery. **Front Psychol**, Pully, n.8, p.1657, 2017.

ZORATTO, F.; FIORE, M.; ALI, S. F.; LAVIOLA, G.; MACRI, S. Neonatal tryptophan depletion and corticosterone supplementation modify emotional responses in adult male mice. **Psyconeuroendocrinology**, Oxford, v.38, n.1, p.24-39, 2013.

YANKELEVITCH-YAHAV, R.; FRANKO, M.; HULY, A.; DORON, R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. **J Vis Exp**, Boston, n.97, p. 52587, 2015.

YE, X.; SHIN, B. C.; BALDAUF, C.; GANGULY, A.; GHOSH, S.; DEVASKAR, S. U. Developing Brain Glucose Transporters, Serotonin, Serotonin Transporter, and Oxytocin Receptor Expression in Response to Early-Life Hypocaloric and Hypercaloric Dietary, and Air Pollutant Exposures. **Dev Neurosci**, Basel, n.43, p.27-42, 2021.

YILDIRIM, E.; EROL, K.; ULUPINAR, E. Effects of sertraline on behavioral alterations caused by environmental enrichment and social isolation. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v.101, n.2, p.278-87, 2012.

YORGASON, J. T.; CALIPARI, E. S.; FERRIS, M. J.; KARKHANIS, A. N.; FORDAHL, S. C.; WEINER, J. L.; JONES, S. R. Social isolation rearing increases dopamine uptake and psychostimulant potency in the striatum, **Neuropharmacology**, Oxford, v.101, p.471-479, 2016.

WALKER, D. M.; CUNNINGHAM, A. M.; GREGOR, K.; NESTLER, E. J. Long-Term Behavioral Effects of Post-weaning Social Isolation in Males and Females. **Front Behav Neurosci**, Lausanne, v.13, n.66, p. 1-20, 2019.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. **Brain Research Bulletin**, Phoenix, v.56, n.5, p.479-485, 2001.

WILLIAMSON, J. M.; LYONS, D. A. Myelin Dynamics Throughout Life: An Ever-Changing Landscape? **Front Cell Neurosci**, Lausanne, v.12, n.424, p. 1-8, 2018.

ANEXO A – PROTOCOLO ENVIADO À PLATAFORMA PROSPERO

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews

NHS
National Institute for
Health Research



Animal review

Please complete all mandatory fields below (marked with an asterisk *) and as many of the non-mandatory fields as you can then click *Submit* to submit your registration. You don't need to complete everything in one go, this record will appear in your *My PROSPERO* section of the web site and you can continue to edit it until you are ready to submit. Click *Show help* below or click on the icon to see guidance on completing each section.

1. * Review title.

Give the working title of the review. This must be in English. The title should have the interventions or exposures being reviewed and the associated health or social problems.

Effects of environmental enrichment as strategy for ameliorate behavioral effects of social isolation:
preclinical systematic review and meta-analysis

2. Original language title.

For reviews in languages other than English, this field should be used to enter the title in the language of the review. This will be displayed together with the English language title.

Efeitos do enriquecimento ambiental como estratégia para amenizar os efeitos comportamentais do
isolamento social: revisão sistemática e metanálise pré-clínica

3. * Anticipated or actual start date.

Give the date when the systematic review commenced, or is expected to commence.

01/09/2020

4. * Anticipated completion date.

Give the date by which the review is expected to be completed.

01/03/2021

5. * Stage of review at time of this submission.

Indicate the stage of progress of the review by ticking the relevant Started and Completed boxes. Additional information may be added in the free text box provided.

Please note: Reviews that have progressed beyond the point of completing data extraction at the time of initial registration are not eligible for inclusion in PROSPERO. Should evidence of incorrect status and/or completion date being supplied at the time of submission come to light, the content of the PROSPERO record will be removed leaving only the title and named contact details and a statement that inaccuracies in the stage of the review date had been identified.

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



This field should be updated when any amendments are made to a published record and on completion and publication of the review.

The review has not yet started: No

Review stage	Started	Completed
Preliminary searches	Yes	No
Piloting of the study selection process	No	No
Formal screening of search results against eligibility criteria	No	No
Data extraction	No	No
Risk of bias (quality) assessment	No	No
Data analysis	No	No
Provide any other relevant information about the stage of the review here.		

6. * Named contact.

The named contact acts as the guarantor for the accuracy of the information presented in the register record.

LIGIA GALINDO

Email salutation (e.g. "Dr Smith" or "Joanne") for correspondence:

Dr GALINDO

7. * Named contact email.

Enter the electronic mail address of the named contact.

ligia.mgalindo@ufpe.br

8. * Named contact address.

Enter the full postal address for the named contact.

Rua São Mateus, 852. Ap.503-D. Iputinga. Recife-PE. Brazil

Postal Code: 50680000

9. Named contact phone number

Enter the telephone number for the named contact, including international dialling code.

+55 81 9 9927-6517

10. * Organisational affiliation of the review.

Full title of the organisational affiliations for this review and website address if available. This field may be

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



completed as 'none' if the review is not affiliated to any organisation.

FEDERAL UNIVERSITY OF PERNAMBUCO

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Anatomia, Av. Professor Moraes Rego, 1235.

Cidade Universitária. Recife-PE. Postal code: 50670-901

Organisation web address:

<https://www.ufpe.br>

Universidade Federal de Pernambuco- Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão

<https://www.ufpe.br/cav>

Universidade Federal de Alagoas

<https://ufal.br>

11. * Review team members and their organisational affiliations.

Give the personal details and the organisational affiliations of each member of the review team. Affiliation refers to groups or organisations to which review team members belong. **NOTE: email and country are now mandatory fields for each person.**

Dr LIGIA GALINDO. FEDERAL UNIVERSITY OF PERNAMBUCO
 Professor Olavo Barbosa de Oliveira Neto (Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde; Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió - AL, Brasil).. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde;
 Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió - AL, Brasil
 Dr Isabeli Lins Pinheiro. Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, 55608-680, Vitória de Santo Antão
 Emanuely Karine Campos Chaves. Federal University of Pernambuco
 Larissa de Souza Correia. Federal University of Pernambuco

12. * Funding sources/sponsors.

Give details of the individuals, organisations, groups or other legal entities who take responsibility for initiating, managing, sponsoring and/or financing the review. Any unique identification numbers assigned to the review by the individuals or bodies listed should be included.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq)

Grant number(s)

Grant number 425743/2018-7

13. * Conflicts of interest.

List any conditions that could lead to actual or perceived undue influence on judgements concerning the main topic investigated in the review.

None

14. Collaborators.

Give the name, affiliation and role of any individuals or organisations who are working on the review but who are not listed as review team members.

15. * Review question.

Give details of the question to be addressed by the review, clearly and precisely.

Does the environmental enrichment attenuate the effects of social isolation in rats and mice?

Context and rationale

Provide a brief description of the context and rationale of the review, including information on the relevance of your review for human health (max 250 words).

The world is facing a global public health crisis since the coronavirus disease 2019 (COVID-19) emerged as a pandemic (Debanjan, Mayank, 2020). Further the number of cases and fatalities with this pandemic there has also been significant socio-economic, political and psychosocial impact (Debanjan, Mayank, 2020). Billions of people have been quarantined in their own homes as nations have locked down to implement social distancing as a measure to contain the spread of infection (Debanjan, Mayank, 2020). This social isolation leads to chronic loneliness and boredom, which if long enough can have detrimental effects on physical and mental well being (Debanjan, Mayank, 2020). Loneliness is described as the state of being without any company or in isolation from the community or society (Wilson et al., 2007). It is considered a risk factor for many mental disorders like depression, anxiety, adjustment disorder, chronic stress, insomnia or even late-life dementia (Wilson et al., 2007). Emerging evidence shows that the pandemic has had dramatic mental health impacts, bringing by increased anxiety and greater social isolation due to the physical distancing policies introduced to control the disease (Smith, Limb, 2020). For instance, a survey of 1000 young people (aged 13–17 years) conducted by UNICEF Australia found that almost half of respondents said COVID-19 had negatively affected their levels of stress and anxiety (47%) (Marlay, Attenborough, Kutcher, 2020). Studies that analyzed long-lasting effects of challenging conditions like the Dutch Famine and the Hertfordshire demonstrated that the early nutritional environment might be related to some long-lasting metabolic disturbances (Ravelli, S. et al. 1976; Barker, Osmond et al. 1989). The responses of organisms to different environmental conditions that generate a series of distinct phenotypes (morphological or physiological states) potentially expressed by a genotype can be nominated phenotypic plasticity (West-Eberhard 2005; Gluckman, Lillycrop et al. 2007; Low, Gluckman et al. 2011). Then the chronic effects of the social isolation on probably will be known in medium/long term.

An example of environmental challenge is the chronic social isolation (SI) from conspecifics which is a highly stressful condition with multiple adverse neurobehavioral effects in humans, non-human primates, and rodents (Harlow et al., 1965; Persky et al., 1966; Fone and Porkess, 2008; Marlay, Attenborough, Kutcher, 2020). On the other hand, the development of an organism is influenced by environmental factors, including

the amount and quality of contact with other animals (the social environment) and other external environmental factors (Geoffrey et al., 2000). A recent study demonstrated that the SI induced a depression related phenotype characterized by a marginal body weight gain, anxiety, anhedonia, behavioral despair, and alterations of serotonin metabolism in rats (Brenes et al., 2020).

On the other hand, the environmental enrichment (EE), in other words, the exposure to sensory, motor, cognitive, and social stimulation higher than that received in standard housing (SH) conditions (Rosenzweig, Bennett, 1996; Simpson and Kelly, 2011). The EE has shown to decrease anxiety- and depression-like behaviors (Pena et al., 2006; Brenes et al., 2008; Brenes et al., 2009) and increase learning and memory (Leggio et al., 2005; Mora-Gallegos et al., 2015) and as well 5-HT levels in the hippocampus and the prefrontal cortex (Brenes et al., 2008; Brenes et al., 2009). Thus, this secondary systematic review will gather the main findings of experimental studies and analyze them using statistical methods to obtain more reliable answers about this very important subject once is related to a possible alternative for preventing behavioral issues associated to the COVID-19 social isolation or any pandemic situation. Thus, the present review proposal is relevant to answer the following research question: Does the environmental enrichment attenuate the effects of social isolation on anxiety/depression-like behaviors in rats and mice?

16. * Searches.

Give details of the sources to be searched, and any restrictions (e.g. language or publication period). The full search strategy is not required, but may be supplied as a link or attachment.

Searches will be conduct in following electronic databases with no restrictions of language and publication period. The database bellow will be searched:

- LILACS (Latin American and Caribbean Health Sciences): <https://LILACS.bvsalud.org/en/>;
- MEDLINE/PubMed (National Library of Medicine/Medical Literature Analysis and Retrieve System Online): <https://PubMed.ncbi.nlm.nih.gov/>;
- Scopus: <https://www.Scopus.com/home.uri>;
- Web of Science: https://www.periodicos.capes.gov.br/?option=com_pcollection&mn=70&smn=79&cid=81;
- EMBASE (<https://www.embase.com/login>)
- Sigle via open gray (<http://www.opengrey.eu>).
- Reference lists of eligible studies

17. URL to search strategy.

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



Give a link to the search strategy or an example of a search strategy for a specific database if available (including the keywords that will be used in the search strategies).

The terms "social isolation", "behavior", "mice" and "rat" (entry term) will be used in MESH (Medical Subject Headings) to create specific search strategies for each of the databases used. The terms "environmental enrichment", "enriched environment", "anxiety" and "depression" will be used as independent terms:

PubMed:

("environmental enrichment"[All Fields] OR "enriched environment"[All Fields]) AND "behavior"[All Fields]

LILACS:

(tw:("environmental enrichment")) OR (tw:("enriched environment")) AND (tw:("behavior"))

Web of Science (via periódicos CAPES):

TS=(environmental enrichment) OR TS=(enriched environment) AND TS=(social isolation) AND TS=(mice)
OR TS=(rat)

EMBASE:

('environmental enrichment'/exp OR 'environmental enrichment') AND ('behavior'/exp OR behavior) OR 'anxiety'/exp OR anxiety OR 'depression'/exp OR depression) AND ('social isolation'/exp OR 'social isolation') NOT ('human'/exp OR human)

Scopus:

"environmental enrichment" OR "enriched environment" AND "behavior" AND "social isolation" AND NOT "human"

Signle via open gray:

"ENVIRONMENTAL ENRICHMENT" OR "ENRICHED ENVIRONMENT" AND "SOCIAL ISOLATION"

Alternatively, upload your search strategy to CRD in pdf format. Please note that by doing so you are consenting to the file being made publicly accessible.

Do not make this file publicly available until the review is complete

18. * Human disease modelled.

Give a short description of the disease, condition or healthcare domain being modelled.

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



Anxiety and depression related to social isolation

19. * Animals/population.

Give summary criteria for the animals being studied by the review, e.g. species, sex, details of disease model. Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Inclusion: Primary experimental studies using subgroups of mice and rats submitted to social isolation, environmental enrichment and normal social condition after weaning

Exclusion criteria:

Exclusion: Studies with other rodents and transgenic rats/mice; ex vivo studies; in vitro studies; studies in humans or in silico studies

20. * Intervention(s), exposure(s).

Give full and clear descriptions of the nature of the interventions or the exposures to be reviewed (e.g. dosage, timing, frequency). Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

The social isolation is characterized by regular sized cage containing only 1 (one) animal per box. The intervention by the environmental enrichment (EE) is giving by a larger cage, with a larger number of animals and objects that encouraged physical activity and creativity, e.g., marbles, tunnels, racing wheels, slides.

Exclusion criteria:

The exposition to the environments should be performed right after the weaning

21. * Comparator(s)/control.

Where relevant, give details of the type(s) of control interventions against which the experimental condition(s) will be compared (e.g. another intervention or a non-exposed control group). Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Regular sized cage containing 2-3 animals

Exclusion criteria:

Studies without control environment

22. * Study designs to be included.

Give details of the study designs eligible for inclusion in the review. If there are no restrictions on the types of study design eligible for inclusion, or certain study types are excluded, this should be stated. Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



Inclusion criteria: controlled studies with separated treatment groups

Exclusion criteria:

Exclusion criteria: Clinical studies with humans, non-original studies, studies that do not performed, at least, the three study groups cited above, studies with other animal species and reviews

23. Other selection criteria or limitations applied.

Give details of any other inclusion and exclusion criteria, e.g. publication types (reviews, conference abstracts), publication date, or language restrictions.

Will be considered the references of the selected studies. No restrictions of language or publication date.

24. * Outcome measure(s).

Give detail of the outcome measures to be considered for inclusion in the review. Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Primary Outcome: Depression-like behaviors will be accessed by tests like elevated plus-maze; open field; fear conditioning; self exposure chambre or any other test used for evaluating those behaviors. In sum up will be quantified the time that the animal spent in chalenging spaces (stressors spaces). Generally, as more anxious or depressed the animal, less time it spends in the challenging spaces. The time will be measured in seconds.

Secondary Outcomes:

Food intake and body weight will be measured in grams.

Serotonin system will be assessed by immunoreactivity (number of active neurons) or gene expression of serotonin system compounds (gene expression in a certain amount of brain protein in relation to a know content of protein -generally ?-actin) or protein expression (given by the size of reactive bands on a nitrocellulose membrane) or the total contente of serotonin in the hole or part of the brain (quantified in nanogram/total contente of brain protein).

Exclusion criteria:

The cage environment will be considered enriched when larger and populated with more than 4 animals with free access to objects that promote social and physical stimulation (marbles, racing wheels, tunnels, slides and other objects).

25. N/A.

This question does not apply to systematic reviews of animal studies for human health submissions.

26. * Study selection and data extraction.

Procedure for study selection

Give the procedure for selecting studies for the review, including the screening phases (title and/or title-abstract and/or full-text), the number of researchers involved, and how discrepancies will be resolved.

Two reviewers (Galindo, LCM and Chaves, EKC), blinded from each other, will independently extract the data as previously described above. A third reviewer (Pinheiro, IL) will be consulted in case of divergence to resolve the discrepancy. Barbosa, O will provide technical consultancy. In addition, the kappa index will be calculated to measure the degree of agreement between the first and second reviewers beyond what would be expected by random chance.

In case of missing data, study investigators will be contacted for unreported data or additional details.

First phase: The studies will be select for inclusion through their title-abstracts according to the inclusion and exclusion criteria.

Second phase: The papers selected by title-abstract will be full read for definitive inclusion or exclusion as result of the systematic review.

Prioritise the exclusion criteria

Multiple exclusion criteria may apply to an abstract/paper, which can cause discrepancies between reviewers in the reason for exclusion recorded. To avoid this, it is helpful to prioritize the exclusion criteria (e.g. 1) not an animal study; 2) not a myocardial infarction model, etc.) and record the highest ranking applicable criterion as the reason for exclusion. Please sort the exclusion criteria defined in questions 19 to 24. If applicable, do so for each screening phase.

2) Not an ~~animal~~ study using rat.

3) Not a study with a separate control group.

4) Not a study with at least the three experimental groups established right after weaning

5) Not a study that used other experimental strategies (e.g drugs, stress, experimental diets, etc) that may interfere in the proposal outcomes

6) Studies with other rodents and transgenic rats/mice; ex vivo studies; in vitro studies; studies in humans or in sillico studies

7) Studies with the exposition to the environments not performed right after the weaning

Methods for data extraction

Describe methods for data extraction, including the number of reviewers performing data extraction, extraction of data from text and/or graphs, whether and how authors of eligible studies will be contacted to provide missing or additional data, etc.

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



Data will be extracted from the texts, graphs and tables and progressively filed in four tables intended to describe the characteristics, variables analyzed/results and risk of bias assessment.

Two reviewers (Chaves, EKC and Galindo, LCM), blinded from each other, will independently extract the data as previously described above. A third reviewer (Pinheiro, IL or Barbosa, O) will be consulted in case of divergence to resolve the discrepancy. In addition, the kappa index will be calculated to measure the degree of agreement between the first and second reviewers beyond what would be expected by random chance. In case of missing data, study investigators will be contacted for unreported data or additional details.

The selected papers based in full-reading will be included according to the PICO points and the eligibility criteria defined in this protocol.

PICO:

Population: rats or mice;

Intervention: exposure to social isolation (1 animal per cage) or environmental enrichment (over 5 animals per cage + stimulating objects) after weaning;

Comparison: control environment (cage with regular size containing 2-4 animals/cage)

Outcomes (Primary): anxiety and depression like behaviors

Outcomes (Secondary): food intake, body weight, serotonin system compounds evaluations in brain (serotonin content; serotonin transporter; serotonin receptors)

Data to be extracted: study design

Specify the data to be extracted related to characteristics of the study design, e.g. controlled versus cross-over, number of experimental groups, etc.

Number of experimental groups; Size of cages used for control, social isolation and enriched environment groups; number of animals/cage in each group; duration of social isolation and enriched environment exposition (this represents the dose of stimuli); elements used for enrich the cage environment (wheels, ladders, marbles, tunnels, slides); standard conditions of vivarium (size of cages; number of animals per cage); light/dark cycle

Data to be extracted: animal model

Specify the data to be extracted related to characteristics of the animal model, e.g. species, sex of the animals, etc.

Specie and sexes of animals

Data to be extracted: intervention of interest

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



Specify the data to be extracted related to characteristics of the intervention of interest, e.g. dose, timing, etc.

Duration of exposure to environments; number of animals in each cage; specie and sex of animal

Data to be extracted: primary outcome(s)

Define the primary outcome measure(s). For each outcome measure, specify in which format data will be extracted, including the eligible units of measurement, and data type (continuous/dichotomous). A description of any other manipulation or transformation of the extracted data that is planned may be included.

The data to be extracted as primary outcome will be represented by the time that the animal spends in challenging spaces (stressors spaces). Generally, as more anxious or depressed the animal, less time it spends in challenging spaces. The time is measured in seconds.

Data to be extracted: secondary outcome(s)

Define the secondary outcome measure(s). For each outcome measure, specify in which format data will be extracted, including the eligible units of measurement, and data type (continuous/dichotomous). A description of any other manipulation or transformation of the extracted data that is planned may be included.

In terms of secondary outcomes will be considered all the studies that express the results as continuous quantitative variables. The final results of each study will be expressed as standardized measure, called effect size. Will be included all the studies performed with at least 3 subgroups (environmental enriched, social isolation and control environment). In all the subgroups will be collected the following information using the respective unities:

Food intake and body weight will be expressed in grams.

Serotonin system will be assessed by immunoreactivity (number of active neurons) or gene expression of serotonin system compounds (gene expression in a certain amount of brain protein in relation to a know content of protein - generally β -actin given in nanogram) or protein expression (given by the size of reactive bands on a nitrocellulose membrane given in millimeters) or the total content of serotonin in the hole or part of the brain (quantified in nanograms/total content of brain protein).

Data to be extracted: other

Specify any other data or study characteristics to be extracted, e.g. bibliographical details, such as author, year and language.

Author and year of publication

27. * Risk of bias and/or quality assessment.

State whether and how risk of bias and/or study quality will be assessed. Assessment tools specific for pre-clinical animal studies include SYRCLE's risk of bias tool and the CAMARADES checklist for study quality

No risk of bias and/or quality assessment planned

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



No

By use of SYRCLE's risk of bias tool

Yes

By use of SYRCLE's risk of bias tool adapted as follows:

No

By use of the CAMARADES checklist for study quality

No

By use of the CAMARADES checklist for study quality, adapted as follows:

No

Other criteria, namely

No

Method for risk of bias and/or quality assessment

Give the procedure for the risk of bias and/or quality assessment, including the number of reviewers involved, their contribution, and how discrepancies will be resolved.

Two reviewers (Batista, JW do N and Galindo, LCM) will assess risk of bias according to the recommendations of SYRCLE's Risk of Bias tool by Hooijmans and collaborators (2014). A third reviewer (Pineiro, IL) will be consulted in case of divergence to resolve the discrepancy. In addition, the kappa index will be calculated to measure the degree of agreement between the first and second reviewers beyond what would be expected by random chance. The data collected from the studies included will be organized on Microsoft Excel or Word tables. The quality of selected studies for review will be evaluated considering individual components that may have interfered with internal validity of animal experimental studies, according to the recommendations of SYRCLE's risk of bias tool as "high", "low" or "uncertain".

The following items will be evaluated: random sequence generation, baseline characteristics, allocation concealment, random housing, blinding of participants and personnel, random outcome assessment, blinding of outcome assessment, incomplete outcome data, selective outcome reporting and other sources of bias. Finally, to analyze the degree of agreement between the first and second reviewer, beyond what would be expected by random chance, the Kappa measure will be used for risk of bias. The information in these steps will be synthesized using Review Manager® software version 5.3.

28. * Strategy for data synthesis.

Planned approach

For each outcome measure, specify whether a quantitative or narrative synthesis is planned and how this decision will be made.

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



This review will compare the effects of environmental enrichment versus social isolation and control condition on the primary (anxiety- and depression-like behaviors) and secondary (food intake; body weight, compounds of serotonin system) outcomes.

A table will be prepared to describe data of outcomes measured and results. The description will be made in three subdivisions:

- 1) Author and year of publication; experimental groups used in each study; period of exposure to the environmental stimuli; experimental groups; size of cages used for each group; number of animals/cage in each group; elements used for enrich the cage environment;
- 2) Regarding to the primary outcomes: age when the behavioral tests were performed; tests used for access each behavior; results of behavioral tests
- 3) Regarding the secondary outcomes in each group: age of registration of food intake and body weight; amount of body weight (g); amount of food intake (g); registration of any analysis related to serotonin system.

Will be considered for meta-analysis all the studies that express the results as continuous quantitative variables. Will be considered at least 3(three) studies for the statistical analysis. The final results of each study will be expressed as standardized measure, called effect size. The goal is to consider all the possible comparisons to verify the effectiveness of the enriched environment to attenuate the effects of the social isolation.

If a meta-analysis is planned, please specify the following:

Effect measure

For each outcome measure, specify the effect measure to be used (e.g. mean difference, odds ratio etc.).

Once will be analyzed continuous variables for all the primary and secondary outcomes, will be calculated the mean difference (MD - for comparison between two groups when the measures have the same scale) or standard mean difference (SMD – for measurements made in different scales, without the possibility of conversion to the same unit). SMD is obtained by dividing the difference of the means of three groups by the standard deviation common to them, generating a value that corresponds to the difference (in standard deviation) among the two interventions and the control.

Effect models

For each outcome measure, specify the statistical model of analysis (e.g. random-effects or fixed-effect model).

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



The random effects model will be used and the evaluations will be performed by the Higgins Test (I^2) for all the outcomes

Heterogeneity

Specify the statistical methods to assess heterogeneity (e.g. I^2 , Q). For further guidance please refer to the [introduction](#) and [practical guide](#) to pre-clinical meta-analysis.

The heterogeneity between the studies will be assessed by the I^2 test. The heterogeneity will be explored by comparing studies of the same type, excluding the analysis of studies with low methodological quality and reanalysis of the data through variation of values for the lost data. The statistical analysis will be conducted in the Review Manager software as potential source of heterogeneity: Period of exposure to the environments, number of animals/cage; experimental procedures and evaluations, methodology used for measuring outcomes.

Other

Specify other details of the meta-analysis methodology (e.g. correction for multiple testing, correction for multiple use of control group).

Once will be analyzed continuous variables, will be calculated the mean difference (MD - for comparison between two groups when the measures have the same scale) or standard mean difference (SMD – for measurements made in different scales, without the possibility of conversion to the same unit). SMD is obtained by dividing the difference of the means of two groups by the standard deviation common to them, generating a value that corresponds to the difference (in standard deviation) between the two evaluated interventions.

The confidence interval will be 95%.

29. * Analysis of subgroups or subsets.

Subgroup analyses

Give any planned exploration of subgroups or subsets within the review. 'None planned' is a valid response if no subgroup analyses are planned.

When possible, the three experimental subgroups will be compared

Sensitivity

For each outcome measure, specify any sensitivity analyses you propose to perform.

Sensitivity analysis will be performed only if identified during the review process individual peculiarities of the studies under investigation. In this case, sensitivity analysis will be performed by repeating the primary analysis or meta-analysis, substituting alternative decisions or ranges of values for decisions that were arbitrary or unclear.

Publication bias

Specify whether an assessment of publication bias is planned. If applicable, specify the method for

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



assessment of publication bias.

We will decide regarding of the use of one of the following assessment of publication bias:

Egger regression test (Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ*. 1997;315(7109):629-634. doi:10.1136/bmj.315.7109.629)

Duval and Tweedie trim-and-fill method (Duval S, Tweedie R. Trim and fill: a simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics*. 2000;56(2):455-463. doi:10.1111/j.0006-341X.2000.00455.x)

Begg rank correlation test (Begg CB, Mazumdar M. Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics*. 1994;50(4):1088-1101. doi:10.2307/2533446).

30. * Review type.

Type of review

Animal model review

No

Experimental animal exposure review

No

Pre-clinical animal intervention review

Yes

31. Language.

Select each country individually to add it to the list below, use the bin icon to remove any added in error.

Portuguese-Brazil

There is not an English language summary

32. * Country.

Select the country in which the review is being carried out from the drop down list. For multi-national collaborations select all the countries involved.

Brazil

33. Other registration details.

List other places where the systematic review protocol is registered. The name of the organisation and any unique identification number assigned to the review by that organisation should be included.

none

34. Reference and/or URL for published protocol.

Give the citation and link for the published protocol, if there is one.

The protocols is not published

Add web link to the published protocol.

Or, upload your published protocol here in pdf format. Note that the upload will be publicly accessible.

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



No I do not make this file publicly available until the review is complete

Please note that the information required in the PROSPERO registration form must be completed in full even if access to a protocol is given.

35. Dissemination plans.

Give brief details of plans for communicating essential messages from the review to the appropriate audiences.

Yes

Give brief details of plans for communicating review findings.?

This review will be published in international magazine with importance to scientific community

36. * Keywords.

Give words or phrases that best describe the review. Separate keywords with a semicolon or new line.

environmental enrichment

social isolation

behavior

anxiety

depression

37. Details of any existing review of the same topic by the same authors.

Give details of earlier versions of the systematic review if an update of an existing review is being registered, including full bibliographic reference if possible.

None

38. * Current review status.

Review status should be updated when the review is completed and when it is published.
Please provide anticipated publication date

Review_Ongoing

39. Any additional information.

Provide any further information the review team consider relevant to the registration of the review.

40. Details of final report/publication(s) or preprints if available.

This field should be left empty until details of the completed review are available OR you have a link to a preprint. Give the full citation for the preprint or final report or publication of the systematic review.

Give the link to the published review or preprint.

ANEXO B – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO do PROSPERO


**National Institute
for Health Research**

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews

[Home](#) | [About PROSPERO](#) | [How to register](#) | [Service information](#)

[Search](#) | [My PROSPERO](#) | Logout: **LIGIA GALINDO**

Register your review now

Edit your details

You have 1 records

My other records

These are records that have either been published or rejected and are not currently being worked on.

ID	Title	Status	Last edited
CRD42020200881	Effects of environmental enrichment as strategy for ameliorate behavioral effects of social isolation: preclinical systematic review and meta-analysis	Registered	06/08/2021 

ANEXO C – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

EFFECTS OF SOCIAL ISOLATION AND POST-WEANING ENVIRONMENTAL
ENRICHMENT ON EMOTIONAL BEHAVIORS AND COMPONENTS OF THE
SEROTONERGIC SYSTEM IN RATS: A SYSTEMATIC REVIEW

**Roxana Patrícia Bezerra da Silva^a, Isabeli Lins Pinheiro^{a,d}, Regina Katiuska Bezerra da
Silva^a, Eduarda Correia Moretti^b, Olavo Barbosa de Oliveira Neto^b, Kelli Nogueira
Ferraz Pereira Althoff^{d,e}, *Lígia Cristina Monteiro Galindo^{a,c,d}**

Affiliations:

^aPost-Graduate Program in Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity, Federal University of Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

^bBiological and Health Sciences Institute; Federal University of Alagoas, 57072-970, Maceió – AL, Brazil.

^cDepartment of Anatomy, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

^dNutrition and Phenotypic Plasticity Study Unit, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

^eDepartment of Fonoaudiology, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Abstract

Social isolation (SI) is related to adverse neurobehavioral effects and neurochemical changes, particularly when they occur in early stages of development. On the other hand, environmental enrichment (EE) appears to reduce anxiety and depression-like behaviors and increase serotonin levels in the prefrontal cortex and hippocampus in rodents. The objective of this study was to systematically review the effects of SI and EE on emotional behaviors and some components of the serotonergic system in rats after weaning. Two authors independently searched the electronic databases Medline/PubMed, LILACS, Scopus, Web of Science, EMBASE, and Sigle via Open Gray. The first stage of the article selection process consisted of reading the articles by title and abstract. Subsequently, the full-text articles were read. Primary experimental studies that subjected rats to SI, EE, and normal social condition after weaning were included in this review. The risk of bias of the selected studies was evaluated considering the recommendations of SYRCLE's Risk of Bias. The Kappa index was calculated to measure the degree of agreement between reviewers during the article selection stage, as well as during the bias risk assessment stage. Eleven articles were included in this systematic review. The results showed that animals exposed to SI presented a lower behavioral index of habituation and a lower coping response to uncontrollable stress situations. On the other hand, EE promoted a reduction in depression-like behavior and an increase in serotonin levels in the hippocampus and prefrontal cortex of rodents. Thus, environmental stimuli during the critical period of development were associated with better emotional response as well as higher long-term levels of serotonin in brain regions.

Keywords: "environmental enrichment"; "serotonergic system"; "social isolation"; "anxiety"; "depression".

1. Introduction

Recently, distancing and social isolation (SI) have been recommended to prevent the propagation of infection caused by the pathogen called Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) (Debanjan and Mayank, 2020). However, it should be considered that long-term SI can cause negative effects on brain plasticity, as well as in different contexts of cognitive and emotional development (Mumtaz et al., 2018).

Series of biological events such as proliferation, cell differentiation, neurons migration, axonal proliferation, glycogenesis, myelination and synaptogenesis characterize the critical period for the growth and development of the nervous system (Morgane et al., 2002). In rodents, this period occurs from gestation to the first three postnatal weeks (Rice and Barone, 2000). During critical periods, organisms are more vulnerable to exposure to adverse environmental stimuli (Cameron and Demerath, 2002). Thus, exposure to SI in early life and adolescence is considered a stress inducer (Yorgason et al., 2016) that can result in neurobehavioral changes (Fones and Porkess, 2008; Brenes et al., 2020), molecular, structural and functional changes in different areas of the brain (Biggio et al., 2019).

Serotonin (5-HT) is a monoamine that participates in many physiological processes (Żmudzka et al., 2018), including the regulation of emotions and behavior (Żmudzka et al., 2018; Muchimapura and Marsden, 2004). Environmental factors can directly affect the availability of 5-HT (Bonnin and Levitt, 2012). As 5-HT is an important neurotropic and signaling factor that acts in the brain during critical periods of development (Volpicelli et al., 2014), changes in the availability of this monoamine can lead to changes in the signaling of its receptors (Bonnin and Levitt, 2012; Brummelte et al., 2017).

In neurobehavioral terms, SI has been associated with anxiety- and depression-like behaviors (Ieraci et al., 2016), as well as changes in serotonin metabolism (Brenes et al., 2020). Thus, SI appears to alter the 5-HT turnover (Brenes et al., 2008a; Brenes et al., 2009)

and influence the responsiveness and binding receptors (Marsden et al., 2011). Additionally, studies have also shown that rodents submitted to SI showed a reduction in gene transcription of 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2C, 5-HT3A, 5-HT6, and 5-HT7 receptors in the prefrontal cortex; reduction in expression of 5-HT1B, 5-HT2A, and 5-HT2C receptors in the hypothalamus and midbrain; increase in 5-HT6 receptor expression in the hippocampus (Bibancos et al., 2007; Grigoryan et al., 2022) and reduction in 5-HT levels in the amygdala (Kaneda et al., 2020). In this context, changes in the availability of 5-HT in specific regions may be associated with differences in the responsiveness of brain serotonergic receptors (Walker et al., 2019).

Environmental enrichment (EE) is an environmental modification strategy that exposes laboratory animals to novelties and enhances sensory, physical and cognitive stimuli (Girbovan and Plamondon, 2013). These environmental stimuli are potent inducers of neurogenesis and neuroplasticity (Schaeffer, 2010). Thus, EE appears to reduce anxiety- and depression-like behavior (Pena et al., 2006; Brenes et al., 2009), as well as increase 5-HT levels in the prefrontal cortex and hippocampus (Brenes et al., 2008b; Brenes et al., 2009) in rodents. These data suggest that EE may be a non-pharmacological intervention (Schaeffer, 2010) capable of attenuating the effects caused by SI. Thus, this review performed a systematic literature search as a tool to investigate the effects of SI and EE after weaning on anxiety- and depression-like behavior and components of the serotonergic system in rats.

2. Methodology

2.1. Type of study

This is a systematic review of primary studies submitted and protocolad on the platform *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO) under the number CRD42020200881 (Annex 1) and described according to the recommendations of the

Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (Page et al., 2021).

2.2. Eligibility Criteria

Primary experimental studies that used subgroups of rats submitted to SI, EE and normal social condition after weaning were considered eligible. On the other hand, studies that used transgenic rodents, ex vivo studies, in vitro studies or in silico studies were ineligible. In addition, works that did not use a control environment were disregarded. Articles selected based on full reading were included according to the characteristics determined for PICO (population, intervention, comparison and outcomes) (Table 1).

Table 1. Eligibility criteria

	Inclusion criteria	Exclusion criteria
Population (P)	Rats	Studies with transgenic rodents and mice.
Intervention (I)	Animals exposed to social isolation (1 animal per cage) or environmental enrichment (more than 2 animals per cage + stimulating objects) after weaning.	Studies that were use stress, feed restriction, interference of external agents in enriched conditions and studies that were not use experimental environments after weaning.
Comparison (C)	Control environment (regular size cage containing 2-5 animals/cage)	Studies that don't used environment control.
Outcomes (O)	Primary outcomes: behaviors related to anxiety and depression. Secondary outcomes: evaluation of components of the serotonin system in the brain (serotonin content; serotonin transporter; serotonin receptors).	None.
Publication parameters	There was no restriction of articles date and languages.	None.

2.2. Search Strategy

The bibliographic searches were carried out in April 2021 and updated in July 2022 in the following electronic databases, no language and year of publication restrictions: MEDLINE/PubMed, LILACS, Scopus, Web of Science, EMBASE and Sigle via open gray. For each of the databases used, specific search strategies were created. The terms “social isolation”, “behavior” and “rat” were used according to the description of the Health Sciences Descriptors (DeCS) and Medical Subject Headings (MESH). The terms “environmental enrichment”, “enriched environment”, “anxiety” and “depression” were used according to the Emtree descriptors for the EMBASE platform and as independent terms, as described in table 2.

Table 2. Terms used in DeCS, MESH and Emtree.

Data base	Search strategies
MEDLINE/PubMed	"environmental enrichment" OR "enriched environment" AND behavior
LILACS	"environmental enrichment" OR "enriched environment" AND behavior
Web of Science	TS=(environmental enrichment) OR TS=(enriched environment) AND TS=(social isolation) AND TS=(rat)
EMBASE	'environmental enrichment'/exp OR 'environmental enrichment' OR 'enriched environment' AND behavior OR anxiety OR depression AND 'social isolation' NOT human
SCOPUS	TITLE-ABS-KEY (<i>"environmental enrichment"</i>) OR TITLE-ABS-KEY (<i>"enriched environment"</i>) AND TITLE-ABS-KEY (<i>behavior</i>) AND TITLE-ABS-KEY (<i>"social isolation"</i>) AND NOT TITLE-ABS-KEY (<i>human</i>)
SIGLE via open gray	"environmental enrichment" OR "enriched environment" AND "social isolation"

Two reviewers (RPBS and ILP) performed the searches independently. In the first phase, studies were selected for inclusion through their titles and abstracts according to the inclusion and exclusion criteria. In the second phase, the selected studies were read in full for definitive inclusion or exclusion, according to the results of the systematic review. After selecting the articles, the two reviewers met to compare the findings. The third reviewer (LCMG) was consulted in cases of disagreements that were not resolved in a consensus meeting.

2.3. Data extraction

The information regarding the title, authorship, journal and year of publication of the selected articles was obtained through a standardized form. Posteriorly, data regarding the methodology were extracted: species used, number of experimental groups, size of cages used to compose the groups, duration of social isolation and exposure to the enriched environment, elements used to enrich the environment and standard bioterium conditions. The primary data regarding anxiety and depression-like behavior were evaluated by studies that used tests such as elevated plus maze, open field, forced swim test or any other test used to evaluate these behaviors. The serotonergic system was evaluated by studies that used immunoreactivity or gene expression of components of the serotonergic system (gene expression in a certain amount of brain protein relative to a known protein content, usually actin) or protein expression (given by the size of the reactive bands on a nitrocellulose membrane) or the total serotonin content in the orifice or part of the brain (quantified in nanograms/total brain protein content).

Data were extracted from texts, graphs and tables and progressively filed into tables designed to describe the characteristics, analyzed variables/results and risk of bias assessment. In all tables the names of the authors and year of publication of the articles are described. To

schematize the results, 3 tables were used: the first table describes information regarding the start and duration of the accommodation conditions; the second table shows behavioral test data and results of emotional findings; the third table presents the data referring to the concentration of serotonin.

2.4. Risk of bias

The risk of bias of the studies selected for review was evaluated according to the recommendations of the SYRCLE's Risk of Bias tool (Hooijmans et al., 2014) that classifies the risk of bias as “high”, “low” or “unclear”. Two reviewers (RPBS and RKBS) rated the following items: random sequence generation, baseline characteristics, allocation concealment, random housing, blinding of participants and personnel, random outcome data, blinding of outcomes assessment, incomplete outcome data, selective reporting, other bias. The disagreements were resolved in a consensus meeting.

2.5. Data processing

The results were presented in the form of a descriptive synthesis, using absolute and relative values (percentages) for the risk of bias. To assess the degree of agreement between reviewers, the Kappa index was applied during the selection of articles, as well as in the risk of bias assessment stage. The summary chart of the risk of bias assessment was performed using the Review Manager® software, version 5.3. The authors of the articles included were consulted for clarification on quantitative data or for additional details. However, due to the absence of feedback from them, it became unfeasible to apply meta-analysis in this review.

3. Results

The search performed in electronic databases identified 4,613 studies in MEDLINE/PubMed, LILACS, Web of Science, EMBASE, SCOPUS and Sigle via Open Gray. Of these, 829 articles were removed due to duplicates in the bases. After analyzing the title and abstract, 3,755 articles were excluded for not meeting the eligibility criteria. Posteriorly, after the complete reading of the 29 selected articles, 11 were included in this review because they met the inclusion criteria (Figure 1) (Kappa = 0.71; indicates substantial agreement).

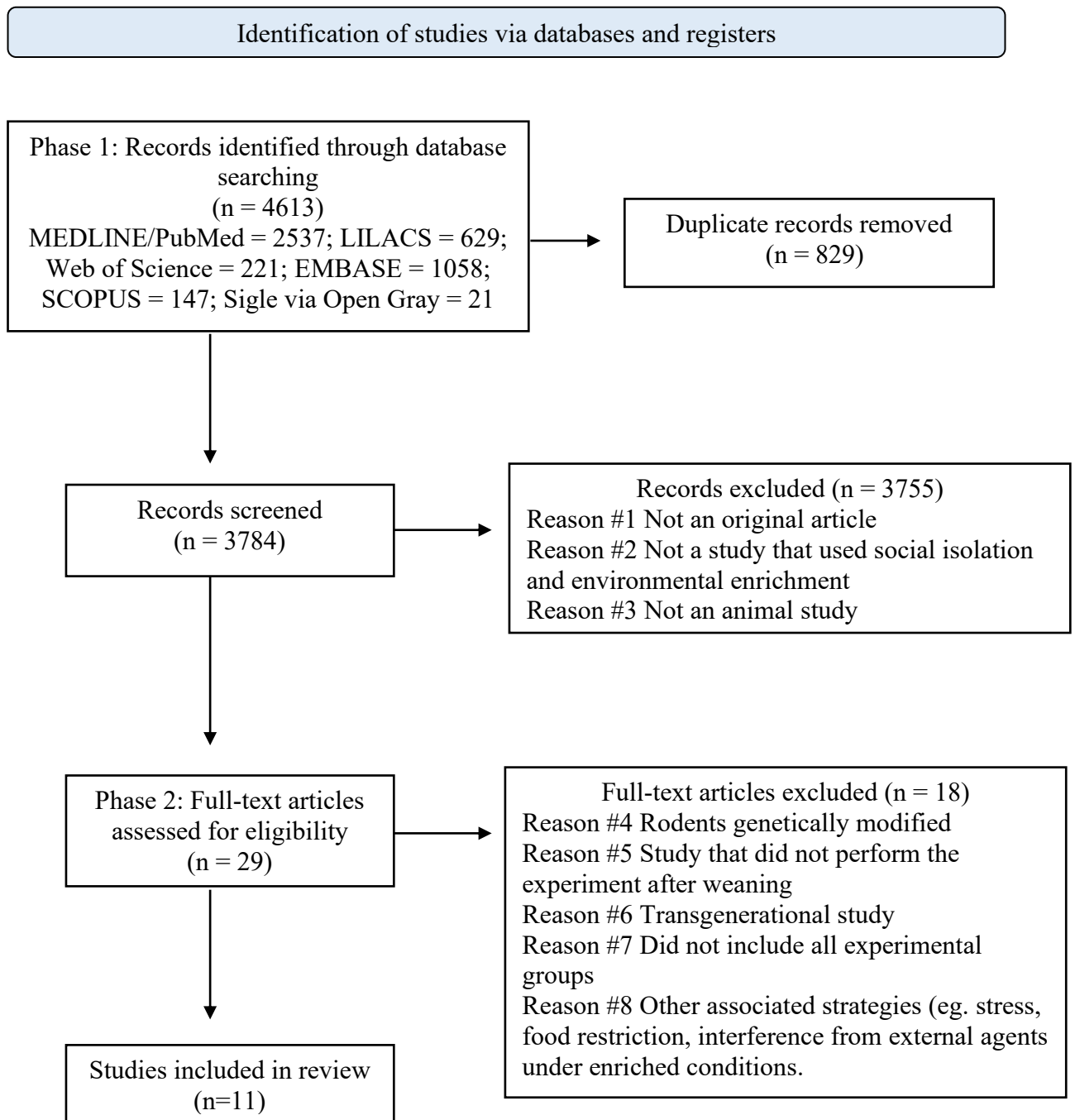


Figure 1. Flowchart of the selection process of studies included according to PRISMA 2020.

3.1. Main characteristics of the studies

The general data related to environmental conditions are described in Table 3. Of the eleven articles selected, most used male Sprague-Dawley rats (Saenz et al., 2006; Brenes et al., 2008a; Brenes et al., 2008b; Brenes et al., 2009; Pascual et al., 2013; Arndt et al., 2015; Mora-Gallegos et al., 2018), one article evaluated male Long-Evans rats (Hellemans et al., 2004), two studies used male Wistar rats (Mosaferi et al., 2015; Tanás et al., 2015) and one evaluated Wistar rats of both sexes (Yildirim et al., 2012). The animals were distributed in different housing conditions (control, isolation and enrichment) between weaning age and the adaptation period that corresponded to the 21st and 30th postnatal day.

The duration of housing conditions ranged from 10 to 42 days (Brenes et al., 2009; Yildirim et al., 2012; Pascual et al., 2013; Arndt et al., 2015) and 72 to 84 days Hellemans et al., 2004; Saenz et al., 2006; Brenes et al., 2008a; Brenes et al., 2008b; Mosaferi et al., 2015; Tanás et al., 2015; Mora-Gallegos et al., 2018). The period that the animals were exposed to the experimental tests ranged from 1 to 6 days (Brenes et al., 2009; Yildirim et al., 2012; Pascual et al., 2013; Tanás et al., 2015; Mosaferi et al., 2015; Arndt et al., 2015) and from 42 to 69 days (Brenes et al., 2008a; Brenes et al., 2008b; Saenz et al., 2006; Mora-Gallegos et al., 2018). Only one of the articles did not mention the age at which behavioral tests started (Hellemans et al., 2004).

3.2. Assessment of the quality of studies

The data referring to the assessment of the risk of bias of the selected articles are shown in figure 2 (Kappa = 0.98; indicates almost perfect agreement). Most studies have randomized animals from experimental groups (Hellemans et al., 2004; Saenz et al., 2006; Brenes et al., 2008a; Brenes et al., 2008b; Brenes et al., 2009; Pascual et al., 2013; Arndt et al., 2015; Mora-Gallegos et al., 2018), reported information on similar baseline characteristics between

groups (Hellemans et al., 2004; Saenz et al., 2006; Brenes et al., 2008a; Arndt et al., 2015; Mosaferi et al., 2015; Tanás et al., 2015; Mora-Gallegos et al., 2018) and random housing (Hellemans et al., 2004; Saenz et al., 2006; Brenes et al., 2008a; Brenes et al., 2008b; Brenes et al., 2009; Pascual et al., 2013; Arndt et al., 2015; Mora-Gallegos et al., 2018). None of the studies mentioned about animal allocation concealment. Only Arndt et al. (2015) and Mosaferi et al. (2015) reported blinding of participants and personnel during intervention measures. On the other hand, only Mosaferi et al. (2015) reported blinding of outcomes assessment. Finally, most studies (81.8%) were classified as having uncertain risk of bias in the description of the outcomes found (Brenes et al., 2008a; Brenes et al., 2008b; Brenes et al., 2009; Yildirim et al., 2012; Pascual et al., 2013; Arndt et al., 2015; Mosaferi et al., 2015; Tanás et al., 2015; Mora-Gallegos et al., 2018).

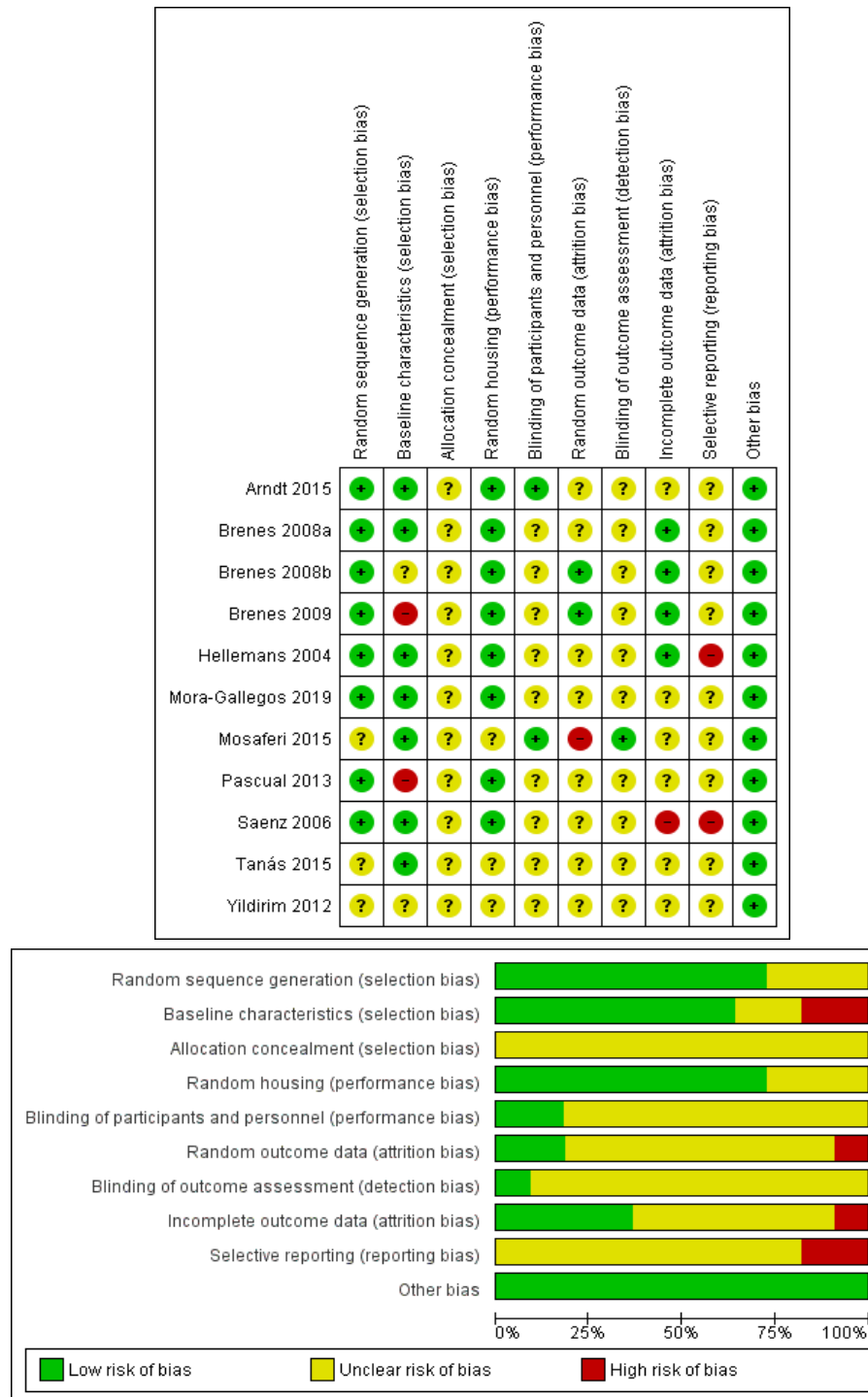


Figure 2. Risk of bias assessment, following the recommendations of the SYRCLE tool. A) Risk of bias studies with their respective results. B) Risk of bias of the studies and their respective percentages in each assessment item.

3.3. Emotional behaviors

To understand the impact of environmental conditions on emotional aspects, the articles performed some behavioral tests that are described in Table 4. To identify anxiety-like behaviors, were used the elevated plus maze test (Hellemans et al., 2004; Pascual et al., 2013; Yildirim et al., 2012; Mosaferi et al., 2015; Tanás et al., 2015; Mora-Gallegos et al., 2018; Brenes et al., 2009), open field test (Brenes et al., 2008b; Tanás et al., 2015; Mosaferi et al., 2015; Mora-Gallegos et al., 2018; Brenes et al., 2009), fear conditioning test (Mora-Gallegos et al., 2018), black/white box (Hellemans et al., 2004) and social interaction test (Tanás et al., 2015). To assess depression-like behaviors, were used the forced swimming test (Saenz et al., 2006; Brenes et al., 2008b; Brenes et al., 2009; Yildirim et al., 2012; Mosaferi et al., 2015; Arndt et al., 2015) and a sucrose preference test (Saenz et al., 2006; Brenes et al., 2008^a; Yildirim et al., 2012).

The plus maze test was performed between PND33 and PND103. There was an increase in anxiety-like behavior in the SI group (Pascual et al., 2013). On the other hand, Brenes et al. (2009), found increased anxiety-like behavior in the EE group on PND60 (greater number of entries in closed arms and crossings in arms). On the contrary, two studies showed parameters for the anxiolytic effect in animals submitted to EE (Hellemans et al., 2004; Mora-Gallegos et al., 2018). Two articles did not find differences between the groups studied (Tanás et al., 2015; Yildirim et al., 2012). When evaluating the Stretch-Attend Posture (SAP), Mora-Gallegos et al. (2018) found no difference between animals in SI or EE. One study associated plus maze results only with exploratory behavior without specifying anxiety-like behavior (Mosaferi et al., 2015).

Regarding the open field test, studies have observed a better habituation to the environment in animals submitted to EE, by reducing the frequency of crossing and rearing, as well as by increasing the duration of grooming (Brenes et al., 2008b; Mora-Gallegos et al.,

2018). Additionally, Brenes et al. (2009) also identified a better habituation to the environment in the animals of the EE group through the increase in the grooming time in the PND62.

Two articles found no differences between environmental conditions and anxiety-like behaviors using the black and white box test (Hellemans et al., 2004), open field test and social interaction test (Tanás et al., 2015). On the other hand, anxiety-like behavior and less adaptation to dangerous situations were observed in SI animals in the PND90 through the fear conditioning test (Mora-Gallegos et al., 2018).

Of the studies that used the sucrose preference test, one identified anxiety-like behaviors by increasing the intake of sucrose solution (ml) (Brenes et al., 2008a) and water (ml) (Brenes et al., 2008a e Yildirim et al., 2012) in socially isolated animals. On the other hand, depressive behavior through increased sucrose intake was observed in both SI and EE groups (Yildirim et al., 2012). An antidepressant effect was found on PND94 in animals exposed to EE, through the reduction in the percentage of preference to sucrose (Brenes et al., 2008a).

The forced swimming test showed homogeneous results. Studies have identified depressive behaviors in SI animals, due to increased immobility (Brenes et al., 2008a; Mosaferi et al., 2015) and reduced diving and struggling (Yildirim et al., 2012). Furthermore, Yildirim et al. (2012) also found depressive behavior in the EE and SI groups due to increased immobility. On the other hand, antidepressant effects were perceived in animals submitted to EE through the behaviors analyzed in the forced swimming test, namely: increase in swimming (Brenes et al., 2008b; Brenes et al., 2009), diving (Brenes et al., 2008b; Saenz et al., 2006) and climbing (Brenes et al., 2008b; Saenz et al., 2006; Arndt et al., 2015).

3.4. Results related to serotonin

Only two articles evaluated serotonin levels in the experiments (Brenes et al., 2008b; Brenes et al., 2009). The studies evaluated the concentrations of serotonin (5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and serotonin turnover (5-HTt) in the prefrontal cortex (PFC) and ventral striatum (VS) (Brenes et al., 2008b), as well as in the hippocampus (Brenes et al., 2009) (Table 4). The 5-HT concentrations were increased in the cortex and hippocampus in animals exposed to EE (Brenes et al., 2008b; Brenes et al., 2009). Rats submitted to SI showed an increase in 5-HTt concentrations in the cortex (Brenes et al., 2008b) and hippocampus (Brenes et al., 2009). In addition, there was a reduction in the concentration of 5-HT in the EV in animals under the same isolation conditions (SI) (Brenes et al., 2008b).

Table 2. General characteristics of the studies included in the systematic review

Author (year)	Population	General conditions of SI and EE	
		Start of social condition	Duration of social condition
Hellemans <i>et al.</i> (2004)	Long-Evans (Males)	PND21	12 weeks
Saenz <i>et al.</i> (2006)	Sprague-Dawley (Males)	PND 22-24	11 weeks
Brenes <i>et al.</i> (2008) ^a	Sprague-Dawley (Males)	PND30	84 days
Brenes <i>et al.</i> (2008) ^b	Sprague-Dawley (Males)	PND30	84 days
Brenes <i>et al.</i> (2009)	Sprague-Dawley (Males)	PND28	42 days
Yildirim <i>et al.</i> (2012)	Wistar (Males and females)	PND21	6 weeks
Pascual <i>et al.</i> (2013)	Sprague-Dawley (Males)	PND22	10 days
Mosaferi <i>et al.</i> (2015)	Wistar (Males)	PND21	73 days
Arndt <i>et al.</i> (2015)	Sprague-Dawley (Males)	PND21	30 days
Tanás <i>et al.</i> (2015)	Wistar (Males)	PND24	73 days
Mora-Gallegos <i>et al.</i> (2018)	Sprague-Dawley (Males)	PND30	72 days

PND = post-natal day; C = control; EE = environmental enrichment; SI = social isolation.

Table 3. Effects of social isolation and environmental enrichment on the behavior patterns of rats.

OPEN FIELD TEST				
Author (year)	Parameters evaluated	Age of experiments	Results analyzed	Interpretation of results
Brenes <i>et al.</i> (2008) ^b	Grooming	PND37	↑ duration in EE group	Faster habituation in EE group
		PND65	↑ duration in EE group	Faster habituation in EE group
		PND93	↑ duration in EE group	Faster habituation in EE group
		PND107	ND	-
	Crossing	PND37	↓ frequency in EE group	Faster habituation in EE group
		PND65	↓ frequency in EE group	Faster habituation in EE group
		PND93	↓ frequency in EE group	Faster habituation in EE group
		PND107	↓ frequency in EE group	Faster habituation in EE group
	Rearing	PND37	↓ frequency in EE group	Faster habituation in EE group
		PND65	ND	-
		PND93	ND	-
		PND107	↑ frequency in SI group	Effect of swimming stress (PND106)
Brenes <i>et al.</i> 2009	<i>Crossing</i>	PND62	↑ frequency in SI group	Less habituation
	<i>Rearing</i>	PND62	ND	-
	<i>Grooming</i>	PND62	↑ time in EE group	Better habituation
Tanás <i>et al.</i> (2015)	Locomotion	PND104	ND	-
	<i>Rearing</i>	PND104	ND	-
Mora-Gallegos <i>et al.</i> (2018)	Locomotion	PND28	ND	-

	PND58	↓ locomotion along OFT in group EE	Faster habituation in EE group
	PND88	↓ locomotion along OFT in group EE	Faster habituation in EE group
	PND28	ND	-
	PND58	↓ frequency and time of rearing in group EE	Faster habituation in EE group
	PND88	ND	-
	PND28	ND	-
Grooming	PND58	↑ in EE group	Faster habituation in EE group
	PND88	↑ in EE group	Faster habituation in EE group

ELEVATED PLUS MAZE

Author (year)	Parameters evaluated	Age of experiments	Results analyzed	Interpretation of results
Hellemans <i>et al.</i> (2004)	Time in open arms (%)	NI	↑ in EE group	↓ anxiety-like behavior
	Number of open-arm entries	NI	↑ in EE group	↓ anxiety-like behavior
Brenes <i>et al.</i> 2009	Time spent in open arms (%)	PND60	ND	-
	Time spent in closed arms (%)	PND60	ND	-
	Time spent in central area (%)	PND60	ND	-
	Number of entries in open arms (frequency)	PND60	ND	-
	Number of entries in closed	PND60	↑ in EE group	↑ anxiety-like behavior in EE group

	arms (frequency)			
	Total arms crossings (frequency)	PND60	↑ in EE group	↑ anxiety-like behavior in EE group
Yildirim <i>et al.</i> (2012)	Time spent in the open arms	PND70	ND	-
	Frequency of the arm entries	PND70	ND	-
Pascual <i>et al.</i> (2013)	Open arm entries (%)	PND33-34	↓ in IS group	↑ anxiety-like behavior
Tanás <i>et al.</i> (2015)	Total time spent in the open arms and closed arms	PND103	ND	-
	Number of entries to the open arms and closed arms	PND103	ND	-
Mosaferi <i>et al.</i> (2015)	Time in open arms	PND93	↑ in SI group IS than control group	Exploratory behavior
	% Open Arms entries	PND93	↑ in SI and EE groups	Exploratory behavior
	Total Arms entries	PND93	↑ in control group	Higher locomotor activity
Mora-Gallegos <i>et al.</i> (2018)	<i>Stretch -Attend Posture (SAP)</i>	PND29	ND	-
		PND89	↑ in control group	↑ anxiety-like behavior
	<i>Head-Dipping (HD)</i>	PND29	ND	-
		PND89	↑ in EE group	↓ anxiety-like behavior
	Time in open arms	PND29	ND	-
		PND89	ND	-
	Time in closed arms	PND29	ND	-
		PND89	ND	-

SOCIAL INTERACTION TEST				
Author (year)	Parameters evaluated	Age of experiments	Results analyzed	Interpretation of results
Tanás et al. (2015)	Social play mean	PND40	ND	-
		PND61	ND	-
FEAR CONDITIONING TEST				
Author (year)	Parameters evaluated	Age of experiments	Results analyzed	Interpretation of results
Mora-Gallegos <i>et al.</i> (2018)	<i>Rearing</i>	PND90	↑ in SI group	↑ anxious and reactive response in SI rats
	<i>Grooming</i>	PND90	ND	-
	<i>Freezing</i>	PND90	↓ in SI group	↓ adaptation to dangerous situations
BLACK/WHITE BOX				
Author (year)	Parameters evaluated	Age of experiments	Results analyzed	Interpretation of results
Hellemans <i>et al.</i> (2004)	Time spent in each compartment	NI	ND	-
	Number of re-entries into the white	NI	ND	-

SUCROSE PREFERENCE TEST				
Author (year)	Parameters evaluated	Age of experiments	Results analyzed	Interpretation of results
Saenz <i>et al.</i> (2006)	Water intake (ml)	Weeks (6 and 10)	↑ in EE group	↑ anxiety-like behavior in EE group
Brenes <i>et al.</i> (2008) ^a	Sucrose consumption (ml)	PND66	↑ in SI group than EE group	↑ depressive-like behavior
		PND94	↑ in SI group than control group	↑ depressive-like behavior
		PND109	ND	-
	Water consumption (ml)	PND66	ND	-
		PND94	ND	-
		PND109	↑ in SI group than EE group	↑ depressive-like behavior
	Preferência à sacarose (%)	PND66	ND	
		PND94	↓ in EE group	↓ depressive-like behavior
		PND109	ND	-
Yildirim <i>et al.</i> (2012)	Sucrose consumption (ml)	PND70	↑ in SI and EE groups	Altered coping response to stress situation
	Water consumption (ml)	PND70	↑ in SI group and ↓ in EE group	Altered coping response to stress situation
	Sucrose preference (%)	PND70	ND	-
FORCED SWIMMING TEST				
Author, year	Parameters evaluated	Age of experiments	Results analyzed	Interpretation of results
Saenz <i>et al.</i> (2006)	<i>Climbing</i>	Week (11)	↑ in EE group	↓ depression-like behaviors

Brenes <i>et al.</i> (2008) ^b	<i>Diving</i>	Week (11)	↑ in EE group	↓ depression-like behaviors
	Immobility	PND106	↑ time in SI group	↑ depressive-like behavior
	<i>Swimming and climbing</i>	PND106	↑ time in EE group	↓ depressive-like behavior
Brenes <i>et al.</i> 2009	<i>Diving</i>	PND106	↑ time in EE group	↓ depressive-like behavior
	Immobility	PND64-65	↓ time of immobility in EE group (PND65)	Coping-stress response in front of an uncontrollable stress situation
	<i>Swimming</i>	PND64-65	↑ time of swimming in EE group (DPN64-65)	↓ depression-like behaviors
	<i>Climbing</i>	PND64-65	↑ time of climbing in all groups from days 1 to 2	↓ depression-like behaviors
Yildirim <i>et al.</i> (2012)	<i>Diving</i>	PND70	↓ in SI group	↑ depression-like behaviors
	<i>Struggling</i>	PND70	↓ in SI group	↑ depression-like behaviors
	Immobility	PND70	↑ in EE and SI groups	↑ depression-like behaviors
Arndt <i>et al.</i> (2015)	Imobilidade – pretest (Exp. II)	PND56-61	ND	-
	<i>Swimming</i> – pretest (Exp. II)	PND56-61	↑ in control group than SI group	↑ escape-directed behavior
	<i>Climbing</i> – pretest (Exp. II)	PND56-61	↑ in EE group	↓ depression-like behaviors
	<i>Swimming</i> – pretest (Exp. II)	PND56-61	ND	-
	Immobility – pretest (Exp. III)	PND56-61	ND	-
	<i>Swimming</i> – pretest (Exp. III)	PND56-61	ND	-
	<i>Climbing</i> – pretest (Exp. III)	PND56-61	↑ in EE group than control	↓ depression-like behaviors

NI = no information; ND = no difference; PND = post-natal day; EE = environmental enrichment; SI = social isolation

Table 4. Evaluation of serotonergic components.

Author, year	Technique used	Parameter evaluated	Region assessed	Result
Brenes et al. (2008) ^b	HPLC-EC	5-HT	PFC	↑ in group EE
			VS	ND
		5-HIAA	PFC	ND
			VS	ND
		5-HIAA/5-HT	PFC	↑ in group SI
			VS	↓ in group EE
Brenes et al. (2009)	HPLC-EC	5-HT	Hippocampus	↑ in group EE
		5-HIAA	Hippocampus	ND
		5-HTt	Hippocampus	↑ in group SI

HPLC-EC = liquid chromatography coupled with electrochemical detection; 5-HT = serotonin; 5-HIAA = 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HTt = 5-HT turnover; PFC = prefrontal cortex; VS = ventral striatum; C = control; EE = environmental enrichment; SI = social isolation; ND = no difference

4. Discussion

The main results found in this systematic review point to the effects of different housing conditions (control environment, social isolation and environmental enrichment) after weaning on emotional behavior and the expression of serotonergic system components.

Regarding behavioral tests, the results related to exploratory and anxiety behavior showed that the animals exposed to the EE had a better behavioral index of habituation compared to the control and SI animals. The EE after weaning reduced locomotor activity and rearing and crossing behavior, as well as increased grooming behavior in the open field. The rapid habituation observed in animals submitted to EE was also observed in other studies (Schrijver et al., 2002; Rojas-Carvajal et al., 2018). Additionally, behavioral effects are evident when habituation occurs in the early stages of development (Mora-Gallegos et al., 2018), due to the greater interaction with the new environment in animals submitted to EE (Varty et al., 2000). Although animals submitted to SI express hyperactivity in new environments and take longer to habituate (Fones and Porkess, 2008). Tanás et al. (2015) found no differences in habituation and anxiety behavior in rodents, regardless of rearing conditions. The authors claimed that their experiments did not produce effects for two reasons: 1) due to a small sample of animals (n=6 per group) or 2) because the enriched cage had little variety of objects and they were changed less frequently (Tanás et al., 2015) (See Supplementary Material).

The studies showed disagreements on the effect of housing conditions on anxiety-like behavior assessed by the elevated plus maze. Parker and Morinan (1986) reported that keeping animals in different housing conditions (SI or EE) for short periods of up to 3 weeks, may be directly related to increased anxiety-like behavior. However, it should be considered that anxiety-like behavior may also appear due to keeping rodents in adverse conditions during the critical developmental window (Lukkes et al., 2009). One study demonstrated an

anxiolytic effect due to the longer time spent in the open arms of the plus maze in animals submitted to EE since weaning (Hellemans et al., 2004). However, Mosaferi et al. (2015) found anxiolytic effects by increasing the time spent in open arms in animals exposed to SI (PND93). A point that should be considered is that the time spent in the open arms of the plus maze may not be a determinant of anxiogenic behavior, since isolated animals may spend more time in the open area as an attempt to escape from the small cages where they were housed (Mosaferi et al., 2015).

When analyzing other parameters of the plus maze, Brenes et al. (2009) described higher anxiety-like behavior in the group submitted to EE, due to the higher frequency of entry of animals into closed arms and the higher number of crossings between the arms (PND 60). However, the anxiety responses observed in the EE animals may also be indicative of a greater capacity to detect dangers and threats in the environment (Mosaferi et al., 2015). Methodological issues may also have influenced these results. A study demonstrated that the intensity of ambient light interferes with the exploratory behavior of rats in the elevated plus maze (Garcia et al., 2005). The same authors reported that rodents tested under low lighting levels (0 and 1 lx), showed greater exploration in the environment by the increase entries and time spent in open arms (Garcia et al., 2005). In this review, only two studies reported the type and intensity of light used (Brenes et al., 2009; Tanas et al., 2015). Brenes et al. (2009) used two 25 wats red lamps (approximately 200 lx), while Tanás et al. (2015) used a red light (100 lux). Both studies found no differences in the conditions of creation and exploration by the entrance of open arms. Both studies found no differences in the conditions of creation and exploration by the entrance of open arms. The data suggest that the light intensity has interfered with the animal's vision and, consequently, in the possible avoidance of open arms (Garcia et al., 2005).

The duration of social isolation may be a determinant for the phenotypic expression of depression-like behavior (Brenes et al., 2020). However, in all reviewed studies, the duration of SI was sufficient to produce these effects. The increased immobility in the forced swim test is a strong predictor of depression-like symptoms in rodents (Yankelevitch-Yahav et al., 2015). Thus, in the evaluated studies, habituation conditions affected immobility, swimming, climbing, and diving parameters. Higher immobility was observed in animals exposed to SI (Brenes et al., 2008b; Mosaferi et al., 2015), suggesting behavioral despair and impaired escape attempts due to depression-like symptoms. Alternatively, climbing and diving are considered effective behavior in the escape attempt to depression-like symptoms (Yankelevitch-Yahav et al., 2015). Thus, most of the included studies identified increased climbing behavior (Saenz et al., 2006; Brenes et al., 2008b; Mosaferi et al. 2015 e Ardnt et al., 2015) and diving in rats exposed to EE (Brenes et al., 2008b). The findings confirm that AE contributes to a better coping response in a stressful situation. Further, EE seems to be involved in higher neural plasticity and neurogenesis in animals (Koh et al., 2007), as well as with the reduction in depression-like states by increasing serotonin levels in the hippocampus (Brenes et al., 2009).

The animals submitted to SI showed emotional dysregulation in the Sucrose Preference Test (Brenes et al., 2008a; Yildirim et al., 2012). Sucrose intake was higher in SI animals, which indicates a change in the reward threshold due to the greater need to experience rewarding sensations (Brenes et al., 2020; Acero-Castillo et al., 2021). Alternatively, Yildirim et al. (2012) observed higher sucrose consumption in SI and EE animals, indicating that the stress caused by other behavioral tests directly affected the result in animals submitted to EE.

At a neurochemical level, the EE increased the concentration of 5-HT in the hippocampus (Brenes et al., 2009) and prefrontal cortex (Brenes et al., 2008b). However, the regulatory mechanism involved in the increase in the amount of 5-HT in animals exposed to AE is still

unclear (Brenes et al., 2008b). However, the SI is considered a stressor agent that manages to reduce 5-HT concentrations and, simultaneously, increase its turnover rate in the hippocampus (Brenes et al., 2020; Krupina et al., 2020) and the prefrontal cortex (Brenes et al., 2008b). An alteration in the turnover of 5-HT and in its 5-HIAA metabolite may suggest that SI animals have a greater use of 5-HT and, consequently, cannot be compensated by the increase in its biosynthesis (Brenes et al., 2009). This happens due to dysfunction in presynaptic 5-HT activity or reduction in 5-HT fibers in the hippocampus (Brenes et al., 2009). Even so, the study by Krupina et al. (2020), found no difference in 5H-T values and 5-HT turnover in the prefrontal cortex and striatum of animals exposed to SI. Thus, the development of neurochemical systems involved in mood, stress and, anxiety regulation may be susceptible to changes arising from adverse events in early life (Fone and Porkess, 2008; Lukkes et al., 2009). However, further studies are needed to assess the effects of different environmental conditions on the procedures involved in neurochemical changes.

In terms of the risk of bias, all studies were classified as “uncertain” in 50% or more of the considered questions. This means that the studies did not describe enough information. Factors such as lighting, time, and the order in which the tests are performed can influence the interpretation of behavioral results (Gulinello et al., 2018). In the study by Yildirim et al. (2012) was reported more than one test performed on the PDN70, but the authors did not describe whether the same animals were used in both tests. Moreover, the study by Helleman et al. (2004) was the only one that did not report the day the tests were performed. With this, there be a standardization and better detailing of the methods of articles that involve emotional behavior to minimize biases and provide better reproducibility.

5. Conclusion

This systematic review demonstrated that social isolation reduced exploratory behavior and coping response to adverse situations associated with the induction of phenotype related to anxiety and depression in rats. Alternatively, the enriched environment promoted an antidepressant effect and increased 5-HT concentration in the hippocampus and prefrontal cortex in rodents. Thus, environmental stimuli during the critical period of development appear to interfere with emotional behavior and neurotransmitter activity in adult rat offspring.

Supplementary table. General characteristics of the enriched environment

Author, year	Box size	Number of animals per cage	Characteristics	Frequency of object exchanges
Hellemans <i>et al.</i> (2004)	75x75x180 cm height	12	Three levels were connected by ramps with several wheels and toys.	Bi-weekly
Saenz <i>et al.</i> (2006)	120x70x70 cm height	15	The rectangular stainless-steel floor with tree levels, walls and roof covered with metal wire netting (2.54 cm holes). Non-chewable plastic objects (three fast track and four crawl balls), two PVC tubes, and a small running wheel.	Each 2 days
Brenes <i>et al.</i> (2008) ^a	120x70x100 cm height	15	Non-chewable plastic objects and two PVC tubes, five food dispensers and two water bottles.	1 or 2 days
Brenes <i>et al.</i> (2008) ^b	120x70x100 cm height	15	Non-chewable plastic objects and two PVC tubes, five food dispensers and two water bottles.	1 or 2 days
Brenes <i>et al.</i> (2009)	120x70x100 cm height	15	Non-chewable plastic objects and two PVC tubes, five food dispensers and two water bottles.	1 or 2 days
Yildirim <i>et al.</i> (2012)	Three large acrylic	6	Three large acrylic boxes were connected to	3 times per week

	boxes (30×30×50 cm)		each other via re-arrangeable tunnels. The boxes contained different food dispensers, water bottles, two running wheels, climbing ladders, shelter and a variety of stimulating objects.	
Pascual <i>et al.</i> (2013)	100x100x100 cm height	14	Ramps, tunnels, wheels, and ropes to climb.	-
Mosaferi <i>et al.</i> (2015)	63x88x82 cm height	5	Two running wheels, two food dispensers, two water bottles and with a variety of toys, several types of stairs and PVC tubes, objects (balls, rings and a block of plate with predrilled holes) made of non-chewable plastic.	Weekly
Arndt <i>et al.</i> (2015)	60×120×45 cm height	10	Equipped with fourteen non-toxic objects (children's toys, PVC pipe, etc.)	Seven of the objects were changed daily and all of the toys were changed weekly.
Tanás <i>et al.</i> (2015)	61×41×21 cm height	Pair-reared	Several objects (small metal ladder, standard 40 mm Ping-Pong ball, wooden brick, natural size plush mouse).	When needed
Mora-Gallegos <i>et al.</i> (2018)	120x70x100 cm height	15	Non-chewable plastic objects, PVC tubes, food dispensers and water bottles.	At least twice a week

6. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES.

- Acero-Castillo, M. C., Ardila-Figueroa, M. C., Botelho de Oliveira, S., 2021. Anhedonic Type Behavior and Anxiety Profile of Wistar-UIS Rats Subjected to Chronic Social Isolation. *Front Behav Neuroscience*. 15:663761. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2021.663761>.
- Arndt, D. L., Peterson, C. J., Cain, M. E., 2015. Differential Rearing Alters Forced Swim Test Behavior, Fluoxetine Efficacy, and Post-Test Weight Gain in Male Rats. *PloS one*. 10(7), e0131709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131709>.
- Bibancos, T., Jardim, D. L., Aneas, I. S., Chiavegatto., 2007. Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. *Genes Brain Behav*. 6(6), 529–539. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00280.x>.
- Biggio, F., Mostallino, M. C., Talani, G., Locci, V., Mostallino, R., Calandra, G., Sanna, E., Biggio, G., 2019. Social enrichment reverses the isolation-induced deficits of neuronal plasticity in the hippocampus of male rats. *Neuropharmacology*. 151, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.030>.
- Bonnin, A., Levitt, P., 2012. Placental Source for 5-HT that Tunes Fetal Brain Development. *Neuropsychopharmacol*. 37, 299-300. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.194>.
- Brenes, J. C., Fornaguera, J., 2008 (A). Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine. *Neurosci Lett*. 436(2), 278-82. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.03.045>.
- Brenes, J. C., Rodríguez, O., Fornaguera J., 2008 (B). Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav*. 89(1), 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.11.004>.

- Brenes, J. C., Padilla, M., Fornaguera, J., 2009. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res.* 197(1), 125-37. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.014>.
- Brenes, J. C., Fornaguera, J., Sequeira-Cordero, A., 2020. Environmental Enrichment and Physical Exercise Attenuate the Depressive-Like Effects Induced by Social Isolation Stress in Rats. *Front. Pharmacol.* 11:804. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00804>.
- Brummelte S., Glanaghy, E. MC., Bonnin, A., Oberlander, T. F., 2017. Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience.* 342, 212-31. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.037>.
- Cameron, N., Demerath, E. W., 2002. Critical Periods in Human Growth and Their Relationship to Diseases of Aging. *Yearbook Of Physical Anthropology.* 45, 159-84. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10183>.
- Debanjan, B., Mayank, R., 2020. Social isolation in Covid-19: The impact of loneliness. *Int J Soc Psychiatry.* 66(6), 1-3. <https://doi.org/10.1177/0020764020922269>.
- Fone, K. C., Porkess, M. V., 2008. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 32(6), 1087-102. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.003>.
- Garcia, A. M. B., Cardenas, F. P., Morato, S., 2005. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav.* 85, 265-70. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.04.007>.
- Girbovan, C., Plamondon, H., 2013. Environmental enrichment in female rodents: Considerations in the effects on behavior and biochemical markers. *Behavioural Brain Research.* 253, 178-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.018>.
- Grigoryan, G. A., Pavlova, I. V., Zaichenko, M. I., 2022. Effects of Social Isolation on the Development of Anxiety and Depression-Like Behavior in Model Experiments in Animals.

Neuroscience and Behavioral Physiology. 52(5), 722-38. <https://doi.org/10.1007/s11055-022-01297-1>.

Gulinello, M., Mitchell, H. A., Chang, Q., Timothy O'Brien, W., Zhou, Z., Abel, T., Wang, L., Corbin, J. G., Veeraragavan, S., Samaco, R. C., Andrews, N. A., Fagiolini, M., Cole, T. B., Burbacher, T. M., Crawley, J. N., 2019. Rigor and reproducibility in rodent behavioral research. *Neurobiol Learn Mem.* 165: 106780. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.01.001>.

Hellemans, K. G., Benge, L. C., Olmstead, M. C., 2004. Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Res Dev Brain Res.* 150(2), 103-15. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.03.003>.

Hooijmans, C. R., Rovers, M. M., De Vries, R. B., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., Langendam, M. W. 2014. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies, *BMC Med. Res. Methodol.* 14(43), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.

Ieraci, A., Mallei, A., Popoli, M., 2016. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plasticity.* 1-13. <https://doi.org/10.1155/2016/6212983>.

Kaneda, Y., Kawata, A., Suzuki, K., Matsunaga, D., Yasumatsu, M., Ishiwata, T., 2020. Comparison of neurotransmitter levels, physiological conditions, and emotional behavior between isolation-housed rats with group-housed rats. *Dev Psychobiol.* 00:1-9. <https://doi.org/10.1002/dev.22036>.

Koh, S., Magid, R., Chung, H., Stine, C. D., Wilson, D. N., 2007. Depressive behavior and selective downregulation of serotonin receptor expression after early-life seizures: reversal by environmental enrichment. *Epilepsy Behav.* 10(1), 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2006.11.008>.

- Krupina, N. A., Shirenova, S. D., Khlebnikova, N. N., 2020. Prolonged Social Isolation, Started Early in Life, Impairs Cognitive Abilities in Rats Depending on Sex. *Brain Science*. 10(11), 799. <https://doi.org/10.3390/brainsci10110799>.
- Lukkes, J. L., Watt, M. J., Lowry, C. A., Forster, G. L., 2009. Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 3(18). <https://doi.org/10.3389/neuro.08.018.2009>.
- Marsden. C. A., King, M V., Fone, K. C. F., 2011. Influence of social isolation in the rat on serotonergic function and memory e Relevance to models of schizophrenia and the role of 5-HT6 receptors. *Neuropharmacology*. 61(3), 400-07. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.03.003>.
- Mora-Gallegos, A., Fornaguera, J., 2018. The effects of environmental enrichment and social isolation and their reversion on anxiety and fear conditioning. *Behav Processes*, 158, 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.10.022>.
- Morgane, P. J., Mokler, D. J., Galler, J. R., 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 26(4), 471-83. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00012-X).
- Mosaferi, B., Babri, S., Ebrahimi, H., Mohaddes, G., 2015. Enduring effects of post-weaning rearing condition on depressive- and anxiety-like behaviors and motor activity in male rats. *Physiol Behav*. 142, 131-6. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.015>.
- Muchimapura, S., Marsden, C., 2004. The effect of creating social isolation on the development of the hippocampus and the serotonergic function. *Thai J Physiol Sciences*. 17(1), 1-8.
- Mumtaz, F., Khan, M. I., Zubair, M., Dehpour, A. R., 2018. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 105, 1205-22. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.086>.

Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Butron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Moher, D., 2021. Updating guidance for reporting systematic reviews: development of the PRISMA 2020 statement. *J Clin Epidemiol.* 134:S0895-4356.

<https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2021.02.003>.

Parker, V., Morinan, A., 1986. The socially-isolated rat as a model for anxiety. *Neuropharmacology.* 25(6), 663-4. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(86\)90224-8](https://doi.org/10.1016/0028-3908(86)90224-8).

Pascual, R., Bustamante, C., 2013. Early postweaning social isolation but not environmental enrichment modifies vermal Purkinje cell dendritic outgrowth in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 73(3), 387-93.

Pena, Y., Prunell, M., Dimitantos, V., Nadal R., Escorihuela, R. M., 2006. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behav Brain Res.* 174 (1), 181-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.07.007>.

Rice, D., Barone Junior, S., 2000. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives.* 108(3), 511-533. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>.

Rojas-Carvajal, M., Fornaguera, J., Mora-Gallegos, A., Brenes, J. C., 2018. Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour in rats. *Animal Behaviour.* 137, 225-35.

<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2018.01.018>.

Sáenz, B. J. C., Villagra, O. R., Fornaguera, T. J., 2006. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behav Brain Res.* 169(1), 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.12.001>.

Schrijver, N. C. A., Bahr, N. I., Weiss, I. C., Würbel, H., 2002. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA

activity in adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 73(1), 209-24.

[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00790-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00790-6).

Tanas, L., Ostaszewski, P., Iwan, A., 2015. Effects of post-weaning social isolation and environmental enrichment on exploratory behavior and anxiety in Wistar rats. *Acta Neurobiol Exp*. 75, 72-79.

Varty, G. B., Paulus, M. P., Braff, D. L., Geyer, M. A., 2000. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry*. 47(10), 864-73. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00269-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00269-3).

Volpicelli, F., Speranza, L., Porzio, U., Crispino, M., Perrone-capano, C., 2014. The serotonin receptor 7 and the structural plasticity of brain circuits. *Front Behav Neuroscience*. 8: 318. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00318>.

Zmudzka, E., Salaciak, K., Sapa, J., Pytko, K., 2018. Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. *Life Sciences*. 210, 106-24. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.050>.

Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., Doron, R., 2015. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp*. 97:52587. <https://doi.org/10.3791/52587>.

Yildirim, E., Erol, K., Ulupinar, E., 2012. Effects of sertraline on behavioral alterations caused by environmental enrichment and social isolation. *Pharmacol Biochem Behav*. 101(2), 278-87. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.12.017>.

Yorgason, J. T., Calipari, E. S., Ferris, M. J., Karkhanis, A. N., Fordahl, S. C., Weiner, J. L., Jones, S. R., 2016. Social isolation rearing increases dopamine uptake and psychostimulant potency in the striatum. *Neuropharmacology*. 101, 471-79. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.025>.

Walker, D. M., Cunningham, A. M., Gregor, K., Nestler, E. J., 2019. Long-Term Behavioral Effects of Post-weaning Social Isolation in Males and Females. *Front Behav Neurosci*.

13(66). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00066>.