

5

Materiais e Métodos

Para atender aos objetivos propostos, foi utilizado o modelo animal como comparativo para o entendimento dos mesmos processos na população humana, com vistas à possibilidade de maior rigor científico junto à população de animais (Landeira-Fernandez e Cruz, 1998; Landeira-Fernandez e Cruz, 2007 in Landeira-Fernandez e Silva, 2007).

O desenho adotado nesta investigação foi o experimental, onde, neste caso, animais (Almeida et al., 2006; Landeira-Fernandez et al., 2006; Landeira-Fernandez et al., 2008) foram submetidos a experiências iniciais negativas (privação de contato materno) e/ou positivas (estimulação, manipulação do experimentador, aumento do contato e do cuidado materno, etc.) e posteriormente foram alvo de avaliação comportamental, na vida adulta (Francis et al., 1999; Kaufman, 2000; Gartside, 2003; Neumann et al., 2005; Lippmann et al., 2007; Aisa et al., 2008). A avaliação comportamental valeu-se do paradigma de LCE, já descrito anteriormente.

5.1

Animais

Para esta pesquisa, foram utilizados ratos (*ratus norvegicus*) Wistar provenientes de cruzamentos realizados do Laboratório de Neurociências da PUC-Rio.

No nascimento, as ninhadas foram reduzidas a oito animais por rata-mãe, sendo seis machos e duas fêmeas. As ninhadas foram designadas aleatoriamente a um dos grupos abaixo, representando as diferentes Condições Ambientais:

- H = *Handling* (manipulados) – filhotes que receberam a manipulação durante 3 minutos cada, diariamente (totalizando uma breve separação materna de 24 minutos);
- MS = *Maternal Separation* (separação materna) – filhotes separados de suas mães por 180 minutos, diariamente;
- HMS = *Handling + Maternal Separation* – animais manipulados por 3 minutos cada e, após todos terem sido manipulados, mantidos separados das mães por mais 180 minutos.
- C = Controle – filhotes mantidos todo o tempo com a ninhada e a rata-mãe, manipulados somente uma vez por semana para pesagem e limpeza da gaiola; e
- CH = Controle do *Handling* – filhotes que não foram manipulados, mas que foram separados das mães por 24 minutos (tempo de duração do procedimento de *handling*).

Todas as manipulações (*handling* e separação materna) foram sempre executadas no período diurno (entre 8h00 e 12h00).

Os filhotes destas ninhadas foram divididos em três subgrupos, testados independentemente aos 21, 50 e 70 dias de idade. Para avaliação dos animais foram utilizados 2 filhotes machos de cada ninhada formada para cada idade (2 filhotes avaliados aos 21 dias, 2 aos 50 e 2 aos 70) a fim de evitar efeitos de fatores genéticos sobre o comportamento desses filhotes no mesmo grupo experimental.

Todos os filhotes machos foram mantidos em conjunto até os 70 dias de idade para evitar alterações na condição de alojamento. As fêmeas foram utilizadas em cruzamentos para outros experimentos do laboratório.

Exemplo de divisão dos grupos, para que todos os animais machos da ninhada fossem utilizados:

- Controle = C
 - 6 machos
 - 2 machos testados aos 21 dias (C21)
 - 2 testados aos 50 dias (C50)
 - 2 testados aos 70 dias (C70)

Na Figura 4 podem ser observados os diferentes grupos da pesquisa, assim como as possibilidades de análise comparativa das diferenças diretas entre os mesmos (linhas conectoras). As linhas conectoras horizontais indicam a avaliação entre animais da mesma idade, porém de diferentes grupos experimentais. As linhas verticais representam a comparação dentro de um mesmo grupo experimental, avaliados em idades diferentes.

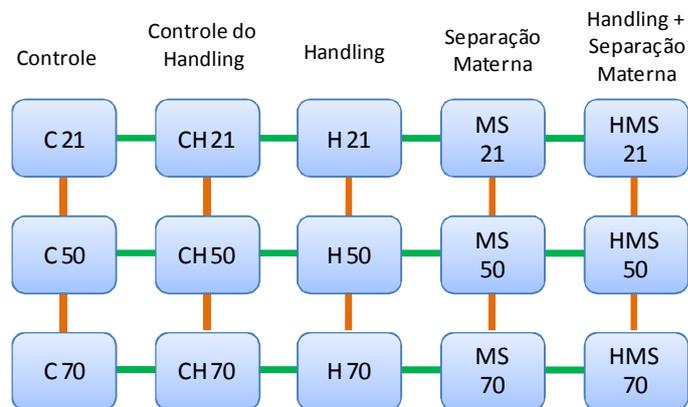


Figura 4 – Composição dos 15 Grupos pela combinação entre as Condições Ambientais e as Idades de avaliação no LCE.

5.2

Instrumentos

5.2.1. Manutenção dos animais

5.2.1.1. Cruzamento e Lactação

Durante o cruzamento, a lactação e até o dia das sessões dos testes comportamentais, os animais foram mantidos em caixas de Polipropileno (41x34x16 cm), com grade superior e garrafa d' água disponível (Figura 5).



Figura 5 – Caixa de Polipropileno usada para acondicionar os animais.

5.2.1.2. Manipulação e Separação Materna

Para a manipulação dos filhotes e separação das ninhadas da rata-mãe, foram usadas caixas de Polipropileno (30x19x13cm). Foram também utilizados algodão, lâmpadas (para manter aquecidos os filhotes que estavam sendo manipulados ou separados das ratas-mães) e termômetro para o controle da temperatura em torno de 25 graus Celsius.

5.2.2. Medida comportamental

Para a avaliação comportamental, foi utilizado o Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

O LCE (ilustrado na Figura 6) do LANEC (Laboratório de Neurociência Comportamental) da PUC-Rio é feito de madeira e disposto a uma altura de 50 cm do chão; apresenta 4 braços dispostos em cruz, sendo 2 abertos (BA) e 2 fechados (BF) por paredes com 50cm de altura. Como citado anteriormente, o LCE é um modelo naturalístico de ansiedade animal que se baseia no comportamento exploratório espontâneo, sendo largamente utilizado para investigar a emocionalidade em ratos.



Figura 6 – Ilustração do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

5.3

Procedimentos

As manipulações foram realizadas desde o período neonatal até o fim da lactação (0-21 dias de idade); a avaliação comportamental foi efetuada nas idades de 21, 50 e 70 (± 1) dias (adulto jovem).

5.3.1. Cuidados com os animais:

As manipulações são de dois tipos: *handling* (manuseio) e *maternal separation* (separação materna).

a) *Handling* - Manipulações gentis e repetidas no dorso do animal – da cabeça para a cauda (Figura 7); realizadas do nascimento ao 21º dia de vida, diariamente, por 3 min em cada animal; procedimento positivo (Plostky & Meaney, 1993; Riul et al., 1998; McIntosh et al., 1999; Neumann et al., 2005; Aisa et al., 2007).



Figura 7 - Procedimento de *Handling*; os dois momentos indicam a direção da manipulação cabeça-cauda. Foto no LANEK – Laboratório de Neurociência Comportamental. Acervo pessoal.

b) *Maternal Separation* - Consiste em separar os filhotes da mãe (mas não de seus irmãos); feito do nascimento ao 14º dia de vida, diariamente, por 180 min (3 horas); adotado como um procedimento negativo (Ladd et al., 1996 e Plostky & Meaney, 1993 in Kaufman et al., 2000; Gartside et al., 2003; Ladd et al., 2005; Neumann et al., 2005; Aisa et al., 2007, 2008; Lee et al., 2007; Rees et al., 2008) – vide Figura 8, abaixo.



Figura 8 - Procedimento de separação materna. Observe a luminária usada para aquecer e o termômetro, para controle da temperatura. Foto no LANEK – Laboratório de Neurociência Comportamental. Acervo pessoal.

5.3.2. Avaliação Comportamental

Os animais foram testados aos 21, 50 ou 70 (± 1) dias. A testagem consistiu na colocação do animal com a cabeça voltada para um dos BF do LCE para livre exploração do aparato por 5 minutos.



Figura 9 – Rato explorando o LCE. Foto no LANEC – Laboratório de Neurociência Comportamental. Acervo pessoal.

Todas as sessões de vídeos foram gravadas para posterior avaliação das seguintes categorias comportamentais (vide Tabela 1), de acordo com a literatura (Cruz et al., 1994; Roy & Chapillon, 2004):

- Número de entradas e saídas de braços;
- Tempo de permanência no centro (quadrado central – vide Figuras 9 e 10) do LCE – tempo total de exploração do LCE enquanto no centro do mesmo.
- Porcentagem de entradas em braços abertos (divide-se o número de entradas em BA pelo número total de entradas – BA + BF);
- Porcentagem de tempo em braços abertos (divide-se o tempo total de exploração dos BA por 5 minutos, que é o tempo total de exploração do aparato); e
- Exploração de extremidades de braços abertos.



Figura 10 - Detalhe do Centro do LCE. Foto no LANEC – Laboratório de Neurociência Comportamental. Acervo pessoal.

Tabela 1 - Categorias comportamentais analisadas e suas definições.

Categoria Comportamental	Definição
BA	Entrada em BA (considerada pela entrada com as 4 patas)
BF	Entrada em BF
Total	Soma das entradas em BA e em BF
Porcentagem de BA (Porc_BA)	Divisão do número de entradas em BA pelo número total de entradas
Tempo Centro (T_Centro)	Tempo de exploração na plataforma central
Tempo BA (T_BA)	Tempo de permanência em BA
Tempo BF (T_BF)	Tempo de permanência em BF
Porcentagem de Tempo em BA (Porc_T_BA)	Divisão do Tempo BA pelo tempo total de exploração do aparato
End-exploration (End_expl)	Frequência de visitas às extremidades (último quarto) dos BA