

Influência da atividade mastigatória, da idade e do ambiente sobre o comportamento sugestivo de ansiedade em modelo murino*

Influence of masticatory activity, age, and environment on the suggestive behavior of anxiety in murine model

Influencia de la actividad masticatoria, de la edad y del ambiente sobre el comportamiento sugestivo de ansiedad en modelo murino

Thaíssa Gomes Borralho

Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes

Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

Marcia Consentino Kronka Sosthenes

Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

Centro Universitário do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil

RESUMO

Estudos anteriores indicaram estreita relação entre envelhecimento, redução da atividade mastigatória, empobrecimento ambiental e declínio cognitivo. Entretanto, pouco se conhece acerca de possíveis relações entre essas variáveis e alterações nos níveis de ansiedade. Assim, em modelo murino senil, diferentes grupos experimentais foram submetidos a dietas de diferentes consistências e a ambientes distintos. Mimetizando o estilo de vida sedentário ou ativo, os animais foram criados, respectivamente, em gaiolas-padrão (ambiente empobrecido) ou em gaiolas enriquecidas (ambiente enriquecido) desde o 21º dia pós-natal. Para medir os efeitos do envelhecimento, foram comparados animais de 6, 12 e 18 meses de idade. Para se investigar os efeitos da atividade mastigatória, foi imposto um de três regimes de dieta aos diferentes grupos experimentais: dieta sólida, tipo *pellet* (*hard diet* – HD); dieta em *pellet* seguida por uma dieta em pó, farelada (*soft diet* – HD/SD); ou dieta peletizada seguida de pó e novamente de *pellet* (HD/SD/HD), com intervalos de tempo iguais em cada regime. O teste do labirinto em cruz elevado foi usado e nesse esperou-se que os animais com comportamento semelhante ao ansioso permanecessem por mais tempo e percorressem maiores distâncias nos braços fechados. Sugeriu-se a hipótese de que o envelhecimento, o ambiente empobrecido e a redução da atividade mastigatória, agindo em conjunto, induziriam a um maior nível de comportamento semelhante ao ansioso. Os dados revelaram que o envelhecimento e o ambiente influenciam de forma significativa o comportamento, e que essas variáveis interagem com a atividade mastigatória, agravando ou reduzindo esse comportamento.

Palavras-chave: Mastigação; Envelhecimento; Comportamento Animal; Ansiedade; Modelos Animais.

* Artigo apresentado no V Congresso HUIBB, promovido pelo Hospital Universitário João de Barros Barreto e Universidade Federal do Pará, realizado de 12 a 14 de agosto de 2015 na Cidade de Belém, Estado do Pará, Brasil. Os Editores agradecem a parceria do HUIBB/UFPA e por terem escolhido a Revista Pan-Amazônica de Saúde para publicação dos excelentes trabalhos apresentados no evento.

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Thaíssa Gomes Borralho
Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção
Rua dos Mundurucus, 4487. Bairro: Guamá
CEP: 66073-005 Belém-Pará-Brasil
Tel.: +55 (91) 3201-6759
E-mail: thaissaborralho_88@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O perfil populacional vem apresentando mudanças no cenário mundial e, nesse, é revelado um aumento da proporção de idosos no Brasil a partir da década de 1980¹. O envelhecimento crescente aumentou a vulnerabilidade e a incidência de processos neurodegenerativos e demenciais, assim como de distúrbios psicológicos, incluindo-se os transtornos de ansiedade.

Em estudos experimentais anteriores em modelo murino, identificou-se a influência de fatores ambientais, idade e atividade mastigatória, que reduzem ou agravam o declínio cognitivo senil². A reabilitação, no entanto, parece recuperar esses danos, sobretudo na presença de um ambiente rico em estímulos cognitivos³. Essas observações foram confirmadas por outros autores que identificaram mudanças estruturais/funcionais associadas ao envelhecimento⁴, a um ambiente pouco estimulante⁵, ou à desarmonia ocular^{6,7}, que, agindo de forma combinada ou isolada, podem promover maiores ou menores *deficits* cognitivos.

A mastigação, quando alterada em seu padrão de atividade, pode desencadear o acúmulo de proteína β -amiloide por meio da sinalização mediada por glicocorticoide⁸, sendo essa alteração associada a alterações comportamentais, cognitivas e até mesmo na capacidade exploratória.

No que se refere à ansiedade, essa tem sido associada a um estado de conflito ou incerteza e surge quando existe a concorrência entre duas opções simultâneas e o indivíduo deve fazer uma escolha entre elas^{9,10}. Sob situações de estresse, a produção hipofisária de hormônio adrenocorticotrófico induz o córtex da adrenal a secretar corticosterona, sendo, então, o hipocampo uma área-alvo, onde as alterações induzidas promovem redução do aprendizado e memória hipocampo-dependentes¹¹. Encontrou-se ainda uma dissociação da função hipocampal ao longo de sua extensão septotemporal^{12,13}, onde lesões no hipocampo ventral, mas não do dorsal, reduziram o comportamento sugestivo de ansiedade, avaliado segundo o paradigma do labirinto em cruz elevado (LCE)^{14,15}.

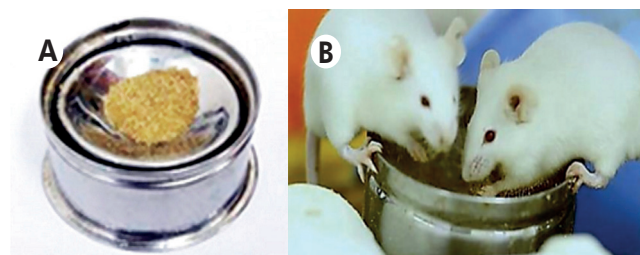
Desse modo, no presente trabalho, investigou-se a hipótese de que o envelhecimento, o ambiente empobrecido e a redução da atividade mastigatória, agindo em conjunto, induziriam a um maior nível de comportamento semelhante ao ansioso.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, foram utilizados camundongos suíços albinos fêmeas, manipulados segundo os *Principles of Laboratory Animal Care* da National Institutes of Health nas instalações do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, no Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará, com parecer e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE/UFGA nº BIO004-009).

Os animais foram distribuídos em grupos de idades de 6 meses, considerado animal jovem; 12 meses, animal adulto; e 18 meses, animal velho, admitindo-se que o tempo de vida do camundongo é de 2 anos, conforme Brown-Borge et al¹⁶. Eles foram alojados em condições empobrecidas (ambiente padrão – AP) ou enriquecidas (ambiente enriquecido – AE).

Em todas as janelas temporais (6, 12 e 18 meses), os efeitos da atividade mastigatória foram medidos a partir da imposição de um de três regimes de dieta: dieta sólida tipo *pellet* (*hard diet* – HD); dieta em *pellet* seguida por uma dieta em pó, farelada (*soft diet* – HD/SD); ou dieta peletizada seguida de pó e novamente de *pellet* (HD/SD/HD), com intervalos de tempo iguais em cada regime. A reposição era feita em dias alternados, conforme se detectava o consumo pelos animais, acompanhada da higienização das gaiolas. Ressalta-se que a dieta em pó era distribuída em dispositivo adequado para facilitar a ingestão e evitar o desperdício, assim como contaminação por dejetos orgânicos (Figura 1). A identificação da sequência temporal dos regimes de dieta está apresentada na figura 2.



A: Recipiente de aço inoxidável utilizado para ofertar a ração em pó. A tampa apresentava o centro perfurado em forma circular para acesso ao pó, sendo móvel e cedendo em direção ao fundo do pote à medida que a ração era consumida; **B:** Camundongos alimentando-se com a ração farelada.

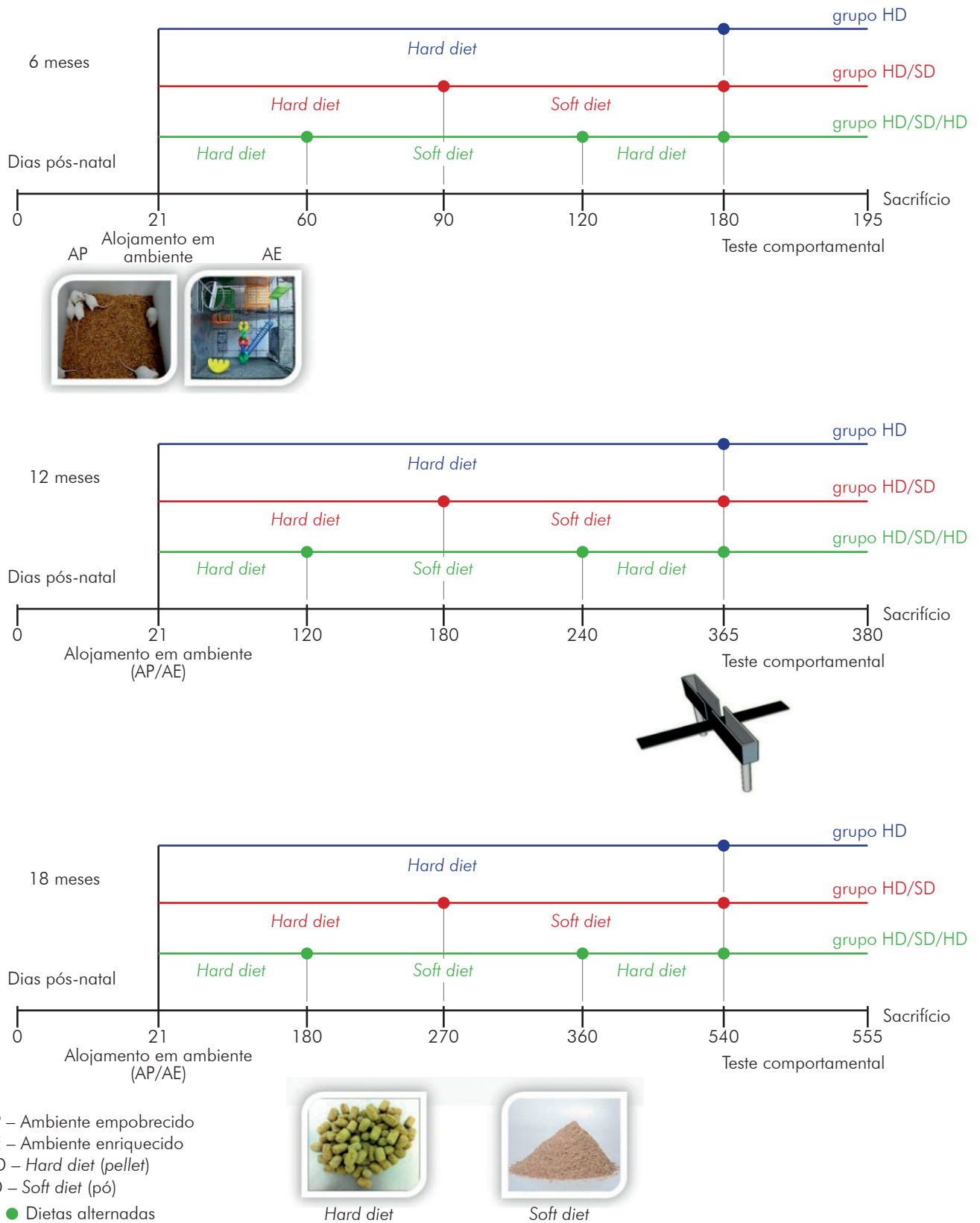
Figura 1 – Dispositivo de alimentação de camundongos

Os animais do ambiente padrão foram alojados em gaiolas plásticas de dimensões 32x39x16,5 cm e cobertas por uma grade de metal, abrigando seis camundongos. Os grupos alojados em condições enriquecidas foram mantidos em um espaço de 50x50x50 cm, com dois andares, equipados com pontes, rodas de correr, brinquedos e túneis, permitindo o exercício voluntário ao longo de todo o período. O ambiente sofria modificações semanalmente, com alteração na posição dos objetos e substituição semanal de, pelo menos, um para garantir novidade ao ambiente. Cada gaiola abrigou 12 camundongos e todas permaneceram em uma sala com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclos claro-escuro de 12 h (período claro, 6–18 h; período escuro, 18–6 h). Durante todo o período de formação dos grupos, os animais eram pesados mensalmente.

Todos os grupos formados foram avaliados quanto à atividade exploratória e condições de deambulação no teste de campo aberto (*open field*), que foi realizado por meio de uma caixa com dimensões

de 30x30x40 cm, revestida com fôrmica cinza e fundo preto. Cada animal permaneceu 5 min dentro da caixa, sendo gentilmente introduzido no centro da arena no início do teste. Com o auxílio do programa de análise ANY-maze Video Tracking System (Stoelting Co.), o

assoalho da caixa foi dividido virtualmente em nove quadrantes de mesma área (10x10 cm), os quais foram tomados como parâmetro para extração de dados, como o número de cruzamento de linhas, e, assim, avaliar a atividade exploratória.



AP – Ambiente empobrecido
 AE – Ambiente enriquecido
 HD – Hard diet (pellet)
 SD – Soft diet (pó)
 ● ● Dietas alternadas

A linha preta representa os dias percorridos da janela temporal e as linhas coloridas, os diferentes grupos de regimes de dieta (azul = HD, vermelho = HD/SD e verde = HD/SD/HD). Os círculos marcam as trocas de dieta, sendo o último círculo das linhas coloridas a marcação do início dos testes comportamentais.

Figura 2 – Sequência temporal de eventos de atividade mastigatória para os grupos em suas janelas temporais de 6, 12 e 18 meses

Além disso, em cada janela temporal, os animais foram submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), constituído por dois braços abertos e dois fechados (35x5 cm) colocados em posições opostas e uma plataforma central (5x5 cm)¹⁵. Os braços fechados têm paredes de 17 cm de altura, enquanto os braços abertos não têm paredes. O assoalho do labirinto ficava a 75 cm do chão. O animal era colocado na plataforma central do LCE com permissão para que explorasse o ambiente por um período de 5 min. As variáveis que foram utilizadas para análise nesse teste foram o tempo de permanência e a distância percorrida nos braços abertos e fechados.

Assim como o teste de campo aberto, o LCE também foi filmado por meio de *webcam* e as imagens do comportamento processadas com o uso do *software ANY-maze Video Tracking System* (Stoelting Co.). No LCE, estimou-se para cada animal um índice de comportamento semelhante ao ansioso, baseado no contraste entre os tempos despendidos ou as distâncias percorridas nos braços abertos e fechados: $C = (\text{Fechado} - \text{Aberto}) / (\text{Fechado} + \text{Aberto})$. Os valores positivos indicavam que a quantidade de tempo gasto ou distância percorrida foram maiores nos braços fechados, comparados aos braços abertos. O índice de contraste foi aplicado para normalizar os dados, minimizando as diferenças na atividade locomotora.

Para a análise estatística, foram utilizados sete animais por grupo experimental, considerando-se processo de morte natural (N inicial de 12 animais) e ser esse um valor válido para extrair resultados significativos, conforme Baykara et al¹⁷.

A seguir, os grupos foram submetidos a testes de normalidade para identificação dos possíveis desvios, e a análise estatística paramétrica avaliou o grau de significância dos resultados, empregando-se a análise

descritiva (dados quantitativos), de variância (ANOVA) para três critérios, seguido do pós-teste de Tukey. O nível de significância para diferenças estatísticas foi definido em $\alpha < 0,05$.

RESULTADOS

CURVA DE PESO

No decorrer da formação dos grupos experimentais, os animais foram pesados mensalmente. Na análise da curva de peso, evidenciou-se que não houve diferenças significativas entre os grupos, o que corrobora a igualdade nutricional entre as dietas; a diferença se restringe à forma de apresentação da ração.

Os valores exatos de média e erro padrão, para cada grupo experimental, relacionados ao peso final dos animais, estão representados no quadro 1.

CRUZAMENTO DE LINHAS – CAMPO ABERTO

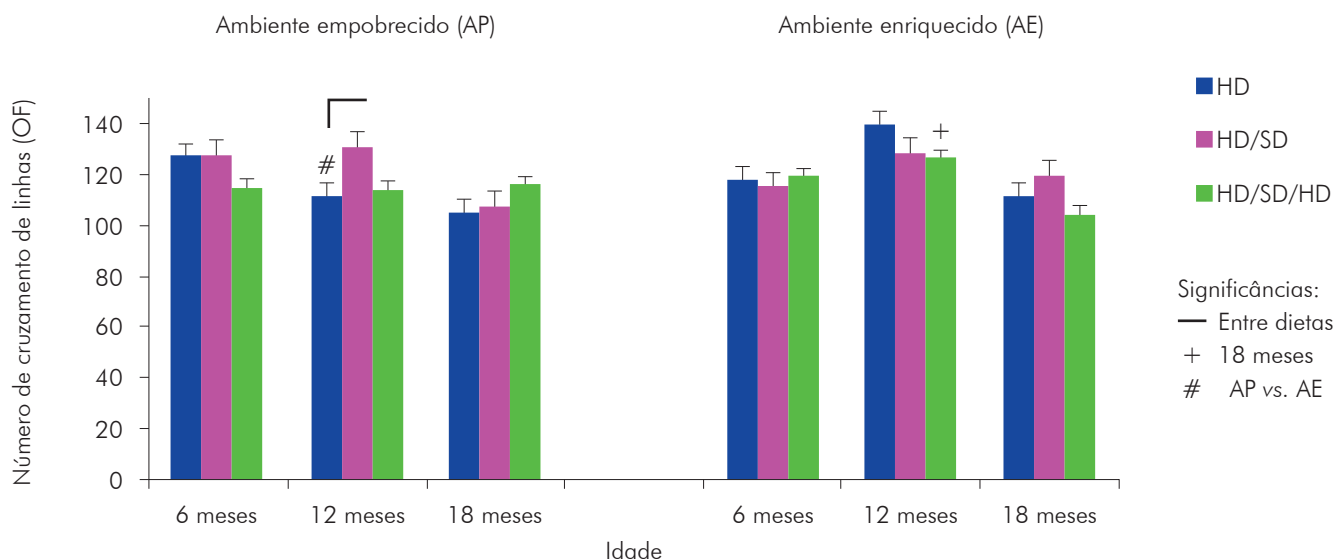
Ao analisar o cruzamento de linhas durante exploração do campo aberto, evidenciou-se que havia condições comuns de deambulação entre os grupos, sem diferenças significativas em análise de variância (um critério) (Figura 3).

Quando realizada a análise de variância de três critérios, encontrou-se que o ambiente ($F_{(1,108)} = 0,74$; $p < 0,391232$) e a dieta ($F_{(2,10)} = 0,818$; $p < 0,444020$) não influenciaram significativamente o padrão de exploração dos animais no campo aberto. Entretanto, o fator idade ($F_{(2,108)} = 5,36$; $p < 0,006008$) influenciou significativamente. Porém, a interação das variáveis ambiente, idade e dieta não revelaram resultados expressivos.

Os valores exatos de média e erro padrão para cada grupo experimental, relacionados ao número de cruzamento de linhas, estão representados no quadro 2.

Grupos	Peso final dos animais (gramas): média ± erro padrão					
	Ambiente padrão			Ambiente enriquecido		
	6 meses	12 meses	18 meses	6 meses	12 meses	18 meses
HD	69,32 ± 1,8	63,08 ± 1,9	72,12 ± 3,7	50,24 ± 1,7	60,17 ± 1,7	68,35 ± 2,3
HD/SD	54,66 ± 0,9	57,57 ± 4,5	56,58 ± 2,3	49,84 ± 1,8	60,41 ± 1,5	65,81 ± 2,3
HD/SD/HD	70,07 ± 1,7	67,22 ± 2,4	69,65 ± 3,8	46,94 ± 2,5	52,38 ± 1,1	59,85 ± 1,7
ANOVA	F = 3,7288 p = 0,1518	F=2,3594 p=0,1216	F = 6,0757 p = 0,097	F = 0,742 p = 0,506	F = 3,9849 p = 0,023	F = 4,4947 p = 0,0552

Quadro 1 – Média de peso dos animais, apresentada em gramas. Média e respectivos valores de erro padrão com base no peso dos animais para os grupos experimentais de 6, 12 e 18 meses de idade, nos diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD) e ambientes (padrão ou enriquecido). Valores de significância obtidos na análise de variância (ANOVA) de um critério (valores de F e de p), na comparação de grupos com mesma idade e ambiente, porém diferente dieta



Nas significâncias ($p < 0,05$), as linhas de conectores indicam diferenças significativas entre diferentes regimes de dieta, entretanto mesmo ambiente e idade; +: Diferenças significativas entre as idades com 18 meses, mas igual regime de dieta e ambiente; #: Diferenças significativas entre os ambientes, porém igual regime de dieta e idade.

Figura 3 – Representação gráfica dos valores do número de cruzamento de linhas no campo aberto

Grupos	Número de cruzamento de linhas: média (%) \pm erro padrão					
	Ambiente padrão			Ambiente enriquecido		
	6 meses	12 meses	18 meses	6 meses	12 meses	18 meses
HD	127,0 \pm 7,04	111,4 \pm 2,4	105,1 \pm 7,3	117,8 \pm 11,6	139,57 \pm 7,4	111,8 \pm 5,6
HD/SD	126,5 \pm 9,0	129,8 \pm 6,4	106,4 \pm 4,0	114,2 \pm 14,5	127,28 \pm 7,8	118,4 \pm 7,3
HD/SD/HD	114,0 \pm 7,51	113,0 \pm 6,8	115,0 \pm 5,95	118,2 \pm 7,41	125,57 \pm 7,96	103,5 \pm 4,78

Quadro 2 – Número de cruzamento de linhas em tempo total do teste de campo aberto. Média do número de cruzamento de linhas e respectivos valores de erro padrão para os grupos experimentais de 6, 12 e 18 meses de idade nos diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD) e ambientes (padrão ou enriquecido)

ANÁLISE DO TEMPO DE PERMANÊNCIA NO BRAÇO FECHADO DO APARATO – LCE

Ao analisar o tempo total de exploração do teste, na relação entre braço aberto e braço fechado, evidenciou-se que a influência da alteração mastigatória foi marcante na janela temporal de 18 meses do ambiente padrão (Figura 4).

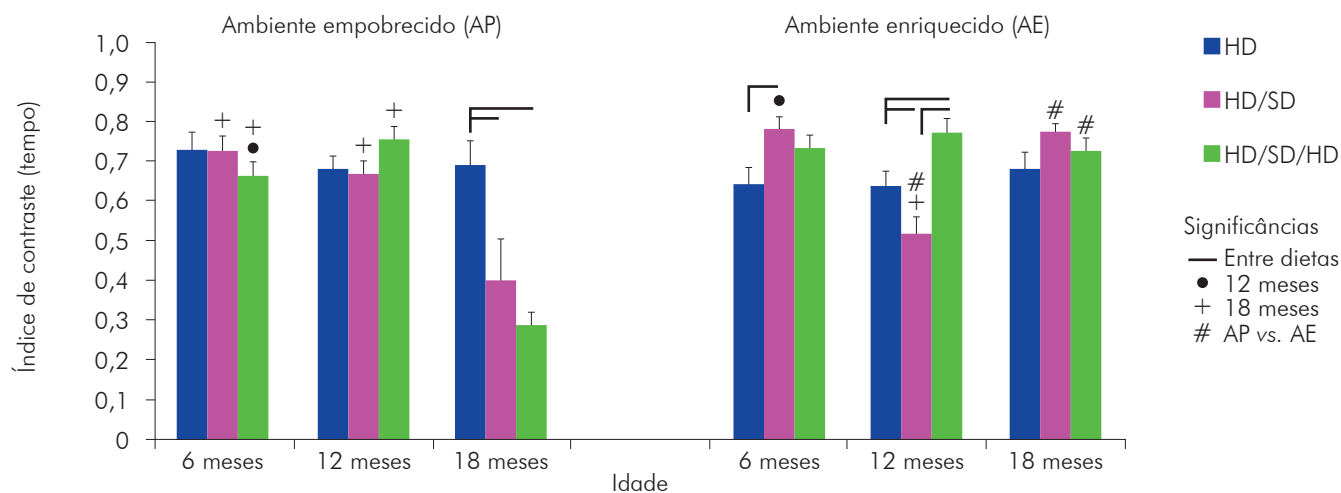
A análise *three-way* revelou que o ambiente ($F_{(1,108)} = 13,0$; $p < 0,00046$) e a idade ($F_{(2,10)} = 11,8$; $p < 0,000023$) influenciaram significativamente o padrão de exploração dos animais no LCE. Essas duas variáveis interagiram com a alteração mastigatória, mudando os níveis de comportamento semelhante ao ansioso ($F_{(4,108)} = 4,83$; $p < 0,01$). A combinação duas a duas das variáveis testadas também revelou interações significativas e isso incluiu ambiente e idade ($F_{(2,108)} = 23,8$; $p < 0,000001$), ambiente e

dieta ($F_{(2,10)} = 10,1$; $p < 0,000103$) e idade e dieta ($F_{(4,10)} = 8,64$; $p < 0,000004$). Os valores exatos de média e erro padrão, para cada grupo experimental, relacionados ao índice de contraste com base no tempo, estão representados no quadro 3.

ANÁLISE DA DISTÂNCIA PERCORRIDA DURANTE O TESTE LCE

No estudo da variável distância (Figura 5), observa-se, nas janelas temporais de 6 e 12 meses, em ambos os ambientes, uma relação direta entre o tempo dispendido no braço fechado e a distância percorrida.

Os valores exatos de média e erro padrão, para cada grupo experimental, relacionados ao índice de contraste com base na distância, estão representados no quadro 4.

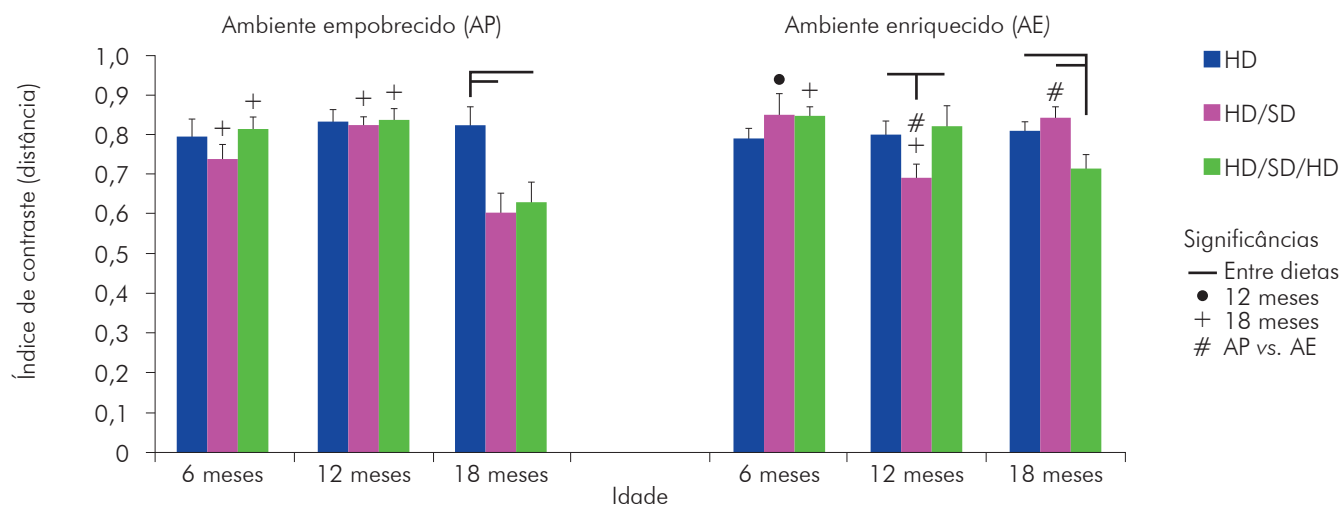


Nas significâncias ($p < 0,05$), as linhas de conectores indicam diferenças significativas entre diferentes regimes de dieta, entretanto mesmo ambiente e idade; ●: Diferenças significativas entre as idades com 12 meses, mas igual regime de dieta e ambiente; +: Diferenças significativas entre as idades com 18 meses, mas igual regime de dieta e ambiente; #: Diferenças significativas entre os ambientes, porém igual regime de dieta e idade.

Figura 4 – Representação gráfica dos valores do índice sugestivo de ansiedade, aplicados para o teste LCE com base no tempo gasto nos braços fechado e aberto, com o tempo total de teste

Grupos	Índice de contraste (tempo): média (%) \pm erro padrão					
	Ambiente padrão			Ambiente enriquecido		
	6 meses	12 meses	18 meses	6 meses	12 meses	18 meses
HD	0,73 \pm 0,04	0,68 \pm 0,03	0,69 \pm 0,06	0,64 \pm 0,04	0,64 \pm 0,04	0,68 \pm 0,04
HD/SD	0,73 \pm 0,04	0,67 \pm 0,03	0,4 \pm 0,10	0,78 \pm 0,03	0,52 \pm 0,04	0,78 \pm 0,02
HD/SD/HD	0,66 \pm 0,03	0,76 \pm 0,03	0,29 \pm 0,03	0,73 \pm 0,03	0,77 \pm 0,04	0,73 \pm 0,03

Quadro 3 – Índice de contraste para o tempo gasto (medido em segundos) nos braços do LCE. Média do índice de contraste em valores percentuais e respectivos valores de erro padrão, com base no parâmetro tempo gasto nos braços do labirinto para os grupos experimentais de 6, 12 e 18 meses de idade, nos diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD) e ambientes (padrão ou enriquecido)



Nas significâncias ($p < 0,05$), as linhas de conectores indicam diferenças significativas entre diferentes regimes de dieta, entretanto mesmo ambiente e idade; ●: Diferenças significativas entre as idades com 12 meses, mas igual regime de dieta e ambiente; +: Diferenças significativas entre as idades com 18 meses, mas igual regime de dieta e ambiente; #: Diferenças significativas entre os ambientes, porém igual regime de dieta e idade.

Figura 5 – Representação gráfica dos valores do índice sugestivo de ansiedade, aplicados para o teste LCE, com base na distância percorrida nos braços fechado e aberto, com o tempo total de teste

Grupos	Índice de contraste (distância): média (%) ± erro padrão					
	Ambiente padrão			Ambiente enriquecido		
	6 meses	12 meses	18 meses	6 meses	12 meses	18 meses
HD	0,80 ± 0,04	0,83 ± 0,03	0,83 ± 0,05	0,79 ± 0,02	0,80 ± 0,03	0,81 ± 0,02
HD/SD	0,74 ± 0,04	0,83 ± 0,02	0,61 ± 0,05	0,85 ± 0,05	0,69 ± 0,03	0,84 ± 0,03
HD/SD/HD	0,82 ± 0,03	0,84 ± 0,03	0,63 ± 0,05	0,85 ± 0,02	0,82 ± 0,05	0,71 ± 0,03

Quadro 4 – Índice de contraste para a distância percorrida (medida em metros) nos braços do LCE. Média do índice de contraste em valores percentuais e respectivos valores de erro padrão, com base no parâmetro distância percorrida nas zonas da arena de campo aberto para os grupos experimentais de 6, 12 e 18 meses de idade, nos diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD) e ambientes (padrão ou enriquecido)

DISCUSSÃO

A ansiedade é definida como uma antecipação emocional a uma situação aversiva, ou seja, é primariamente uma resposta a um perigo potencial evoluindo enquanto resposta comportamental no sentido de evitá-lo⁹. Distingue-se do medo pelo fato deste estar relacionado a uma ameaça real e bem definida de perigo. A ansiedade, portanto, estaria associada a um estado de conflito ou incerteza e surge quando existe a concorrência entre duas opções simultâneas e o indivíduo tem que fazer uma escolha entre elas^{9,10}.

As causas que podem levar um indivíduo a esses estados conflitantes e alterados de humor são inúmeras, e o seu estudo, a partir de modelos animais, tem buscado responder a três questões: quais sistemas neuronais estão envolvidos nas emoções; como esses sistemas funcionam quando alterados; e como essas condições patológicas podem ser modeladas¹⁸. As análises expostas contribuem para esse corpo de dados, indicando a interação entre atividade mastigatória, idade e ambiente sob o comportamento sugestivo de ansiedade.

O LCE, pautando-se no paradigma da agorafobia, sugere que níveis mais altos de ansiedade estariam associados a um aumento do tempo de permanência no braço fechado do aparato¹⁹. Neste experimento, objetiva-se a revelação de que a imposição de modificações do padrão de atividade mastigatória, seja pela sua redução ou pela sua reabilitação, interfere no padrão comportamental dos animais.

Nesse contexto, estudos prévios apontaram que o ato de roer atenuaria uma variedade de índices fisiológicos de estresse em ratos, tais como o aumento de atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a participação de catecolaminas centrais^{20,21}. Em concordância, há relatos de um aumento seletivo na imunoreatividade para c-Fos no córtex pré-frontal de ratos que optaram por mastigar de forma espontânea durante exposição ao estresse²², sinalizando uma maior ativação mesocortical no ato de mastigar.

Estudos utilizando neuroimagem, em particular a ressonância magnética funcional, são apontados como importantes ferramentas para se investigar a fenomenologia dos transtornos de ansiedade. Nesses casos, a amígdala tem se mostrado hiperativa em vários

trabalhos^{23,24}, mas não em outros^{25,26}. A região ventral do córtex pré-frontal, incluindo o córtex pré-frontal ventrolateral e o córtex cingulado anterior, também mostraram padrões anormais de ativação^{24,25,27}. Essas áreas têm sido destaque em pesquisas sobre regulação e modulação das emoções em populações saudáveis, e especula-se, afinal, que o córtex pré-frontal e giro do cíngulo modulariam essas respostas, enquanto que a amígdala hiperativa seria observada somente nos casos de ansiedade elevada²⁸. Além disso, o emprego da ressonância magnética funcional revelou perda associada ao envelhecimento da reatividade da amígdala e, em contraposição, uma atividade amplificada no córtex pré-frontal em resposta a estímulos nocivos^{29,30,31,32,33}. Isso poderia explicar o fato dos animais velhos de ambiente empobrecido apresentarem redução de comportamento semelhante ao ansioso em comparação com os adultos jovens.

Quanto ao envelhecimento, é bem documentado que ele está associado ao declínio das funções cognitivas e também às mudanças emocionais. Percebe-se que camundongos velhos, de ambiente empobrecido e que sofreram alteração da atividade mastigatória, apresentaram redução do tempo de permanência no braço fechado em relação aos animais jovens. Dessa forma, mudanças no estado ansioso e relacionadas à idade parecem ter origem multifatorial³⁴, justificando possivelmente os controversos achados na literatura, sobretudo em modelos experimentais, onde resultados parecem ser dependentes também dos testes e procedimentos experimentais aplicados.

Nesse contexto, utilizando camundongos machos C57BL6/J jovens (com 7 e 14 semanas de vida) criados em AP e submetidos a dieta com ração farelada, Nose-Ishibashi et al³⁵ concluíram, em teste de campo aberto, que uma dieta habitual com ração em pó pode afetar a capacidade de resposta a novos ambientes, gerando, inclusive, possível dificuldade desses animais de se adaptarem aos novos ambientes.

No presente estudo, almejou-se elucidar a influência que a idade, a alteração mastigatória e o ambiente exercem no comportamento sugestivo de ansiedade. Ao seguir o protocolo de trabalhos realizados previamente em pesquisas do Laboratório, optou-se pela utilização de camundongos fêmea, não objetivando, nesse caso,

realizar a comparação entre machos e fêmeas. Essa opção deve-se à reconhecida influência hormonal e sua capacidade de promover alterações celulares, em particular de astrócitos. Mouton et al³⁶ concluíram que fêmeas senis da variedade C57Bl6J apresentaram 18,3% mais astrócitos que fêmeas jovens e 32% mais que machos de idades correspondentes. Dessa forma, é razoável supor que possa haver diferenças também no comportamento. Neste trabalho, foram utilizadas somente fêmeas e considera-se que elas, mesmo as mais senis, estavam sob o mesmo estado hormonal, acreditando-se, assim, que as variáveis contribuintes para os achados comportamentais foram a alteração da mastigação ou o ambiente.

Muitos estudos que investigam os efeitos da estimulação ambiental sobre comportamentos semelhantes à ansiedade são controversos. Há estudos que apontam que o exercício diminuiria os sintomas de depressão e ansiedade^{37,38,39}, ao passo que outros sugerem que ele seria ansiogênico^{39,40,41}. Essa aparente inconsistência pode ser em parte atribuída ao tipo de teste de ansiedade aplicado num caso e noutro, assim como a espécie e a variedade do animal utilizada no experimento.

No que se refere à análise da distância percorrida, essa é útil para investigar o tempo associado à imobilidade. Constatada a contribuição significativa do tempo imóvel para o tempo total no braço fechado, é possível sugerir, por exemplo, que há acomodação do animal ao teste e isso pode representar desinteresse em explorar o ambiente. O experimento acima relatado, entretanto, não se enquadra nesse caso.

De modo geral, os animais sob alteração mastigatória apresentaram diferenças significativas nos índices de contraste em comparação com os animais controles (HD), sugerindo que a mastigação induziria modificação no padrão de permanência no braço fechado.

O enriquecimento ambiental poderia ter a sua influência interpretada como indutor de estresse, e

a renovação contínua do meio, pela substituição ou deslocamento dos brinquedos, poderia ser comparável a exposições repetidas ao estresse leve⁴². Isso, de forma crônica, poderia tornar os animais velhos, de ambiente enriquecido, mais vulneráveis⁴³.

Finalmente, a transição demográfica colabora para a incidência de processos neurodegenerativos e transtornos de comportamento. Transtorno de ansiedade generalizada correlaciona-se com um pior estado de saúde geral e comorbidades comuns ao envelhecimento⁴⁴. Diante disso, modelos murinos almejam identificar as mudanças funcionais e estruturais, a fim de correlacioná-las com as alterações de comportamento. Desse modo, por mais que haja limitação na transposição de resultados nas diferentes espécies citadas, o presente estudo indicou que variáveis, como a estimulação ambiental e a alteração da atividade mastigatória, podem ser contribuintes nesses processos de alterações comportamentais.

CONCLUSÃO

A partir da interação entre condições de envelhecimento, alteração da atividade mastigatória e estimulação somatomotora e visuoespacial, investigaram-se as possíveis alterações de comportamento sugestivo de ansiedade. A alteração da atividade mastigatória influencia o padrão de permanência no braço fechado, e a estimulação ambiental acentua os seus efeitos, privilegiando a preferência pelo braço fechado como sugestão de um estado ansioso nos animais jovens e senis e com alterações do padrão da atividade mastigatória. Mecanismos celulares e moleculares permanecem por serem investigados.

APOIO FINANCEIRO

Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA – nº outorga 136/2008) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – nº processo 475677/2008-0).



Influence of masticatory activity, age, and environment on the suggestive behavior of anxiety in murine model

ABSTRACT

Previous studies have indicated a close relationship among aging, reduction of masticatory activity, environmental impoverishment, and cognitive decline. However, little is known about possible relationships among these variables and changes in anxiety levels. Thus, in a senile murine rodent, different experimental groups were submitted to diets of distinct consistencies and environment. Imitating the sedentary or active lifestyle, the animals were raised in standard cages (impoverished environment) or in enriched cages (enriched environment), respectively, from the 21st postnatal day. In order to measure the effects of aging, animals of 6, 12 and 18 months of age were compared with each other. To investigate the effects of masticatory activity, one of three dietary regimens was imposed to the different experimental groups: solid diet, pellet (hard diet – HD); pelleted diet followed by a powdered one, mash feed (soft diet – HD/SD); or pelleted diet followed by powder and pelleted diet again (HD/SD/HD) with equal time intervals in each diet. The elevated plus maze test was used expecting that animals with anxious-like behavior remained for a long time in there and walked greater distances in the closed arms. It was hypothesized that aging, impoverishment, and reduction of masticatory activity, acting together, would induce a higher level of behavior similar to the anxious. Data revealed that aging and environment influence significantly in behavior and these variables interact with masticatory activity, increasing or reducing this behavior.

Keywords: Chewing; Aging; Animal Behavior; Anxiety; Animal Models.

Influencia de la actividad masticatoria, de la edad y del ambiente sobre el comportamiento sugestivo de ansiedad en modelo murino

RESUMEN

Estudios anteriores han indicado estrecha relación entre envejecimiento, reducción de la actividad masticatoria, empobrecimiento ambiental y disminución cognitiva. Sin embargo, poco se conoce acerca de las posibles relaciones entre esas variables y alteraciones en los niveles de ansiedad. Así, en modelo murino senil, diferentes grupos experimentales fueron sometidos a dietas de diferentes consistencias y a ambientes distintos. Mimetizando el estilo de vida sedentario o activo, los animales fueron criados, respectivamente, en jaulas estándar (ambiente empobrecido) o en jaulas enriquecidas (ambiente enriquecido) desde el 21º día postnatal. Para medir los efectos del envejecimiento, se compararon animales de 6, 12 y 18 meses de edad. Para investigar los efectos de la actividad masticatoria, se imponía uno de tres regímenes de dieta a los diferentes grupos experimentales: dieta sólida, tipo *pellet* (*hard diet* – HD); dieta en *pellet* seguida por una dieta en polvo, granulada (*soft diet* – HD/SD); o dieta peletizada seguida de polvo y nuevamente de *pellet* (HD/SD/HD), con intervalos iguales en cada régimen. Se usó la prueba del laberinto en cruz elevado, esperando que, en esta, animales con comportamiento similar al ansioso permanecieran por más tiempo y recorrieran distancias más grandes en los brazos cerrados. Se ha sugerido la hipótesis de que el envejecimiento, el ambiente empobrecido y la reducción de la actividad masticatoria, actuando en conjunto, inducirían un nivel mayor de comportamiento semejante al ansioso. Los datos revelaron que el envejecimiento y el ambiente influyen de forma significativa el comportamiento y que esas variables interactúan con la actividad masticatoria, agravando o reduciendo ese comportamiento.

Palabras clave: Masticación; Envejecimiento; Comportamiento Animal; Ansiedad; Modelos Animales.



REFERÊNCIAS

- World Health Organization. Noncommunicable Diseases and Mental Health Cluster. Noncommunicable Disease Prevention and Health Promotion Department. Active ageing a policy framework. Geneva: WHO; 2002.
- Almeida MNF, Mendes FCCS, Felício APG, Falsoni M, Andrade MLF, Bento-Torres J, et al. Spatial memory decline after masticatory deprivation and aging is associated with altered laminar distribution of CA1 astrocytes. *BMC Neurosci*. 2012 Feb;13:23.
- Mendes FCCS, Almeida MNF, Felício APG, Fadel AC, Silva DJ, Borrvalho TG, et al. Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. *BMC Neurosci*. 2013 Jun;14:63.
- Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci*. 2010 Oct;87(17-18):521-36.
- Volkerskm, Scherder EJ. Impoverished environment, cognition, aging and dementia. *Rev Neurosci*. 2011 Jun;22(3):259-66.
- Weijenbergh RA, Scherder EJ, Lobbezoo F. Mastication for the mind — the relationship between mastication and cognition in ageing and dementia. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 Jan;35(3):483-97.
- Ono Y, Yamamoto T, Kubo KY, Onozuka M. Occlusion and brain function: mastication as a prevention of cognitive dysfunction. *J Oral Rehabil*. 2010 Aug;37(8):624-40.
- Ekuni D, Tomofuji T, Irie K, Azuma T, Endo Y, Kasuyama K, et al. Occlusal disharmony increases amyloid- β in the rat hippocampus. *Neuromol Med*. 2011 Sep;13(3):197-203.
- Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, McHugh SB, Rawlins JN, Monyer H, et al. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Mar;15(3):181-92.
- Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Jan;35(1):105-35.
- Kim JJ, Song EY, Kosten TA. Stress effects in the hippocampus: synaptic plasticity and memory. *Stress*. 2006 Mar;9(1):1-11.
- Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, et al. Regional dissociations within the hippocampus — memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004 May;28(3):273-83.
- Engin E, Treit D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol*. 2007 Sep;18(5-6):365-74.
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Aug;99(16):10825-30.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 1987 Jun;92(2):180-5.

- 16 Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature*. 1996 Nov;384(6604):33.
- 17 Baykara B, Cetin F, Baykara B, Aksu I, Dayi A, Kiray M, et al. Anxiety caused by traumatic brain injury correlates to decreased prefrontal cortex VEGF immunoreactivity and neuron density in immature rat. *Turk Neurosurg*. 2012;22(5):604-10.
- 18 Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Sep;4(9):775-90.
- 19 Fernandes C, File SE. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996 May;54(1):31-40.
- 20 Okada S, Hori N, Kimoto K, Onozuka M, Sato S, Sasaguri K. Effects of biting on elevation of blood pressure and other physiological responses to stress in rats: biting may reduce allostatic load. *Brain Res*. 2007 Dec;1185:189-94.
- 21 Hori N, Yuyama N, Tamura K. Biting suppresses stress-induced expression of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat hypothalamus. *J Dent Res*. 2004 Feb;83(2):124-8.
- 22 Stalnaker TA, Espana RA, Berridge CW. Coping behavior causes asymmetric changes in neuronal activation in the prefrontal cortex and amygdala. *Synapse*. 2009 Jan;63(1):82-5.
- 23 Nitschke JB, Sarinopoulos I, Oathes DJ, Johnstone T, Whalen PJ, Davidson RJ, et al. Anticipatory activation in the amygdala and anterior cingulate in generalized anxiety disorder and prediction of treatment response. *Am J Psychiatry*. 2009 Mar;166(3):302-10.
- 24 Etkin A, Prater KE, Hoeft F, Menon V, Schatzberg AF. Failure of anterior cingulate activation and connectivity with the amygdala during implicit regulation of emotional processing in generalized anxiety disorder. *Am J Psychiatry*. 2010 May;167(5):545-54.
- 25 Monk CS, Nelson EE, McClure EB, Mogg K, Bradley BP, Leibenluft E, et al. Ventrolateral prefrontal cortex activation and attentional bias in response to angry faces in adolescents with generalized anxiety disorder. *Am J Psychiatry*. 2006 Jun;163(6):1091-7.
- 26 Whalen PJ, Johnstone T, Somerville LH, Nitschke JB, Polis S, Alexander AL, et al. A functional magnetic resonance imaging predictor of treatment response to venlafaxine in generalized anxiety disorder. *Biol Psychiatry*. 2008 May;63(9):858-63.
- 27 McClure EB, Monk CS, Nelson EE, Parrish JM, Adler A, Blair RJ, et al. Abnormal attention modulation of fear circuit function in pediatric generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Jan;64(1):97-106.
- 28 Tromp DP, Grupe DW, Oathes DJ, McFarlin DR, Hernandez PJ, Kral TR, et al. Reduced structural connectivity of a major frontolimbic pathway in generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2012 Sep;69(9):925-34.
- 29 Gunning-Dixon FM, Gur RC, Perkins AC, Schroeder L, Turner T, Turetsky BI, et al. Age-related differences in brain activation during emotional face processing. *Neurobiol Aging*. 2003 Mar-Apr;24(2):285-95.
- 30 Mather M, Canli T, English T, Whitfield S, Wais P, Ochsner K, et al. Amygdala responses to emotionally valenced stimuli in older and younger adults. *Psychol Sci*. 2004 Apr;15(4):259-63.
- 31 Roalf DR, Pruis TA, Stevens AA, Janowsky JS. More is less: emotion induced prefrontal cortex activity habituates in ageing. *Neurobiol Ageing*. 2011 Sep;32(9):1634-50.
- 32 Tessitore A, Hariri AR, Fera F, Smith WG, Das S, Weinberger DR, et al. Functional changes in the activity of brain regions underlying emotion processing in the elderly. *Psychiatry Res*. 2005 May;139(1):9-18.
- 33 Williams LM, Brown KJ, Palmer D, Liddell BJ, Kemp AH, Olivieri G, et al. The mellow years?: neural basis of improving emotional stability over age. *J Neurosci*. 2006 Jun;26(24):6422-30.
- 34 Chen GH, Wang C, Yangcheng HY, Liu RY, Zhou JN. Age-related changes in anxiety are task-specific in the senescence-accelerated prone mouse 8. *Physiol Behav*. 2007 Aug;91(5):644-51.
- 35 Nose-Ishibashi K, Watahiki J, Yamada K, Maekawa M, Watanabe A, Yamamoto G, et al. Soft-diet feeding after weaning affects behavior in mice: potential increase in vulnerability to mental disorders. *Neuroscience*. 2014 Mar;263:257-68.
- 36 Mouton PR, Long JM, Lei DL, Howard V, Jucker M, Calhoun ME, et al. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res*. 2002 Nov;956(1):30-5.
- 37 Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Campisi J, Hammack SH, Campeau S, et al. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci*. 2003 Apr;23(7):2889-98.
- 38 Duman CH, Schlesinger L, Russell DS, Duman RS. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain Res*. 2008 Mar;1199:148-58.

- 39 Leasure JL, Jones M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience*. 2008 Oct;156(3):456-65.
- 40 Burghardt PR, Fulk LJ, Hand GA, Wilson MA. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res*. 2004 Sep;1019(1-2):84-96.
- 41 Van Hoomissen JD, Holmes PV, Zellner AS, Poudevigne A, Dishman RK. Effects of beta-adrenoreceptor blockade during chronic exercise on contextual fear conditioning and mRNA for galanin and brain-derived neurotrophic factor. *Behav Neurosci*. 2004 Dec;118(6):1378-90.
- 42 Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 Aug;73(1):93-207.
- 43 Konkle AT, Kentner AC, Baker SL, Stewart A, Bielajew C. Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010 Jul;49(4):427-36.
- 44 Xavier MF, Ferraz MPT, Trentia CM, Argimona I, Bertolluccic PH, Poyares D, et al. Transtorno de ansiedade generalizada em idosos com oitenta anos ou mais. *Rev Saude Publica*. 2001 jun;35(3): 294-302.

Recebido em / Received / Recibido en: 4/1/2016
Aceito em / Accepted / Aceptado en: 3/10/2016