



## 15° Congresso de Iniciação Científica

### **AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL EM RATOS SUBMETIDOS A LIMITAÇÃO FUNCIONAL COM ORTESE DE METACRILATO DE ETILA**

#### **Autor(es)**

REINALDO DE JESUS MACEDO JÚNIOR

#### **Orientador(es)**

Carlos Alberto Silva

#### **Apoio Financeiro**

PIBIC

#### **1. Introdução**

Os modelos animais são fundamentais para a pesquisa, porque mimetizam algumas características elementares de um estado patológico específico, favorecem sua compreensão e o desenvolvimento de terapias eficazes, fornecem uma aproximação simplificada aos complexos fatores relacionados à patologia, simplificam o sistema estudado, reduzindo o número de variáveis cujo controle é inacessível, oferecendo, assim, maior grau de controle experimental e permitindo manipulações experimentais que poderiam ser impossíveis em outras circunstâncias (THRANE et al., 1996). A ciência tem buscado constantemente metodologias no âmbito comportamental que permitam estudar e avaliar a susceptibilidade, grau de ansiedade e de estresse. Para contemplar esta necessidade premente, vários modelos animais têm sido propostos, visando, sobretudo avaliar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e evolução das alterações indutoras de estresse (Willner 1990). Os fatores ambientais podem determinar adaptações que fundamentam os comportamentos de diversos animais. Embora a expressão emocional varie de uma espécie para outra, comportamentos emocionais, como evitação e imobilismo, permanecem a mesma e constituem a base para a classificação das emoções ao longo da evolução biológica. Com base nisso, emoções básicas, tais como medo e expectativa, são representadas por redes neurais inatas que coordenam as estratégias comportamentais permitindo aos animais interagirem com mudanças contínuas no ambiente (Zangrossi et al., 2003). Por muitos anos têm sido desenvolvido diferentes métodos que permitem quantificar a atividade locomotora de ratos submetidos ao teste de campo aberto (open field). Neste sentido, os parâmetros que quantificam o padrão de movimentação no open field estão relacionados com a frequência de amostragem, a resolução espacial, a relação entre o tamanho do animal e a área do aparato experimental, a distância do deslocamento, o tempo de permanência em cada região do campo e a velocidade do movimento (ROUSSEAU, GISPEN, SPRUIJT, 1998). O labirinto em cruz elevado (LCE ou

pluz maze) faz parte do rol de testes indicados na avaliação do comportamento de ratos, sendo útil na pesquisa de comportamento animal, pois requer um aparato mínimo para a sua realização, inclui um procedimento simples e rápido baseado no comportamento espontâneo do animal (Schimitt e Hiemke, 1998). O LCE se baseia na medida de todas as categorias comportamentais que refletem o conflito resultante da tendência dos animais de explorar ambientes desconhecidos e evitar situações potencialmente perigosas, sendo um dos testes mais empregados no estudo da ansiedade (GRAEFF, 1994). Diferentes fatores podem propiciar a prescrição de imobilização durante um processo de reabilitação, merecendo destaque, as entorses, as lesões nos membros inferiores, fraturas ósseas, rupturas ligamentares ou doenças degenerativas das articulações e como consequência, é inevitável à diminuição da amplitude de movimentos das articulações e aparecimento de hipotrofia muscular (Mcdougall et al., 1980). Recentemente desenvolvemos um modelo de órtese de metacrilato de etila aplicado para ratos no estudo de fenômenos ligados a imobilização muscular e verificamos alterações quimio-metabólicas e histológicas de caráter diferenciado e de acordo com a posição articular e período de desuso (SILVA et al., 2006). Uma vez que existem poucos trabalhos abrangendo os efeitos comportamentais associados à imobilização a proposta deste trabalho foi avaliar o comportamento de ratos imobilizados quando submetidos ao open field ou ao LCE durante 5.

## 2. Objetivos

---

O objetivo deste estudo foi avaliar através do teste de campo aberto open field ou labirinto em cruz elevado (pluz maze), às respostas comportamentais em ratos submetidos a 5 dias de imobilização articular através de órtese de resina acrílica mantendo a articulação do tornozelo em 90°.

## 3. Desenvolvimento

---

Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg,i.p) a pata posterior esquerda dos animais foi imobilizada com o modelo de órtese de resina acrílica proposto por Silva et al. (2006), e os ratos submetidos aos protocolos de avaliação comportamental. Os animais foram diariamente expostos ao open field sempre no início da noite, período de maior atividade da espécie, permanecendo no ambiente durante 3 minutos (PELLOW et al., 1985). Para o teste do labirinto em cruz elevado, cada animal foi submetido ao teste comportamental sendo colocado no centro do labirinto, de frente para um dos braços fechados e, observado durante 5 minutos (CRUZ e GRAEFF, 1994). Para os experimentos de labirinto em cruz elevado, utilizamos o aparato que consiste de duas superfícies horizontais de madeira, medindo 50x10 cm, justapostas pelas pontas, com bordas de acrílico de 1cm de altura (braços abertos), cruzados em angulo reto com duas superfícies de igual tamanho, circundadas por paredes de 40 cm de altura (braços fechados) exceto na parte central onde os braços se cruzam. Todo o aparato eleva-se a 50 cm do piso. Circundando os braços abertos havia uma borda de acrílico de 1 cm de altura com a finalidade de evitar que os ratos caíssem. Após as fases experimentais, os animais foram anestesiados e uma amostra de sangue coletada, centrifugada e o plasma encaminhado para análise da concentração plasmática de corticosterona através de ELISA (BIORAD- diagnósticos) e glicemia através de método enzimático calorimétrico (CELM- reactoclin). A glândula supra-renal foi retirada e o conteúdo de ácido ascórbico avaliado por método colorimétrico. A avaliação estatística foi utilizada pelo teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido da análise variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. Resultados

---

Iniciamos realizando um teste de movimentação exploratória submetendo os ratos ao teste de campo aberto (open field). A análise do comportamento exploratório dos ratos do grupo controle mostrou redução de 25% no índice de deambulação na transição do 1º para o 2º dia, redução de 36% no 3º, 4º e 5º dia, ocasião em que o índice de deslocamento manteve-se constante, caracterizando a adaptação. Por outro lado, a mesma análise realizada no grupo submetido à imobilização, mostrou inibição no índice de deslocamento não sendo verificado diferença nos 5 dias de análise, no entanto, se comparamos com o grupo controle observamos

uma expressiva redução atingindo 68,9%, 55,2%, 54%, 61,5%, 63,8%, respectivamente do 1º ao 5º dia de análise, fato que mostra inibição no comportamento exploratório. Comportamento exploratório é a denominação da expressão comportamental da curiosidade que acontece de forma espontânea nos animais. Ao avaliarmos o comportamento de ratos controle submetidos ao open field verificamos uma grande atividade exploratória nos dias iniciais seguido de uma adaptação progressiva, representado pela redução na atividade, ao longo dos cinco dias de avaliação. Neste sentido sabe-se que o substrato neural de tal comportamento é representado por redes neurais inatas que coordenam as estratégias comportamentais permitindo aos animais interagirem com mudanças contínuas no ambiente e aprendizagem topográfica independente de recompensa (ZANGROSSI e FILE, 2003). Tendo observado alterações comportamentais induzidas pela limitação funcional imposta pela órtese, passamos a avaliar a concentração plasmática de corticosterona, que é um dos hormônios mais importantes para determinação do índice de estresse e foi observado que o grupo imobilizado apresentou no 1º e 2º dia de imobilização, uma elevação média de 177% na concentração plasmática se comparado ao controle, no 3º dia a concentração apresenta diminuição de 38% se comparado ao 1º de imobilização, 22% no 4º dia de imobilização e ainda permanecia 16,4% maior do que o controle no 5º dia. Acompanhando a elevação na concentração plasmática do glicocorticoide o conteúdo de ácido ascórbico da supra-renal foi reduzido em 43,4% após 5 dias de imobilização quando o conteúdo passou de  $3,45 \pm 0,1$  mg/mg no grupo controle para  $1,95 \pm 0,1$  mg/mg no grupo imobilizado ( $P < 0,05$ ). Este dado indica elevação na atividade do eixo-hipotálamo-hipófise-adrenal que podem constituir-se em medidas objetivas de ansiedade e medo, uma vez que, estes hormônios modulam o comportamento emocional (GRAEFF et al., 1997; TREIT, MENARD, ROYAN, 1993). Neste sentido, nossos resultados são expressivos, pois revela que ratos imobilizados expostos ao LCE, apresentam elevação na concentração plasmática de corticosterona similar a aqueles expostos uma única vez, indicando que se trata de uma alteração no estado emocional do animal, mais do que a simples habituação (FILE, 1992). Uma vez que, os índices de estresse apresentaram-se alterados durante os dias de imobilização passamos a avaliar a concentração plasmática de glicose e não verificamos diferença significativa se compararmos ao grupo controle. Na seqüência experimental passamos a avaliar o comportamento dos ratos submetidos ao (LCE), e verificamos que o grupo I apresentou redução de 135% na porcentagem de tempo de permanência no braço aberto, efeito também observado ao se analisar a % de entrada no braço aberto onde à redução atingiu 66,6% ( $P < 0,05$ ). Por sua vez, ao analisarmos o efeito da imobilização sobre o número de entradas no braço fechado observou-se que houve elevação de 34,5% ( $P < 0,05$ ) acompanhado de elevação de 45% ( $P < 0,05$ ) na avaliação de risco. Cabe salientar que não houve diferença nas idas ao final do braço aberto. Uma possível explicação para este comportamento pode ser fundamentada no componente cognitivo das emoções, que nas suas relações neurofisiológicas com os núcleos da base, corpo mamilar, hipotálamo, córtex pré-frontal e o sistema septo-hipocampal que elaboram as manifestações neurovegetativas e endócrinas e geram inibição comportamental, estado identificado como ansiedade (KAPCZINSKI et al., 2004). Finalmente temos que considerar que os ratos imobilizados manifestaram redução na porcentagem de tempo nos braços abertos e na entrada nestes braços indicando ansiedade fatores que acompanharam elevação no número de entradas no braço fechado e na avaliação de risco. Estes dados refletem dois sistemas neurais que medeiam à reação dos animais: o sistema cerebral de defesa, acionado em situações de conflito ou de perigo iminente e o sistema de inibição comportamental (GRAEFF, 1994). O sistema cerebral de defesa é representado pelo hipotálamo medial, pela matéria cinzenta periaquedutal dorsal e pela amígdala. Nele processam-se os mecanismos associados à resposta incondicionada. Há evidências, por exemplo, que na amígdala os sinais de perigo se tornam efetivos e são avaliados quanto ao grau de ameaça que representam para o organismo. Esse conjunto de respostas descrito caracteriza uma reação de defesa que normalmente acompanha os eventos aversivos característicos de medo e ansiedade.

## 5. Considerações Finais

Os resultados sugerem à existência de alterações fisiológicas e comportamentais ligadas a imobilização neuromuscular. Estas alterações são caracterizadas pela redução na atividade exploratória e desenvolvimento de ansiedade, fatos que podem acompanhar a limitação imposta pela imobilização e devem fazer parte dos padrões de análise de estudos que avaliam respostas induzidas pelo desuso.

### REFERÊNCIAS

#### BIBLIOGRÁFICAS

- Cruz, A. P. M., Graeff, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 49, 171-176, 1994.
- File, S. E. . Behavioural detection of anxiolytic action. In J. M. Elliott, D. J. Heal, & C. A. Marsden (Orgs.), *Experimental approaches to anxiety and depression* (pp. 25-44). Nova York: Wiley,1992.
- GRAEFF FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Braz J. Med. Biol. Res.** 27(4): 811-829,1994.
- GRAEFF FG, VIANA MB, MORA PO. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neurosci. Biobehav. Res.** 21(6):791-799, 1997.
- MCDUGALL, J. D.; ELDER, G. C. B.; SALE, D. C.; MOROZ, J. R. & SUTTON, J. R. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibers. **Eur. J. Appl. Physiol**, 43: 25-34, 1980.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., Briley, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 14, 149-167,1985.
- SCHIMITT U, HIEMKE C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. **Pharmacol Biochem, Behav.** 59 (4): 807-811,1998.
- Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 39: 979-85, 2006.
- Treit, D., Menard, J., Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 44: 463-469,1993.
- THRANE PS, MAEHLEN J, STOLTENBERG L, BRANDTZAEG P. Retrograde axonal cytokine transport; a pathway for immunostimulation in the brain inducing hypoxia and sudden infant death. **Med. Hypotheses.** 44 (2): 81-84, 1996.
- Willner P. Animal models of depression: an overview. **Pharmacol Ther.** 45(3): 425-55,1990.
- ZANGROSSI H, FILE SE. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. **Brain Res. Bull.** 29 (3-4): 1289-1292, 1992.