

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

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

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

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.

* Artículo presentado al V Congreso HUIBB, promovido por el Hospital Universitario João de Barros Barreto y la Universidad Federal do Pará, realizado de 12 a 14 de agosto de 2015 en la Ciudad de Belém, Estado de Pará, Brasil. Los Editores agradecen la colaboración de la HUIBB/UFPA y por haber elegido a La Revista Pan-Amazônica de Saúde para publicación de los excelentes trabajos presentados al evento.

Correspondencia / Correspondência / Correspondence:

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

INTRODUCCIÓN

El perfil de la población está presentando cambios en el escenario mundial, y esto pone de manifiesto un aumento de la proporción de ancianos en Brasil desde la década de 1980¹. El envejecimiento creciente aumentó la vulnerabilidad y la incidencia de procesos neurodegenerativos y demenciales, así como de trastornos psicológicos, incluyendo los trastornos de ansiedad.

En estudios experimentales anteriores en modelo murino, se identificó la influencia de factores ambientales, edad y actividad masticatoria, que reducen o agravan el declive cognitivo senil². La rehabilitación, sin embargo, parece recuperar esos daños, sobre todo en la presencia de un ambiente rico en estímulos cognitivos³. Estas observaciones fueron confirmadas por otros autores que identificaron cambios estructurales/funcionales asociados al envejecimiento⁴, a un ambiente poco estimulante⁵, o a la desarmonía oclusal^{6,7}, que, actuando de forma combinada o aislada, pueden promover mayores o menores deficiencias cognitivas.

La masticación, cuando alterada en su patrón de actividad, puede desencadenar la acumulación de proteína β -amiloide a través de la señalización mediada por glucocorticoide⁸, siendo esta alteración asociada a alteraciones comportamentales, cognitivas e incluso de la capacidad exploratoria.

En lo que se refiere a la ansiedad, ésta se ha asociado con un estado de conflicto o incertidumbre y surge cuando existe la competencia entre dos opciones simultáneas y el individuo debe elegir entre ellas^{9,10}. En las situaciones de estrés, la producción hipofisaria de hormona adrenocorticotropa induce a la corteza adrenal a secretar corticosterona, tornando el hipocampo un área objetivo, donde los cambios inducidos promueven la reducción del aprendizaje y la memoria hipocampo-dependiente¹¹. Se encontró una disociación de la función hipocámpal a lo largo de su extensión septo temporal^{12,13}, en donde lesiones en el hipocampo ventral, pero no del dorsal, redujeron el comportamiento sugestivo de ansiedad, evaluado según el paradigma del laberinto en cruz elevado (LCE)^{14,15}.

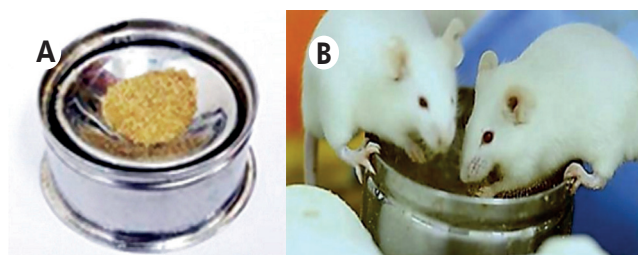
De este modo, en el presente trabajo, se investigó la hipótesis de que el envejecimiento, el ambiente empobrecido y la reducción de la actividad masticatoria, actuando en conjunto, inducirían a un mayor nivel de comportamiento semejante al ansioso.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio, se utilizaron ratones suizos albinos hembras, manipulados según los *Principles of Laboratory Animal Care* de National Institutes of Health en las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones en Neurodegeneración e Infección, en el Hospital Universitario João de Barros Barreto de la Universidad Federal de Pará, con parecer y aprobación del Comité de Ética en Investigación con Animales de Experimentación (CEPAE/UFPA n° BIO004-009).

Los animales fueron distribuidos en grupos de edades de 6 meses, considerado animal joven; 12 meses, animal adulto; y 18 meses, animal viejo, admitiendo que el tiempo de vida del ratón es de 2 años, según Brown-Borge et al¹⁶. Se alojaron en condiciones empobrecidas (ambiente estándar – AE) o enriquecidas (ambiente enriquecido – AE).

En todas las ventanas temporales (6, 12 y 18 meses), los efectos de la actividad masticatoria se midieron a partir de la imposición de uno de tres regímenes de dieta: dieta sólida tipo *pellet* (*hard diet* – HD); dieta en *pellet* seguida por una dieta en polvo, triturada (*soft diet* – HD/SD); o dieta peletizada seguida de polvo y de nuevo de *pellet* (HD/SD/HD), con intervalos de tiempo iguales en cada régimen. La reposición se hizo en días alternados, según se detectaba el consumo por los animales, acompañada de la higienización de las jaulas. Se destaca que la dieta en polvo se distribuía en un dispositivo adecuado para facilitar la ingestión y evitar el desperdicio, así como la contaminación por desechos orgánicos (Figura 1). La identificación de la secuencia temporal de los regímenes de dieta se presenta en la figura 2.



A: Recipiente de acero inoxidable utilizado para ofrecer el alimento en polvo (la tapa tenía el centro perforado en forma circular para acceso al polvo. La tapa era móvil, cediendo en dirección al fondo del pote a medida que el alimento era consumido); **B:** Ratones comiendo el alimento en forma de harina.

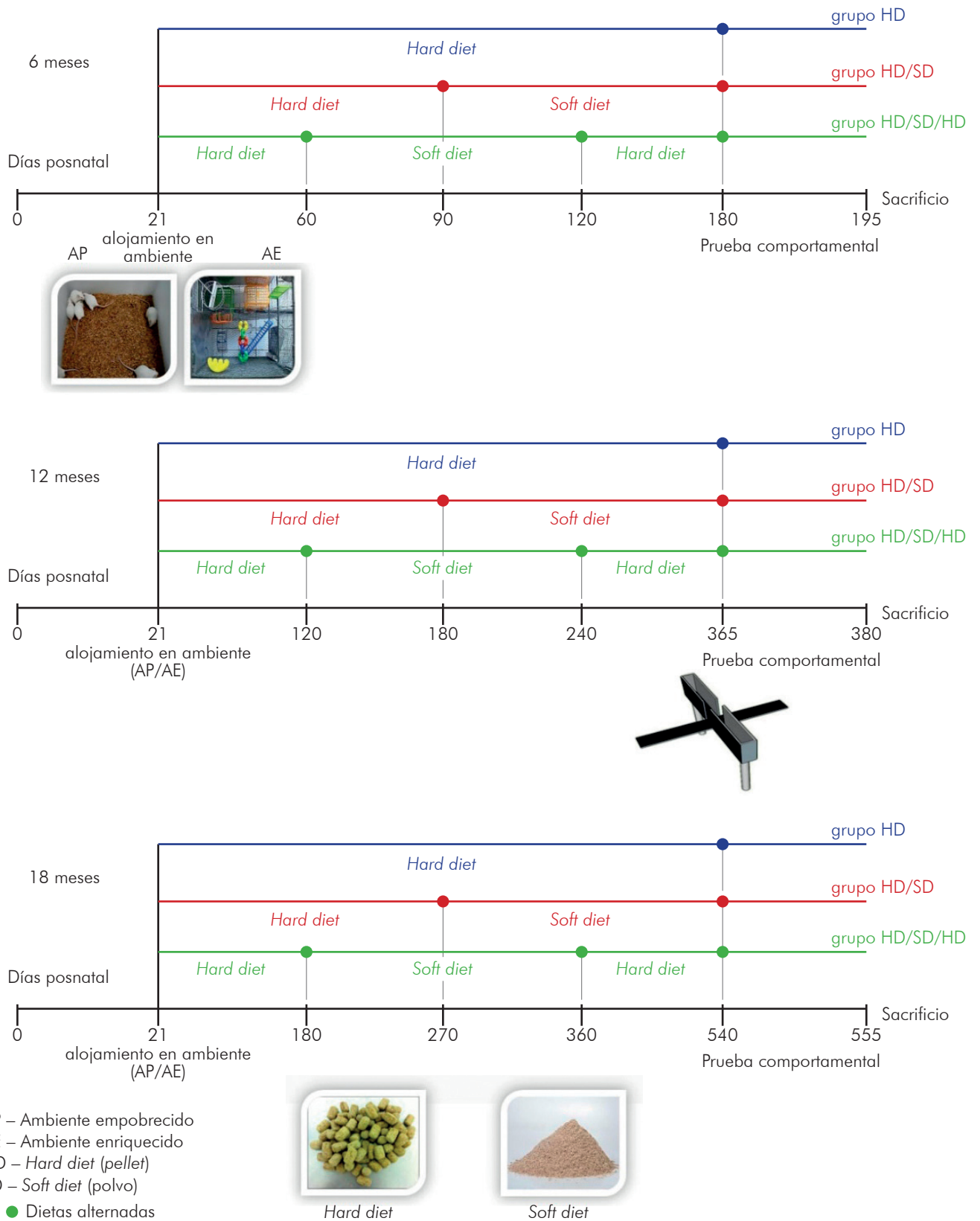
Figura 1 – Dispositivo de alimentación de ratones

Los animales del ambiente estándar fueron alojados en jaulas plásticas de dimensiones 32x39x16,5 cm, cubiertas por una rejilla de metal, abrigando a seis ratones. Los grupos alojados en condiciones enriquecidas se mantuvieron en un espacio de 50x50x50 cm, con dos pisos, equipados con puentes, ruedas de correr, juguetes y túneles, permitiendo el ejercicio voluntario a lo largo de todo el período. El ambiente sufría modificaciones semanales, con alteración en la posición de los objetos y sustitución semanal de al menos uno para garantizar novedad al ambiente. Cada jaula abrigó a 12 ratones y todas permanecieron en una habitación con temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) y ciclos claro-oscuros de 12 h (período claro, 6-18 h, período oscuro, 18-6 h). Durante todo el período de formación de los grupos, los animales eran pesados mensualmente.

Todos los grupos formados fueron evaluados en relación a la actividad exploratoria y condiciones de deambulación en la prueba de campo abierto (*open field*), que se realizó por medio de una caja con

dimensiones de 30x30x40 cm, revestida con fórmica gris y fondo negro. Cada animal permaneció 5 minutos dentro de la caja, siendo gentilmente introducido en el centro de la arena al inicio de la prueba. Con el auxilio del programa de análisis ANY-maze Video Tracking

System (Stoelting Co.), el piso de la caja fue dividido virtualmente en nueve cuadrantes de la misma área (10x10 cm), los que fueron tomados como parámetro para extracción de datos, número de cruce de líneas, y así evaluar la actividad exploratoria.



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

La línea negra representa los días recorridos de la ventana temporal y las líneas coloridas, los diferentes grupos de regimenes de dieta (azul = HD, rojo = HD/SD y verde = HD/SD/HD). Los círculos marcan los cambios de dieta, siendo el último círculo de las líneas coloridas la marca del inicio de las pruebas comportamentales.

Figura 2 – Secuencia temporal de eventos de actividad masticatoria para los grupos en sus ventanas temporales de 6, 12 y 18 meses.

Además, en cada ventana temporal, los animales fueron sometidos a la prueba del Laberinto en Cruz Elevado (LCE), constituido por dos brazos abiertos y dos cerrados (35x5 cm) colocados en posiciones opuestas y una plataforma central (5x5 cm)¹⁵. Los brazos cerrados tienen paredes de 17 cm de altura, mientras que los brazos abiertos no tienen paredes. El piso del laberinto quedaba a 75 cm del suelo. El animal era colocado en la plataforma central del LCE con libertad para que explotara el ambiente por un período de 5 minutos. Las variables que se utilizaron para analizar en esta prueba fueron el tiempo de permanencia y la distancia recorrida en los brazos abiertos y cerrados.

Al igual que la prueba de campo abierto, el LCE también fue filmado a través de *webcam* y las imágenes del comportamiento procesadas con el uso del *software* ANY-maze Video Tracking System (Stoelting Co.). En el LCE, se estimó para cada animal un índice de comportamiento similar al ansioso, basado en el contraste entre los tiempos gastados o las distancias recorridas en los brazos abiertos y cerrados: $C = (\text{Cerrado} - \text{Abierto}) / (\text{Cerrado} + \text{Abierto})$. Los valores positivos indicaban que la cantidad de tiempo gastado o la distancia recorrida fueron mayores en los brazos cerrados, comparados a los brazos abiertos. El índice de contraste se aplicó para normalizar los datos, minimizando las diferencias en la actividad locomotora.

Para el análisis estadístico, se utilizaron siete animales por grupo experimental, considerando el proceso de muerte natural (N inicial de 12 animales) y este se un valor válido para extraer resultados significativos, conforme Baykara et al¹⁷.

A seguir, los grupos fueron sometidos a pruebas de normalidad para identificar posibles desvíos, y el análisis estadístico paramétrico evaluó el grado de significación de los resultados, empleando el análisis descriptivo (datos cuantitativos), de varianza (ANOVA)

para tres criterios, seguido de la pos-prueba de Tukey. El nivel de significación para diferencias estadísticas se definió en $\alpha < 0,05$.

RESULTADOS

CURVA DE PESO

Durante la formación de los grupos experimentales, los animales fueron pesados mensualmente. En el análisis de la curva de peso, no hubo diferencias significativas entre los grupos, lo que corrobora la igualdad nutricional entre las dietas; la diferencia está restringida a la forma de presentación del alimento.

Los valores exactos de media y error estándar, para cada grupo experimental, relacionados al peso final de los animales, están representados en el cuadro 1.

CRUCE DE LÍNEAS – CAMPO ABIERTO

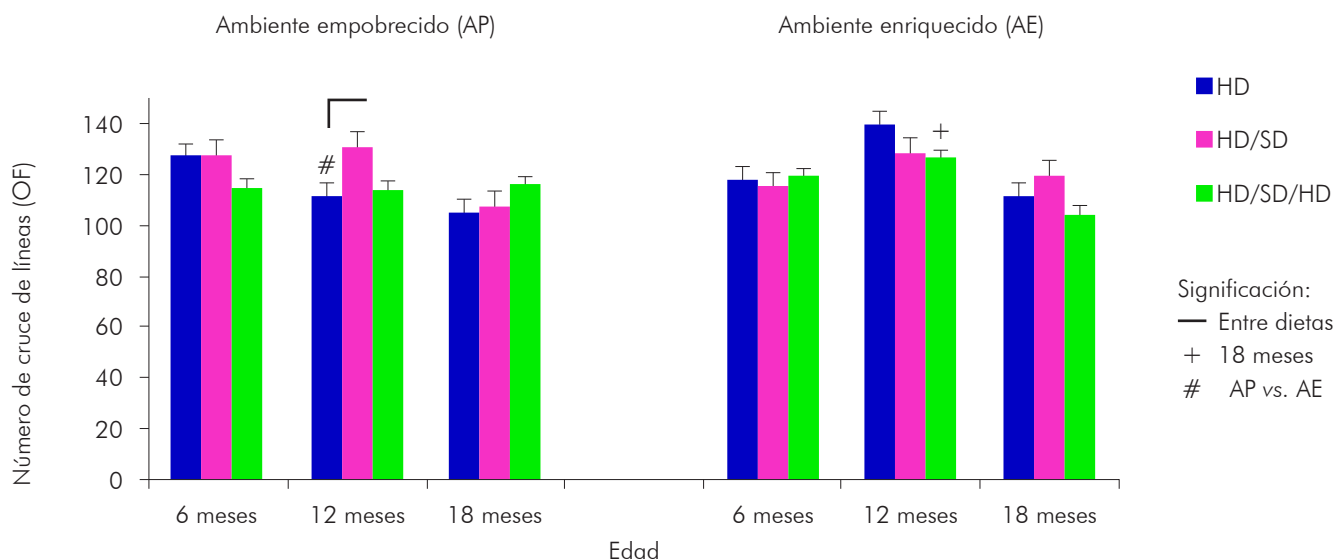
Al analizar el cruce de líneas durante la exploración del campo abierto, se evidenció que había condiciones comunes de deambulación entre los grupos, sin diferencias significativas en el análisis de varianza (un criterio) (Figura 3).

Cuando se realizó el análisis de varianza de tres criterios, se encontró que el ambiente ($F_{(1,108)} = 0,74$, $p < 0,391232$) y la dieta ($F_{(2,10)} = 0,818$, $p < 0,444020$) no influenciaron significativamente el patrón de exploración de los animales en el campo abierto. Sin embargo, el factor de edad ($F_{(2,108)} = 5,36$; $p < 0,006008$) influyó significativamente. Sin embargo, la interacción de las variables ambiente, edad y dieta no reveló resultados expresivos.

Los valores exactos de promedio y error estándar para cada grupo experimental, relacionados con el número de cruce de líneas, se representan en el cuadro 2.

Grupos	Peso final de los animales (gramos): promedio \pm error-estándar					
	Ambiente Estándar			Ambiente Enriquecido		
	6 meses	12 meses	18 meses	6 meses	12 meses	18 meses
HD	69,32 \pm 1,8	63,08 \pm 1,9	72,12 \pm 3,7	50,24 \pm 1,7	60,17 \pm 1,7	68,35 \pm 2,3
HD/SD	54,66 \pm 0,9	57,57 \pm 4,5	56,58 \pm 2,3	49,84 \pm 1,8	60,41 \pm 1,5	65,81 \pm 2,3
HD/SD/HD	70,07 \pm 1,7	67,22 \pm 2,4	69,65 \pm 3,8	46,94 \pm 2,5	52,38 \pm 1,1	59,85 \pm 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

Cuadro 1 – Promedio de peso de los animales, presentado en gramos. Promedio y respectivos valores de error-estándar con base en el peso de los animales para los grupos experimentales de 6,12 y 18 meses de edad, en los diferentes regímenes de dieta (HD, HD/SD o HD/SD/HD) y ambientes (estándar o enriquecido). Valores significantes obtenidos en el análisis de varianza (ANOVA) de un criterio (valores de F y de p), en la comparación de grupos con la misma edad y ambiente, pero distinta dieta.



En las significaciones ($p < 0,05$), las líneas de conectores indican diferencias significativas entre distintos regímenes de dieta, pero mismo ambiente y edad; (+) diferencias significativas entre las edades con 18 meses, pero igual régimen de dieta y ambiente; (#) diferencias significativas entre los ambientes, pero igual régimen de dieta y edad.

Figura 3 – Representación gráfica de los valores del número de cruces de líneas en el campo abierto

Grupos	Número de cruces de líneas: promedio (%) \pm error-estándar					
	Ambiente estándar			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

Cuadro 2 – Número de cruces de líneas en tiempo total de la prueba en campo abierto. Promedio del número de cruces de líneas y respectivos valores de error-estándar para los grupos experimentales de 6,12 y 18 meses de edad en los distintos regímenes de dieta (HD, HD/SD o HD/SD/HD) y ambientes (estándar o enriquecido).

ANÁLISIS DEL TIEMPO DE PERMANENCIA EN EL BRAZO CERRADO DEL APARATO – LCE

Al analizar el tiempo total de exploración de la prueba, en la relación entre brazo abierto y brazo cerrado, se evidenció que la influencia de la alteración masticatoria fue marcada en la ventana temporal de 18 meses del ambiente estándar (Figura 4).

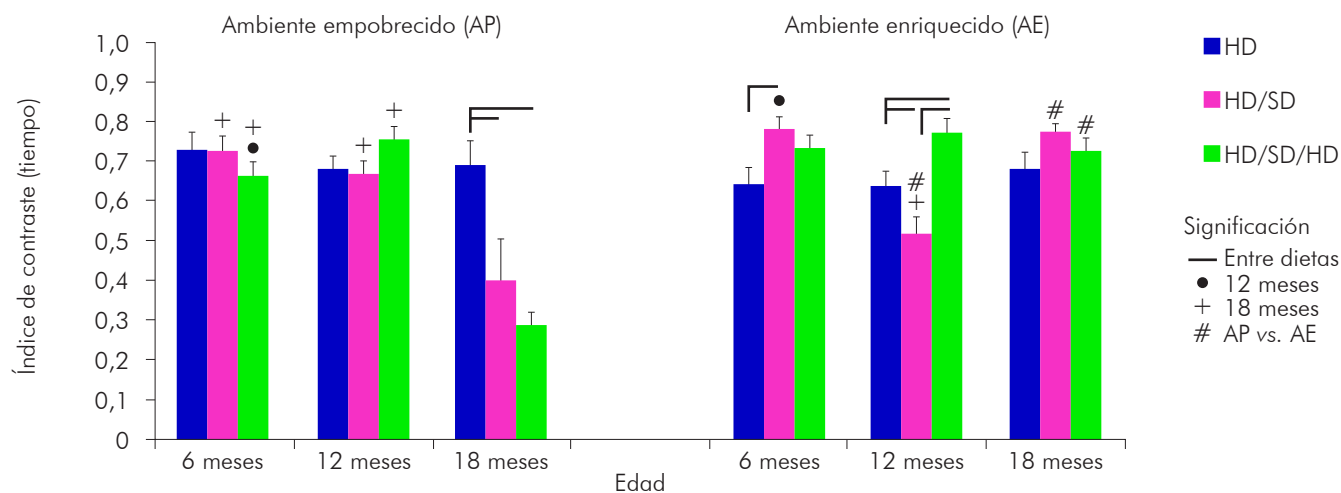
El análisis *three-way* reveló que el ambiente ($F_{(1,108)} = 13,0$; $p < 0,00046$) y la edad ($F_{(2,10)} = 11,8$; $p < 0,000023$) influyeron significativamente el patrón de exploración de los animales en el LCE. Estas dos variables interactuaron con la alteración masticatoria, cambiando los niveles de comportamiento similares al ansioso ($F_{(4,108)} = 4,83$; $p < 0,01$). La combinación dos a dos de las variables probadas también reveló interacciones significativas y esto incluyó ambiente y edad ($F_{(2,108)} =$

23,8; $p < 0,000001$), ambiente y dieta ($F_{(2,10)} = 10,1$; $P < 0,000103$) y edad y dieta ($F_{(4,10)} = 8,64$; $p < 0,000004$). Los valores exactos de promedio y error estándar, para cada grupo experimental, relacionados con el índice de contraste con base en el tiempo, están representados en el cuadro 3.

ANÁLISIS DE LA DISTANCIA RECORRIDA DURANTE LA PRUEBA LCE

En el estudio de la variable distancia (Figura 5), se observa, en las ventanas temporales de 6 e 12 meses, en ambos ambientes, una relación directa entre el tiempo dispendido en el brazo cerrado y la distancia recorrida.

Los valores exactos de promedio y error estándar, para cada grupo experimental, relacionados al índice de contraste con base en la distancia, están representados en el cuadro 4.

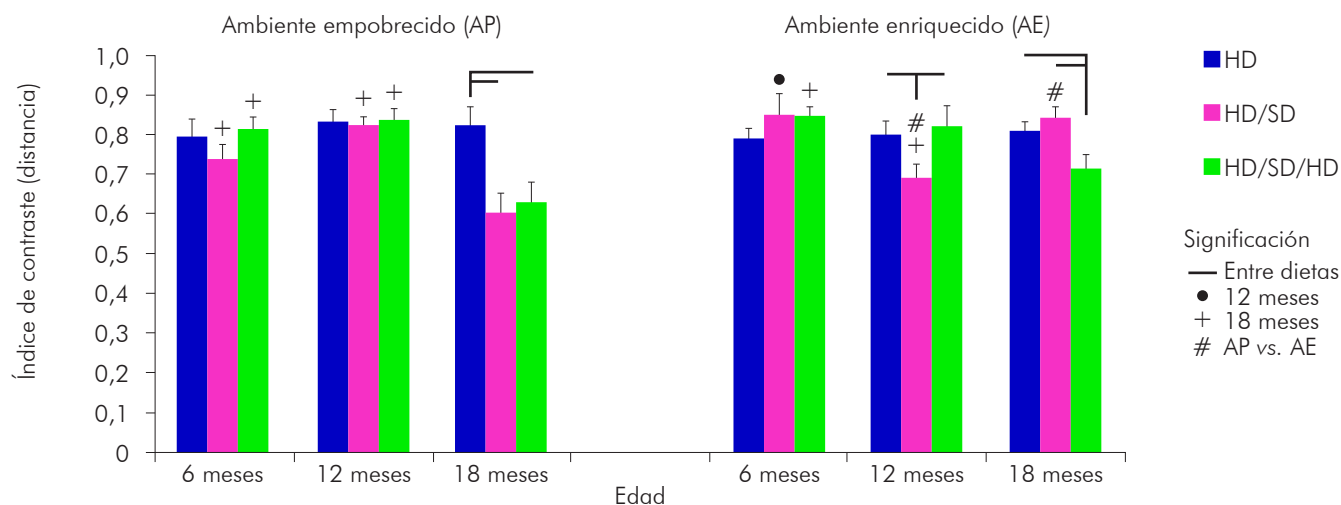


En las significaciones ($p < 0,05$), las líneas de conectores indican diferencias significativas entre distintos regímenes de dieta, pero mismo ambiente y edad; (●) diferencias significativas entre las edades con 12 meses, pero igual régimen de dieta y ambiente; (+) diferencias significativas entre las edades con 18 meses, pero igual régimen de dieta y ambiente; (#) diferencias significativas entre los ambientes, pero igual régimen de dieta y edad.

Figura 4 – Representación gráfica de los valores del índice sugestivo de ansiedad, aplicados a la prueba LCE con base en el tiempo gasto en el brazo cerrado y abierto, con el tiempo total de prueba

Grupos	Índice de Contraste (tiempo): promedio (%) \pm error-estándar					
	Ambiente estándar			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

Cuadro 3 – Índice de contraste para el tiempo gasto (medido en segundos) en los brazos del LCE. Promedio del índice de contraste en valores porcentuales y respectivos valores de error-estándar, con base en el parámetro tiempo gasto en los brazos del laberinto para los grupos experimentales de 6, 12 y 18 meses de edad, en los distintos regímenes de dieta (HD, HD/SD o HD/SD/HD) y ambientes (estándar o enriquecido)



En las significaciones ($p < 0,05$), las líneas de conectores indican diferencias significativas entre distintos regímenes de dieta, pero mismo ambiente y edad; (●) diferencias significativas entre las edades con 12 meses, pero igual régimen de dieta y ambiente; (+) diferencias significativas entre las edades con 18 meses, pero igual régimen de dieta y ambiente; (#) diferencias significativas entre los ambientes, pero igual régimen de dieta y edad.

Figura 5 – Representación gráfica de los valores del índice sugestivo de ansiedad, aplicados a la prueba LCE, con base en la distancia recorrida en el brazo cerrado y abierto, con el tiempo total de prueba

Grupos	Índice de Contraste (distancia): promedio (%) \pm error-estándar					
	Ambiente estándar			Ambiente enriquecido		
	6 meses	12 meses	18 meses	6 meses	12 meses	18 meses
HD	0,80 \pm 0,04	0,83 \pm 0,03	0,83 \pm 0,05	0,79 \pm 0,02	0,80 \pm 0,03	0,81 \pm 0,02
HD/SD	0,74 \pm 0,04	0,83 \pm 0,02	0,61 \pm 0,05	0,85 \pm 0,05	0,69 \pm 0,03	0,84 \pm 0,03
HD/SD/HD	0,82 \pm 0,03	0,84 \pm 0,03	0,63 \pm 0,05	0,85 \pm 0,02	0,82 \pm 0,05	0,71 \pm 0,03

Cuadro 4 – Índice de contraste para la distancia recorrida (medida en metros) en los brazos del LCE. Promedio del índice de contraste en valores porcentuales y respectivos valores de error-estándar, con base en el parámetro distancia recorrida en las zonas de arena de campo abierto para los grupos experimentales de 6, 12 e 18 meses de edad, en los diferentes regímenes de dieta (HD, HD/SD o HD/SD/HD) y ambientes (estándar o enriquecido)

DISCUSIÓN

La ansiedad se define como una anticipación emocional a una situación aversiva, es decir, es primariamente una respuesta a un peligro potencial evolucionando como respuesta conductual en el sentido de evitarlo⁹. Se distingue del miedo por el hecho de estar relacionado con una amenaza real y bien definida de peligro. La ansiedad, por lo tanto, estaría asociada a un estado de conflicto o incertidumbre y surge cuando existe la competencia entre dos opciones simultáneas y el individuo tiene que hacer una elección entre ellas^{9,10}.

Las causas que pueden llevar a un individuo a esos estados conflictivos y alterados de humor son innumerables, y su estudio, a partir de modelos animales, ha buscado responder a tres preguntas: qué sistemas neuronales están involucrados en las emociones; cómo estos sistemas funcionan cuando alterados; y cómo estas condiciones patológicas pueden ser modeladas¹⁸. Los análisis expuestos contribuyen a ese cuerpo de datos, indicando la interacción entre actividad masticatoria, edad y ambiente bajo comportamiento sugestivo de ansiedad.

El LCE, pautándose en el paradigma de la agorafobia, sugiere que niveles más altos de ansiedad estarían asociados con un aumento del tiempo de permanencia en el brazo cerrado del aparato¹⁹. En este experimento, se aclara la revelación de que la imposición de modificaciones del patrón de actividad masticatoria, sea por su reducción o por su rehabilitación, interfiere en el patrón comportamental de los animales.

En este contexto, estudios previos apuntaron que el acto de roer atenuaría una variedad de índices fisiológicos de estrés en ratones, tales como el aumento de actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y la participación de catecolaminas centrales^{20,21}. Hay informes de un aumento selectivo en la inmunorreactividad para c-Fos en la corteza prefrontal de ratones que optaron por masticar de forma espontánea durante la exposición al estrés²², señalando una mayor activación mesocortical en el acto de masticar.

Estudios utilizando neuroimagen, en particular la resonancia magnética funcional, son apuntados como importantes herramientas para investigar la fenomenología de los trastornos de ansiedad. En estos casos, la amígdala se ha mostrado hiperactiva en varios trabajos^{23,24}, aunque no en otros^{25,26}. La

región ventral de la corteza prefrontal, incluyendo la corteza prefrontal ventrolateral y el córtex del cíngulo anterior, también mostraron patrones anormales de activación^{24,25,27}. Esas áreas han sido destacadas en investigaciones sobre regulación y modulación de las emociones en poblaciones saludables, y se especula que la corteza prefrontal y el giro del cíngulo modularían esas respuestas, mientras que la amígdala hiperactiva sería observada solamente en los casos de ansiedad elevada²⁸. Además, el empleo de la resonancia magnética funcional reveló pérdida asociada al envejecimiento de la reactividad de la amígdala y, en contraposición, una actividad amplificada en la corteza prefrontal en respuesta a estímulos nocivos^{29,30,31,32,33}. Esto explicaría el hecho de que los animales viejos de ambiente empobrecido presentaran una reducción de comportamiento similar al ansioso en comparación con los adultos jóvenes.

En cuanto al envejecimiento, está bien documentado que está asociado al declive de las funciones cognitivas y también a los cambios emocionales. Se verifica que los ratones viejos, de ambiente empobrecido y que han sufrido alteración de la actividad masticatoria, presentaron reducción del tiempo de permanencia en el brazo cerrado en relación a los animales jóvenes. De esta forma, cambios en el estado ansioso y relacionados a la edad parecen tener origen multifactorial³⁴, justificando posiblemente, los controvertidos hallazgos en la literatura, sobre todo en modelos experimentales donde los resultados parecen depender también de las pruebas y de los procedimientos experimentales aplicados.

En este contexto, utilizando ratones machos C57BL6/J jóvenes (con 7 y 14 semanas de vida) criados en AP y sometidos a dieta con alimento granulado, Nose-Ishibashi et al³⁵ concluyeron, en una prueba de campo abierto, que una dieta habitual con ración en polvo puede afectar la capacidad de respuesta a nuevos ambientes, generando, incluso, posible dificultad de estos animales para adaptarse a los nuevos ambientes.

En el presente estudio, se quiso analizar la influencia que la edad, la alteración masticatoria y el ambiente ejercen en el comportamiento sugestivo de ansiedad. Al seguir el protocolo de trabajos realizados previamente en investigaciones del Laboratorio, se optó por la utilización de ratones hembras, sin el objetivo, en ese caso, de realizar la comparación entre machos y

hembras. Esta opción se debe a la reconocida influencia hormonal y su capacidad para promover cambios celulares, en particular de los astrócitos. Mouton et al³⁶ concluyeron que las hembras seniles de la variedad C57Bl6J presentaron un 18,3% más de astrócitos que hembras jóvenes y un 32% más que machos de edades correspondientes. Así, es razonable suponer que puede haber diferencias también en el comportamiento. En este trabajo se utilizaron solamente hembras y se consideraba que ellas, incluso las más seniles, estaban bajo el mismo estado hormonal, creyendo así que las variables contribuyentes a los hallazgos conductuales fueron la alteración de la masticación o el ambiente.

Muchos estudios que investigan los efectos de la estimulación ambiental sobre comportamientos similares a la ansiedad son controvertidos. Hay estudios que apuntan a que el ejercicio disminuiría los síntomas de depresión y la ansiedad^{37,38,39}, mientras que otros sugieren que sería ansiogénico^{39,40,41}. Esta aparente inconsistencia puede ser, en parte, atribuida al tipo de prueba de ansiedad aplicado en un caso y en otro, así como a la especie y la variedad del animal utilizado en el experimento.

En lo que se refiere al análisis de la distancia recorrida, es útil para investigar el tiempo asociado a la inmovilidad. Constatada la contribución significativa del tiempo inmóvil para el tiempo total en el brazo cerrado, es posible sugerir, por ejemplo, que hay acomodación del animal a la prueba y eso puede representar desinterés en explorar el ambiente. El experimento arriba relatado, sin embargo, no se encuadra en ese caso.

En general, los animales con alteración masticatoria presentaron diferencias significativas en los índices de contraste en comparación con los animales controles (HD), sugiriendo que la masticación induciría a modificación en el patrón de permanencia en el brazo cerrado.

El enriquecimiento ambiental podría tener su influencia interpretada como inductor de estrés, y la

renovación continua del medio, por la sustitución o el desplazamiento de los juguetes, podría ser comparable a exposiciones repetidas al estrés leve⁴². Esto, de forma crónica, podría tornar a los animales viejos, de ambiente enriquecido, más vulnerables⁴³.

Finalmente, la transición demográfica colabora para la incidencia de procesos neurodegenerativos y trastornos de comportamiento. El trastorno de ansiedad generalizada se correlaciona con un peor estado de salud general y comorbilidades comunes al envejecimiento⁴⁴. Ante esto, los modelos murinos anhelan identificar los cambios funcionales y estructurales, a fin de correlacionarlos con los cambios de comportamiento. De este modo, por más que haya limitación en la transposición de resultados en las diferentes especies citadas, el presente estudio indicó que variables, como la estimulación ambiental y la alteración de la actividad masticatoria, pueden contribuir en esos procesos de alteración comportamental.

CONCLUSIÓN

A partir de la interacción entre condiciones de envejecimiento, alteración de la actividad masticatoria la estimulación somatomotora y visoespacial, se investigaron las posibles alteraciones de comportamiento sugestivo de ansiedad. La alteración de la actividad masticatoria influye en el patrón de permanencia en el brazo cerrado, y la estimulación ambiental acentúa sus efectos, privilegiando la preferencia por el brazo cerrado como sugestión de un estado ansioso en los animales jóvenes y seniles y con alteraciones del patrón de la actividad masticatoria. Mecanismos celulares y moleculares permanecen para ser investigados.

APOYO FINANCIERO

Fondo de Amparo a la Investigación del Estado de Pará (FAPESPA – n° otorgado 136/2008) y Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq – n° proceso 475677/2008-0).



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

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 influenciavam 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.

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.



REFERENCIAS

- 1 World Health Organization. Noncommunicable Diseases and Mental Health Cluster. Noncommunicable Disease Prevention and Health Promotion Department. Active ageing a policy framework. Geneva: WHO; 2002.
- 2 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.
- 3 Mendes FCCS, Almeida MNF, Felício APG, Fadel AC, Silva DJ, Borralho TG, et al. Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. *BMC Neurosci*. 2013 Jun;14:63.
- 4 Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci*. 2010 Oct;87(17-18):521-36.
- 5 Volkerskm, Scherder EJ. Impoverished environment, cognition, aging and dementia. *Rev Neurosci*. 2011 Jun;22(3):259-66.
- 6 Weijenberg 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 Kim JJ, Song EY, Kosten TA. Stress effects in the hippocampus: synaptic plasticity and memory. *Stress*. 2006 Mar;9(1):1-11.
- 12 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.
- 13 Engin E, Treit D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol*. 2007 Sep;18(5-6):365-74.
- 14 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.
- 15 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.

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

Se refiere al doi: 10.5123/S2176-62232016000400009, publicado originalmente en portugués.

Traducido por: Lota Moncada

Cómo citar este artículo / How to cite this article:

Borrvalho TG, Mendes FCCS, Diniz CWP, Sosthenes MCK. Influencia de la actividad masticatoria, de la edad y del ambiente sobre el comportamiento sugestivo de ansiedad en modelo murino. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2016 oct-dic;7(4):1-11. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232016000400009>