UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

“Efeitos do trauma sub-aquático e da estimulação tátil na resposta de exploração do labirinto em cruz elevado em ratos desnutridos”.

ALICIA CABRAL

Pró-forma apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Psicobiologia.

Ribeirão Preto - SP
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

“Efeitos do trauma sub-aquático e da estimulação tátil na resposta de exploração do labirinto em cruz elevado em ratos desnutridos”.

ALICIA CABRAL

Orientador: Prof. Dr. SEBASTIÃO DE SOUSA ALMEIDA

Pró-forma apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Psicobiologia.

Ribeirão Preto - SP
2003

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO

1.1. Desnutrição.....	1
1.2. Alterações comportamentais em animais desnutridos.....	6
1.3. Ansiedade.....	10
1.4. Desnutrição e Ansiedade.....	12
1.5. Modelos animais da ansiedade.....	13
1.6. Labirinto em cruz elevado (LCE).....	17
1.7. Estimulação tátil.....	19
1.8. Trauma sub-aquático e estresse.....	20

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais.....	24
3.2. Composição das ninhadas.....	24
3.3. Alojamento.....	24
3.4. Grupos de animais.....	25
3.5. Manutenção dos animais.....	25
3.6. Composição das dietas.....	26
3.7. Equipamentos.....	27
3.8. Procedimentos.....	28
3.9. Análise etológica.....	30
3.10. Tratamento estatístico.....	32

IV. RESULTADOS

4.1. Pesos corporais	
4.1.1. Peso corporal das ratas-mães.....	33
4.1.2. Peso corporal dos filhotes.....	34
4.1.3. Peso corporal dos animais adultos.....	35

4.2.	Resultados comportamentais no LCE	
4.2.1	Entradas nos braços fechados do LCE.....	37
4.2.2	Entradas nos braços abertos do LCE.....	40
4.2.3	Tempo de permanência nos braços abertos.....	42
4.2.4	Latência de primeira entrada nos braços abertos no LCE.....	44
4.2.5	Frequência de chegada ao fim dos braços abertos.....	47
4.2.6	Levantamentos.....	50
4.2.7	Mergulhos.....	53
4.2.8	Tentativa de entrada nos braços abertos.....	57
V.	DISCUSSÃO.....	60
VI.	CONCLUSÕES	
6.1	Conclusão geral.....	69
6.2	Conclusões específicas.....	69
VII.	RESUMO.....	70
VIII.	ABSTRACT.....	71
IX.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

INTRODUÇÃO

1.1. Desnutrição

A nutrição é uma necessidade básica e essencial a todo o organismo vivo. A desnutrição protéico-calórica ou a deficiência na ingestão de alguns nutrientes é um dos mais graves problemas mundiais, atingindo em maior ou menor grau tanto países desenvolvidos como os em desenvolvimento. Entretanto, a desnutrição não deve ser atribuída apenas à insuficiência alimentar, uma vez que sua etiologia é agravada por diversos fatores ambientais, sócio-econômicos e culturais.

As deficiências nutricionais são causadas principalmente pela ingestão de alimentos em quantidades insuficientes para o organismo. Ocorre também pela carência de nutrientes essenciais ou por deficiências fisiológicas: nos processos de dissociação dos componentes nutricionais, no processo de absorção ou na utilização do alimento pelos tecidos.

Nas pesquisas sobre os efeitos da desnutrição em animais, a deficiência protéica tem tido preferência com relação a outros componentes, visto que dentre estes nutrientes, os aminoácidos são essenciais para a síntese de proteínas estruturais, enzimas, neuropeptídeos e neurotransmissores. As proteínas desempenham um papel fundamental na estrutura e no funcionamento do sistema nervoso central (TONKISS e cols., 1993), especialmente na fase de crescimento, e são imprescindíveis na formação e recuperação dos tecidos e suas funções. Por este motivo, em grande parte dos estudos relacionados à desnutrição experimental, as proporções de nutrientes são mantidas constantes e se reduz somente a concentração de proteína do grupo desnutrido provocando uma desnutrição protéica – caso haja a complementação do valor calórico na dieta - ou protéico-calórica.

As alterações, assim como a reversão dos efeitos causados pela desnutrição, depende de vários aspectos: (1) o tipo do componente nutricional deficiente –

relacionado à natureza da deficiência, podendo ser protéica, calórica, vitamínica, de minerais ou ainda, a combinação de mais de um destes componentes, (2) os níveis de restrição protéica na dieta, (3) a gravidade, referindo-se ao grau de desnutrição, (4) a fase de introdução do insulto alimentar – no período pré-natal, nos períodos de lactação e/ou pós-lactação, (5) a duração do insulto nutricional (a desnutrição pode ocorrer cronicamente, no período gestacional ou ainda, ser esporádica – carência nutricional por um curto espaço de tempo e (6) sua interação com os fatores ambientais e genéticos (AHMAD e RAHMAN, 1975; MORGANE e cols., 1992). Quando a desnutrição imposta é grave, são múltiplos seus efeitos sobre o organismo, que aparecem no comportamento somático, no crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), no metabolismo, no funcionamento dos órgãos e no comportamento (BROZECK, 1979).

O período de introdução da desnutrição também determina o impacto que esta causará sobre o cérebro e o comportamento. O estado nutricional do organismo é de grande relevância para a síntese de inúmeros compostos que o cérebro necessita para funcionar adequadamente. Dada a importância deste órgão, ele é preferencialmente protegido em relação aos outros órgãos quando existe algum tipo de carência nutricional. Entretanto, a maneira como este processo se dá em termos funcionais ainda é desconhecida, devido à complexidade dos fatores envolvidos (YOUNG, 1985).

O desenvolvimento fetal e o início da infância são períodos de rápida divisão e crescimento celular, respectivamente. A deficiência nutricional durante estas fases causa distúrbios no processo de desenvolvimento e pode ocasionar alterações permanentes no organismo. Segundo Ahmad e Rahman, 1975, o período de lactação parece ser o mais crítico para o desenvolvimento do SNC de ratos, visto

que o crescimento e a maturação do cérebro são afetados quando a quantidade de proteína na dieta é diminuída. Foi descrito ainda que um prolongado período de reabilitação nutricional em ratos, após a fase de desnutrição, não foi suficiente para corrigir o déficit no desenvolvimento cerebral (ROCINHOLI e cols., 1997). Alguns experimentos realizados com animais revelam que quanto mais prolongado e precoce for o insulto nutricional, mais graves serão seus efeitos no desenvolvimento cerebral (DOBBINGS e WIDDOWSON, 1965; DICKERSON e WALMSLEY, 1967).

O cérebro recebe, processa e armazena informações recebidas do ambiente, sendo responsável pela elaboração de comportamentos voltados para a sobrevivência do organismo em seu meio. Desta forma, o comportamento provém da interação do SNC e do ambiente. Por ser extremamente sensível a alterações ambientais – de ordem biológica, fisiológica ou comportamental – o cérebro desenvolve respostas frente a tais alterações que, quando perduram por longos períodos de tempo, são descritas como adaptativas. A ausência de um nutriente essencial na dieta, dentro deste contexto, passa a ser considerada uma alteração duradoura, podendo influenciar o desenvolvimento do SNC como um todo.

Quando a desnutrição é imposta em períodos críticos em que o cérebro está se desenvolvendo rapidamente, graves alterações estruturais, neuroquímicas e funcionais são ocasionadas no SNC, ou seja, quando a desnutrição é imposta durante a vida neonatal, causa prejuízos mais intensos que quando imposta na vida adulta (WINICK e NOBLE, 1966).

A fase de maior vulnerabilidade do cérebro às perturbações ambientais acontece durante o seu período de crescimento acelerado (DOBBING, 1968), que no rato, este período compreende as três primeiras semanas de vida pós-natal (MORGANE e cols., 1992). Este crescimento corresponde a um aumento no peso

cerebral de um modo particularmente rápido. Nesta fase, cada região está passando por um processo de desenvolvimento, bem como interagindo com as outras regiões que também estão em crescimento. Dessa forma, parece lógico que as estruturas que se desenvolvem após o nascimento destes animais – tais como encéfalo, hipocampo e cerebelo, sejam as estruturas mais susceptíveis às alterações permanentes causadas pela desnutrição.

Existem, no entanto, algumas divergências em relação ao período de máxima vulnerabilidade cerebral frente à desnutrição precoce.

Algumas investigações demonstram que a maior vulnerabilidade está presente quando ocorre a organização de neurônios específicos durante a ontogênese. A desnutrição limitada ao período pré-natal é suficiente para produzir alterações permanentes tanto na estrutura cerebral como no comportamento de ratos (MORGANE e cols., 1993). Estas alterações, porém, são menos acentuadas que aquelas produzidas pela desnutrição pós-natal (SMART e cols., 1973; AUSTIN e cols., 1992).

Deve-se ressaltar que a hipótese do período de crescimento crítico ou vulnerável do cérebro, proposto por Dobbing em 1968, foi baseada apenas em medidas de peso cerebral total. Dados mais recentes apontam para ‘picos’ distintos de neurogênese para cada uma das estruturas cerebrais, de modo que o cérebro estaria vulnerável ao insulto durante todo o seu desenvolvimento (MORGANE e cols., 1992).

Ao se avaliar os resultados de estudos que envolvem variáveis nutricionais, deve-se considerar o período da vida do animal que o insulto nutricional foi introduzido e o modelo de desnutrição empregado. O mais freqüentemente utilizado é imposto durante a fase de lactação, quando a maior parte das estruturas cerebrais

está em fase de crescimento e desenvolvimento, portanto, mais vulneráveis (MOREIRA, 1996).

Dentre os modelos de desnutrição experimental, que envolvem o período de lactação, os mais comumente utilizados são: restrição na oferta de um ou mais nutrientes da dieta oferecida à rata-mãe; uso de grandes ninhadas, provocando competição pelos mamilos e menor ingestão de leite por alguns filhotes; a mamectomização das ratas-mães; a substituição da mãe por uma 'rata-tia' (rata virgem sensibilizada); ou ainda, impedindo o contato da mãe com o filhote, tornando ainda mais graves os efeitos da desnutrição neste período.

Todas estas técnicas reduzem o suprimento de leite para os filhotes (DENENBERG e cols., 1969). No entanto, no modelo de restrição de dieta oferecida às ratas-mães durante o período de lactação, a quantidade de nutrientes presente no leite materno também está reduzida (PASSOS e cols., 2000), esclarecendo que não somente a quantidade, mas também a qualidade do leite fica prejudicada neste modelo.

A desnutrição protéica ou protéico-calórica, quando imposta no início da vida, produz uma série de alterações no sistema de neurotransmissão, além de alterações neuroanatômicas e/ou neuroquímicas no cérebro, tanto de animais de laboratório quanto em seres humanos (MORGANE, 1978).

Sob o ponto de vista estrutural, um dos efeitos mais marcantes da desnutrição precoce são os baixos pesos corporal e cerebral (MORGANE, 1978; DE OLIVEIRA e ALMEIDA, 1985; DOBBING, 1987), efeitos que persistem mesmo após longos períodos de recuperação nutricional. Além disso, tem-se demonstrado diminuição no número e no tamanho total de células cerebrais (DOBBING, 1971), embora seja difícil afirmar quais células estão alteradas, considerando a complexidade de se

distinguir células gliais de neurônios através das medidas clássicas. Alguns estudos sugerem que o SNC é preferencialmente protegido dos efeitos prejudiciais da desnutrição, ou seja, nos modelos de desnutrição pré-natal, no período de lactação e/ou pós-natal, o peso corporal total do organismo parece sofrer maiores prejuízos do que o peso cerebral (DOBBING, 1968; SANDS, 1971).

1.2. Alterações comportamentais em animais desnutridos

O comportamento provém da interação entre determinações do SNC e do ambiente; com isso, merece destaque a consistência dos dados evidenciando que a desnutrição precoce também provoca alterações no comportamento animal: ratos desnutridos apresentaram alterações motivacionais e um aumento na latência de esquiva passiva, além de freqüentemente serem hiper-reativos a situações de natureza aversiva e apresentarem diminuição da latência da resposta para estímulos aversivos dolorosos (LYNCH, 1976; SMART e cols., 1975).

Levitsky e Barnes, em 1970, interpretaram a maior sensibilidade de animais desnutridos a situações aversivas como aumento da emocionalidade destes animais e mostraram a hiper-reatividade dos desnutridos aos estímulos de natureza aversiva no teste do campo aberto. Neste trabalho, os desnutridos apresentaram maior porcentagem na redução da atividade locomotora após introdução de um som alto, além de apresentarem maiores níveis de micção e defecação, resultados interpretados como aumento da emocionalidade decorrente da desnutrição protéica precoce.

Assim sendo, é relevante destacar a consistência de dados que evidenciam a hiper-reatividade a situações de natureza aversiva e as alterações motivacionais entre os animais desnutridos. Modelos que associam desnutrição a modelos

aversivos/dolorosos – como os que utilizam choque elétrico ou privação de água ou alimento – podem gerar uma série de complicações na interpretação dos processos de ansiedade, aprendizagem e memória. Neste sentido, torna-se cada vez mais freqüente na literatura da área de nutrição e comportamento o uso de modelos animais que utilizam estímulos aversivos não dolorosos e que não dependam da privação alimentar ou do treino comportamental prolongado (ALMEIDA e cols., 1990; BRIONI e ORSINGHER, 1988). Além disso, a maioria destes modelos permite o uso de metodologias farmacológicas em que o pesquisador pode fazer uso de drogas de conhecidos mecanismos de ação, como uma ferramenta útil para investigar até que ponto as alterações de ordem neuroquímica produzidas pela desnutrição precoce estão associadas com a gênese das alterações funcionais encontradas nestes animais.

Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório sugerem que ratos desnutridos podem exibir uma maior impulsividade, ou uma menor ansiedade, frente a situações aversivas em modelos naturalistas (ALMEIDA e cols., 1992). Desta forma, torna-se cada vez mais freqüente na literatura da área de nutrição e comportamento o uso de modelos animais que utilizam estímulos aversivos ‘naturais’ e que não dependam da privação alimentar ou de treino comportamental prolongado (ALMEIDA e cols., 1991).

Inúmeras evidências mostram que as alterações estruturais e neuroquímicas do SNC não são suficientes para explicar as alterações comportamentais causadas pela desnutrição. Estudos sobre a interação mãe-filhote revelaram que os filhotes de mães desnutridas passam muito mais tempo no ninho amamentando-se, demonstrando que para satisfazer as necessidades básicas de alimento, apresentam restrição das manifestações comportamentais no ambiente, como, por

exemplo, explorar as vizinhanças do ninho (LEVITSKY e cols., 1975; RIUL e cols., 1999). Estes comportamentos foram observados em estudos que utilizaram modelos de desnutrição protéica e protéico-calórica, havendo divergências quando comparados com modelos de grandes ninhadas e separação temporária, por exemplo.

A hipótese do isolamento funcional se baseia no princípio de que a desnutrição determina uma forma de se comportar incompatível com a incorporação de informação ambiental necessária para um desenvolvimento cognitivo adequado.

A consequência imediata seria uma mudança adaptativa, uma reprogramação das manifestações comportamentais, no sentido de sobreviver à desnutrição, direcionando a atenção para necessidades básicas – como procura de alimento ou cuidados maternos. Uma primeira consequência desta adaptação, por envolver um processo de priorização de gasto de energia, seria uma redução na atividade motora básica, que apesar de posteriormente reestabelecida, causa alteração na atividade exploratória.

Animais previamente desnutridos apresentam menor latência de fuga e esquia em procedimentos operantes de esquia ativa, aprendem mais rapidamente a se esquivar de estímulos aversivos dolorosos (DE OLIVEIRA e ALMEIDA, 1985) e apresentam maiores latências no procedimento de esquia passiva (LYNCH, 1976).

Animais desnutridos, após recuperação nutricional, apresentam aumento da atividade exploratória nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, tanto após desnutrição protéica pré-natal (ALMEIDA e cols., 1996b) como desnutrição protéica precoce e protéico-calórica pós-natal (ALMEIDA e cols., 1991; SANTUCCI e cols., 1994). Animais desnutridos apresentam também menores latências em modelos etológicos de esquia inibitória como o teste do labirinto em T elevado (ALMEIDA e

cols., 1996b) e menor frequência de transição no teste claro-escuro (BRIONI e ORSINGHER, 1988), quando comparados aos animais controle. Esse aumento de exploração tem sido interpretado como menor ansiedade e/ou maior impulsividade dos animais desnutridos nestes testes comportamentais.

Alguns trabalhos avaliam os efeitos durante o processo de desnutrição, ao invés de avaliar o período de pós-recuperação nutricional, como na grande maioria dos estudos. Riul e colaboradores, em 1998, descreveram que ratos desnutridos apresentam maior exploração nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, quando comparados aos controle, testados aos 22 e aos 35 dias de idade.

Em 1990, Tonkiss e colaboradores observaram dificuldade nos animais desnutridos e recuperados, testados a partir dos 160 dias de idade, em aprender a responder em *Differential Reinforcement of Low Rates* (DRL) após reforçamento contínuo. Contudo, estes animais adquiriram a habilidade de responder em baixa taxa para obter o reforço. Ao se comparar o desempenho final dos animais, verificou-se que não houve diferença entre desnutridos e controle. Desta forma, parece mais difícil para estes animais mudar a estratégia comportamental anteriormente adquirida do que aprender a responder em um esquema de DRL.

Esta dificuldade, nos animais desnutridos recuperados, pode não prejudicar a aprendizagem em si, mas incapacita estes animais de extinguir uma estratégia comportamental anteriormente aprendida (TONKISS e cols., 1993). Isto pode estar relacionado a uma maior resistência à extinção, rigidez comportamental característica dos desnutridos; ou ainda à maior impulsividade destes animais quando comparados aos bem nutridos em uma situação de teste – o que impede estes animais de responderem em baixas taxas.

1.3. Ansiedade

A ansiedade pode ser entendida como um estado emocional resultante de sentimentos de apreensão, incerteza e medo, freqüentemente experimentados pela espécie humana e por outros mamíferos (DARWIN, 1872). É um estado emocional desagradável com as qualidades subjetivas do medo, apreensão, temor e sentimentos correlatos (LADER, 1981). Pode vir acompanhado por diversas manifestações do estresse, insegurança e um conjunto de alterações comportamentais, psicológicas e fisiológicas – como taquicardia, sudorese, hiperventilação, aumento da tensão muscular, inquietude e alerta (NUTT, 1990). É uma emoção causada principalmente pela expectativa de um perigo eminente ou indefinido, porém sem que uma ameaça real seja identificada ou, quando presente, é considerada pelos demais como desproporcional à intensidade da emoção (LADER, 1981).

Apesar das tentativas de definir a ansiedade normal ou patológica, um limite bem definido entre ambas é difícil de ser estabelecido. Quando manifestada em níveis adequados e normais, a ansiedade envolve a ativação e a mobilização do organismo e cumpre um papel funcional na interação do indivíduo com o meio ambiente, ajustando e até otimizando seus recursos frente a diversas exigências ambientais. Neste contexto, a ansiedade é vista como um fenômeno que possui claro valor adaptativo do animal com seu meio, assim, um certo grau de ansiedade é necessário para motivar um bom desempenho do organismo (GRAEFF, 1993). No entanto, quando a ansiedade se torna excessiva e passa a prejudicar o desempenho do indivíduo, pode ser considerada patológica (GRAEFF, 1989; DRACUT e LADER, 1993).

Podem aparecer, conjuntamente, algumas manifestações somáticas, tais como dor precordial – na região adiante do coração, dificuldade de respiração, tremor, taquicardia, aumento da sudorese; bem como sintomas de cunho psicológico, tais como hipervigilância, dificuldades de concentração, de conciliação do sono e sentimentos de apreensão e angústia.

Embora seja difícil delimitar uma fronteira entre os níveis ‘normais’ e ‘patológicos’ de ansiedade (MARKS e LADER, 1973), quando esta atinge caráter desagradável muito intenso e passa a ser motivo de sofrimento, se faz necessária uma intervenção terapêutica que visa restabelecer o ‘equilíbrio’ de ordem psíquica, assim como das alterações neuro-vegetativas e neuro-endócrinas que possam acompanhar este estado emocional. Quando a ansiedade patológica é decorrente de outras doenças, de natureza psiquiátrica ou não, tem-se um quadro de ansiedade secundária. Porém, se consiste na manifestação única do quadro clínico é denominada, então, de ansiedade primária.

Um outro aspecto relevante diz respeito à distinção entre ansiedade-estado e ansiedade-traço. A primeira refere-se à ansiedade vivenciada em um momento particular, ou seja, circunstancial quando na presença de um estímulo ansiogênico. Uma vez retirado este estímulo, o indivíduo volta ao estado anterior, considerado normal fisiologicamente. A ansiedade-traço, ao contrário, não ocorre esporádica, e sim continuamente, como uma característica inerente ao indivíduo (LISTER, 1990).

A ansiedade pode ser observada clinicamente sob várias formas e aspectos, e quanto mais preciso for o diagnóstico clínico, maiores as chances de sucesso terapêutico. Segundo o DSM-IV (*Diagnostic Statistical Manual-IV*), elaborado pela Associação Americana de Psiquiatria, a ansiedade está classificada em diversos grupos como distúrbio do pânico, agorafobia, distúrbio do pânico com agorafobia,

fobia específica, fobia social, distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbio do estresse pós-traumático, distúrbio da ansiedade generalizada, distúrbio da ansiedade devido a uma condição médica geral, distúrbio de ansiedade induzida por substâncias e distúrbio de ansiedade não especificada. Essas diferentes formas de ansiedade respondem a diferentes tratamentos farmacológicos e diferentes abordagens terapêuticas.

Muito do conhecimento a respeito dos substratos neuroanatômicos da ansiedade tem sido obtido através de observações experimentais, utilizando-se de modelos animais desenvolvidos para tal propósito.

1.4. Desnutrição e Ansiedade

Como descrito anteriormente, ratos desnutridos podem exibir maior impulsividade ou menor ansiedade frente a situações aversivas em modelos naturalistas (ALMEIDA e cols., 1992). No teste do labirinto em cruz elevado (LCE), que apresenta a vantagem do conflito ser gerado entre a exploração de um novo ambiente e a esquia de áreas abertas, animais desnutridos precocemente mostraram maior exploração das áreas abertas quando comparados aos animais controle (ALMEIDA e cols., 1996b). Um padrão semelhante de resposta também pode ser observado no teste claro-escuro, no qual ratos desnutridos no período pré ou pós-natal realizam mais transições entre os compartimentos quando comparados aos ratos controle (BRIONI e ORSINGHER, 1988).

Com relação à atividade exploratória de animais desnutridos, alguns dados da literatura são conflitantes. Alguns autores mostram aumento (WHATSON e cols., 1976), outros, redução da exploração (ZIMMERMAN e ZIMMERMAN, 1972). Almeida e colaboradores, em 1992, relataram que os animais desnutridos apresentaram maior dificuldade para se habituarem a situações novas em testes

realizados no campo aberto e Barnes e colaboradores (1976), observaram menor exploração de objetos novos em animais desnutridos no labirinto aquático em “Y”. Em 1974, Smart e colaboradores descreveram ausência de diferenças na atividade exploratória entre os grupos controle e desnutridos. Tais evidências mostram que as divergências podem estar relacionadas com o padrão do insulto nutricional, com o momento no qual a desnutrição foi imposta e com o tipo de desnutrição utilizada, variáveis que, em conjunto ou isoladamente, podem influenciar a avaliação dos resultados obtidos pelos diferentes grupos de pesquisa.

1.5. Modelos animais de ansiedade

A utilização de modelos animais de ansiedade tem se tornado cada vez mais necessária na compreensão dos mecanismos de diversos transtornos psiquiátricos. A justificativa para a utilização de modelos de ansiedade em estudos animais encontra fundamento quando, partindo de uma perspectiva evolutiva, considera-se que as raízes da ansiedade e do medo humano encontram uma analogia nas reações de defesa que os animais exibem frente a estímulos ou situações de perigo (GRAEFF, 1990).

Frente a uma ameaça ao seu bem-estar, à sua integridade física ou à própria sobrevivência, o animal exibe um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Em circunstâncias onde o perigo é apenas potencial, havendo um componente de incerteza, tem-se a ansiedade.

Estudos experimentais com animais de laboratório permitem um controle das variáveis encontradas em estudos com humanos. A análise dos resultados destes experimentos laboratoriais auxilia na proposição de explicações teóricas sobre esta complicada interação entre desnutrição-ambiente-comportamento. Na grande

maioria das vezes, a ansiedade nos diversos modelos é inferida a partir da análise das respostas comportamentais de diferentes espécies, em geral roedores, frente a estímulos aversivos que representam perigo ou ameaça.

As tentativas de correlacionar o comportamento dos animais nos testes experimentais, com os níveis de diferentes indicadores fisiológicos e neuroquímicos das reações de medo e ansiedade, são cada vez mais freqüentes. Estes estudos permitem ampliar conhecimentos sobre as bases neuro-humorais envolvidas na expressão destas emoções e fortalecem as interpretações da viabilidade dos diferentes modelos experimentais para a ansiedade humana (ZANGROSSI, 1997).

Referindo-se à ansiedade e aos transtornos comportamentais, muitos experimentos têm sido relatados na tentativa de se reverter este estado através de estímulos externos (LEVINE e cols., 1967).

Um modelo animal de psicopatologia deve satisfazer alguns critérios, tais como o de previsibilidade de resposta farmacológica, de semelhança ou analogia, e de validade teórica ou homologia (TREIT, 1985; LISTER, 1990). A previsibilidade é obtida através das correções observadas pela administração de uma mesma droga, tanto em pacientes como em animais de laboratório, permitindo a elaboração de comparações entre os efeitos clínicos e as alterações comportamentais verificadas nos diferentes modelos animais de ansiedade. A analogia diz respeito ao grau de similaridade entre a ansiedade humana e o comportamento definido operacionalmente como ansiedade no modelo animal. Por fim, a homologia pressupõe que os mesmos processos psicobiológicos relacionados com a etiologia e a fisiopatologia dos sintomas clínicos atuem também no modelo experimental (WILLNER, 1984).

As manifestações comportamentais relacionadas com alguns aspectos da ansiedade podem ser encontradas nos animais sob diversas formas, avaliadas através da utilização de dois tipos de modelos: os baseados em aprendizagem associativa e os baseados em medos inatos, também chamados de etologicamente fundamentados.

Os modelos animais de ansiedade que envolvem processo de aprendizagem associativa são fundamentados no condicionamento clássico e/ou operante do medo.

Pelo condicionamento clássico, estímulos originalmente neutros como sons de baixa intensidade e luzes, quando associados a estímulos aversivos - incondicionados, como choques elétricos e sons intensos, podem desencadear respostas de medo/ansiedade - resposta condicionada. Neste sentido, estes estímulos neutros passariam a desencadear respostas de medo/ansiedade por antecipar para o animal uma situação aversiva. Já pelo condicionamento operante, os animais aprendem determinadas estratégias ou tarefas a fim de diminuir ou suprimir as consequências negativas associadas com a apresentação de estímulos aversivos.

Quando a resposta do animal é seguida da apresentação do estímulo aversivo resultando na diminuição da expressão deste comportamento no futuro, tem-se caracterizada uma situação de punição. Caso as respostas sejam seguidas pela retirada do estímulo aversivo tem-se a fuga, e quando são seguidas pela evitação da apresentação do estímulo aversivo tem-se a esquiva (MILLENSON, 1975).

Entre os principais modelos de aprendizagem associativa estão: a resposta de sobressalto intensificada pelo medo, o teste de conflito do beber punido (teste de Vogel) e o teste de pressão à barra (teste de Geller-Seifter). Os modelos

etologicamente fundamentados utilizam estímulos que desencadeiam respostas incondicionadas de medo, em diferentes espécies animais, frente a situações e/ou estímulos naturalmente aversivos – lugares novos e/ou intensamente iluminados, a presença de co-específicos e o confronto com predadores.

Estes modelos oferecem várias vantagens sobre os modelos de punição por não empregarem estímulos nocivos, como choques elétricos, privação de água ou alimentos, que geram estados motivacionais – dor, sede e fome – que podem interferir no comportamento do animal e assim, obscurecer as análises da ansiedade (ZANGROSSI, 1997). Além disso, não requisitam o treino ou a modelagem do comportamento do animal, tendo, portanto, um grau mais elevado de validade etológica. Outra vantagem destes modelos é que apresentam baixo custo operacional.

Entre os principais modelos etologicamente fundamentados estão a transição claro-escuro, a interação social, a interação presa-predador, o labirinto em cruz elevado (LCE), labirinto em T elevado (LTE) e a plataforma circular coberta elevada (PCCE). Com o avanço das pesquisas que utilizam animais, discute-se se estes modelos são capazes de avaliar os diferentes transtornos de ansiedade hoje conhecidos. Inúmeras evidências começam a ser acumuladas indicando que a ansiedade verificada em determinado modelo pode diferir daquela gerada em outros modelos experimentais, seja quanto à natureza – inata ou aprendida – à susceptibilidade ao efeito de drogas e/ou manipulações ambientais, ou ao seu substrato neuroanatômico (HERNANDES, 2000).

Vale ressaltar que a atual divisão dos distúrbios da ansiedade dentro dos diversos subtipos é ainda controversa, mas a aparente heterogeneidade destes

distúrbios certamente precisa ser considerada na discussão dos modelos animais de ansiedade.

1.6. Labirinto em cruz elevado (LCE)

Dentre vários modelos utilizados no estudo experimental da ansiedade, o labirinto em cruz elevado (LCE) merece destaque por possuir vantagens quando relacionado a outros modelos que utilizam procedimentos operantes básicos, como estímulos aversivos dolorosos, privação alimentar ou mesmo treino prolongado. É o modelo animal mais utilizado nos testes com drogas ansiolíticas, no estudo sobre o mecanismo de ação de drogas e na investigação dos substratos neurais da ansiedade. Por este motivo tornou-se clássico nestes estudos comportamentais, baseando-se na premissa de que espaços abertos e elevados geram estado de medo em roedores.

O LCE teve sua origem a partir de estudos feitos por Montgomery (1955), que primeiramente utilizava um labirinto elevado em “Y”, cuja disposição possibilitava variação da proporção de braços abertos em relação aos braços fechados - envolvidos por paredes laterais. Posteriormente desenvolvido por Handley e Mithami (1984), o LCE foi validado farmacológica, fisiológica e comportamentalmente como modelo animal de ansiedade por Pellow e colaboradores em 1985. Estes autores demonstraram que a exposição aos braços abertos do labirinto produzia mais comportamentos relacionados à ansiedade que a exposição aos braços fechados – pelo constante congelamento e defecação e pelas elevadas concentrações de corticosterona plasmática – mostrando evidências nos padrões típicos de defesa desta espécie durante a exposição ao labirinto.

O LCE é um equipamento de custo acessível, que pode ser utilizado para o estudo da ansiedade, aprendizagem e memória em animais desnutridos, além de dispensar a necessidade de treinos prolongados. Este labirinto apresenta a vantagem do conflito ser gerado entre a exploração de um novo ambiente e a esquivas de áreas abertas, que podem levar tanto ao impulso de exploração como ao impulso de medo. Além disso, baseia-se na exploração natural do animal, sem a utilização inconveniente de estímulos aversivos ou dolorosos - uma vez que os animais submetidos à desnutrição são mais sensíveis a estes procedimentos - ou manipulações comportamentais de apetite (MONTGOMERY, 1958).

O labirinto em cruz elevado (LCE) é composto por dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços fechados, elevados a cinquenta centímetros do piso. Atribui-se a preferência do rato pelos braços fechados à diferença na extensão com que cada um dos braços leva o animal a impulsos de medo e de exploração ao mesmo tempo, gerando assim, conflito de aproximação-evitação (RODGERS e COLE, 1994).

Os aspectos dos braços abertos que levam o animal a passar pela experiência da situação de conflito são a aversão inata do animal a lugares abertos e iluminados, à altura e à impossibilidade do animal realizar a tigmotaxia – principal causa do medo observado nos braços abertos (TREIT e cols., 1993).

Almeida e colaboradores (1991) demonstraram que animais desnutridos no período de lactação e pós-lactação apresentaram consistentes comportamentos com uma menor ansiedade quando submetidos ao modelo do LCE.

Animais expostos precocemente à dieta hipoprotéica – no período pré-natal, mostraram um maior número de entradas nos braços abertos e uma maior exploração nas áreas abertas, comparados ao grupo controle, indicando que os

animais desnutridos apresentaram um menor nível de ansiedade em comparação com os controle (ALMEIDA e cols., 1996a).

1.7. Estimulação tátil

Referindo-se à ansiedade e aos transtornos comportamentais, notáveis experimentos têm sido relatados na tentativa de se reverter este estado através de estímulos externos. A estimulação tátil é uma das formas de enriquecimento ambiental utilizadas em laboratório, e consiste em segurar o animal com uma das mãos, e com a outra, passar o polegar sobre o dorso do animal. O período e a duração da estimulação difere de acordo com o modelo utilizado e geralmente esta é empregada diariamente.

Tem-se demonstrado que a estimulação produzida pela manipulação tátil diária em ratos durante a fase de lactação diminui a emocionalidade destes animais quando adultos (LEVINE e cols., 1967). Assim, a estimulação ambiental pode agir tanto no sentido de reduzir a ansiedade como de minimizar as alterações comportamentais induzidas pela desnutrição protéica precoce (LEVITSKY e BARNES, 1972).

Em estudos com restrição de proteínas na dieta, Levitsky e Barnes (1972) verificaram que a desnutrição causa alterações no cérebro, no comportamento – a longo prazo – e altera os tipos de informação que o animal desnutrido adquire em seu ambiente. Ou seja, o animal desnutrido adulto reduz as atividades exploratórias no ambiente quando submetido à estimulação tátil no início da vida.

Independentemente das condições nutricionais, tanto desnutridos quanto controle alteraram o desempenho no campo aberto, quando estimulados. Entretanto, considerando-se experimentos de restrição protéica, o efeito da estimulação foi mais

evidente nos animais bem nutridos (CINES e WINNICK, 1979; CRNIC, 1983). Muitas alterações comportamentais posteriores podem resultar destas reduções de interações com os estímulos do meio ambiente no início da vida (LEVITSKY e BARNES, 1972).

Vários outros estudos demonstraram os efeitos da estimulação ambiental sobre o SNC de ratos desnutridos. A recuperação parcial dos prejuízos causados pela desnutrição, tanto em comportamentos simples como preferências no teste claro-escuro, proporcionou melhora no desempenho no labirinto, recuperando alguns déficits cognitivos (CELEDON e cols., 1979).

A estimulação do meio externo pode ser feita pelo enriquecimento do meio ambiente, estimulação social e/ou estimulação tátil. A estimulação ambiental foi capaz de promover mudanças na estrutura e função no SNC (BARNES, 1976), produziu alterações nos parâmetros estruturais, neuroquímicos e funcionais no SNC de ratos (ROCINHOLI, 1997) e reverteu, pelo menos em parte, os prejuízos causados pela desnutrição.

Segundo Lima (1999), a estimulação – ou enriquecimento ambiental – produziu aumento no peso do cérebro, sugerindo que a estimulação externa pode ter aumentado número e tamanho das células nervosas, pelo aumento da quantidade de DNA e RNA, após o procedimento.

Este tipo de estímulo parece auxiliar, também, na recuperação de déficits comportamentais causados pela desnutrição protéica, tanto em ratos filhotes como jovens (CARUGHI, 1989).

1.8. Trauma sub-aquático e estresse

Animais submetidos à desnutrição precoce apresentaram alterações motivacionais e um aumento da latência da esQUIVA passiva. Frequentemente são

hiper-reativos a situações de natureza aversiva e apresentam diminuição da latência da resposta para estímulos aversivos dolorosos (LYNCH, 1976; SMART e cols., 1975). Richter-Levin (1998) observou que ratos traumatizados realizaram insatisfatoriamente a tarefa de memória espacial no labirinto aquático e diminuíram a quantidade de entradas nos braços abertos no LCE.

Por outro lado, o trauma sub-aquático pode estabelecer um importante e poderoso modelo para se compreender os mecanismos pertencentes à relação entre estresse, cognição e aprendizagem. Este trauma pode provocar alterações comportamentais, eletrofisiológicas e neuroquímicas semelhantes às aquelas observadas em outros modelos de estresse experimental.

São escassos os trabalhos descritos utilizando-se de um trauma curto, agudo e minutos antes do teste. A grande maioria dos estudos utiliza-se de modelos de estresse crônico, ou seja, por um período curto de tempo, mas durante vários dias consecutivos; ou aplica-se o trauma 24 horas antes do teste.

Alguns estudos utilizam a imobilização forçada do animal como procedimento ansiogênico. A imobilização por 2 horas, aplicada 30 (SMAGIN e cols., 1996) e 60 minutos (RAGHAVENDRA e cols., 1999) antes do teste afetou os comportamentos realizados, fazendo com que houvesse um aumento na latência de emergência, aumento no tempo total de permanência e também um aumento no tempo médio gasto na câmara, quando comparado aos não-imobilizados.

Através destes trabalhos observa-se que, em estudos utilizando a imobilização como trauma, este procedimento foi eficiente em diminuir a atividade locomotora de animais no teste do campo aberto e, na re-exposição ao teste (segunda sessão), ratos e camundongos demonstraram aumento da retenção da aprendizagem.

O trauma sub-aquático é um procedimento ansiogênico que consiste em submerger o animal, após colocá-lo em uma gaiola perfurada, em um recipiente com água. Este trauma é uma situação ameaçante para o animal, e como é uma experiência de estresse rápida (60 segundos), é um trauma breve, comparado com outros tipos de modelos estressantes utilizados, tal como o choque elétrico na cauda do animal ou a restrição de alimento ou de água. Além disso, diferentemente de outros modelos estressantes, o trauma sub-aquático pode, ainda, reduzir a probabilidade de indução da plasticidade sináptica do hipocampo (WANG e cols., 2000).

Mason e Stone (1953) descreveram que forçar o rato a nadar sob a água, por imersão, é uma maneira de aumentar a aversividade do animal. Estes autores demonstraram que as latências de fuga nos ratos forçados a nadar abaixo da água foram menores que quando os animais eram capazes de colocar patas e cabeça acima da superfície. Broadhurst (1957) demonstrou que o nado forçado rápido, que o animal executa em uma caixa que possibilite seus movimentos, aumenta ainda mais a privação ao ar – pela restrição do rato sob a água – por períodos superiores a oito segundos. Broadhurst afirma, ainda, que os efeitos da imersão em água sobre o comportamento são semelhantes ao do choque elétrico, tornando-se mais aversivo se a água for muito quente, muito fria, ou se o animal for forçado a permanecer sob a água.

O modelo de trauma sub-aquático foi desenvolvido por Wang, no ano de 2000, para estudar estresse e síndrome pós-estresse. E justamente para explorar este efeito, optou-se pela utilização deste método de trauma no presente trabalho.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

2.1.1. Estudar os efeitos da estimulação tátil a longo prazo e do trauma sub-aquático agudo sobre o comportamento exploratório de animais submetidos à desnutrição protéica precoce, no teste do LCE em várias sessões.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Investigar se a estimulação tátil a longo prazo afeta diferencialmente o peso corporal e o comportamento no LCE de animais controle e desnutridos.

2.2.2. Investigar se o trauma sub-aquático, aplicado anteriormente ao teste no LCE, altera diferencialmente a atividade exploratória e a ansiedade de animais controle e desnutridos.

2.2.3. Verificar se há interação entre estimulação tátil a longo prazo e trauma sub-aquático agudo e, em caso afirmativo, se esta interação depende das condições de dieta.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 100 ratos albinos, machos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.2. Composição das ninhadas

Cada ninhada, composta por uma rata-mãe e oito filhotes (seis machos e duas fêmeas), foi transportada ao biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP) no dia do nascimento.

Para a composição das ninhadas, foi feita uma escolha aleatória para que, na constituição das mesmas, não fossem incluídos apenas filhotes provenientes da mesma rata-mãe. Formadas as ninhadas, estas também foram escolhidas ao acaso para receberem as dietas contendo 6% ou 16% de proteína.

3.3. Alojamento

Durante a fase de lactação (0 aos 21 dias), as ratas-mães com suas ninhadas foram acomodadas em gaiolas de polipropileno medindo 39x32x17cm, forradas com raspas de madeira (maravalha) trocadas semanalmente, com tampas e comedouros de aço inoxidável e bebedouros de plástico. No 21º dia – início do período pós-lactação – as fêmeas e as ratas-mães foram descartadas. Os machos foram separados em gaiolas individuais, de polipropileno, medindo 28x17x13cm, permanecendo assim acomodados até o último dia de teste (77º dia).

3.4. Grupos de animais

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizados oito grupos de animais: controle não-estimulados, controle estimulados, desnutridos não-estimulados e desnutridos estimulados, descritos na Tabela 1. Cada um destes grupos foi subdividido, e os novos grupos formados foram submetidos ao trauma sub-aquático.

Tabela 1. Esquema da divisão realizada entre os grupos de animais utilizados nos testes.

3.5. Manutenção dos animais

Durante a fase de lactação (0 aos 21 dias), os animais desnutridos amamentaram-se das ratas-mães que receberam dieta contendo 6% e os animais controle amamentaram-se das ratas-mães que receberam dieta contendo 16% de proteína.

Ao término da fase de lactação, os machos foram separados em caixas individuais. A partir do 21º dia, os animais foram submetidos às mesmas dietas que suas respectivas mães receberam durante a fase de lactação (6% ou 16% de proteína), até completarem 49 dias de idade (Tabela 2).

Do 50º ao 77º dia – fase de recuperação alimentar para os grupos desnutridos – os dois grupos nutricionais receberam dieta comercial para ratos

(Tabela 2). Esta dieta substituiu a de 16% e a de 6% de proteína, servida aos animais no período de lactação e pós-lactação (0 - 49º dias). Todo o tempo em que os animais permaneceram no biotério, tiveram livre acesso a água e ao alimento.

Durante todo o período de teste, os animais permaneceram no biotério do laboratório, mantidos em temperaturas de 23 a 25°C, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, onde a luz se acendia às 6 horas da manhã.

A estimulação tátil foi realizada diariamente, entre 8 e 10 horas da manhã.

Foram feitas medidas do peso corporal dos ratos. Essas medidas tiveram início no dia 0, e foram coletadas a cada 7 dias, até os animais completarem 70 dias de idade, quando, então, foram realizados os testes no labirinto em cruz elevado (LCE).

Tabela 2. Divisão esquemática do modelo experimental utilizado, de acordo com os períodos da vida dos animais.

0-21 dias	22-49 dias	50-77 dias	71-77 dias
período de lactação	período pós-lactação	recuperação nutricional	testes (7 sessões)

3.6. Composição das dietas

As dietas foram preparadas de acordo com Almeida e colaboradores, 1994, com as misturas salina e vitamínica preparadas segundo recomendações do *American Institute of Nutrition* (REEVES e cols., 1993).

A Tabela 3 mostra as porcentagens dos componentes da dieta contendo 16%, oferecida aos animais controle, e da dieta contendo 6% de proteína, oferecida aos animais desnutridos. Ambas as condições de dieta foram suplementadas com L-metionina em 2,0g/kg de proteína, já que a caseína é deficiente neste aminoácido. Na dieta composta de 6% de proteína, a porcentagem de caseína retirada foi suplementada com carboidrato para manter as dietas isocalóricas.

Tabela 3. Proporções dos nutrientes das dietas, em porcentagem, oferecidas aos animais controle (16%) e desnutridos (6% de proteína).

Componentes	Controle	Desnutrido
Proteína (caseína)	16,0	6,0
L-metionina	0,032	0,012
Gordura (óleo de milho)	8,0	8,0
Mistura salina	5,0	5,0
Mistura vitamínica	1,0	1,0
Colina	0,2	0,2
Carboidrato (amido de milho)	69,768	79,788
Total	100 g	100 g

Proteína – Caseína (SKF, Alemanha);

L-metionina (Dyets, USA);

Gordura – Óleo de Milho (Mazola® Refinaria de Milho, Brasil);

Mistura salina (Rhoster, Indústria e Comércio Ltda., Brasil);

Mistura vitamínica (Rhoster, Indústria e Comércio Ltda., Brasil);

Colina (Rhoster, Indústria e Comércio Ltda., Brasil);

Carboidrato (Maisena® Refinarias de Milho, Brasil).

Após o 49º dia foi oferecido, tanto aos animais desnutridos quanto aos controle, ração comercial para ratos. Os animais alimentaram-se desta dieta até o último dia de teste, quando completaram 77 dias de idade.

3.7. Equipamentos

Para ocasionar o trauma, foi utilizada uma gaiola metálica, de 17x23x19cm; perfurada, que possibilitou a entrada de água no momento do mergulho. Utilizou-se também um recipiente redondo de polietileno, com capacidade para 20 litros, para a submersão da gaiola.

Após o trauma, utilizou-se o labirinto em cruz elevado (LCE), que consiste de um labirinto de madeira composto por dois braços abertos de 50x10cm e dois braços fechados lateralmente, de 50x10x40cm, com teto aberto (Figura 1). Os braços do labirinto são unidos perpendicularmente e o labirinto está elevado do piso a uma altura de 50cm.

Os testes foram registrados em câmera de vídeo, montada verticalmente sobre o labirinto, acoplada a um monitor adjacente, e gravados em fita VHS para que os resultados pudessem ser posteriormente observados e analisados.

Figura 1. Desenho esquemático do labirinto em cruz elevado (LCE), equipamento utilizado para avaliação comportamental dos animais.

3.8. Procedimentos

Os filhotes desnutridos foram divididos em dois grupos: um deles recebeu estímulo tátil (handling), que consiste em acomodar o filhote em uma das mãos do experimentador – passada anteriormente na maravalha para adquirir odor semelhante ao da rata-mãe – e com o polegar da outra mão realizar movimentos no sentido cabeça-cauda na região dorsal do animal, acariciando-o lenta e suavemente.

O estímulo tátil foi empregado durante 3 minutos para cada animal, do primeiro dia de vida até que completassem 49 dias de idade, sem interrupção. O outro grupo não recebeu estimulação tátil.

Da mesma forma, os filhotes controle foram divididos em dois grupos: um deles recebeu estímulo tátil a partir do primeiro dia de vida, nos mesmos períodos de tempo dos animais desnutridos; o outro grupo não recebeu estímulo tátil.

Esta estimulação foi realizada em uma sala localizada a frente do biotério do laboratório. Até o dia do desmame, quando ainda estavam agrupados em ninhadas, os animais foram levados juntos, e a partir do 22º dia foram transportados em caixas individuais. Os filhotes pertencentes às ninhadas dos grupos não-estimulados também foram separados de suas mães durante o período em que a estimulação tátil foi empregada nas ninhadas estimuladas, para a minimização da interferência dos fatores externos. O teste feito no 70º dia, no LCE, foi realizado no mesmo local em que os animais foram submetidos na estimulação tátil, e por este motivo, não houve a necessidade de, anteriormente ao teste, ser realizada uma habituação à sala.

Ao completarem 70 dias de idade, os animais escolhidos aleatoriamente passaram pelo trauma sub-aquático. O trauma consistiu em colocá-los individualmente em gaiolas metálicas, as quais foram submersas em um recipiente com água mantida à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O trauma foi realizado com um rato de cada vez, e cada animal permaneceu submerso por um período de 60 segundos. Em seguida, a gaiola foi retirada da água. Houve um intervalo de 60 segundos para a secagem do animal, que consistiu em esfregar cuidadosamente um tecido absorvente em seu dorso e ventre. Após este período foi realizada uma sessão no LCE, que consistiu na colocação do animal no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e os comportamentos dos animais foram gravados em fita de vídeo. Foram realizadas

sete sessões com duração de 300 segundos de duração cada uma, e com intervalo de 24 horas entre uma sessão e outra.

3.9. Análise Comportamental

Os comportamentos realizados no labirinto foram medidos através de quatro parâmetros convencionais: frequência de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados. A partir dos valores encontrados, foram calculadas as seguintes medidas:

- Entradas nos braços fechados: obtido através da frequência de entradas nos braços fechados do LCE, considerado todas as vezes que o animal entrou, com as quatro patas, em um dos braços fechados. Este comportamento reflete a atividade locomotora geral do animal (File, 1992);
- Porcentagem de entradas nos braços abertos: obtido através da relação entre o número de entradas nos braços abertos pelo número total de entradas (braços abertos + braços fechados) do LCE;
- Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos: obtido através da relação entre o tempo gasto nos braços abertos pelo tempo total de permanência nos braços abertos e fechados;

Além das medidas clássicas, a atividade exploratória dos animais foi analisada através de cinco categorias comportamentais, previamente descritas por Almeida e colaboradores, em 1993: latência de primeira entrada nos braços abertos, chegada ao fim do braço aberto, levantamento, mergulho da cabeça e tentativa de entradas no braço aberto (Figura 2).

- Latência de 1ª entrada nos braços abertos: o tempo que o animal demorou a entrar, pela primeira vez, em um dos braços abertos. Caso o animal não entrasse em um dos braços durante a sessão, o tempo considerado era de 300 segundos, ou seja, o tempo de duração daquela sessão;
- Chegada ao fim dos braços abertos: toda vez que o animal alcança, com uma ou com as duas patas anteriores, a extremidade de um dos braços abertos do LCE;
- Levantamento: consiste na postura bípede do animal, apoiando-se com as patas posteriores no assoalho do labirinto, podendo posicionar-se completamente ereto ou semi-arqueado, apoiando-se ou não nas paredes laterais do labirinto. É uma medida clássica de exploração de ambientes novos (ALMEIDA e cols., 1993);
- Mergulho da cabeça: movimento exploratório de cabeça e ombros nas laterais do labirinto, em direção ao precipício. Esta categoria comportamental foi descrita por Almeida e colaboradores, em 1993, como avaliação de risco;
- Tentativa de entradas nos braços abertos: postura exploratória na qual o animal, estira-se em direção a um dos braços abertos, somente com as patas anteriores, não completando a entrada.

As categorias comportamentais: número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos e exploração no fim dos braços abertos tem sido utilizadas como indicadores comuns de ansiedade e foram validadas comportamental e farmacologicamente para

ratos (PELLOW e cols., 1985) e camundongos (LISTER, 1987; RODGERS e COLE, 1993).

Figura 2. Fotografias de algumas das atividades comportamentais realizadas no LCE. Levantamento (A), permanência em um dos braços abertos (B), mergulho da cabeça (C) e permanência em um dos braços fechados do labirinto (D).

3.10. Tratamento estatístico

Os dados de peso corporal das ratas-mães; dos filhotes (no período de lactação) e dos animais adultos (no período pós-lactação) foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) de três fatores – desnutrição, estimulação e idade.

Os dados comportamentais no LCE foram submetidos à ANOVA de quatro fatores – desnutrição, estimulação, trauma e sessões – para medidas repetidas no fator sessões. Foram realizadas sete sessões experimentais, porém as análises foram realizadas a partir da primeira, segunda e média da terceira à sétima sessão.

As análises do peso corporal e da atividade comportamental foram seguidas do teste Newman-Keuls de comparações múltiplas ($p \leq 0,05$), sempre que apropriado.

RESULTADOS

4.1. Pesos corporais

4.1.1. Peso corporal das ratas-mães

Os dados de peso corporal médio das ratas-mães estão apresentados na Figura 3. Ao longo dos 21 dias da fase de lactação houve efeito significativo do fator dia [$F(3,42)=117,21$; $p<0,001$], mostrando que durante as quatro semanas em que as mães permaneceram com os filhotes, os grupos analisados apresentaram redução de peso corporal ($p<0,05$).

Observou-se também efeito significativo na interação dos fatores dieta e dia [$F(3,42)=23,62$; $p<0,001$], indicando que as ratas-mães desnutridas e controle tiveram perda de peso corporal, porém as desnutridas apresentaram redução mais acentuada, quando comparadas às ratas controle ($p<0,05$).

Figura 3. Peso corporal médio das ratas-mães, durante o período de lactação (0 – 21º dia). Os símbolos representam o peso médio e as barras sobre os símbolos representam o erro padrão da média (EPM). CE- = ratas-mães controle com ninhadas não-estimuladas (n=6); CE+ = ratas-mães controle com ninhadas estimuladas (n=5); DE- = ratas-mães desnutridas com ninhadas não-estimuladas (n=6); DE+ = ratas-mães desnutridas com ninhadas estimuladas (n=5). * = $p<0,05$ em relação ao grupo controle.

Através da análise de comparações múltiplas, observou-se que o peso médio das ratas-mães desnutridas foi significativamente menor nos dias 07, 14 e 21 da

lactação ($p<0,05$), quando comparado ao das ratas controle. Não foram encontrados efeitos significativos entre os fatores dieta e estimulação.

4.1.2. Peso corporal dos filhotes

A Figura 4 apresenta o peso corporal médio dos filhotes durante a fase de lactação. Os resultados mostraram efeito significativo do fator dieta [$F(1,13)=98,51$; $p<0,001$], indicando que as ninhadas desnutridas tiveram um ganho de peso inferior ao das ninhadas controle.

Foi encontrado efeito significativo do fator estimulação [$F(1,13)=5,13$; $p<0,05$], demonstrando que os filhotes que receberam estímulo tátil apresentaram pesos corporais maiores quando comparados aos que não passaram por este procedimento.

Figura 4. Peso corporal médio dos filhotes, durante o período de lactação (0 – 21º dia). Os símbolos representam o peso médio e as barras representam o EPM. CE- = filhotes controle não-estimulados (n=30); CE+ = filhotes controle estimulados (n=24); DE- = filhotes desnutridos não-estimulados (n=30); DE+ = filhotes desnutridos estimulados (n=24). * = $p<0,05$ em relação ao grupo desnutrido.

Houve efeito significativo do fator idade [$F(3,39)=255,89$; $p<0,001$]. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que houve aumento significativo de

peso corporal dos filhotes, mostrando que os pesos, nas quatro semanas analisadas, foram estatisticamente significativas entre si ($p<0,05$).

Também foi encontrado efeito significativo na interação dos fatores dieta e idade [$F(3,39)=68,63$; $p<0,001$], mostrando que durante as quatro semanas do período de lactação, os dois grupos nutricionais apresentaram ganho de peso, mas os filhotes desnutridos tiveram um ganho de peso inferior ($p<0,05$).

Através da análise de comparações múltiplas observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e desnutrido no dia zero, mas foi houve um aumento de peso gradual entre os dias 07, 14 e 21 ($p<0,05$) do período de lactação.

4.1.3. Peso corporal dos animais adultos

O peso médio dos animais adultos durante a fase pós-lactação está representado na Figura 5. A análise estatística mostrou efeito significativo do fator dieta [$F(1,95)=975,59$; $p<0,001$], indicando que, também nesta fase, os desnutridos tiveram um ganho de peso menor que os controle.

Foi encontrado efeito significativo do fator estimulação [$F(1,95)=11,27$; $p<0,01$], mostrando que os filhotes que receberam estímulo tátil apresentaram peso corporal maior que os animais que não passaram por este procedimento.

Houve efeito significativo do fator idade [$F(6,570)=3263,03$; $p<0,001$], indicando que o peso corporal dos filhotes de todos os grupos aumentou no decorrer das semanas. Através da análise de comparações múltiplas observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as semanas analisadas, quando comparadas entre si ($p<0,05$).

Figura 5. Peso corporal médio dos filhotes, após o período de lactação (28 – 70º dia). Os símbolos representam o peso médio e as barras representam os EPM. CE- = controle não-estimulados (n=30); CE+ = controle estimulados (n=24); DE- = desnutridos não-estimulados (n=30); DE+ = desnutridos estimulados (n=24). * = $p < 0,05$ em relação ao grupo desnutrido; + = $p < 0,05$ em relação ao grupo estimulado.

Com relação à interação, a ANOVA mostrou efeito significativo dos fatores dieta e idade [$F(6,570)=411,18$; $p < 0,001$], demonstrando que, durante os 49 dias do período pós-lactação, os animais desnutridos apresentaram aumento de peso corporal inferior ao do grupo controle. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que os grupos desnutridos permaneceram com peso inferior ao dos controle durante as sete semanas do período pós-lactação ($p < 0,05$).

Houve também efeito significativo dos fatores estimulação e idade [$F(6,570)=3,25$; $p < 0,005$], evidenciando que os animais estimulados e não-estimulados apresentaram ganho de peso, porém, o grupo estimulado apresentou aumento de peso corporal mais acentuado, quando comparado aos controle.

A análise de comparações múltiplas mostrou que os grupos estimulados apresentaram peso maior que os não-estimulados durante as sete semanas do período pós-lactação ($p < 0,05$).

Nas quatro semanas finais da fase pós-lactação (56° ao 70° dia), todos os grupos foram tratados com ração comercial balanceada. Apesar deste período corresponder à fase de recuperação nutricional para os animais desnutridos, esses animais apresentaram uma redução de 58% no peso corporal em relação aos controle. Esta proporção se manteve constante até o último dia de teste ($p<0,05$).

4.2. Resultados comportamentais no labirinto em cruz elevado (LCE)

4.2.1. Entradas nos braços fechados do LCE

A frequência de entradas nos braços fechados LCE é uma medida comportamental indicativa da atividade locomotora do animal.

Através da ANOVA, observou-se efeito significativo do fator estimulação [$F(1,91)=5,16$; $p<0,05$], apontando que os animais submetidos ao estímulo tátil apresentaram redução na porcentagem de tempo despendido nos braços fechados, quando comparados com o grupo não-estimulado.

Houve diferença estatisticamente significativa do fator trauma [$F(1,91)=54,85$; $p<0,001$], indicando que os animais que passaram por este procedimento apresentaram redução no número de entradas nos braços fechados do LCE, quando comparados aos não-traumatizados.

Houve efeito significativo do fator sessões [$F(2,182)=71,51$; $p<0,001$], mostrando que houve um aumento na frequência de entradas nestes braços do labirinto. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que na primeira sessão, os animais apresentaram menor frequência de entradas, quando comparada com as sessões subsequentes. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a segunda sessão e a média das sessões 3 a 7, quando comparadas entre si ($p<0,05$) (Figura 6).

Figura 6. Frequência de entradas nos braços fechados do LCE. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fatores estimulação, trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. E- = grupos não-estimulados (n=55); E+ = grupos estimulados (n=44); T- = grupos não-traumatizados (n=49); T+ = grupos submetidos ao trauma (n=50); 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). * = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-estimulado, ■ = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado; ° = $p < 0,05$ em relação à primeira sessão.

Também foi encontrado efeito significativo na interação dos fatores dieta e estimulação [$F(1,91)=10,84$; $p < 0,05$]. A análise de comparações múltiplas, para esta interação, mostrou que o grupo controle estimulado apresentou menor frequência de entradas que o grupo controle não-estimulado. No entanto, entre o grupo de animais desnutridos não observou-se diferença estatisticamente significativa na frequência de entradas nos braços fechados entre os grupos estimulados e não-estimulados ($p < 0,05$) (Figura 7).

Figura 7. Frequência de entradas nos braços fechados do labirinto, na interação dos fatores dieta e estimulação. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. CE- = controle não-estimulados (n=31); CE+ = controle estimulados (n=23), DE- = desnutridos não-estimulados (n=21); DE+ = desnutridos estimulados (n=21). * = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-estimulado.

Houve efeito significativo na interação dos fatores dieta e trauma [$F(1,91)=5,95$; $p<0,05$], indicando que os dois grupos nutricionais responderam diferentemente ao trauma sub-aquático. Pela análise de comparações múltiplas, observou-se que, entre os animais do grupo controle, os traumatizados apresentaram redução na frequência de entradas nos braços fechados do labirinto, em relação aos grupos não-traumatizados.

Assim como os controle, os animais desnutridos, quando submetidos ao trauma, apresentaram menor número de entradas nos braços fechados do LCE ($p<0,05$). Este efeito, porém, foi mais acentuado entre os grupos desnutridos que entre os controle (Figura 8).

Figura 8. Frequência de entradas nos braços fechados do labirinto, na interação dos fatores dieta e estimulação. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. CT- = controle não-traumatizados (n=27); CT+ = controle traumatizados (n=27), DT- = desnutridos não-traumatizados (n=22); DT+ = desnutridos traumatizados (n=23). * = $p<0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado.

Foi encontrado efeito significativo na interação dos fatores trauma e sessões [$F(2,182)=8,64$; $p<0,001$]. A análise de comparações múltiplas demonstrou que a frequência de entradas na primeira sessão foi significativamente menor que nas sessões posteriores. O grupo traumatizado apresentou redução na frequência de entradas nos braços fechados quando comparado ao grupo não-traumatizado.

Observou-se que durante a primeira, a segunda e a média da terceira à sétima sessão, as entradas nos braços fechados foi menos freqüente no grupo traumatizado quando comparado com o não-traumatizado ($p<0,05$). Não houve diferenças estatisticamente significativa entre as sessões 2 e a média das sessões 3-7 (Figura 9).

Figura 9. Freqüência de entradas nos braços fechados do labirinto, na interação dos fatores trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. T- = grupos não-traumatizados (n=49); T+ = grupos traumatizados (n=50); 1 = primeira sessão; 2 = segunda sessão; 3-7 = média da terceira à sétima sessão. * = $p<0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado; # = $p<0,05$, em relação às sessões posteriores.

4.2.2. Entradas nos braços abertos do LCE

A porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE é uma medida clássica de ansiedade animal.

Foram encontrados efeitos significativos do fator dieta [$F(1,91)=10,14$; $p<0,01$], indicando que o grupo desnutrido apresentou maior porcentagem de entradas que o grupo controle.

Houve diferença estatisticamente significativa do fator estimulação [$F(1,91)=4,99$; $p<0,05$], mostrando que os animais estimulados tiveram porcentagens menores de entradas nos braços abertos do labirinto, quando comparados aos que não foram submetidos à estimulação tátil.

Também houve diferença estatisticamente significativa do fator sessões [$F(2,182)=64,28$; $p<0,001$]. De acordo com a análise de comparações múltiplas, observou-se os grupos analisados apresentaram alta porcentagem de entradas nos braços abertos, na primeira sessão, quando comparada às sessões subseqüentes. A primeira sessão foi maior que todas as outras, e não houve diferença estatisticamente significativa entre a segunda sessão e a média da terceira à sétima sessão ($p<0,05$) (Figura 10).

Efeito significativo foi encontrado na interação dos fatores trauma e sessões [$F(2,182)=3,51$; $p<0,05$].

Figura 10. Porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fatores dieta, estimulação e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. C = grupo controle (n=54); D = grupo desnutrido (n=45); E- = grupo não-estimulados (n=55); E+ = grupo estimulados (n=44); 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). ▲ = $p<0,05$, em relação ao grupo controle; * = $p<0,05$, em relação ao grupo não estimulado; ° = $p<0,05$ em relação à primeira sessão.

Foi encontrado efeito significativo na interação dos fatores trauma e sessões [$F(2,182)=3,51$; $p<0,05$]. Pela análise de comparações múltiplas, observou-se que os animais traumatizados apresentaram, na primeira, porcentagens maiores de entradas nos braços abertos, em relação à segunda sessão e à média da terceira à sétima sessão ($p<0,05$). Os animais não-traumatizados também apresentaram porcentagem maior de entradas na primeira sessão, em relação às sessões posteriores ($p<0,05$).

Na média da terceira à sétima sessão, o grupo traumatizado apresentou redução na porcentagem de entradas nos braços abertos, em relação ao grupo não-traumatizado. Esta diferença entre os grupos traumatizado e não-traumatizado, porém, não foi observada na primeira e na segunda sessão, para esta categoria comportamental (Figura 11).

Figura 11. Porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE, na interação dos fatores trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. T- = grupos não-traumatizados (n=27); T+ = grupos traumatizados (n=27); 1 = primeira sessão; 2 = segunda sessão; 3-7 = média da terceira à sétima sessão. * = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado; # = $p < 0,05$, em relação às sessões posteriores.

4.2.3. Tempo de permanência nos braços abertos

O tempo que os animais permaneceram nos braços abertos do LCE foi calculado em porcentagem e, assim como a frequência de entradas nos braços abertos, quantifica o estado de ansiedade do animal.

Houve efeito significativo do fator trauma [$F(1,91)=4,68$; $p < 0,05$] demonstrando que os animais que passaram por este procedimento apresentaram menor porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE, comparados ao grupo não-traumatizado.

Foram encontrados efeitos significativos do fator sessões [$F(2,182)=29,72$; $p < 0,001$]. De acordo com a análise de comparações múltiplas, observou-se que na primeira sessão, a porcentagem de tempo foi significativamente maior que na segunda e na média da terceira à sétima sessão ($p < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12. Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fatores trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. T- = grupos não-traumatizados (n=49); T+ = grupos submetidos ao trauma (n=50); 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). ■ = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado; ○ = $p < 0,05$ em relação à primeira sessão.

Além disso, a ANOVA apontou efeito significativo na interação dos fatores dieta e trauma [$F(1,91)=4,17$; $p < 0,05$], mostrando que os grupos nutricionais responderam diferentemente a este processo ansiogênico. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que os animais desnutridos traumatizados apresentaram menor porcentagem de tempo nos braços abertos em relação aos desnutridos não-traumatizados ($p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 13. Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE, na interação dos fatores dieta e trauma. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. CT- = grupo controle não-traumatizados (n=27); CT+ = grupo controle traumatizados (n=25); DT- = grupo desnutrido não-traumatizado (n=22); DT+ = grupo desnutrido traumatizado (n=23). * = $p < 0,05$, em relação aos desnutridos não-traumatizados.

No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, entre o grupo controle traumatizado e o grupo controle não-traumatizado, para porcentagem de tempo despendido nos braços abertos.

4.2.4. Latência de primeira entrada no braço aberto do LCE

A latência de primeira entrada no braço aberto, ou seja, o tempo que o animal demorou a entrar pela primeira vez em um dos braços abertos do labirinto, é uma medida de ansiedade e de atividade exploratória do animal.

Foi encontrado, para esta categoria comportamental, efeito significativo do fator dieta [$F(1,91)=7,96$; $p<0,01$], mostrando que os animais desnutridos apresentaram latências de primeira entrada maiores que os controle.

Foi encontrado efeito significativo do fator estimulação [$F(1,91)=7,25$; $p<0,01$], indicando que os animais que receberam estímulo tátil apresentaram alta latência de primeira entrada nos braços abertos do labirinto.

Houve efeito significativo do fator trauma [$F(1,91)=6,08$; $p<0,05$], demonstrando que os grupos submetidos a este processo ansiogênico apresentaram latência de primeira entrada maior que os grupos não-traumatizados.

Foi encontrado efeito significativo do fator sessões [$F(2,182)=60,90$; $p<0,001$], indicando que houve diferença estatisticamente significativa entre as sessões analisadas. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que na primeira sessão os animais apresentaram latência de primeira entrada reduzida, quando comparada às outras sessões ($p<0,05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a segunda sessão e a média da terceira à sétima sessão (Figura 14).

Figura 14. Latência de primeira entrada em um dos braços abertos do LCE. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fatores dieta, estimulação, trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. C = animais controle (n=54); D = animais desnutridos (n=45); E- = grupos não-estimulados (n=55); E+ = grupos estimulados (n=44); T- = grupo não-traumatizado (n=49); T+ = grupos submetidos ao trauma (n=50). 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). ▲ = $p < 0,05$, em relação ao grupo controle; * = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-estimulado; ■ = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado; ○ = $p < 0,05$ em relação à primeira sessão.

Houve efeito significativo na interação dos fatores dieta e trauma [$F(1,91)=6,04$; $p < 0,05$], mostrando que os grupos nutricionais responderam diferentemente a este processo ansiogênico. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que o grupo desnutrido traumatizado apresentou maior latência de primeira entrada quando comparados aos não-traumatizados ($p < 0,05$) (Figura 15).

Figura 15. Latência de primeira entrada em um dos braços abertos do LCE, na interação dos fatores dieta e trauma. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. CT- = grupo controle não-traumatizados (n=27); CT+ = grupo controle traumatizados (n=25); DT- = grupo desnutrido não-traumatizado (n=22); DT+ = grupo desnutrido traumatizado (n=23). * = $p < 0,05$, em relação aos desnutridos não-traumatizados.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle traumatizados e controle não-traumatizados, na análise desta categoria comportamental.

Além disso, foram encontrados efeitos significativos dos fatores trauma e sessões [$F(2,182)=3,54$; $p<0,05$]. Através da análise de comparações múltiplas, observou-se que na primeira sessão os grupos submetidos apresentaram menor latência de primeira entrada que o grupo não-traumatizado ($p<0,05$). Os animais traumatizados apresentaram menor latência de primeira entrada na primeira sessão, em relação à segunda e à média da terceira à sétima sessão. Da mesma forma, o grupo não-traumatizado apresentou latência reduzida na primeira sessão, quando comparada à segunda e à média da terceira à sétima sessão ($p<0,05$).

Na média da terceira à sétima sessão observou-se que o grupo traumatizado apresentou maior latência que o grupo não-traumatizado ($p<0,05$) (Figura 16). Não houve diferença estatisticamente significativa, na segunda sessão, entre os grupos traumatizado e não-traumatizado.

Figura 16. Latência de primeira entrada em um dos braços abertos do LCE, na interação dos fatores trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. T- = grupos não-traumatizados (n=49); T+ = grupos traumatizados (n=50); 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). * = $p<0,05$ em relação ao grupo não-traumatizado, # = $p<0,05$ em relação às sessões posteriores.

4.2.5. Frequência de chegada ao fim dos braços abertos

A frequência com que os animais chegaram até o fim dos braços abertos no LCE é um índice de atividade exploratória, também utilizada para medidas de ansiedade em ratos. Para este comportamento, a ANOVA mostrou que houve efeito significativo do fator estimulação [$F(1,91)=14,02$; $p<0,001$], demonstrando que os animais que receberam estímulo tátil apresentaram redução na frequência deste comportamento.

Houve efeito significativo do fator trauma [$F(1,91)=14,27$; $p<0,001$] indicando que os grupos submetidos a este processo ansiogênico apresentaram menor frequência de chegadas ao fim dos braços abertos do LCE.

Também foi encontrado efeito do fator sessões [$F(2,182)=16,35$; $p<0,001$], mostrando que houve diferença estatisticamente significativa entre as sessões analisadas. A análise de comparações múltiplas apontou aumento na frequência deste comportamento na primeira sessão, quando comparada às demais. Tanto na segunda sessão quanto na média da terceira à sétima sessão, os animais apresentaram menor frequência de chegadas, em relação à primeira sessão.

Observou-se, ainda, uma acentuada redução de chegadas ao fim dos braços abertos na segunda sessão em relação à primeira ($p<0,05$) (Figura 17).

Houve efeito significativo na interação dos fatores dieta e trauma [$F(1,91)=4,45$; $p<0,05$], mostrando que os grupos nutricionais responderam diferentemente ao trauma sub-aquático.

Pela análise de comparação múltiplas observou-se que dentre os animais desnutridos, os traumatizados apresentaram menor frequência nesta categoria comportamental quando comparados aos não-traumatizados ($p<0,05$) (Figura 18).

Figura 17. Frequência de chegadas ao fim de um dos braços abertos do LCE. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fatores estimulação, trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. E- = grupos não-estimulados (n=55); E+ = grupos estimulados (n=45); T- = grupo não-traumatizado (n=49); T+ = grupos traumatizados (n=50); 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). * = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-estimulado; ■ = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado; ° = $p < 0,05$ em relação à primeira sessão.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle traumatizados e controle não-traumatizados para frequência de chegadas ao fim dos braços abertos do LCE.

Figura 18. Frequência de chegadas ao fim de um dos braços abertos do LCE, na interação dos fatores dieta e trauma. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. CT- = grupo controle não-traumatizado (n=27); CT+ = grupo controle traumatizado (n=25); DT- = grupo desnutrido não-traumatizado (n=22); DT+ = grupo desnutrido traumatizado (n=23). * = $p < 0,05$, em relação ao grupo desnutrido não-traumatizado.

Foi encontrado efeito significativo na interação dos fatores dieta e sessões [$F(2,182)=3,56$; $p < 0,05$]. A análise de comparações múltiplas, para esta interação, mostrou que o grupo controle, na primeira sessão, apresentou maior frequência de

chegadas ao fim dos braços abertos, em relação à segunda e à média da terceira à sétima sessão ($p<0,05$).

Na segunda sessão, o grupo desnutrido apresentou menor frequência de chegadas, tanto em relação à primeira sessão quanto em relação à média da terceira à sétima sessão ($p<0,05$).

Na média da terceira à sétima sessão, foi observado que os animais desnutridos apresentaram maior número de chegadas que os controle ($p<0,05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e desnutridos nas sessões 1 e 2 (Figura 19).

Figura 19. Frequência de chegadas ao fim de um dos braços abertos do LCE, na interação dos fatores dieta e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. C = grupo controle (n=54); D = grupo desnutrido (n=45); 1 = primeira sessão; 2 = segunda sessão; 3-7 = média da terceira à sétima sessão. * = $p<0,05$, em relação ao grupo controle; # = $p<0,05$ em relação às sessões posteriores.

Houve também efeito na interação dos fatores estimulação e sessões [$F(2,182)=5,21$; $p<0,01$], mostrando que, ao longo das sessões, os animais submetidos à estimulação tátil apresentaram respostas comportamentais diferentes daquelas realizadas pelos grupos não-estimulados. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que na primeira sessão, o grupo estimulado visitou menos vezes o fim de um dos braços abertos do LCE, quando comparado com o grupo não-estimulado, na mesma sessão ($p<0,05$).

Da mesma forma, observou-se que na média da terceira à sétima sessão, o grupo estimulado apresentou menor frequência de chegadas, quando comparado com o grupo não-estimulado ($p < 0,05$).

Ainda, através da análise de comparações múltiplas, observou-se que na primeira sessão os animais não-estimulados apresentaram maior frequência de chegadas ao fim dos braços abertos, com relação às demais sessões ($p < 0,05$) (Figura 20). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estimulados e não-estimulados durante a segunda sessão experimental.

Figura 20. Frequência de chegadas ao fim de um dos braços abertos do LCE, na interação dos fatores estimulação e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. E- = grupos não-estimulados (n=55); E+ = grupos estimulados (n=45); 1 = primeira sessão; 2 = segunda sessão; 3-7 = média da terceira à sétima sessão. * = $p < 0,05$, em relação aos grupos não-estimulados; # = $p < 0,05$, em relação às sessões posteriores.

4.2.6. Levantamentos

Para o comportamento de levantamento, um dos índices de atividade exploratória do animal, foi encontrado efeito significativo do fator trauma [$F(1,91)=45,58$; $p < 0,001$]. Este resultado demonstra que os animais submetidos ao trauma sub-aquático apresentaram porcentagens menores de levantamentos.

Houve efeito do fator sessões [$F(2,182)=29,79$; $p < 0,001$], indicando que as sessões realizadas foram estatisticamente diferentes entre si. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que, na primeira sessão, os grupos analisados

realizaram menor frequência de levantamentos quando comparada com as outras sessões subsequentes ($p<0,05$); e que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a segunda e a média da terceira à sétima sessão (Figura 21).

Figura 21. Frequência de levantamentos realizados no LCE. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fatores trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. T- = grupos não-traumatizados ($n=49$); T+ = grupos submetidos ao trauma ($n=50$); 1 = primeira sessão ($n=49$); 2 = segunda sessão ($n=49$); 3-7 = média da terceira à sétima sessão ($n=49$). ■ = $p<0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado; ° = $p<0,05$ em relação à primeira sessão.

Foi encontrado efeito significativo na interação dos fatores dieta e estimulação [$F(1,91)=8,12$; $p<0,01$]. A análise de comparações múltiplas, para esta interação, mostrou que o grupo controle estimulado apresentou menor frequência de levantamentos que o grupo controle não-estimulado ($p<0,05$). Porém, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos desnutrido estimulados e desnutrido não-estimulados (Figura 22).

A ANOVA mostrou efeito significativo na interação dos fatores dieta e trauma [$F(1,91)=9,01$; $p<0,01$]. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que os animais controle traumatizados apresentaram menor frequência de levantamentos que os controle não-traumatizados ($p<0,05$).

Figura 22. Frequência de levantamentos realizados no LCE, na interação dos fatores dieta e estimulação. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. T- = grupo não-traumatizado (n=49); T+ = grupos traumatizados (n=50); 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). * = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-estimulado.

Assim como nos controle, os animais desnutridos, quando submetidos ao trauma, apresentaram menor número de entradas nos braços fechados do LCE ($p < 0,05$). Este efeito, porém, foi mais acentuado entre os grupos desnutridos que entre os controle (Figura 23).

Figura 23. Frequência de levantamentos realizados no LCE, na interação dos fatores dieta e trauma. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. CT- = grupo controle não-traumatizado (n=29); CT+ = grupo controle traumatizado (n=27); DT- = grupo desnutrido não-traumatizado (n=22); DT+ = grupo desnutrido traumatizado (n=23). * = $p < 0,05$, em relação aos desnutridos não-traumatizados.

Foi encontrado efeito significativo na interação dos fatores trauma e sessões [$F(2,182)=20,03$; $p < 0,001$]. Pela análise de comparações múltiplas, observou-se que

o grupo traumatizado apresentou menor frequência de levantamentos que o grupo não-traumatizado, durante a primeira sessão ($p<0,05$).

Observou-se também que a frequência de levantamentos foi significativamente menor na primeira sessão, quando comparada à frequência da segunda sessão e da média da terceira à sétima sessão ($p<0,05$) (Figura 24).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para os grupos não-traumatizados na segunda sessão e na média da terceira à sétima sessão. Também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para os grupos não traumatizados, quando comparada a primeira sessão com as sessões posteriores, nesta categoria comportamental.

Figura 24. Frequência de levantamentos realizados no LCE, na interação dos fatores trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. T- = grupo não-traumatizado (n=49); T+ = grupos traumatizados (n=50); 1 = primeira sessão; 2 = segunda sessão; 3-7 = média da terceira à sétima sessão. # = $p<0,05$, em relação às sessões posteriores.

4.2.7. Mergulhos

Os mergulhos realizados pelos animais no LCE são medidas comportamentais de ansiedade e atividade exploratória. Através da análise estatística realizada, observou-se efeito significativo do fator dieta [$F(1,91)=8,71$; $p<0,01$], indicando que os animais desnutridos apresentaram maiores frequências de mergulhos quando comparados aos controle.

Foram encontrados efeitos significativos do fator estimulação [$F(1,91)=4,23$; $p<0,01$], demonstrando que os animais que receberam estímulo tátil apresentaram redução na frequência deste comportamento, quando comparados aos não-estimulados.

Houve efeito do fator trauma [$F(1,91)=23,44$; $p<0,001$]. Este resultado mostra que os grupos submetidos a este processo ansiogênico apresentaram menor frequência de mergulhos que os não-traumatizados.

Também foi encontrado efeito significativo do fator sessões [$F(2,182)=45,69$; $p<0,001$]. Pela análise de comparações múltiplas observou-se que na primeira sessão os grupos apresentaram maior número de mergulhos quando comparada a todas outras sessões ($p<0,05$). Entre as sessões 2 e 3-7 não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (Figura 25).

Figura 25. Frequência de mergulhos realizados no labirinto. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fatores dieta, estimulação, trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. C = animais controle (n=54); D = animais desnutridos (n=45); E- = grupos não-estimulados (n=55); E+ = grupos estimulados (n=44); T- = grupo não-traumatizado (n=49); T+ = grupos traumatizados (n=50); 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). ▲ = $p<0,05$ em relação ao grupo controle; * = $p<0,05$ em relação ao grupo não-estimulado; ■ = $p<0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado; ° = $p<0,05$ em relação à primeira sessão.

Entre os fatores de interação, foram encontrados efeitos significativos de dieta e trauma [$F(1,91)=8,43$; $p<0,01$]. Observou-se que, entre os grupos desnutridos, os

animais traumatizados apresentaram redução na frequência de mergulhos quando comparados com os não-traumatizados ($p < 0,05$) (Figura 26).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as frequências de mergulhos dos grupos controle submetidos e não submetidos ao trauma sub-aquático.

Figura 26. Frequência de mergulhos realizados no labirinto, na interação dos fatores dieta e trauma. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. CT- = grupo controle não-traumatizado (n=27); CT+ = grupo controle traumatizado (n=25); DT- = grupo desnutrido não-traumatizado (n=22); DT+ = grupo desnutrido traumatizado (n=23). * = $p < 0,05$, em relação ao grupo desnutrido não-traumatizado.

Houve efeito significativo entre os fatores estimulação e sessões [$F(2,182)=7,68$; $p < 0,001$], indicando que a estimulação tátil provocou redução na frequência de mergulhos nos grupos analisados. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que na primeira sessão, os animais estimulados apresentaram menor número de mergulhos, quando comparados aos não estimulados ($p < 0,05$). tanto o grupo estimulado quanto o não-estimulado apresentaram maior frequência de mergulhos na primeira sessão, quando comparada a segunda sessão.

Na primeira sessão, os animais estimulados apresentaram maior frequência de mergulhos da cabeça, quando comparada às sessões posteriores ($p < 0,05$). Da mesma forma, os animais não-estimulados apresentaram maior número de mergulhos na primeira sessão, quando comparada à segunda sessão e à média da

terceira à sétima sessão ($p < 0,05$) (Figura 27). Não houve diferença estatisticamente significativa entre primeira e as demais sessões experimentais no LCE.

Figura 27. Frequência de mergulhos realizados no labirinto, na interação dos fatores estimulação e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. E- = grupos não-estimulados ($n=55$); E+ = grupos estimulados; 1 = primeira sessão; 2 = segunda sessão; 3-7 = média da terceira à sétima sessão. * = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-estimulado; # = $p < 0,05$ em relação às sessões posteriores.

Ainda, foram encontrados efeitos significativos dos fatores trauma e sessões [$F(2,182)=26,04$; $p < 0,001$]. Através da análise de comparações múltiplas, observou-se que, na primeira sessão, os animais traumatizados realizaram menos mergulhos que os não-traumatizados. Da mesma forma, na média da terceira à sétima sessão os animais traumatizados também apresentaram redução na frequência de mergulhos, quando comparados aos não-traumatizados ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos traumatizados e não-traumatizados na segunda sessão.

Com relação ao grupo não-traumatizado, observou-se que na primeira sessão houve menor frequência de mergulhos da cabeça que nas sessões posteriores, e que entre a segunda e a média da terceira à sétima sessão, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 28).

Figura 28. Frequência de mergulhos realizados no labirinto, na interação dos fatores trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. T- = grupo não-traumatizado (n=49); T+ = grupos traumatizados (n=50); 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). * = $p < 0,05$ em relação ao grupo não-estimulado; # = $p < 0,05$ em relação ao grupo não-traumatizado.

4.2.8. Tentativa de entrada nos braços abertos

A tentativa de entrada nos braços abertos do LCE também é uma categoria comportamental utilizada como índice de ansiedade e atividade exploratória.

Efeitos significativos foram observados no fator trauma [$F(1,91)=22,48$; $p < 0,001$], mostrando que os grupos submetidos a este processo ansiogênico apresentaram redução no número de tentativas, quando comparados aos não-traumatizados.

Também foi encontrado efeito do fator sessões [$F(2,182)=19,61$; $p < 0,001$]. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que, na primeira sessão, os grupos realizaram menor frequência de tentativas, em relação à sessão 2 e à média das sessões 3-7 ($p < 0,05$). (Figura 29).

Foram encontrados efeitos significativos na interação dos fatores trauma e sessões [$F(2,182)=19,42$; $p < 0,001$]. Através da análise de comparações múltiplas observou-se que, na primeira sessão, os animais submetidos ao trauma sub-aquático apresentaram menor frequência de tentativas, comparados aos animais não-traumatizados ($p < 0,05$).

Figura 29. Frequência de tentativas de entradas nos braços abertos do LCE. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fatores trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. T- = grupo não-traumatizado (n=49); T+ = grupos traumatizados (n=50); 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). ■ = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado; ○ = $p < 0,05$ em relação à primeira sessão.

Na primeira sessão, o grupo traumatizado apresentou frequência de tentativas significativamente menor, em relação à sessão 2 e à média das sessões 3-7 ($p < 0,05$) (Figura 30). No entanto, o grupo não-traumatizado não apresentou diferença estatisticamente significativa entre sessões.

Figura 30. Frequência de tentativas de entradas nos braços abertos do LCE, na interação dos fatores trauma e sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o EPM de cada grupo. T- = grupo não-traumatizado (n=49); T+ = grupos traumatizados (n=50); 1 = primeira sessão (n=99); 2 = segunda sessão (n=99); 3-7 = média da terceira à sétima sessão (n=99). * = $p < 0,05$, em relação ao grupo não-traumatizado; # = $p < 0,05$ em relação às sessões posteriores.

Não foram encontradas diferenças entre os grupos traumatizados e não-traumatizados durante a segunda sessão, ou entre a média da terceira à sétima

sessão. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as sessões 1, 2 e a média das sessões 3 a 7, entre os grupos não-traumatizados.

Na tabela a seguir (Tabela 4) estão representados os efeitos dos fatores: dieta, estimulação, estimulação ambiental e trauma sub-aquático, em todas as categorias comportamentais analisadas.

Tabela 4. Relação das categorias comportamentais dos animais desnutridos e controle, que receberam ou não-estimulação tátil, submetidos ou não ao trauma sub-aquático, observados na primeira sessão experimental. ↑ : Aumento, ↓ : Diminuição, – : Ausência de efeito.

<i>Categorias comportamentais</i>	
Entradas nos braços fechados	Dieta (–) Estimulação (–) Trauma (↓)
% de entradas nos braços abertos	Dieta (↑) Estimulação (↓) Trauma (↓)
% de tempo nos braços abertos	Dieta (↑) Estimulação (↓) Trauma (↓)
Latência de 1ª entrada nos braços abertos	Dieta (↑) Estimulação (↑) Trauma (↑)
Chegada ao fim do braço aberto	Dieta (–) Estimulação (↓) Trauma (↓)
Levantamentos	Dieta (–) Estimulação (–) Trauma (↓)
Mergulhos	Dieta (↑) Estimulação (↓) Trauma (↑)
Tentativa de entradas nos braços abertos	Dieta (↓) Estimulação (↑) Trauma (↓)

DISCUSSÃO

Através da análise do peso das ratas-mães, nas três semanas do período de lactação, observou-se que as ratas controle e desnutridas (com ninhadas estimuladas ou não-estimuladas) apresentaram redução de peso corporal. As ratas-mães submetidas às dietas hipoprotéicas apresentaram redução de peso mais acentuada que as controle, como já descrito em estudos feitos por nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA e cols., 1990; 1991; 1992; SANTUCCI e cols., 1994; ROCINHOLI e cols., 1997) e por outros grupos (BEDI, 1994; FINGER e GREEN, 1993; PEELING e SMART, 1994; ROCHA E MELLO, 1994). A redução de peso no grupo desnutrido foi de aproximadamente 20% em relação ao peso total das ratas controle.

De acordo com De Oliveira e Almeida (1985) e Riul e cols. (1998), a perda de peso das ratas-mães pode estar relacionada ao fato das mães desnutridas passarem mais tempo no ninho cuidando de seus filhotes.

As alterações observadas na interação entre ratas-mães e filhotes, provocadas pela desnutrição protéica precoce, podem estar associada ao retardo no desenvolvimento neuromotor desses animais e à maior dependência das ninhadas desnutridas às suas mães. Essas alterações podem representar uma importante maneira de reduzir gasto de energia e manter-se aquecido. Este maior gasto energético, associado à menor ingestão de dieta, levaria à conseqüente perda de peso.

No presente estudo, as ratas foram escolhidas aleatoriamente para compor o grupo desnutrido e apresentaram aproximadamente o mesmo peso corporal no dia do nascimento dos filhotes – considerado o dia zero. Por esta razão as ratas-mães não apresentaram diferença significativa de peso corporal no dia zero do experimento, mas sim no decorrer das semanas, entre os dias 7 e 21 do período de lactação.

Entre o peso corporal médio das ratas-mães que amamentaram ninhadas submetidas à estimulação tátil e o das que amamentaram os filhotes não-estimulados, não houve diferença. A estimulação tátil a que os filhotes foram submetidos parece não ter refletido em alterações comportamentais capazes de produzir diferença no peso corporal das ratas mães, quando comparadas àquelas com ninhadas não-estimuladas. Estes dados também estão de acordo com outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA e cols., 1991; DE OLIVEIRA, 1985; ROCINHOLI e cols., 1997; RIUL e cols., 1999). Porém, a estimulação tátil durante o período de lactação alterou o peso corporal dos filhotes, indicando que este tipo de estímulo foi suficiente para aumentar o déficit provocado pela desnutrição protéica precoce.

Um dos fatores do peso médio das ninhadas desnutridas ser inferior tem de-se à desnutrição imposta às mães, já que a deficiência de proteínas na dieta pode ser importante para a produção de leite (KATZ e DAVIES, 1983). Passos e colaboradores, em 2000, relataram que esta diferença de peso entre filhotes desnutridos e controle se deve a uma alteração na produção e composição do leite das ratas-mães desnutridas em decorrência da desnutrição, e não somente ao volume produzido. Os dados sugerem que a variação na proteína materna e o total de alimento ingerido estão associados a uma redução da síntese protéica nas glândulas mamárias. Sendo assim, as mães estariam fornecendo, além de uma quantidade menor, um leite deficiente em proteínas.

Reduções no peso corporal dos animais submetidos à restrição protéica têm sido relatadas durante os períodos de lactação e pós-lactação (ROCINHOLI e cols., 1997). Além disso, a proporção de peso encontrada assemelha-se muito aos dados de procedimentos de desnutrição protéica utilizados em nosso laboratório (ALMEIDA e cols., 1990; 1991; 1992; 1993).

Estes dados já eram esperados, pois a desnutrição protéica, quando imposta nos estágios iniciais da vida, produz inúmeras alterações morfológicas e neuroquímicas no SNC (SHOEMAKER e WURTMAN, 1973; LEWIS e cols., 1979), assim como acentuada redução nos pesos corporal e cerebral (MORGANE e cols., 1978, DOBBING, 1987).

O aumento significativo de peso corporal dos animais submetidos à estimulação, comparados aos animais não-estimulados, pôde ser observado tanto no período de lactação quanto durante a fase adulta. Este resultado indica que estimulação tátil foi responsável pelo aumento do peso corporal médio dos filhotes, devido à maior ingestão de dieta por este grupo de animais, e uma vez melhor alimentados na infância, o peso corporal destes animais manteve-se maior também durante a fase adulta.

Deve-se ressaltar, ainda, que houve uma diferença menor de peso entre os grupos desnutridos estimulados e não-estimulados, quando comparados aos controle estimulados e não-estimulados, ou seja, o grupo desnutrido foi menos beneficiado com a estimulação que o grupo controle.

Nas três semanas finais da fase pós-lactação os animais foram tratados com ração comercial balanceada para laboratório. Nesta fase de recuperação nutricional – do 50º ao 77º dia – notou-se um aumento no ganho de peso corporal dos animais desnutridos. Estes dados mostraram que a reabilitação nutricional imposta aos ratos a partir do 50º dia recuperou parcialmente o peso corporal dos animais desnutridos. Esta recuperação de peso, porém, não foi suficiente para igualar o peso do grupo desnutrido ao controle no final do período pós-lactação, aos 70 dias de idade, porém, mostrou-se eficiente em reduzir de 58% para 51% a diferença de peso entre os grupos.

Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Celedón e cols. (1979), Morgane e cols. (1993) e Lima (1992), que utilizaram estimulação ambiental em ratos submetidos ao mesmo modelo de desnutrição protéica que o presente estudo. Porém, estes autores mostram que a estimulação tátil pode atenuar alguns efeitos da desnutrição protéica, desde que o insulto nutricional não tenha sido grave. Assim, esta poderia ser uma possível explicação para o fato da estimulação não ter afetado significativamente os pesos dos animais no presente estudo, uma vez que foi utilizada uma desnutrição grave e prolongada.

Pelos resultados de peso corporal obtidos durante a fase pós-lactação observou-se que a estimulação tátil aumentou somente o peso médio dos animais controle, pois esta diferença não foi estatisticamente significativa entre os animais desnutridos.

Os animais controle foram os que mais foram beneficiados com a estimulação tátil, avaliando seus comportamentos, talvez devido à extensa manipulação; uma vez demonstrado que a manipulação sistemática reduz os efeitos de procedimentos experimentais aversivos (BODNOFF e cols., 1987).

Através dos dados de medidas comportamentais observou-se que os animais desnutridos apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE), menor latência de primeira entrada nos braços abertos e maior frequência de mergulhos, quando comparados aos controle. Sabe-se que quanto maior a porcentagem de entradas nos braços abertos e mergulhos da cabeça, menor o estado de ansiedade do animal e maior a atividade exploratória. Sendo assim, estes resultados reproduzem os de outros trabalhos em que os animais submetidos a uma desnutrição protéica precocemente são menos ansiosos e/ou

impulsivos (ALMEIDA e cols., 1993; 1994; 1996a; 1998). Os efeitos da dieta foram preservados, visto que os grupos desnutridos demonstraram menor ansiedade e/ou maior impulsividade, no que diz respeito às categorias clássicas. O desempenho dos animais para estas categorias foi afetado pelo trauma; houve diminuição na porcentagem de entradas, bem como no tempo despendido nos braços abertos do LCE, o que comprova dados da literatura (WANG, 2000; NETTO, 1995, CIBIEN, 1995). Vale ressaltar que este efeito apresentou-se principalmente no grupo submetido à desnutrição protéica.

Estes resultados indicam que os animais desnutridos apresentaram menor ansiedade e/ou maior impulsividade em ratos desnutridos precocemente, como descrito por Almeida e colaboradores (1990), Brioni e Orsingher (1988), Santucci e colaboradores (1994); Moreira e colaboradores (1997) e outros autores da área. Desta forma, conseguiu-se reproduzir os efeitos da desnutrição no comportamento no labirinto em cruz elevado anteriormente descritos.

Deve-se salientar, ainda, que a maior exploração nos braços abertos do LCE pelos animais desnutridos não se deve a alterações na atividade locomotora destes animais, visto que a desnutrição protéica não alterou a frequência de entradas nos braços fechados.

Através da análise comportamental dos grupos submetidos à estimulação tátil, observou-se que esses animais apresentaram redução na porcentagem de entradas nos braços abertos, maior latência de primeira entrada nos braços abertos, redução nas chegadas ao fim dos braços abertos e redução na frequência de levantamentos realizados, demonstrando que ratos estimulados mostraram-se mais ansiosos e redução na atividade exploratória. Assim, conclui-se que a estimulação tátil, neste modelo, apresentou caráter ansiogênico.

Os animais estimulados também apresentaram redução na frequência de entradas nos braços fechados do labirinto, demonstrando que estes animais apresentaram menor atividade locomotora quando comparados aos não-estimulados.

Barnes, em 1976, descreveu que a consequência comportamental da desnutrição precoce não deve somente ser associada à privação de nutrientes, mas intensificada pela ausência ou redução de estímulos ambientais em populações mal nutridas. Neste estudo, no entanto, na interação entre estimulação tátil e desnutrição, observou-se que não houve diferença entre os grupos desnutridos e que, entre os controle, a estimulação provocou menor frequência de entradas nos braços fechados e levantamentos, indicando atividade locomotora e exploratória reduzidas para este grupo.

Estes resultados, para estimulação tátil, vão de encontro à grande maioria de trabalhos publicados anteriormente. Muitos destes estudos, no entanto, utilizaram-se de estimulação ambiental complexa, ou seja, envolveram estimulações auditiva, olfativa e visual. Esta estimulação complexa pode ou não vir acompanhada da estimulação tátil (handling). Além disso, em sua maioria, os animais são alojados em grupos de quatro ou mais animais por caixa. O fato dos grupos serem alojados em caixas individuais deve ser considerado como um fator estressante, visto que ratos são animais sociais em seu ambiente natural (MAISONNETTE, 1993).

Uma outra hipótese para se explicar o porque da estimulação ambiental ter apresentado caráter ansiogênico é o grande período de exposição ao handling que os animais foram submetidos, no presente estudo. Riul e colaboradores (1999), por exemplo, descreveram que os animais expostos à estimulação ambiental, como a estimulação tátil, nas primeiras semanas de vida, demonstraram-se menos ansiosos e apresentaram maior atividade exploratória em ambientes novos, quando comparados

aos animais controle. Esta é uma clara evidência que a estimulação ambiental precoce reduz, ou modifica, os efeitos comportamentais da desnutrição, e explica as alterações observadas entre os animais desnutridos estimulados e não-estimulados. Do dia do nascimento ao dia 70, no entanto, inclui-se todos os períodos da vida do animal – infância, juventude e idade adulta. Com isso, uma das explicações seria a grande diversidade de modelos utilizados nas pesquisas da área.

Através da análise comportamental dos animais traumatizados, observou-se que os efeitos do trauma sub-aquático foram opostos aos da dieta: o grupo traumatizado apresentou redução na frequência de entradas nos braços fechados do LCE, demonstrando que este procedimento reduziu a atividade locomotora para este grupo de animais. A atividade exploratória também foi reduzida, indicada pela redução na frequência de levantamentos.

A redução no tempo de permanência nos braços abertos, na frequência de chegadas ao fim dos braços abertos, nos mergulhos, nas tentativas de entrada nos braços abertos; e aumento na latência de primeira entrada nos braços abertos indica que o trauma sub-aquático, aplicado anteriormente ao teste, foi eficiente em provocar efeito ansiogênico nos animais traumatizados.

Tanto os fatores dieta e trauma, isolados, como a interação entre os dois fatores provocou maior ansiedade e redução da atividade exploratória dos ratos desnutridos e traumatizados, quando comparados aos desnutridos não-traumatizados, demonstrando efeito ansiogênico. Isto pode ser demonstrado através das medidas comportamentais em que animais desnutridos e estimulados apresentaram redução no tempo de permanência nos braços abertos, redução na frequência de chegadas ao fim dos braços abertos, redução na frequência de levantamentos e maior da latência de primeira entrada nos braços abertos do LCE.

Além disso, este grupo apresentou menor frequência de entradas nos braços fechados do labirinto, indicando também a atividade locomotora mostrou-se prejudicada.

Por fim, coloca-se a importância da reprodução do teste no LCE ao longo de sete sessões experimentais, com intervalos de 24 horas entre elas. Os testes foram repetidos por sete dias consecutivos, em sete sessões experimentais. Observou-se que houve uma redução no número de entradas nos braços fechados do labirinto, demonstrando que na primeira sessão os grupos apresentaram menor atividade locomotora em relação às sessões posteriores.

Exceto pela redução na frequência de tentativas de entrada e chegadas ao fim dos braços abertos, todos os outros comportamentos evidenciaram diminuição na atividade exploratória a partir da primeira sessão. Como a maioria destes dados são índices de ansiedade, a repetição do teste parece ter um caráter ansiogênico. Por outro lado, esta redução na exploração do labirinto durante as sessões também pode estar demonstrando uma redução na novidade que o teste estaria proporcionando aos animais, explicado pela habituação dos animais ao teste.

Resultados como o aumento na porcentagem de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos e a maior frequência de mergulhos, assim como a redução da latência de primeira entrada – observados na primeira sessão – demonstram que a primeira exposição do animal ao LCE foi menos aversiva em relação à re-exposição. Estes dados também demonstram que a repetição reduziu a atividade exploratória e a impulsividade e/ou aumentou a ansiedade nos animais, e afirma, mais uma vez, que exposição repetidas no LCE aumentam a ansiedade do animal (File, 1992)..

Uma explicação satisfatória para estes resultados seria que os animais tendem a explorar mais os ambientes novos a que são expostos (Levine e Mullins, 1966, Levine e cols., 1967, Fernández-Teruel e cols., 1991) e por este motivo, os animais exploraram menos a partir da segunda sessão, e não foram encontradas diferenças comportamentais entre a terceira e a sétima sessão em todas as categorias comportamentais, ou seja, a partir da segunda sessão, os animais demonstraram menor atividade exploratória em todas as outras sessões.

Com base nos resultados descritos conclui-se que a desnutrição protéica precoce provocou aumento da impulsividade e/ou redução do estado de ansiedade, assim como descrito por Almeida e colaboradores (1992, 1993); o estímulo tátil empregado do dia do nascimento até os 70 dias de idade provocou redução da atividade locomotora e exploratória e apresentou caráter ansiogênico e, por fim, o trauma sub-aquático diminuiu a atividade locomotora e exploratória, demonstrando um caráter ansiogênico, assim como descrito por Mason e Stone (1953) e Breadhurst (1957).

CONCLUSÕES

6.1. Conclusão Geral

6.1.1. Os resultados do presente estudo permitem concluir, de forma geral, que a dieta hipoprotéica produz redução da ansiedade e/ou aumento a impulsividade; que tanto a estimulação tátil a longo prazo quanto o trauma sub-aquático agudo têm efeitos ansiogênicos; e que a repetição de sessões leva a aumento das atividades locomotora e exploratória, assim como aumento da ansiedade no LCE.

6.2. Conclusões específicas

6.2.1. A estimulação tátil a longo prazo produziu aumento do peso corporal dos animais, independentemente da condição nutricional. Além disso, a estimulação reduziu a atividade locomotora e exploratória no teste do LCE nos animais controle e desnutridos, exceto nas categorias entradas nos braços fechados e levantamentos, onde a estimulação reduziu a frequência dos dois comportamentos nos animais controle e não produziu nenhum efeito nos animais desnutridos.

6.2.2. O trauma sub-aquático agudo produziu um efeito geral de aumento da ansiedade e/ou redução da impulsividade. Além disso, este procedimento não alterou diferencialmente a atividade locomotora e a atividade exploratória (frequência de entradas nos braços fechados e levantamentos) de animais controle e desnutridos. Por outro lado, verificou-se que o trauma aumentou a ansiedade para animais desnutridos na maioria das categorias analisadas, sem produzir nenhum efeito nos animais controle. Este resultado gerou uma interação entre condições de dieta e trauma.

6.2.3. Não houve interação entre estimulação tátil a longo prazo e trauma sub-aquático agudo. Além disso, a condição de dieta não produziu nenhum efeito diferencial na relação entre estas variáveis.

RESUMO

Com o objetivo de verificar o efeito do trauma sub-aquático e da estimulação tátil a longo prazo no comportamento exploratório de animais submetidos à desnutrição protéica precoce, ratos albinos, machos, foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Para isto, foram utilizados ratos machos provenientes de ninhadas controle (16% de proteína) e desnutridas (6% de proteína). Após o desmame, os animais receberam as mesmas dietas da fase de lactação até os 49 dias, e ração comercial após esta idade – período de recuperação nutricional para os animais desnutridos. Os animais controle e desnutridos foram divididos em dois grupos: os que receberam ou não estimulação tátil – do nascimento aos 70 dias de idade. No 71º dia, metade dos animais de cada grupo foi submetida ao trauma sub-aquático por 60 segundos, e testada por 5 minutos no LCE. A outra metade foi mantida em suas gaiolas-viveiro antes do teste. Os resultados demonstraram que a desnutrição protéica reduziu o peso corporal tanto das ratas-mães quanto dos filhotes, e que a estimulação tátil reduziu, em parte, as diferenças de peso corporal observada entre animais controle e desnutridos. Quando testados no LCE, os animais desnutridos apresentaram-se menos ansiosos e/ou mais impulsivos. A estimulação tátil apresentou caráter ansiogênico para todos os grupos analisados e através da análise de interação dos fatores dieta e estimulação concluiu-se que o estímulo reduziu atividade locomotora e exploratória dos animais controle. O trauma sub-aquático diminuiu a exploração dos braços abertos nos grupos desnutridos, diminuindo desta forma, as diferenças encontradas entre animais controle e desnutridos. Os dados sugerem que os efeitos da dieta dependem da interação com outros fatores ambientais como a estimulação tátil e o trauma sub-aquático.

ABSTRACT

Early protein malnutrition, besides reducing body and brain weights, causes structural, neurochemical and functional changes in Central Nervous System, leading to behavioral alterations. Malnourished animals seem to be less anxious and/or more impulsive in models that do not involve privation or pain. Several studies with models of anxiety have investigated the influence of external stimuli on the emotionality of the animals. The principal aim of the present study was to evaluate the interaction of sub-aquatic trauma and chronic tactile stimulation on the exploratory behavior of malnourished rats, in the elevated plus-maze test (EPM). For this purpose, we used male rats fed by lactating female rats, receiving either 6% (malnourished) or 16% (well-nourished) protein diets. After weaning (21 days), the animals continued to receive the same diets as in the lactating period until 49 days of age, when they all started to receive a regular lab chow diet – period of nutritional recovery for the malnourished rats. Control and malnourished animals were divided in two groups: the first one received tactile stimulation from birth to 70 days of age, while the other group was not stimulated. On day 71st, half of the animals of each group was submitted to the sub-aquatic trauma for 60 seconds and tested for 5 minutes in the EPM, while the others were kept in their cages before the test. Protein malnutrition reduced the body weight of the dams as well as of the pups. When tested in EPM, malnourished animals showed less anxiety and/or more impulsiveness. Tactile stimulation recovered part of the weight of the malnourished animals, although it presented an anxiogenic profile. Sub-aquatic trauma decreased the open arms exploration, thus reducing the differences found in control and malnourished animals. These data suggest that the effects of the diet are dependent on the interaction between tactile stimulation and sub-aquatic trauma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, G.; RAHMAN, M.A. Effects of undernutrition and protein malnutrition on brain chemistry of rats. **Journal of Nutrition**, v. 105, p. 1090-1103, 1975.

AUSTIN, K.B. Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. **Brain Research Bulletin**, v.28, p.245-255, 1992.

ALMEIDA, S.S.; DE OLIVEIRA, L.M.; GRAEFF, F.G. Decrease reactivity to anxiolytics caused by early protein malnutrition in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 36, p. 997-1000, 1990.

ALMEIDA, S.S.; DE OLIVEIRA, L.M.; GRAEFF, F.G. Early life protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity to anxiolytics. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 513-518, 1991.

ALMEIDA, S.S.; GARCIA, R.A.; DE OLIVEIRA, L.M. Effects of early protein malnutrition on repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. **Physiology and Behavior**, v. 54, p. 749-752, 1992b.

ALMEIDA, S.S.; SOARES, E.G.; BICHUETTE, M.Z.; GRAEFF, F.G.; DE OLIVEIRA, L.M. Effects of early postnatal malnutrition and chlordiazepoxide on experimental aversive situations. **Physiology and Behavior**, v. 51, p. 1195-1199, 1992a.

ALMEIDA, S.S.; GARCIA, R.A.; CIBIEN, M.M.R.; DE ARAÚJO M., MOREIRA G.M.S.; DE OLIVEIRA, L.M. The ontogeny of exploratory behaviors in early malnourished rats exposed to elevated plus-maze test. **Psychobiology**, v. 22, p. 283-288, 1994.

ALMEIDA, S.S.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology and Behavior**, v. 60, nº 2, p. 675-680, 1996a.

ALMEIDA, S.S.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 20, nº 3, p. 389-402, 1996b.

BARNES R.H. Dual role of environmental deprivation and malnutrition in retarding intellectual development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 29, p. 912-917, 1976.

BEDI, K.S. Undernutrition of rats during early life does not affect the number of cortical neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 342, p. 596-602, 1994.

BODNOFF, S.R.; CADOTTE, B.S.; QUIRION, R.; MEANEY, M.J. Postnatal handling reduces novelty induced fear and increases [³H] flunitrazepam binding in rat brain. **Europe journal of Pharmacology**, v. 144, p. 105-107, 1987.

BRIONI, J.D.; CORDOBA, N.; ORSINGHER, O.A. Decreased reactivity to the anticonflict effect of diazepam in perinatally undernourished rats. **Behavioural and Brain Research**, v. 34, p. 159-162; 1989.

BROADHURST, P.L.; Emotionality and the Yerkes-Dodson law. **Journal of Experimental Psychology**, v. 54, p. 345-352; 1957.

BROZECK, J. **Malnutrition and behaviour: critical assessments and key issues**, In. Grantham-McGregor S. Social background in childhood malnutrition. Eds. Lausanne, Switzerland: Nestlé Foundation, p. 358-374; 1979.

CARUGHI, A.; CARPENTER, K.J.; DIAMOND, M.C. Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on body growth, blood parameters and cerebral cortical development of rats. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 2005-2016, 1989.

CELEDON, J.M.; SANTANDER, M.; COLOMBO, M. Long-term effects of early undernutrition and environmental stimulation on learning performance of adult rats. **Journal of Nutrition**, v. 109, p. 1880-1886, 1979.

CIBIEN, M.M.R. Efeitos da desnutrição protéica precoce e estimulação ambiental em modelos de memória e ansiedade no labirinto em cruz elevado. **Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**, SP, Universidade de São Paulo, p. 36-48, 1995.

CINES, B.W.; WINICK, M. Behavioral and physiological effects of early handling and early malnutrition in rats. **Development Psychology**, v. 12, nº 4, p. 381-389, 1979.

CRNIC, L.S. Effects of infantile undernutrition and environment on adult learning rats: methodological and design problems. **Psychology Bulletin**, v. 16, p. 129-145, 1983.

DARWIN, C.R. The expression of the emotions in man and animals. John Murray, **London**, 1872.

DENENBERG, V.H. The effects of early experience. In: Hafez, E.S.E. (Ed). The behavior of domestic animals, Bailliere, Trindall and Castell. **London**, p. 95-130, 1969.

DE OLIVEIRA, L.M.; ALMEIDA, S.S. Effects of malnutrition and environment on the acquisition and extinction of avoidance behavior in rats. **Physiology and Behavior**, v. 34, p. 141-154, 1985.

DICKERSON, J.W.T.; WALMSLEY, A.L. The effects of undernutrition and subsequent rehabilitation on the growth and composition of the central nervous system of the rat. **Brain**, v. 90, p. 897-906; 1967.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: Davidson, N.A.; Dobbing, J. (Eds). **Applied Neurochemistry**. Oxford Blacwell Scientific Publications, Ltd., p. 287-316, 1968.

DOBBING, J. **Early nutrition and later achievement**. London, UK: Academic Press, 1987.

DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain the use of animals models of elucidated the human problem. **Psychiatric and Neurological Neurochivement**, v. 76, nº 6, p. 433-442, 1971.

DRACUT, L.; LADER, M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia. Uma interpretação contemporânea da literatura. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 42, p. 19-32, 1993.

FENÁNDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R.M.; DRISCOLL, P.; TOBENA, A.; BATTING, K. Infantile (handling) stimulation and behaviour in young roman high- and low-avoidance rats. **Psychology and behaviour**, v. 50, p. 563-565; 1991.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott, J. M; Heal, D. J. Marsden, C. A. (Eds.). **Experimental approaches to anxiety and depression**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, p. 25-44, 1992.

FINGER, S.; GREEN, L. Early undernutrition and later hippocampal damage: I. DRL Performance in rats. **Nutrition and Behavior**, v. 1, p. 195-206, 1983.

FUKUDA, M.T.H. **Efeitos da desnutrição protéica precoce sobre a aprendizagem e memória espacial**. 2000. 68f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

GRAEFF, F.G. Ansiolíticos. In: Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. **E.P.U.**, São Paulo, p. 61-83, 1989.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety, In: Handbook of anxiety. **The neurobiology of anxiety**, Burrow, G.D., Roth, M & Noyes Jr., R. (Ed): Elsevier Science Publishers, Amsterdam, v. 3, p. 307-354; 1990.

GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. **Reviews in the Neuroscience**, v. 4, p. 181-211; 1993.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HERNANDES, A.S. **Efeitos da desnutrição protéica precoce sobre o comportamento de ratos em modelos de ansiedade**. 2000. 68f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

KATZ, H.B.; DAVIES, C.A. The separated and combined effects of early undernutrition and environmental complexity at different ages on cerebral measures in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 16, nº 1, p. 47-58, 1983.

LADER, M.H. In: Rodgers, R.J. e COOPER, S.J. 5HT-1A agonists, 5-HT3 antagonists and benzodiazepines. **Their Behavioral Pharmacology**. Wiley, Chichester, p. 343-363, 1981.

LEVINE, S.; HALTMEYER, G.C.; KARAS, G.G.; DENENBERG, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology of Behaviour**, v. 2, p. 55-59, 1967.

LEVITSKY, D.A.; BARNES, R.H. Effect of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli. **Nature**, v. 225, p. 468-469, 1970.

LEVITSKY, D.A.; BARNES, R.H. Nutritional and environmental interaction in the behavior development of the rat: long term effects. **Science**, v. 176, p. 68-71, 1972.

LEVITSKY, D.A.; MASSARO, T.F.; BARNES R.H. Maternal malnutrition and neonatal environment. **Federation Proceedings**, v. 34, p. 1583-1586, 1975.

LEWIS, P.D.; PATEL, A.J.; BALÁZS, R. Effects of undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. **Brain Research**, v. 168, p. 186-189, 1979.

LIMA, J.G. Estudo morfológico do corpo caloso de ratos submetidos a diferentes tipos de dieta e à estimulação sensorial ambiental. **Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, 1992.

LIMA, J.G.; DE OLIVEIRA, L.M.; ALMEIDA, S.S. Effects of early concurrent protein malnutrition and environmental stimulation on the central nervous system and behavior, **Nutritional Neuroscience**, v. 1, p. 439-448, 1999.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 46, p. 321-340, 1990.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**. Berlin, v. 92, p. 180-185, 1987.

LYNCH, A. Passive avoidance behavior and response thresholds in adult male rats after early postnatal undernutrition. **Physiology and Behavior**, v. 16, p. 27-32, 1976.

MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; BRANDÃO, M.L. Role of resocialization and of 5H-T_{1A} receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus maze test. **Physiology and Behavior**, v. 54, p.753-758; 1993.

MASON, W.A.; STONE, C.P. Maze performance of rats under conditions of surface and underwater swimming. **Journal of Comparative Physiology Psychology**, v. 46, p. 159-165, 1953.

MILLENSON, J.R. Contingências aversivas. In: Millenson, J.R. Princípios de análise do comportamento, Editora Coordenada, Brasília. P.383-404, 1975.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative Physiology Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1955.

MOREIRA, G.M.S. **Análise etofarmacológica dos padrões diferenciados de defesa em ratos desnutridos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado.** 1996. 56f. Monografia de conclusão de curso de Bacharelado em Psicologia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MOREIRA, G.M.S.; DE ARAÚJO, M.; DE OLIVEIRA, L.M.; ALMEIDA, S.S. The behavior of protein-calorie-malnourished rats on the elevated plus maze test: an ethopharmacological analysis. **Psychobiology**, v. 23, p. 180-185, 1997.

MORGANE, P.J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, W.; HALL, T.; BRONZINO, J.D.; KISSANE, J. HAWRYLEWICZ, E.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience and Biobehavior Reviews**, v. 2, p. 137-230, 1978.

MORGANE, P.J.; AUSTIN LA-FRANCE, R.J.; BRONZINO, J.D.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavior Reviews**, v. 17, p. 91-128, 1993.

MORGANE, P.J. Malnutrition and the developing central nervous system. In: **The Vulnerable Brain Environmental Risks**, vol.1: Malnutrition and Hazard Assessment, edited by Robert L. Isaacson and Karl F. Jensen. New York: Plenum Press, 1992.

NETTO, S.M. **Papel da 5-HT nas consequências comportamentais do estresse.** 1995. 72f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) - Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

NUTT, D.J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, p. 233-266, 1990.

PASSOS, M.C.F.; RAMOS, C.F.; MOURA, E.G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, v. 20, nº 11, p. 11603-1612, 2000.

PEELING, A.; SMART, J.L. Successful prediction of immediate effects of undernutrition throughout the brain growth spurt on capillary and synapse-to-neuron ratio cerebral cortex in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 9, p. 81-95, 1994.

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 rat. **Journal Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

RAGHAVENDRA, V.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S.K. Brain renin angiotensin system (RAS) in stress-induced analgesia and impaired retention. **Peptides**, v. 20, p. 335-342, 1999.

REEVES, P.G.; ROSSOW, K.L.; LINDLAUF, J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone

mineralization in rats and mice. **Nutrient Requirements and Interaction**, v. 123, p. 1923-1931, 1993.

RICHTER-LEVIN, G. Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma - potential relevance to stress and post-stress syndromes. **Psychiatry Research**, v. 79, p. 73-83, 1998.

RIUL, T.R.; ALMEIDA, P.S.; CARVALHO, A.F.; ALMEIDA, S.S.; DE OLIVEIRA, L.M. Effects of different levels of protein and environmental stimulation on the behavior of young rats tested in the elevated plus-maze. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, p. 295-303, 1998.

RIUL, T.R., ALMEIDA, P.S., DE-OLIVEIRA, L.M.; ALMEIDA S.S. Ethological analysis of mother-pup interactions and other behavioral reactions in rats: the effects of malnutrition and tactile stimulation of the pups. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p. 875-983, 1999.

ROCHA, J.B.T; MELLO, C.F. Handling during suckling alters rat behaviour but does not reverse the deleterious effects of undernutrition on naltrexone-induced inhibition of exploratory activity. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 64, p. 152-156, 1994.

ROCINHOLI, L.F.; ALMEIDA, S.S.; DE OLIVEIRA, L.M. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, nº 3, p. 407-413, 1997.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. Anxiety enhancement in the elevated-plus maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiology and Behavior**, v. 53, p. 383-388, 1993.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus maze: pharmacology, methodology and ethology. **Ethology and Psychopharmacology**, p. 9-44, 1994.

SANTUCCI, L.B.; DAUD, M.M.; ALMEIDA, S.S.; DE OLIVEIRA, L.M. Effects of early protein malnourished and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 393-398, 1994.

SHOEMAKER, W.J.; WURTMAN, T.J. Effect of perinatal undernutrition on the metabolism of catecholamines in the rat brain. **Journal of Nutrition**, v. 103, p. 1537-1547, 1973.

SMAGIN, G.N.; HARRIS, R.B.S.; RYAN, D.H. Corticotropin-releasin factor receptor antagonist infused into the locus coeruleus attenuates immobilization stress-induced defensive withdrawal in rats. **Neuroscience Letters**, v. 220, p.167-170, 1996.

SMART, J.L.; DOBBING, J.; ADLARD, B.P.F.; LYNCH, A.; SANDS, J. Vulnerability of developing brain: relative effects of growth restriction during the fetal and suckling periods on behavior and brain composition of adults rats. **Journal of nutrition**, v. 103, p. 1327-1338, 1973.

SMART, J.L. Activity and exploratory behavior of adult offspring of undernourished mother rats. **Developmental Psychobiology**, v. 7, p. 315-321, 1974.

SMART, J.L.; WATSON, T.S.; DOBBING, J. Thresholds of response to electric shock in previously undernourished rats. **British Journal of Nutrition**, v. 34, p. 511-516, 1975.

TONKISS, J.; GALLER, J.R. Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 40, p. 95-107, 1990.

TONKISS, J.; GALLER, J.R.; MORGANE, P.J.; BRONZINO, J.D.; AUSTIN-LAFRANCE, R.J. Prenatal protein malnutrition and postnatal brain function. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 678, p. 215-227, 1993.

TORGENSEN, S. Genetics of anxiety and its clinical implications. In M. Roth, G.D. Burrows and R. Noyes (Ed) **Handbook of anxiety, the neurobiology of anxiety**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 381-406, 1991.

TREIT, D. Animals models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 9, p. 203-222, 1985.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 463-469, 1993.

WINICK, M. Malnutrition and mental development. In: Winick, M., ed. **Human nutrition**. A comprehensive treatise. New York: Plenum Press, v. 1, p. 41-59, 1979.

WANG, J.; AKIRAV, I.; RICHTER-LEVIN, G. Short-term behavioral and electrophysiological consequences of underwater trauma. **Physiology and Behavior**, v. 70, p. 327-332, 2000.

WHATSON, T.S.; SMART, J.L.; DOBBING, J. Undernutrition early in life: lasting effects on activity and social behavior of male and female rats. **Developmental Psychobiology**, v. 9, nº 6, p. 529-538, 1976.

WILLNER, P. The validity of animals models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, p. 1-3, 1984.

WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **Journal of nutrition**, v. 89, p. 300-306, 1966.

YOUNG, J.Z. What's in a brain? In: Coen, C. (Ed.) **Functions of the brain**, Claredon Press Oxford, p. 1-10, 1985.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.J. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 44, p. 1-5, 1997.