

Efeito precoce do álcool e da hipernutrição em ratos adultos sobre o desempenho do labirinto em cruz elevado

Early effect of alcohol and overnutrition in adult rats on the performance of the elevated plus maze

Andréa Kátia Prado de Oliveira¹, Nathalia Fidelis Lins², Ana Catarina Pessoa de Aquino Andrade², Dione Lins dos Santos², Maria Surama Pereira da Silva³, Juliana Maria Carrazzone Borba³, Ana Paula Rocha-de-Melo^{3}*

RESUMO

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) foi utilizado para avaliar ansiedade em ratos submetidos ao consumo de álcool (AL) e à hipernutrição (H) na fase de lactação. Durante a lactação, as lactantes receberam etanol a 50% (3ml/Kg/dia) ou água (AG) no mesmo volume e os filhotes foram amamentados em ninhadas de 6 filhotes/mãe (Controle-C) ou 3 filhotes/mãe (Hipernutrido - H). Foram formados 4 grupos: C+AG (CAG), C+AL (CAL), H+AG (HAG) e H+AL (HAL). O peso corporal (p) da prole foi verificado aos 7, 14, 21, 30 e 60 d de vida. Aos 60 d, os animais foram submetidos ao teste do LCE. Os resultados indicaram que o AL afetou o peso aos 60 d enquanto a H afetou o peso do 14° até o 30° d em relação aos respectivos C. No LCE, os animais HAG apresentaram maior frequência de entradas nos BA em relação aos CAG. No entanto, os animais do grupo CAL exploraram mais o segmento do BA do que o CAG. Em relação ao tempo gasto nos BA, o grupo HAG permaneceu mais tempo em relação ao grupo CAG. Os dados confirmam a ação ansiolítica do AL nos animais C e sugerem uma ação ansiogênica da hipernutrição.

Palavras-chave: Ansiedade, álcool, hipernutrição, labirinto em cruz elevado, ratos.

¹Graduação em Psicologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

²Graduação em nutrição pela Universidade Federal de Pernambuco.

³Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50670-901, Brazil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 8121268470; Fax +55 8121268473.

E-mail: apmelo@ufpe.br (A.P. Rocha-de-Melo).

ABSTRACT

Elevated Plus Maze (EPM) was used to evaluate anxiety in rats submitted to alcohol (AL) intake and overnutrition (H) during lactation. Ethanol 50% (3ml/Kg/day) or water (W) was administered at the same volume to the dams and pups were fed in litters of 6 pups/dam (Control-C) or 3 pups/dam (overnourished-H). There were 4 groups: C+W (CW), C+AL (CAL), H+W (HW) and H+AL (HAL). Pups body weight (bw) was obtained at 7,14,21,30 and 60 days of life (d). At 60 d, rats were submitted to the EPM test. Results indicated that the AL affected bw at 60 d and H from 14° to 30° d when compared to the respective C. At EPM test, HW animals showed the higher entrance frequency at the open arms (OA) than the CW group. However, CAL animals spent more time at the OA than the CW. Data confirm AL anxiolytic action in C animals and suggest anxiogenic action of the overnutrition.

Keywords: Anxiety, Alcohol, overnutrition, Elevated Plus Maze, rats.

INTRODUÇÃO

Ansiedade é uma sensação natural que existe em todos os seres humanos e de extrema importância para a sobrevivência. Pode ser definida como um estado subjetivo de apreensão ou tensão, induzida pela expectativa de perigo e frequentemente acompanhada por um ou mais sintomas como taquicardia, aumento da pressão arterial, medo, transpiração entre outros. Dependendo de sua intensidade ou duração torna-se patológica, podendo interferir no aprendizado pela redução da atenção e da memória³.

Um modelo bastante utilizado para estudar a ansiedade em animais de laboratório é o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), consiste num labirinto em dois braços abertos e dois braços fechados os quatro braços estão dispostos em cruz unidos por uma área central. Por ser um modelo não condicionado, é baseado em comportamentos espontâneos do animal¹⁴.

Para combater a ansiedade, o álcool etílico ou etanol, componente essencial de numerosas bebidas de consumo popular, é utilizado com frequência por indivíduos ansiosos como forma de recompensa¹⁵. O consumo de bebidas alcoólicas é maior na população jovem do sexo masculino, porém em mulheres jovens, o consumo de álcool torna-se ainda mais preocupante quando coincide

com o período reprodutivo. Inicialmente, o álcool produz no organismo um estado de euforia e desinibição, para em seguida promover um efeito depressivo sobre o sistema nervoso. A intensidade dos efeitos varia, portanto, de acordo com a quantidade ingerida e acumulada pelo organismo. A partir de uma concentração de 0,5 g de álcool por litro de sangue, o indivíduo começa a se sentir relaxado e tranqüilo. Quando a concentração atinge entre 0,5 g e 1,5 g/l/sangue os reflexos e a coordenação motora diminuem, surgindo os primeiros sinais de embriaguês. Similarmente ao álcool, alguns fármacos utilizados no tratamento de ansiedade, como os benzodiazepínicos, produzem efeitos semelhantes¹¹.

O consumo de álcool durante a gestação produz efeitos severos, uma vez que o álcool consumido pela gestante atravessa à placenta, deixando o feto exposto às mesmas concentrações de álcool do sangue materno. No entanto, a consequência para o feto é mais severa, pois o metabolismo e a eliminação do álcool são mais lentos, ficando o feto exposto por um período maior⁴. O grau em que as crianças são afetadas não depende apenas da quantidade do álcool ingerido pela mãe, mas também do período da gestação em que houve o consumo materno²². Quando o consumo de álcool ocorre no período de lactação, o resultado é uma diminuição no volume do leite,

bem como no tempo de amamentação. Quando isto ocorre, a nutrição da criança pode ser prejudicada e graves repercussões em sua saúde poderão eclodir⁵.

Uma nutrição adequada no início da vida é um fator essencial para a formação do Sistema Nervoso Central (SNC), sua organização funcional e para o bom desenvolvimento do organismo como um todo. Um déficit nutricional causado por excesso, diminuição ou ausência de nutrientes pode resultar em alterações morfológicas, neuroquímicas, como também comportamentais^{2, 19}. O excesso de peso entre crianças e adolescentes tem aumentado assustadoramente nos países industrializados e, em geral, está associado com o comprometimento da saúde tanto a curto como a longo prazo¹³.

Em animais de laboratório, a hipernutrição pode ser imposta durante o período de lactação através do modelo de redução do tamanho da ninhada. A técnica consiste em manter 3 filhotes/mãe e assim promover um aumento da oferta do leite materno com conseqüente sobrepeso dos filhotes^{23, 24}. Animais hipernutridos preçõ-cemente sofrem alterações sistêmicas como hipoinsulinemia, hiperglicemia e aumento dos lipídios plasmáticos, bem como alterações da expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos^{17, 18}.

Neste trabalho, serão investigados os efeitos da associação do consumo de álcool com a hipernutrição sobre o comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (LCE), como uma forma de avaliar o nível de ansiedade em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar provenientes de mães que durante a lactação receberam administração de etanol a 50% (Vetec) na concentração de 3ml/kg/dia ou água destilada no mesmo volume. O etanol e a água foram administrados por gavagem nas ratas lactantes do 2º ao 20º dia do aleitamento.

Além da administração de álcool nas mães, manipulou-se também o estado nutricional dos

filhotes, segundo a técnica da redução da ninhada. Esta técnica consiste em manter as ninhadas com 3 animais/mãe durante a lactação, o que leva ao aumento do peso dos filhotes. Os animais obtidos dessas ninhadas foram considerados hipernutridos em relação aos controles (6 animais/ninhada)²³. Assim, do ponto de vista nutricional, foram obtidos dois grupos: controle (C) e hipernutrido (H), nos quais foi mantida a proporção de 2 machos para 1 fêmea. Somando-se todas as condições experimentais foram obtidos quatro grupos: Controle+Água (CAG; n =12), Controle+Álcool (CAL; n=13), Hipernutrido+Água (HAG; n=10) e Hipernutrido+Álcool (HAL; n=9).

Aos 21 dias, os filhotes foram desmamados e partir desse momento apenas os machos passaram a ser utilizados no trabalho. Após o desmame, os animais foram mantidos em gaiolas de plástico (3 ratos/gaiola) e passaram a receber a dieta padrão do biotério Labina (Agribands Purina do Brasil Ltda) e água "ad libitum". Os animais foram pesados no primeiro dia após o nascimento e aos 7, 14, 21, 30 e 60 dias de vida.

As condições de temperatura (24º) e iluminação (ciclo claro escuro com duração de 12 horas) do biotério do Departamento de Nutrição atendiam às normas estabelecidas para o cuidado de animais de laboratório segundo o US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

O teste comportamental foi realizado no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). O aparelho utilizado neste trabalho foi construído em madeira e era constituído de dois braços abertos (50 x 10 cm), perpendiculares a dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), elevados a uma altura de 50 cm do piso, como descrito por Pellow et al (1985). Nas laterais dos braços abertos foi adaptada uma faixa de acrílico, com uma saliência de 1,0 cm acima da base de madeira para evitar a queda do animal. O labirinto foi colocado em uma sala iluminada com uma luz vermelha de 40W.

O teste do LCE foi realizado sempre no período da manhã e tinha uma duração de 5

minutos/animal. Aos 60 dias de idade, um animal de cada grupo experimental era colocado no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Ao final de cada sessão do teste, o animal era retirado e o labirinto era higienizado com solução de álcool a 10% para remover qualquer pista olfativa para o animal que era colocado subsequentemente. As sessões foram filmadas por uma câmara de alta sensibilidade conectada a um computador provido de placa de vídeo e software (X-Plot-Rat 2005) para posterior análise das seguintes categorias comportamentais: número de entradas nos braços abertos (BA); número de entradas nos braços fechados (BF); tempo gasto nos braços abertos.

Os resultados foram avaliados utilizando uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores e quando apropriado foi usado o teste *post-hoc* de

Tukey. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peso Corporal

A análise do peso corporal dos filhotes mostrou um efeito significativo do fator nutrição aos 14, 21, 28 e 35 dias de idade. Os filhotes hipernutridos apresentaram um maior ganho de peso a partir do décimo quarto dia até o trigésimo dia de vida quando comparados com os animais controles. Em relação ao efeito do fator álcool, os animais dos grupos cujas mães receberam o álcool apresentaram o peso significativamente superior aos 60 dias de idade em relação aos animais tratados com água (Figura 01).

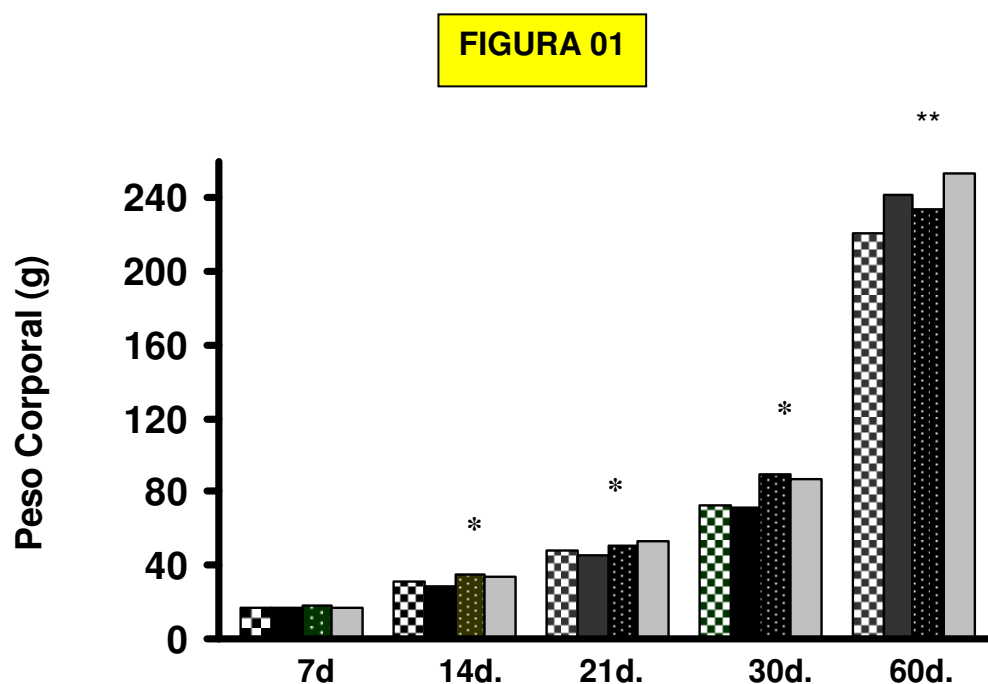


FIGURA 1- Pesos corporais dos animais do sétimo dia até o sexagésimo dia de vida. Cada barra representa à média \pm DP; CAG= animais controle cujas mães receberam água (n=12; barras quadrados pretos); CAL= animais controle cujas mães receberam álcool (n=13; barras pretas); HAG= animais hipernutridos cujas mães receberam água (n=10; barras bolinhas brancas); HAL= animais hipernutridos cujas mães receberam álcool (n=9; barras cinza). * $p < 0.05$ comparado com o grupo controle; ** $p < 0.05$ comparado com o grupo CAL.

Medidas comportamentais

Como ilustrado na Figura 2, os animais do grupo HAG apresentaram um aumento no número de entradas nos braços abertos em relação ao grupo CAG mostrando um efeito significativo do

fator hipernutrição ($p < 0,001$). Um efeito significativo do álcool foi observado no grupo controle. Os animais do grupo CAL apresentaram um aumento significativo do número de entrada nos braços abertos quando comparados com o grupo CAG ($p < 0,05$).

FIGURA 02

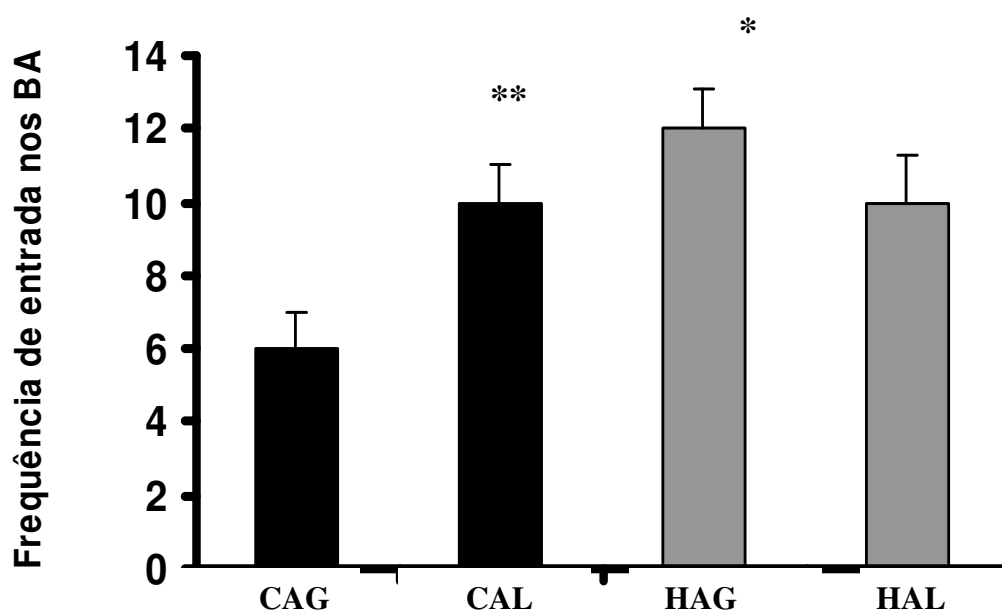


FIGURA 2- Números de entradas nos braços abertos. Cada barra representa a média \pm DP. Animais controle (barras pretas) e hipernutridos (barras cinzas). CAG= animais controle cujas mães receberam água ($n=12$); CAL= animais controle cujas mães receberam álcool ($n=13$); HAG= animais hipernutridos cujas mães receberam água ($n=10$); HAL= animais hipernutridos cujas mães receberam álcool ($n=9$). * $p < 0,05$ comparado com o grupo CAG; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo CAL.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto ao número de entradas nos braços fechados.

Em relação ao tempo gasto nos braços abertos foi observado efeito significativo do fator nutrição. O grupo HAG permaneceu mais tempo

explorando este segmento do que o grupo CAG ($p < 0,05$) (Figura 3)

Em relação ao tempo despendido nos braços fechados não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

FIGURA 03

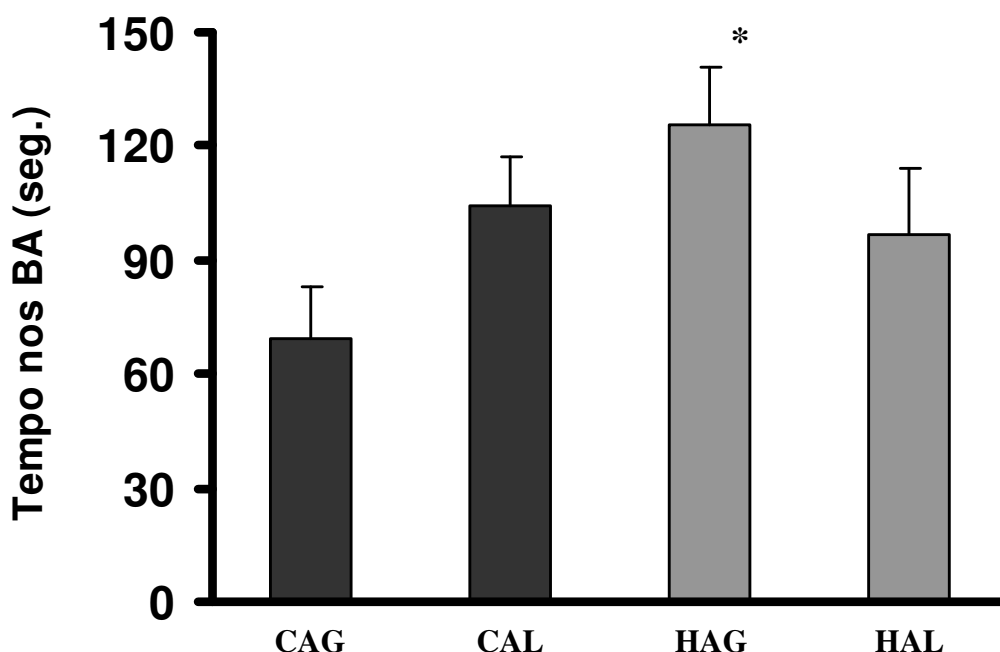


FIGURA 3- Tempo de exploração nos braços abertos. Cada barra representa à média \pm DP. Animais controle (barras pretas) e hipernutridos (barras cinzas). CAG= animais controle cujas mães receberam água (n=12); CAL= animais controle cujas mães receberam álcool (n=13); HAG= animais hipernutridos cujas mães receberam água (n=10); HAL= animais hipernutridos cujas mães receberam álcool (n=9). * $p < 0.05$ comparado com o grupo CAG.

DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a manipulação nutricional produziu um aumento significativo no ganho ponderal, o que corrobora achados anteriores^{23, 24}. Em relação aos animais cujas mães foram tratadas com álcool apresentaram um ganho significativo na massa corporal aos 60 dias de vida. Estes resultados indicam que o álcool produziu alterações no crescimento corporal que repercutiu apenas na vida adulta. Contudo, estes resultados contradizem os achados de Neves et al. (1995) que demonstraram que o consumo de álcool na lactação, mesmo numa concentração baixa e por um pequeno período, é capaz de reduzir o peso corporal da prole devido a diminuição do volume de leite materno, como também redução do conteúdo lipídico do mesmo.

A hipernutrição aumentou o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos. Esta observação sugere que os animais hipernutridos apresentaram um menor comportamento ansioso quando expostos a situações aversivas brandas ou pouco intensas. Sabe-se que a redução no tamanho da ninhada promove melhora na interação mãe-filhote²⁰. No presente estudo, este fator pareceu influenciar o comportamento dos filhotes na vida adulta, fazendo-os lidar melhor com suas emoções ao apresentarem-se menos ansiosos quando submetidos ao teste do LCE⁷.

Do mesmo modo, o aumento no número de entradas nos braços abertos observado no grupo CAL sugere que o álcool, de fato, reduz a ansiedade, porém quando associado ao fator nutrição este efeito desaparece.

Greff (2003) em seu modelo teórico demonstrou o envolvimento da serotonina (5HT) na modulação da ansiedade. A 5HT exerce efeito ansiogênico na amígdala e ansiolítico na matéria cinzenta periaquedutal. Estudos utilizando a aplicação de um antagonista dos receptores 5HT₂ (RP62203) na porção basolateral da amígdala observaram um aumento nas porcentagens de entrada e no tempo gasto nos braços abertos indicando uma redução do nível de ansiedade.

Vários estudos têm mostrado uma relação dos efeitos da ingestão alcoólica aguda ou crônica e com o funcionamento do sistema serotoninérgico. Vasconcelos et al. (2003) observaram que o tratamento com álcool por 7 dias diminui a concentração serotonina (5HT) no cérebro de ratos. Por outro lado, alguns estudos encontraram que a ingestão aguda de etanol aumenta o nível de 5HT cerebral. Isto sugere que o etanol produz um aumento transitório da atividade serotoninérgica ¹².

A compreensão dos mecanismos através dos quais o álcool modula a ansiedade ainda não estão completamente esclarecidos. Além disso, deve-se levar em consideração que a resposta neuroquímica ao etanol depende de vários fatores, dentre eles a espécie, a linhagem e o sexo do animal, bem como a dose, a duração do tratamento e estado nutricional.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco/ FACEPE e ao Dr. Edeones França (Biotério do Depto. de Nutrição/UFPE).

REFERÊNCIAS

1. Almeida, SS, Françolin-Silva, AL. The interaction of housing condition and acute immobilization stress on the elevated plus-maze behaviors of protein-malnourished rats. *Braz J of Med Biol Res*, 2004; 37: 1035 -1042.
2. Austin KB, Beiswanger C, Bronzino JD, Austin-Lafrance RJ, Galler JR, Morgane PJ. Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. *Brain Res Bull*. 1992 Feb; 28(2):245-55.
3. Brandão, M.L. Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento. Ed. Editora Atheneu. São Paulo, 2001, p.245.
4. Chaudhuri, JD. Alcohol and developing fetus: a review. *Med Sci Monit.*, 2000; 6(5):1031-1041.
5. Chaves, RG, Lamounier, JA, César, CC. Factors associated with duration of breastfeeding. *Jornal de Pediatria*, 2007; 83(3):241-246.
6. Dratcu, L, Lader, M. Ansiedade - conceito, classificação e biologia: uma interpretação contemporânea da literatura. *J Bras. de Psiquiatria*; 1993; 42(1): 19-32.
7. Egan, O, Royce, JR. Litter size and emotionality in two strains of mice. *J Comp Physiol Psychol*, 1973; 82:55-59.
8. Fioretim, CF, Vargas, D. O uso de álcool entre gestantes e seu conhecimento sobre os efeitos do álcool no feto, *Revista eletrônica saúde mental, álcool e drogas*, 2006; 2:1-13.
9. Freire, TM, Machado, JC, Melo, EV, Melo, DG. Efeitos do consumo de bebida alcoólica pelo feto. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 2005; 27 (7): 376-381
10. Godoy, MM, Lopes, RA, Sala, MA, Vinha, D, Regalo, SCH. Acción del etanol sobre el epitelio nasal y glándulas septales de ratas, durante la lactancia. *Int J Morphol*, 2005; 23(4):293-300.
11. Graeff, FG, Guimarães, FS. Fundamentos de Psicofarmacologia. 1º Ed. Editora Atheneu. São Paulo, 2001. p.1603.
12. LeMarquand D, Pihl RO, Benkelfat C. Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. *Biol Psychiatry*. 1994; 15;36(6):395-421.

13. Luiz, AMAG, Gorayeb R, Liberatore, RDR, Domingos, NAM. Depressão, ansiedade e competência social em crianças obesas. *Estudos de Psicologia*, 2005; 10(1):35-39.
14. 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. *J of Neurosci Methods*, 1985; 14: 451-454.
15. Pereira, MO. Transtorno de ansiedade, dependência a álcool e benzodiazepínicos: comorbidade e aspectos clínicos em comum. *J Bras. Psiquiatria*; 1991; 40(1): 65-68.
16. Pinheiro, GA, Alves, SHS, Murce, PP, Mello-Cruz, AP. Envolvimento dos receptores 5HT₂ da amígdala nos níveis de ansiedade induzidos pela exposição de ratos ao labirinto em cruz elevado. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 2002; 18(3):329-335.
17. Plagemann, A, Rake, A, Melchior, K, Rohde, W., Dorner, G. Reduction of cholecystokinin – 8s – neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weaning rats. *Neurosci. Letters*, 1998; 258: 13-16.
18. Plagemann, A, Harder, T, Rake, A, Voits, M, Fink, H, Rohde, W, Dorner, G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaminergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res*, 1999; 836:146-155.
19. Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002 Jun; 26(4):471-83.
20. Moriceau S, Sullivan RM. Neurobiology of infant attachment. *Dev Psychobiol*. 2005;47(3): 230-42
21. Neves, J, Faccin, GL; Tavares-do-Carmo, MG Efeito da ingestão de álcool durante a lactação sobre a produção e composição do leite materno e sobre o crescimento da prole: estudo em ratas. *Rev Nutr PUCCAMP*; 1995; 8(1): 65-82.
22. Ribeiro, EM, Gonzalez, CH. Síndrome alcoólica fetal: Revisão. *Pediatrics*, 1995; 17(1):48-56.
23. Rocha-de-Melo, AP, Picanço-Diniz, CW, BORBA, JMC, Santos-Monteiro, J., Guedes, RCA. NADPH-diaphorase Histochemical Labeling Patterns in the Hippocampal Neuropil and Visual Cortical Neurons in Weaned Rats Reared during Lactation on Different Litter Sizes. *Nutri Neurosci*, 2004; 7 (4): 207–216.
24. Rocha-de-Melo, AP, Cavalcanti, JB, Barros, AS, Guedes, RCA. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutri Neurosci*, 2006; 9(3/4):155-160.
25. Viana, GSB, Vasconcelos, SMM, Macêdo, DS, Lima, LO, Sousa, FCF, Fonteles, MMF. Effect of one-week ethanol treatment on monoamine levels and dopaminergic receptors in rat striatum. *Braz J of Med and Biol Res*. 2003; 36:503-509.