

COMPORTAMENTO DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO CALÓRICA NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

CRISTIANE PEREIRA¹; DOUGLAS MESQUITA DE FIGUEIREDO²; THAÍS MARTEN³; ADRIANA LOURENÇO DA SILVA⁴; GIOVANA DUZZO GAMARO⁵; ELIZABETE HELBIG⁶

¹ Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos/FN/UFPEL – crispnutri@yahoo.com.br

² Curso de Graduação em Nutrição/FN/UFPEL – fdmesquita2008@hotmail.com

³ Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos/FN/UFPEL – thsmarten@hotmail.com

⁴ Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - adrilourenco@gmail.com

⁵ Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - giovanagamaro@hotmail.com

⁶ Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos/FN/UFPEL - helbignt@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo anormal e excessivo de gordura corporal, sendo consequência do balanço energético positivo, o que acarreta repercussões à saúde (WHO, 2000). É uma doença crônica e multifatorial que se desenvolve na interação de fatores genéticos, metabólicos, sociais, comportamentais e culturais (National Institute of Health, 2000)

Essa variedade de fatores a tornam um problema de saúde complexo para avaliar. Visando uma maior compreensão desses fatores, inúmeros estudos têm sido realizados sendo que evidências recentes sugerem que a obesidade está ligada a ansiedade e que essas podem ter uma relação causal na qual a associação pode ser bidirecional (Matter et al, 2009)

A fim de modificar esse cenário atual, intervenções nutricionais têm sido propostas, dentre as quais a restrição calórica (RC), que consiste em uma redução na ingestão calórica inferior ao *ad libitum* (AL) sem má-nutrição. É uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutidas por aumentar a longevidade em várias espécies, inclusive mamíferos (Roth & Polotsky, 2012).

Estudos com animais e humanos demonstram que a RC promove menor ganho de peso e diminuição da gordura corporal, fato que consiste em uma das hipóteses propostas para o aumento de longevidade promovido por essa intervenção (Genaro et al, 2009). No entanto, seus efeitos comportamentais ainda não estão bem estabelecidos (Levay et al, 2007).

O teste do labirinto em cruz elevado (LCA) explora a aversão natural dos roedores a espaços abertos e consiste no método validado mais utilizado para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade nesses animais (Pellow et al, 1985; Levay et al, 2007).

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da RC, iniciada na adolescência, na ansiedade de ratos *wistar* por meio da tarefa do labirinto em cruz elevado.

2. METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Ensaios Biológicos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), com temperatura e umidade relativa de 22-24°C e 65-75%, respectivamente, e ciclo claro/escuro de 12 horas e conduzido em um total de 120 dias, sendo os 5 primeiros destinados à adaptação dos animais ao ambiente e controle do consumo da dieta. Foram utilizados 16 ratos machos (*Rattus Novergicus*) da linhagem *Wistar/UFPEL*, com 35 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas.

Os animais foram mantidos em gabinetes ventilados, alojados em caixas moradia e divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo dieta restrição calórica (GRC40+) e grupo controle com ração *ad libitum* (GC40+). A RC foi progressiva, 10% na primeira semana, 20% na segunda, e 30% a partir da terceira semana até o final do experimento. O percentual da RC da primeira semana foi calculado a partir da média de consumo alimentar dos animais nos cinco dias de adaptação; após, a média do consumo alimentar do grupo controle foi recalculada semanalmente e, a partir deste valor, foi efetuada a RC na semana posterior ao cálculo. Utilizou-se ração comercial marca Nuvilab®.

O teste comportamental foi realizado na última semana do experimento. O labirinto em cruz elevado consiste em 2 braços abertos (50 X 10 cm) sem qualquer anteparo dispostos em oposição a outro e de 2 braços fechados (de mesma proporção com paredes de 40 cm de altura) também opostos, formando uma cruz. O equipamento estava a 50 cm de altura do chão. Individualmente, os animais foram colocados no centro do labirinto (no cruzamento entre os braços), com a cabeça voltada para um dos braços abertos. Durante 5 minutos o número de entradas bem como o tempo de permanência nos braços abertos/fechados foram registrados. Uma entrada foi registrada quando o animal colocou as quatro patas dentro de um dos braços. O aparato foi limpo com álcool a 70% após cada animal ser retirado, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferisse no teste (Levay et al, 2007).

A eutanásia ocorreu no 120º dia de tratamento, com prévio jejum de 12 horas, pelo procedimento de decapitação, conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº 714 de junho de 2002. O presente estudo seguiu os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004) e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA-UFPEL) sob o número 9827.

Os dados foram analisados estatisticamente por meio do teste *t* para amostras independentes, em programa *BioEstat 5.3* (Software livre, Instituto Mamirauá). Em todas as comparações valores de *P* menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da tarefa do labirinto em cruz elevado encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados no labirinto em cruz elevado de ratos *Wistar* submetidos à restrição calórica e alimentados *ad libitum*, Controle.

Grupo	n	Braços abertos		Braços fechados	
		Nº de Entradas	Tempo de permanência	Nº de entradas	Tempo de permanência
Restrição Calórica*	8	0,37±0,74	0.06±0,12	7,87±3.83	2,13±0,29
Controle*	8	1,12±1.36	0.10±0,11	9,00±3.25	2,26±0.46

Não foi verificada diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). Os valores representam as médias \pm desvio padrão;

Diante dos resultados da tabela 1 verificou-se que não houve diferenças no número de entradas e no tempo gasto nos braços abertos e fechados ($p < 0,05$). Resultado semelhante ao encontrado por Ribeiro et al (2012) os quais utilizaram o LCA para avaliar o comportamento de ratos adultos submetidos à RC de 30% durante 12 semanas.

Levay et al (2007) avaliaram os efeitos da RC de 25%, de 50% e aguda (ratos receberam 50% da ração oferecida aos controles 3 dias antes dos testes comportamentais e, em seguida, a ração foi ofertada *ad libitum*) na ansiedade por meio do LCA. Os autores evidenciaram que todos os grupos exibiram o comportamento típico padrão no labirinto, que é a maior permanência nos braços fechados.

O comportamento exploratório típico no LCA é a favor dos braços fechados e esta tendência em permanecer nesses braços do labirinto pode ser aumentada por compostos/tratamentos que aumentam a aversão aos braços abertos, ou seja, que provoquem ansiedade (anxiogênicos). Em contrapartida, a administração de compostos/tratamentos ansiolíticos reduz a aversão aos braços abertos e promove a exploração dos mesmos (Hogg et al, 1996).

Desse modo, os resultados sugerem que o protocolo de RC adotado nesse estudo não modificou a típica resposta comportamental para esse teste diferentemente de outros estudos (Means, Higgins & Fernandes, 1993; Genn et al, 2003; Inoue et al, 2004). Essa divergência nos resultados pode ser atribuída às diferentes espécies de animais e regimes de RC adotados pelos estudos, fase da vida em que a RC foi iniciada, às diferenças entre o horário de realização do teste e horário de alimentação bem como ao momento do dia em que o teste foi realizado (devido à influência do ciclo claro-escuro). Por exemplo, no primeiro estudo supracitado utilizaram camundongos, enquanto que no segundo e terceiro empregaram períodos relativamente breves de restrição (7 e 10 dias, respectivamente, em comparação com os 115 dias no presente estudo).

No entanto, é importante destacar que, se por um lado a RC não proporcionou um efeito ansiolítico, ela também não acarretou em aumento na ansiedade, sugerindo que essa intervenção pode ser utilizada na prevenção da obesidade.

4. CONCLUSÕES

A RC não modificou a resposta típica para o LCA bem como não acarretou em comportamentos relacionados à ansiedade. Este estudo traz dados importantes mostrando que essa intervenção nutricional quando iniciada em fase de desenvolvimento não promoveu ansiedade de acordo com os parâmetros analisados. Esses achados estimulam a realização de estudos para investigar a utilização da RC no tratamento da obesidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/>. Acesso em: 26 de set 2013.
- Genaro, PS; Sarkis, KS; Martini, LA. O efeito da restrição calórica na longevidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.51, n.5, p.667-672, 2009.
- Genn RF, Tucci SA, Thomas A, Edwards JE, File SE. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1–2, p. 155–61, 2003.
- Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n.1, p. 21–30.1996.
- Inoue K, Zorrilla EP, Tabarin A, Valdez GR, Iwasaki S, Kiriike N, Koob GF. Reduction in anxiety after restricted feeding in the rat: implication for eating disorders. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 11, p. 1075–81, 2004.
- Levay, EA; Govic, A; Penman, J; Paolini,AG; Kent, S. Effects of adult-onset calorie restriction on anxiety-like behavior in rats. **Physiology & Behavior**, v. 92, p. 889–896, 2007.
- Mather, AA; Cox, BJ, Enns, MW; Sareen, J. Associations of obesity with psychiatric disorders and suicidal behaviors in a nationally representative sample. **Journal of Psychosomatic Research**, v.66, p.277-285, 2009.
- Means LW, Higgins JL, Fernandez TJ. Mid-life onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive functioning. **Physiology & Behavior**, v. 54, n.3, p. 503–8, 1993.
- National Institute of Health. **The practical guide: Identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults**. Num. 00-4084. 2000. Disponível em: http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity/prctgd_c.pdf Acesso em: 07 out 2013.
- Pellow, S; Chopin, P; File, SE; Briley, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–67, 1985.
- Ribeiro, LC.; Rodrigues, L; Quincozes-Santos, A; Tramontina, AC.; Bambini-Junior, V; Zanotto, C; Diehl, LA.; Biasibetti, R; Kleinkauf-Rocha, J; Dalmaz, C; Gonçalves, CA; Gottfried, C. Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of Wistar rats. **Brain Research**, v. 1472, p. 11-19, 2012.
- Roth, LW; Polotsky, AJ. Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. **Maturitas**. v. 71, n.4, p 315-319, 2012.
- World Health Organization (WHO). **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva, 2000. Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894, 252 p).