

8

Discussão

Uma série de trabalhos aponta os efeitos de manipulações realizadas durante fases iniciais do desenvolvimento, como no período da lactação, por exemplo, na emocionalidade e em outras funções cognitivas; porém há ainda insuficiente informação sobre como esses efeitos podem interagir de acordo com diferentes períodos do desenvolvimento (Rocinho e Landeira-Fernandez, 2010).

Neste sentido, para esta pesquisa, foi pensado um desenho experimental que desse conta de investigar esta interação com a idade, ao menos nas primeiras 10 semanas de vida dos animais. As análises realizadas dentro de cada uma das cinco Condições Ambientais e as que investigaram os efeitos de interação puderam mostrar diferenças comportamentais, como foi visto na seção anterior e será mais detalhadamente interpretado e discutido a seguir, com comentários sobre os resultados obtidos nas diferentes análises realizadas.

8.1

Resultados por Análise efetuada

a) Análises em função da Condição Ambiental, fixadas as idades de avaliação no LCE:

a.1) Gupos C21 x CH21 x H21 x HMS21 x MS21

O Grupo C21 despendeu significativamente menos tempo explorando os BA do que os Grupos H21 e HMS21, representando comportamento mais indicativo de ansiedade, quando evita os BA. Já o Grupo MS21 apresentou significativa diferença em relação aos Grupos H21 e HMS21, passando menos tempo que eles nos BA; entretanto, não apresentou diferença significativa em relação ao Grupo C21, embora tenha explorado menos os braços abertos do Labirinto. Outra diferença encontrada foi entre os Grupos CH21 e HMS21, onde o segundo explorou mais o BA que o primeiro.

O Grupo C21 passou mais tempo explorando os BF que os Grupos H21 e HMS21 (em relação a este último, $p=0,066$); a diferença em relação ao grupo MS21 não foi significativa. O Grupo MS21 explorou por mais tempo os BF que os Grupos H21 e HMS21, indicando que a manipulação (*handling*) foi capaz de alterar esta medida comportamental, mesmo que, em relação ao Grupo HMS21, tenha havido também separação materna.

O Grupo C21 apresentou menos tempo relativo de permanência em BA que os Grupos H21 e HMS21. Mais uma vez, não houve diferença significativa em relação aos animais do Grupo MS21. O Grupo HMS21 apresentou diferença significativa em relação a todos os outros, em exceção ao Grupo H21, passando mais tempo relativo nos BA. O Grupo MS21 passou menos tempo relativo nos BA que os Grupos H21 e HMS21.

Aos 21 dias, não houve diferença entre os grupos CH e H. Isto pode significar que o fato de ter recebido o procedimento de *handling* não promoveu alterações comportamentais em comparação com o simples fato de ter sido manipulado na lactação, sem que se tenha recebido o procedimento. No entanto, nas categorias comportamentais indicativas de menor ansiedade, este Grupo (CH), não se mostrou diferente do Grupo C, nas avaliações por Grupo levando em conta a sessão integral.

De um modo geral, os resultados relativos aos Grupos H21 e HMS21 indicam que o *handling* foi capaz de alterar esta medida comportamental relacionada com a ansiedade (Plotsky e Meaney, 1993): animais menos ansiosos (pelo conflito causado por este aparato naturalístico) tendem a explorar mais os BA, seja em termos absolutos ou relativos.

Este resultado está coerente com o encontrado em muitos estudos anteriores, especialmente os que se referem aos elevados níveis de comportamento exploratório em novos ambientes, com menor ansiedade (Ruil et al. 1999; Diamond 2001; Beaney et al. 2002; Cirulli et al. 2010).

a.2) Grupos C50 x CH50 x H50 x HMS50 x MS 50

Não houve diferença significativa entre os Grupos, avaliados com 50 dias de vida através de uma ANOVA de uma via. Em virtude de os Gráficos (Figuras 10a, b, c) referentes aos animais de 50 dias mostrarem desenhos gráficos indicativos de uma tendência – no que tange especificamente a medida Porcentagem de Tempo de BA –, estas análises foram refeitas por ANOVAS de duas vias, buscando a investigação da interação entre os fatores manuseio, separação materna e idade, como será visto em momento posterior desta Discussão.

a.3) Grupos C70 x CH70 x H70 x HMS70 x MS 70

Não houve diferença significativa entre os Grupos, avaliados com 70 dias de vida.

Comparando as análises “a.1” e “a.3” as diferenças percebidas aos 21 dias não se mantiveram ao longo do tempo, indicando que as manipulações efetuadas na lactação não configuraram um efeito de longo prazo no comportamento emocional destes ratos.

Esta informação é bastante relevante quando a proposta deste trabalho é avaliar uma forma de Modelagem Animal para o estudo das influências que as experiências infantis podem exercer sobre a emocionalidade na vida adulta. No modelo animal aplicado, pareceu haver um efeito apenas inicial (nas idades tenras), que diminuiu ao longo do tempo, cessadas as manipulações. Como os ratos são avaliados apenas com 50 e 70 dias, não foi possível, neste trabalho, observar exatamente quando as experiências iniciais deixaram de influenciar o comportamento.

Aqui é importante mencionar que numa análise clínica com seres humanos jovens e adultos é bastante explícito que as experiências emocionais, sejam elas positivas (como suporte social, estabelecimento de apego seguro, estimulação ambiental) ou negativas (abuso, negligência, entre outras) não cessam após o término da primeira infância. Se isto ocorrer, em raros casos se dá de forma estanque e repentina, como é o que acontece neste desenho experimental.

A influência mais forte das experiências iniciais na emotividade de seres humanos, como amplamente apresentado nesta Dissertação, do que a percebida através dos dados deste trabalho com animais (roedores) demonstra a grande complexidade do aparato cognitivo-emocional humano, que não pode ser completamente modelado.

b) Análises em função da Idade, dentro de cada Condição Ambiental:

b.1) Grupo C: Grupos C21 x C50 x C70

Foi observada uma tendência de variação entre os ratos Controle de diferentes idades quanto ao BA (número absoluto e relativo de entradas, tempo de permanência, absoluto e relativo), porém sem significância estatística (talvez pelo número pequeno do n neste grupo). Esta tendência pode também ser explicada pelo resultado da análise por Idade, independente do grupo experimental (ver análise no item d.1, na seção Resultados).

b.2.) Grupo CH: Grupos CH21 x CH50 x CH70

O comportamento dos ratos do Grupo CH pode estar refletindo apenas a maior ativação motora de ratos jovens e sua posição em relação aos BA, o que pode ser visualizado na análise por Idade.

b.3) Grupo H: Grupos H21 x H50 x H70

O Grupo H não apresentou diferença significativa ao longo do tempo.

b.4) Grupo HMS: Grupos HMS21 x HMS50 x HMS70

Sem diferenças significativas para o Grupo HMS em diferentes idades.

b.5) Grupo MS: Grupos MS21 x MS50 x MS70

As diferenças significativas encontradas no Grupo MS podem estar traduzindo o comportamento de ratos de diferentes idades. Porém, como essas diferenças não foram encontradas nos Grupos H e HMS, podemos sugerir que o *handling* foi capaz de mediar a influência da idade: em ratos de todos os grupos, analisados por Idade, os mais jovens tiveram uma tendência maior a evitar os BA e preferir os BF, comportando-se de maneira díspare em relação aos mais velhos, e esta diferença entre idades não foi confirmada para os grupos que receberam a manipulação *handling*. Esta sugestão deve ser investigada em estudos futuros, para que seja ou não refutada.

c) Análises por Condição Ambiental (sem que se separassem em diferentes idades de avaliação no LCE)

c.1) Grupos C x CH x H x HMS x MS

O Grupo C despendeu significativamente menos tempo (absoluto e relativo) explorando os BA do que os Grupos H e HMS, representando comportamento mais indicativo de ansiedade, quando evita os BA. Já o Grupo MS apresentou significativa diferença em relação aos Grupos H e HMS, passando menos tempo (absoluto e relativo) que eles nos BA. Este dado pode traduzir uma possível redução da ansiedade provocada pela manipulação recebida pelos animais H e HMS no período de lactação. Ao mesmo tempo, como não houve diferença significativa na comparação dos Grupos C e MS, podemos inferir que o procedimento de separação materna não foi capaz de modelar uma experiência aversiva na infância que pudesse elevar os níveis de ansiedade.

Esta observação é também de suma importância para este estudo. A relevância clínica da investigação das experiências infantis negativas (como o abuso, a negligência e o estabelecimento de vínculos inseguros) está em saber de que maneira elas alteram a emocionalidade, levando ao desenvolvimento de

doenças mentais. O protocolo de separação materna utilizado neste estudo não mostrou grande validade na tentativa de construção de um modelo animal para representar a influência de experiências negativas no comportamento emocional. Este resultado está de acordo com a literatura, que aponta existirem muitos modelos diferentes de separação materna e, além disso, muitos resultados incoerentes entre os trabalhos efetuados usando este paradigma (Lehman e Feldon, 2000).

Podemos atentar para a comparação, nas categorias referentes aos BA, entre os Grupos MS e HMS, onde o procedimento de *handling* foi capaz de alterar respostas emocionais de ratos avaliados no LCE. Os grupos HMS exploraram mais os BA que os ratos MS, indicando que o *handling* alterou medidas relacionadas à ansiedade (Ruil et al. 1999; Diamond 2001; Beaney et al. 2002; Cirulli et al. 2010).

Os animais do Grupo C passaram mais tempo que os do H e HMS nos BF. O Grupo MS diferiu dos ratos dos Grupos H e HMS, que apresentaram menor tempo de permanência no BF que os ratos MS, porém sem diferença entre si. Estes dados apontam no sentido de que o *handling* também foi capaz de alterar medidas de locomoção, quando realizada esta análise entre todos os animais das cinco Condições Ambientais, independente da idade de avaliação no LCE. Sabe-se, entretanto, que é importante que se façam análises de interação, o que foi atendido pela análise “e”, apresentada em momento posterior.

d) Análises por Idade (sem que se separassem em Condições Ambientais)

d.1) Idades 21 dias x 50 dias x 70 dias

Os resultados em BA e BF indicam que o LCE foi mais aversivo para os ratos mais jovens. Os ratos avaliados no Labirinto aos 21 dias passaram menos tempo relativo nos BA que os Grupos 50 e 70 dias, não havendo, porém, diferença entre estes. Esta medida vai ao encontro das anteriores, apontando que os ratos mais jovens evitam mais os BA que os mais velhos.

e) Análises em função da divisão dos grupos quanto à idade, manuseio e separação materna de 3h de duração.

Nestas análises, que funcionaram como um recorte possível dentro dos grupos e variáveis comportamentais analisadas, os dados estão se referindo apenas as modalidades comportamentais frequência de entradas em BF, porcentagem de entradas e de tempo em BA.

e.1) Manuseio X Separação Materna X Idades (Grupos HMS, H, MS e C, de todas as idades)

Analisando animais das três idades, diante dos resultados referentes aos BF, não houve alteração do comportamento motor que possa ser devido às Condições Ambientais durante a lactação: os procedimentos efetuados (manipulação e separação materna) não promoveram efeitos na ambulação dos animais.

Em relação às medidas de emocionalidade, somente foram encontradas variações significativas na medida Porcentagem de Tempo nos BA. Este resultado será discutido a seguir.

e.2) Manuseio X Separação Materna X Idades de 21 e 50 dias (Grupos HMS, H, MS e C, nas Idades 21 e 50 dias)

Nesta análise ficou novamente explícita a ausência de efeito motor ou de ambulação, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos analisados a respeito do número de entradas em BF.

Da mesma maneira, o procedimento de separação materna mostrou-se ineficaz para promover alterações comportamentais nos ratos destes grupos, independente da ocorrência simultânea de manuseio durante a lactação.

De forma intrigante, o manuseio foi capaz de alterar seletivamente apenas uma das duas medidas relacionadas à ansiedade: a porcentagem de tempo nos BA. A literatura correlata à investigação da emocionalidade de ratos no LCE nos traz muitos exemplos de alta taxa de ocorrência de comportamento alterado em ambas as medidas (Porcentagem de entradas e Porcentagem de Tempo em BA), em

diversas linhas de pesquisa diferentes, com diferentes VI's² manipuladas e ratos avaliados em idades diversas (Scarpelli et al. 2008; Cruz et al. 1994, entre outros).

Entretanto, também podem ser encontrados trabalhos em que o padrão de diferenças foi semelhante ao encontrado nesta pesquisa: as diferenças entre os grupos ocorreram apenas na Porcentagem de Tempo de BA, sem extensão dos efeitos para a Porcentagem de Entradas em BA (Liebsh et al. 1998; Holmes et al., 2003; Bailey e Crawley, 2009; Matsuto et al., 2009.). Por exemplo, o estudo de Liebsch e colegas (1998) verificou que ratos das Linhagens LAB (*Low-anxiety behavior*) e HAB (*High-anxiety behavior*), com administração ou não de Diazepam (uma medicação ansiolítica) comportaram-se de maneiras diferentes nas duas categorias comportamentais citadas acima. Os ratos LAB que receberam a medicação apresentaram uma diferença comportamental em relação aos ratos LAB sem medicação apenas na Porcentagem de Tempo em BA. Os autores se posicionam em relação a esta variabilidade defendendo que a resposta de ansiedade e a própria resposta à medicação ansiolítica são extremamente complexas, inclusive dependentes de padrões genéticos determinantes dos níveis basais de ansiedade; apontam que são necessários mais estudos para examinar estes padrões díspares entre as duas medidas.

Matsuto e colegas (2009), também analisando comportamentos de animais de diferentes linhagens, encontraram as variações de respostas no LCE: não houve efeito entre os grupos na porcentagem de entradas em BA, mas houve na porcentagem de tempo de exploração dos BA. Como neste estudo outros paradigmas de avaliação da ansiedade foram aplicados, foi possível uma melhor discussão sobre estes efeitos: como não foram encontradas diferenças em relação a outras medidas de emocionalidade indicativas de menor ansiedade (como a exploração do centro do campo aberto e das áreas claras do paradigma claro-escuro), estes autores concluíram que as diferenças comportamentais entre as linhagens estudadas podem sugerir diminuição da ansiedade como uma consequência, embora o efeito seja sutil, se houver.

Um ponto a ser considerado para ampliar a discussão sobre esta diferença é o fato de o *handling* afeta o comportamento exploratório dos animais

² VI: Variável Independente

(Denenberg 1999), o que pode trazer um dado a mais sobre o comportamento dos animais manipulados no LCE.

Nesta análise, ficou bastante claro o efeito do procedimento de *handling* (manipulação) na emocionalidade dos animais, quando testados no LCE. O resultado de rebaixamento do comportamento ansioso encontrado está de acordo com o documentado em trabalhos anteriores (Plotsky e Meaney 1993; Ladd et al. 2000; Francis et al. 1999; Caldji et al. 1999), indicando que o *handling* é capaz de reduzir reações de medo em ambientes novos.

O efeito redutor de ansiedade do *handling* pode ser observado em várias das análises anteriores, sugerindo que uma manipulação durante o desenvolvimento pode provocar alterações no comportamento emocional de ratos. Estes efeitos comportamentais são acompanhados por efeitos neurobiológicos correspondentes (Kaufman et al 2000), que estiveram, neste momento, à parte dos objetivos desta pesquisa.

A questão de reversibilidade ou interação que buscou ser acessada com o grupo HMS (manipulado e separado) ainda está em discussão (Francis et al. 2002; Pryce et al. 2001; Heim e Nemeroff 2001). Os dados encontrados nesta pesquisa de Mestrado – em especial os das análises “a” dos animais de 21 e 50 dias – revelaram dados curiosos sobre este grupo. Como pôde ser visto nas Figuras 11b, 11c e 12c e na Tabela 4, os ratos HMS21 diferiram dos ratos MS21 e H21³, comportamento que sugere ser resultante da aplicação das duas manipulações de forma simultânea. Estudos mais detalhados sobre este grupo seriam interessante para contribuir nesta discussão.

8.2

Resultados relativos ao procedimento de separação materna

O protocolo de separação materna utilizado (separação por 3 horas diárias nas primeiras duas semanas de vida dos animais MS e HMS) não se mostrou capaz de

³ Diferença significativa em: H21 e HMS21 > MS21 no Tempo de BA; H21 e HMS21 < MS21 no Tempo de BF; HMS21 > MS na Porcentagem Tempo BA; (p<0,05); diferença indicativa de tendência em Porcentagem Tempo BA (50 dias) e Porcentagem Entradas BA (21 dias).

alterar – negativamente – o comportamento emocional dos animais avaliados: os animais MS e HMS não se mostraram mais ansiosos que os outros quando avaliados no LCE, nas três idades avaliadas.

Embora o procedimento de *maternal separation* seja largamente apontado como influente para alterações morfofuncionais no SNC – em especial alterando a função do eixo HPA – os efeitos comportamentais não puderam ser observados nesta pesquisa.

Desta maneira, conclui-se que o protocolo adotado neste procedimento experimental não foi suficientemente bom para servir como um modelo animal da associação entre negligência e doença mental nestes animais estudados.

É preciso indicar, entretanto, que os efeitos comportamentais da separação materna freqüentemente apresentam-se como contraditórios (Lehmann e Feldon 2000), e que muitas vezes o comportamento emocional avaliado é o referente à depressão (como o uso do paradigma de Nado forçado, por exemplo – Aisa et al. 2007). Nesta pesquisa, o comportamento estudado foi o relativo à ansiedade.

Além disso, os resultados não significativos obtidos com os animais em relação ao procedimento de separação materna encontra espaço na literatura da área, que demonstra haver grande inconsistência de resultados em relação a este procedimento, no que tange aos efeitos sobre a emocionalidade (Newport et al. 2002); enquanto alguns trabalhos apontam que o procedimento de separação materna é capaz de promover alterações comportamentais posteriores à lactação (Heim e Nemeroff 2001; Ladd et al. 2000; Aisa et al. 2007; Lippmann et al. 2007; Lee et al. 2007), outros argumentam que ela se mostra ineficaz (Caldji et al. 1999; McIntosh et al. 1999; Marais et al. 2008; Aisa et al. 2008⁴; Cirulli et al. 2010).

Em relação aos estudos que apontam a crítica à validade e aplicabilidade deste modelo para o estudo das implicações da infância para a emocionalidade, pode-se destacar o trabalho de Lehmann e Feldon (2000), que, ao promover uma extensa revisão sobre os efeitos biocomportamentais da separação materna, apontam para a grande inconsistência de protocolos e resultados. Estes autores defendem, entre outros pontos, que o termo “separação materna” mostra-se como

⁴ Neste estudo, os resultados referem-se ao Labirinto em Cruz Elevado; foi encontrada diferença significativa no paradigma de nado forçado, modelo animal para o estudo da Depressão.

um termo coletivo para uma variedade de manipulações experimentais extremamente diferentes umas das outras.

Um outro ponto que pode ser considerado nesta discussão é que uma experiência estressante não pode ser considerada como sendo necessariamente negativa, uma vez que representa uma resposta fisiológica adaptativa aos perigos aos quais todos os indivíduos são expostos (Lupien et al. 2009; Cirulli et al. 2010), aumentando a regulação excitatória e gerando resiliência (Lyons et al. 2010).

8.3

Considerações críticas

Algumas considerações críticas podem ser feitas ao desenho experimental utilizado e às análises estatísticas efetuadas para analisar os dados.

O desenho experimental deste projeto é complexo e inclui muitos grupos e níveis diferentes de variáveis independentes. Como foi explicitado anteriormente, esta característica aumenta o número de fontes de variação no mesmo, o que aumenta a probabilidade de se cometerem erros na interpretação dos dados. Por esta razão, diferentes análises foram executadas, desde as análises com uma só variável até as análises de interação (ANOVA *two-way*).

Devido às características do desenho experimental, e à existência de diversas variáveis dependentes, muitos recortes podem ser feitos nestes dados⁵, o que tornou extensas a análise dos dados e a interpretação dos resultados alcançados.

Em função dos dados obtidos com o procedimento de separação materna não terem sido capazes de mostrar alterações comportamentais provocadas por esta manipulação, outros paradigmas de avaliação comportamental poderiam ter sido utilizados, como por exemplo os que simulam situações que geram respostas

⁵ Estes recortes foram feitos também durante a realização desta pesquisa, ao longo dos meses, resultando em diferentes trabalhos apresentados em Congressos da área; os Resumos destes trabalhos estão nos Anexos desta Dissertação.

similares à depressão, como o nado forçado (Newport et al. 2002; Aisa et al. 2007, 2008).

Um outro ponto que cabe consideração é a respeito do número de animais; ainda que o número total de animais efetivamente avaliados no LCE tenha sido expressivo, contando com 154 ratos ao fim da pesquisa, o n por grupo foi pequeno (média de aproximadamente 10 por grupo). O número de sujeitos avaliados é um fator que tem relação direta com os resultados obtidos. O número de *outliers* nos grupos (ver Anexos) foi expressivo, e somente um aumento considerável do n por grupo poderia dizer se os resultados obtidos se alterariam ou não.