http://journal.unoeste.br/index.php/cv
DOI: 10.5747/cv.2019.v11.n2.v259
ISSN on-line 1984-6436

Colloquium Vitae

EFEITOS DA RESTRIÇÃO HÍDRICA E ALIMENTAR SOBRE A CORTICOSTERONA SÉRICA E A ANSIEDADE DE RATOS WISTAR

Raissa de Oliveira Mantovani, Felipe Viegas Rodrigues

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Curso de Biomedicina, Presidente Prudente, SP. E-mail: raissamantovani@outlook.com

RESUMO

A ansiedade é uma emoção com consequências psicológicas e fisiológicas para o organismo. Gera estresse, sendo possível ser avaliado pelos níveis de glicocorticóide sanguíneo, um importante biomarcador daquele. O presente trabalho buscou investigar se a restrição hídrica e alimentar, rotineiramente empregada com animais de laboratório, é capaz de induzir estresse em ratos Wistar submetidos a tempos progressivamente maiores de restrição. Trinta e seis ratos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos, sendo um grupo controle sem restrição, e três grupos com restrições, em intervalos de 24h, 36h e 48h. O nível de estresse dos animais foi avaliado através dos níveis de corticosterona sérica e pelo teste no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Os resultados mostraram ausências de diferenças significantes entre os grupos com níveis semelhantes de corticosterona sérica e de ansiedade, sugerindo que o tratamento não foi capaz de modular o nível de ansiedade dos animais.

Palavras-chave: ansiedade, corticosterona, LCE, restrição.

EFFECTS OF WATER AND FOOD RESTRICTIONS ON SERUM CORTICOSTERONE AND ANXIETY OF WISTAR RATS

ABSTRACT

Anxiety is an emotion with psychological and physiological effects on the organism. It generates stress which can be evaluated by the levels of blood corticosterone, an important biomarker of the level of stress. The present study investigated if water and food restriction, commonly used in laboratory animals, is able to induce stress in Wistar rats subjected to progressively larger restriction times. Thirty-six Wistar rats were randomly divided into four groups: one Control Group (no restriction) and three groups of water and food restriction (Group 24h, 36h and 48h). The stress level of the animals was assessed by means of serum corticosterone and on the Elevated Plus Maze Task (EPM). Results showed absence of significant differences between groups with high levels of serum corticosterone and anxiety, suggesting that the treatment was not able to modulate stress levels in all animal.

Keywords: anxiety, corticosterone, EPM, restriction.

INTRODUÇÃO

Emoções são respostas transitórias que se manifestam em nível fisiológico, cognitivo e comportamental. Segundo Oatley[1], funcionam no gerenciamento de objetivos, isto é, promovem resposta comportamental mais adequada. Ansiedade é o nome dado ao sentimento eliciado por certos estímulos e envolve sentimento

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

principal de antecipação e expectativa a eventos futuros.

Assim, várias alterações fisiológicas podem ser observadas durante uma resposta ansiosa, mediadas por estimulação simpática: aumento da frequência cardíaca e respiratória, pressão arterial, tônus muscular, além da inibição do trato gastrointestinal, dilatação da pupila e aumento do fornecimento de energia metabólica aos músculos esqueléticos [2].

Com relação ao comportamento, uma ameaça pode desencadear respostas como esquiva, congelamento, aproximação e avaliação de risco, e em caso de muita ansiedade, podem ocorrer ainda respostas de defesa ou de ataque[3].

Sendo assim, Corticosterona é o principal corticoide a ser secretado nos ratos[4]. Os glicocorticóides participam em todas as etapas da resposta de estresse, e são, por isso, considerados como marcadores biológicos[5], tendo como papel relevante em todo o momento da resposta de estresse, e ainda, indiretamente, continua após o desaparecimento do agente estressor[6].

Por conseguinte, a glândula suprarrenal, na sua porção cortical (zona fasciculada), é a responsável pela síntese dos glicocorticóides e está sob o comando adenohipofisário do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) que, por sua vez, é controlado pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH), secretado pelo hipotálamo[7], já que a resposta ao estresse gera a secreção de ACTH, que desencadeia a liberação de glicocorticóides.

Vale frisar que tanto corticosterona quanto ACTH seguem um ciclo circadiano de liberação[8] , ou seja, ciclos de 24h onde há variação de iluminação ambiental denominado dia e noite, respectivamente, isto é, fase clara e fase escura[9,10]. Tal alternância de variação é o que garante a sincronização endógena, embora seja passível de influência por fatores externos, em geral são regulados por controle do Núcleo Supraquiasmático do Hipotálamo[8,11].

Segundo Tomanari, Pine e Silva[12] a privação hídrica ou alimentar é uma das operações motivacionais mais comumente usadas em laboratórios de Psicologia para o estudo de processos de aprendizagem. Assim, privam-se os animais de alimento ou água, que serão apresentados como consequências de comportamentos emitidos em sessão. Este procedimento faz com que as respostas que produziram a comida ou água aumentem de frequência.

No entanto, pouco se avalia as consequências da restrição para o comportamento dos animais. Leathwood e Plummer (1969) descrevem que ambas as restrições levam a hiperatividade, curiosidade diminuída e diminuição do comportamento exploratório, comportamentos semelhantes ao de ratos ansiosos [13].

Desde a década de 80 o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) vem sendo utilizado como um dos principais e mais robustos instrumentos de mensuração de ansiedade [14-17]. Fatores como seu baixo custo de produção e utilização, assim como sua rapidez de aplicação foram essenciais na sua popularização e seu princípio básico de funcionamento reside em novos ambientes gerarem tanto medo como curiosidade, criando um conflito esquiva-aproximação[18]. Os parâmetros mais usados são o tempo gasto em cada braço, o número de entradas nos braços abertos e as porcentagens de tempo, sendo a permanência nos braços abertos um índice robusto de ansiedade [16].

A combinação da medida dos níveis de corticóides com o desempenho de ratos no LCE tem grande relevância para o entendimento do quanto as restrições hídrica e alimentar podem estressar os animais e avaliar a amplitude de alterações tanto em seus aspectos subjetivos (emocionais) quanto fisiológicos.

Portanto, o presente trabalho tem como avaliar se restrições hídricas e alimentares com diferentes períodos de duração, tem efeitos ansiogênicos sobre ratos Wistar.

METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados 36 ratos albinos, machos, da raça Wistar com aproximadamente 100 dias de vida como sujeitos experimentais. Os animais pesavam entre 250 e 450g e foram fornecidos pelo Biotério Central (BC) da Universidade. Foram alojados individualmente em gaiolas de metal e distribuídos entre quatro grupos (n=9 cada): (1) um Grupo Controle; e três grupos privados de água e alimento por intervalos de tempo progressivamente maiores, constituindo o (2) Grupo 24 horas; o (3) Grupo 36 horas; e o (4) Grupo 48 horas. O período de adaptação ao laboratório, onde os experimentos

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

foram realizados, foi de uma semana, período no qual os animais tiveram água e alimento *ad libitum*. A restrição apenas teve início após esse período, para os experimentos.

Todos os procedimentos foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade (Protocolo 1732). O número final de ratos em cada grupo foi de n=7 para o Grupo Controle, n=8 para o Grupo 24h, n=9 para o Grupo 36h e n=8 para o Grupo 48h, por problemas com a coleta de sangue de quatro dos animais (coleta insuficiente em dois ratos e anestesia ineficiente em outros dois).

Aparato

O LCE (Figura 1) é um aparato elevado a 50 cm do chão, constituído por passarelas em forma de cruz simétrica formada por quatro braços de 50x10cm, sendo dois braços abertos (A) e dois fechados (B) por paredes laterais com 40cm de altura. Todos os braços são unidos por um Quadrante Central (QC) de 10x10 cm, a área de junção dos quatros braços [18, 19, 20]. Cada rato é colocado individualmente no QC voltado para um dos braços fechados e tem 5 minutos para explorar o ambiente. Os parâmetros do teste já têm sido extensivamente validados, inclusive para o teste de drogas ansiolíticas [18].



Figura 1. Demonstração do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).[21]

Coleta e análise de amostras

As amostras de sangue (2 mL) foram coletadas por punção cardíaca [22] com tubos a vácuos sem heparina, refrigerado até 7 dias entre 2° e 8°C e enviadas para o laboratório Hermes Pardini, Belo Horizonte-MG, para análise quantitativa de Corticosterona. A dosagem foi realizada pelo método de Quimioluminescência.

Procedimento

Todos os testes foram conduzidos dentro do Laboratório de Psicologia Experimental (LPE) numa sala com iluminação ambiente. Após uma semana de aclimatação, deu se início aos experimentos.

No primeiro dia do experimento foram testados os ratos do Grupo Controle e iniciada a privação hídrica e alimentar dos três grupos de restrição (Grupo 24h, 36h, e 48h). No LCE os ratos eram colocados sobre a plataforma central com a cabeça sempre voltada para um dos braços

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

fechados, podendo explorar o labirinto por cinco minutos. Os dados de movimentação do animal foram registrados com o programa X-Plo-Rat[23], software para registro comportamental do LCE. Entre um teste e outro, o LCE era limpo com álcool 70% e os ratos eram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg) para a coleta de sangue.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos Vacutainer de 4mL, com a agulha 25x7 mm a vácuo, 2mL de sangue por punção cardíaca, onde posicionava-se o animal em decúbito dorsal, localizava-se o coração posicionando o dedo indicador sobre o tórax, introduzindo a agulha perpendicularmente à parede torácica [24, 25].

Dado que o Corticosterona sofre variações diárias nos níveis séricos, as amostras de sangue e os testes no LCE foram realizados ao redor das duas horas da tarde para os grupos Controle, 24h e 48h e às duas horas da manhã para o Grupo 36h, horários em que os níveis de Corticosterona sérica são semelhantes para a espécie [26].

Ao final do experimento os ratos foram recolocados em suas caixas individuais sendo retirados de suas restrições hídrica e alimentar.

Análise dos dados

Uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA) foi utilizada para comparar os níveis de corticosterona sérica e o desempenho no LCE, com grupo como fator entressujeitos. Para o LCE, foram considerados como indicadores de ansiedade a porcentagem de tempo em braços abertos (TBA), a porcentagem de tempo em braços fechados (TBF) (ambos calculados em função do tempo total gasto em braços do LCE, isto é, excluindo-se o tempo no QC) e o número de entradas nos braços abertos (EBA).

O número de entradas nos braços fechados (EBF) foi utilizado como medida de atividade locomotora. Além disso, o tempo no QC foi utilizado como uma estimativa de tomada de decisão [18].

RESULTADOS

A MANOVA apresentou ausência de diferença significante entre os Grupos ($F_{12,81}$=0,365; p=0,517) na comparação geral.

Amostras de Corticosterona

Os níveis médios de Corticosterona sérica podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios e erro padrão da média (EPM) de Corticosterona sérica por grupo (µg/dL). MANOVA (p=0,713).

Grupos	Média	Erro Padrão
Grupo Controle	0,614	0,096
Grupo 24h	0,538	0,050
Grupo 36h	0,633	0,060
Grupo 48h	0,625	0,056

Os testes univariados da MANOVA mostraram ausência de diferença significante para os níveis de Corticosterona sérica dos ratos ($F_{3,28}$=0,047; p=0,713) (Figura 2).

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

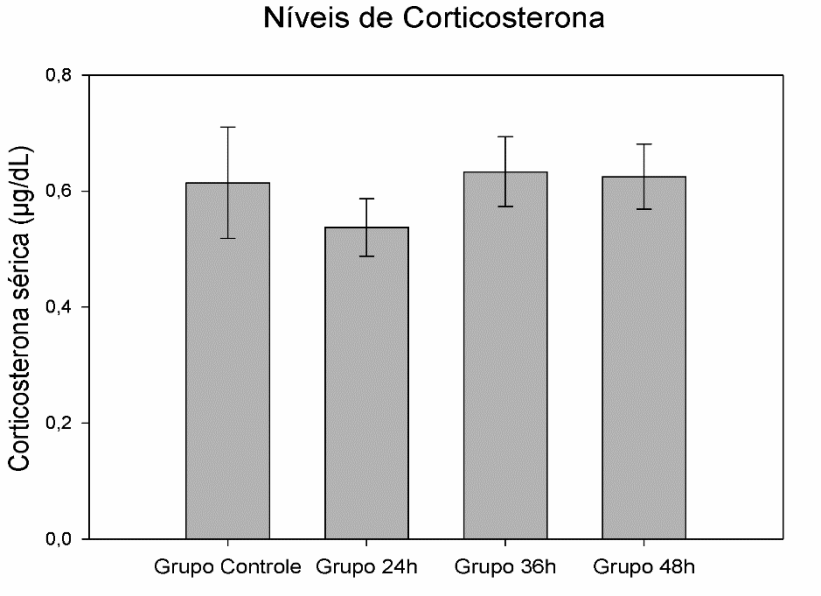

Figura 2. Níveis médios de Corticosterona sérica em µg/dL nos Grupos Controle, 24h, 36h e 48h. Barras representam EPM.

Teste comportamental

Os testes univariados da MANOVA mostraram ausência de diferença significante para a TBA ($F_{3,28}$=1,000; p=0,407), ausência de diferença significante para a TBF ($F_{3,28}$=1,000; p=0,407) e ausência de diferença significante para o EBA ($F_{3,28}$=1,000; p=0,407). A Figura 3 mostra que os ratos dos Grupos Controle, 36h e 48h gastaram 100% do tempo em braços do LCE nos braços fechados do LCE. Os dados brutos (não mostrados) revelam que no Grupo 24h, apenas um dos ratos, uma única vez entrou nos braços abertos, gerando a pequena porcentagem exibida na Figura 3.

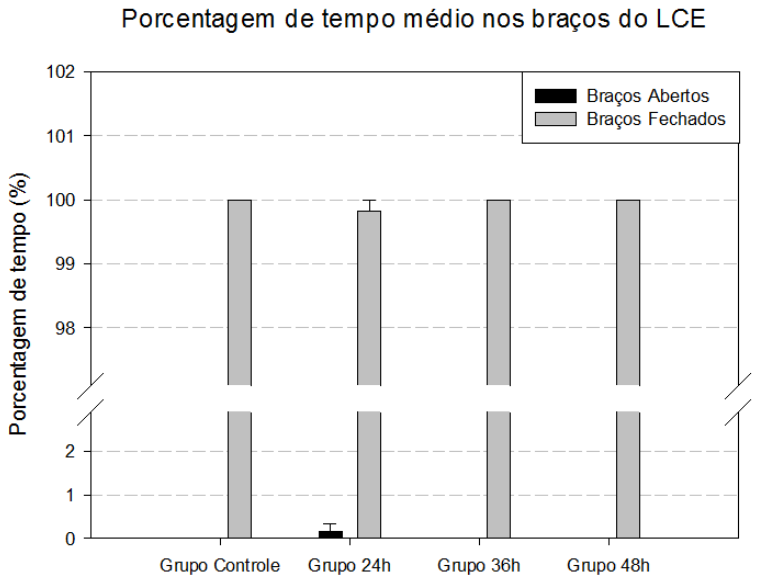

Figura 3. Porcentagem de tempo médio gasto em braços abertos e fechados do LCE para os Grupos Controle, 24h, 36h e 48h.

A MANOVA apontou ainda diferença significante para o EBF ($F_{3,28}$=39,026; p=0,023). O teste *post hoc* (Tukey HSD) aponta diferenças entre os Grupos Controle e 24h (p=0,024),

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

indicando que o Grupo 24h caminhou mais entre os dois braços fechados do LCE (Figura 4).

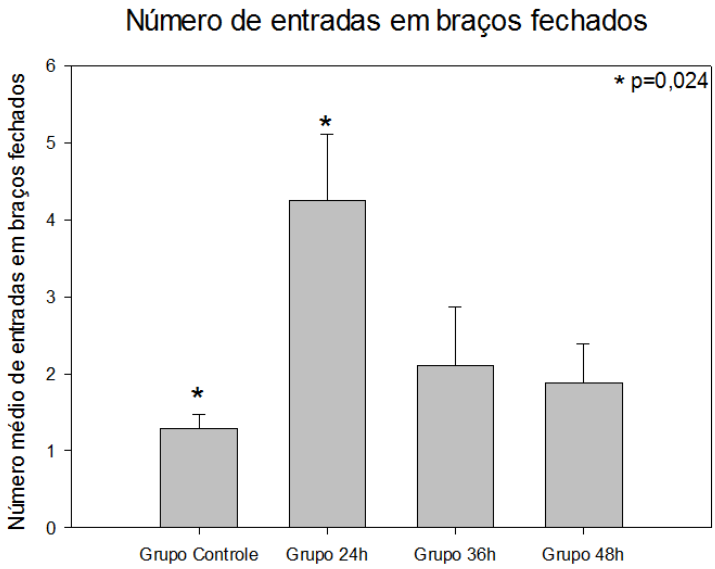

Figura 4. Número total médio de entradas nos braços fechados do LCE nos Grupos Controle, 24h, 36h e 48h. Barras representam EPM.

A MANOVA também mostrou diferenças significantes para o Tempo no Quadrante Central ($F_{3,28}$=0,005; p=0,032) e o teste *post hoc* (Tukey HSD) também aponta diferenças entre os Grupos Controle e 24h (p=0,042), além de diferença próxima de significante entre os Grupos Controle e 48h (p=0,065), revelando que o Grupo 24h consumiu mais tempo decidindo que ambiente do LCE explorar, pelo menos em relação ao Grupo Controle (Figura 5).

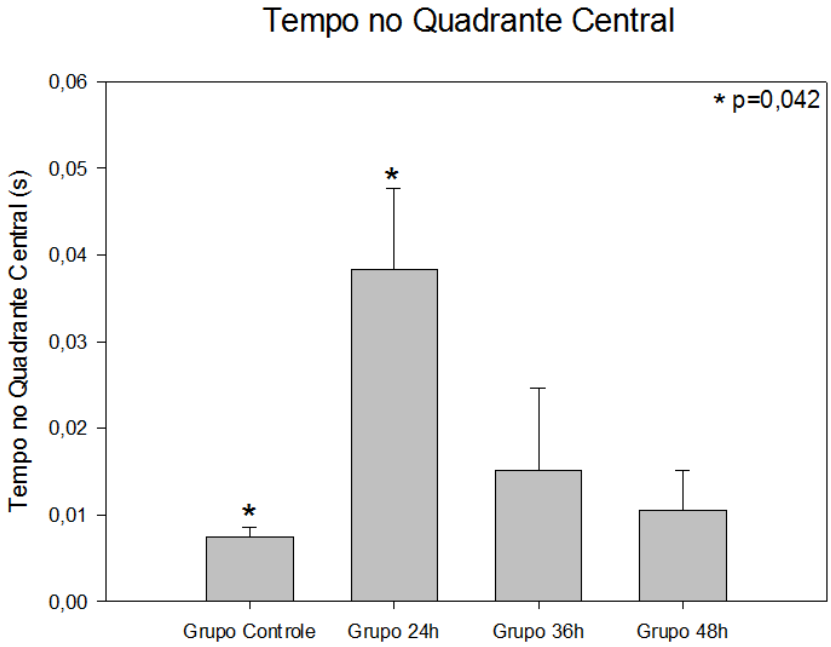

Figura 5. Tempo médio gasto no Quadrante Central do LCE nos Grupos Controle, 24h, 36h e 48h. Barras representam EPM.

No conjunto, esses dados não suportam diferenças de ansiedade entre os grupos, mas apontam que todos os ratos no experimento, mesmo aqueles do Grupo Controle estavam ansiosos.

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

DISCUSSÃO

A ausência de diferenças significantes, com relação aos divergentes níveis de ansiedade entre os grupos Controle e os grupos 24h, 36h e 48h de restrição hídrica e alimentar submete-se tanto pelos níveis de Corticosterona sérica, quanto pelo teste comportamental no LCE, inclinando-se a uma casuística em que o Grupo 24h gastou mais tempo no quadrante central do LCE, índice de Tomada de Decisão, e os mesmos também transitaram mais entre os dois braços fechados do LCE, índice de atividade locomotora.

Desse modo, é importante apontar que a ausência de diferença entre os grupos pode ser causada por dois fatores distintos: em primeiro lugar porque o tratamento realizado com os grupos (restrição hídrica e alimentar) não foi suficiente para gerar ansiedade nos ratos, ou porque todos os ratos, incluindo aqueles do Grupo Controle, estavam ansiosos. Os resultados apresentados, tanto para os níveis séricos de Corticosterona quanto para o comportamento no LCE, sustentam esta segunda hipótese.

Qian, et al.[25] apontam que o Corticosterona em ratos exibe ciclo diário de concentração sérica, com picos de concentração ao final da tarde, horário em que os animais acordam, já que os mesmos possuem hábitos noturnos. Humanos também apresentam ciclo circadiano para glicocórticoides, sendo o principal deles o Cortisol, porém com pico de liberação pela manhã [26].

Assim, para os horários em que os experimentos foram realizados (14h ou 2h), a concentração sérica esperada de Corticosterona seria de 0,1 µg/dL. Os dados obtidos apontam concentrações aproximadamente seis vezes maiores, indicando que os ratos estavam bastante ansiosos, o que é suportado também pelo teste comportamental.

Dessa forma, o presente experimento falhou em evidenciar possíveis efeitos ansiogênicos da restrição hídrica e alimentar, mas, por outro lado, sustenta que há uma miríade de fatores que podem influenciar o desempenho comportamental dos ratos, especialmente no LCE, como defendido por Rodgers e Dalvi[18].

Além do mais, o presente trabalho não buscou evidenciar qual o peso respectivo de cada um desses fatores na elevação dos níveis de ansiedade e, portanto, não poderia fazer considerações nesse sentido. Ainda assim, defende-se aqui que todos os fatores apontados a seguir podem ter contribuído em maior ou menor grau para elevar a ansiedade dos ratos.

Some-se a isto que as condições do biotério do LPE, onde os ratos foram aclimatados para o experimento, já pode ter sido um dos primeiros fatores ansiogênicos. Já em relação ao BC da UNOESTE, o biotério do LPE funcionava com ciclo claro-escuro invertido, isto é, as luzes eram acesas às 18h e apagavam-se às 6h. Todavia, dado o curto tempo de aclimatação (uma semana), os animais possivelmente não tiveram tempo suficiente para, de fato, aclimatarem-se às novas condições, gerando estresse.

Outrossim, a inversão do ciclo claro-escuro também inverte o padrão de liberação do hormônio Corticosterona, idealizando que mais duas semanas de aclimatação seriam necessárias para provocar a inversão do ciclo [28]. Frisa-se ainda que com a mudança de biotério, os animais também tiveram alteração de gaiolas e passaram a ficar em gaiolas individuais, outro fator ansiogênico [18].

Da mesma forma, a fase do dia também parece importante para os resultados obtidos no LCE, no que notasse para espécies noturnas. Bilu e Kronfeld-Schor[28] demonstraram que ratos apresentam comportamento mais ansiogênico no LCE, durante o dia, em relação à noite. Embora os dados apresentados neste trabalho não suportem essa diferença, vale notar que todos os testes foram no claro, com luz natural e artificial durante o dia, e com luz artificial durante a madrugada, de forma que a presença de luz pode ter sido um dos fatores que contribuíram para elevar a ansiedade dos ratos.

Dados semelhantes são reportados por Griebel, Moreau, Jenck, Martin e Misslin [29] que demonstraram que os ratos têm comportamento menos ansiosos pela manhã em relação à tarde e, ainda, que há mais ansiedade quando o labirinto está iluminado em relação à condição de baixa luminosidade. No entanto, não há dados para testes durante a madrugada, na fase ativa dos ratos.

Salienta-se que os autores também fizeram avaliações apenas comportamentais, sem avaliar as concentrações séricas de Corticosterona, embora estes resultados sejam condizentes com o ciclo circadiano de Corticosterona em ratos [25].

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Vale ressaltar que os horários do presente experimento foram escolhidos com base no ciclo diário de Corticosterona sérica, de forma que as concentrações basais fossem as mesmas para todos os grupos, apesar da inversão de fase em 12h do Grupo 36h. É importante notar também que o LCE permite avaliações independentes entre Ansiedade e Atividade Locomotora[18], de forma que efeitos gerados por animais em diferentes fases (sono ou vigília) poderiam ser avaliados independentemente.

Apesar disso, os resultados apontaram que somente o Grupo 24h, apresentou maior taxa de entrada em braços fechados e tempo no QC, indicando, respectivamente, maiores níveis de Atividade Locomotora e de Tomada de Decisão neste Grupo. Dados os altos níveis de ansiedade em todos os grupos, acreditamos que esta diferença não deve ser levada em consideração como significativa, como o resultado geral da MANOVA sugere.

A única particularidade do Grupo 24h é o menor tempo de restrição (em relação aos outros grupos que também tiveram restrição) e um dia a mais de aclimatação (em relação ao Grupo Controle), que não parece ser significativo para reduzir os níveis de ansiedade em relação ao pequeno período de aclimatação. Assim, talvez para o Grupo 24h ainda houvesse alguma reserva energética que justificasse a exploração do ambiente, o que não ocorreu para os grupos com maior tempo de restrição, mas, não há dados coletados do metabolismo dos animais, no presente experimento, que possam sustentar essa hipótese.

Destarte, este conjunto de dados suporta afirmações já feitas por outros autores, seja ressaltando os apontamentos de picos de concentração sérica dentro de um ciclo diário[25], demonstrando assim comportamentos mais ansiogênicos de ratos no LCE[28] sempre dentro de uma transição de dia e noite/claro e escuro. Ou mesmo frisando em pequenas particularidades no desempenho comportamental[18], tais como a singularização temporal na restrição hídricas e alimentares, ou mesmo de aclimatização pré-inclusão no LCE. Assim, em relação ao cuidado experimental em testes que envolvem ansiedade e, em especial, cronobiologia, além de chamar a atenção para o rigor no cuidado com biotérios e no trato com os animais de laboratório [18, 27, 28, 30, 31], os resultados mostraram-se, até certo ponto, com insignificantes diferenças entre os grupos com e sem restrições, deixando uma tênue limiar de ansiedade nas Tomadas de Decisões dos indivíduos daqueles.

DECLARAÇÃO DE AUSÊNCIA DE CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver qualquer potencial conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

REFERÊNCIAS

1. Oatley, K. Emotions. In: Wilson, R. A.; Keil, F. C. The MIT encyclopedia of the cognitive sciences. 1ª ed. Cambridge, MA. The MIT Press. 1999. pág. 273.

2. Stein DJ. Clinical Manual of Anxiety Disorders. Arlington: American Psychiatric Publishing 2004; 240 p. DOI: 10.1007 / s00702-009-0215-z.

3. Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. Eur. j. pharmacol. 2003; 463, 97– 116. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01276-7

4. Bhatnagar S, Costall B, Smythe JW. Hippocampal cholinergic blockade enhances hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. Brain Res 1997; 766 (1-2); 244-248. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00684-7

5. Garcia MC, Souza AG, Bella GP, Tacla AP, Grassi-Kassisse MD e Spadari- Bratfisch RC. Salivary cortisol levels in Brazilian citizens of distinct socioeconomic and cultural levels. Estresse, neurotransmissores e Hormônios. Ann NY Acad Sci. 2008 Dec; 1148: 504-8. https://doi.org/10.1196/annals.1410.065

6. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress response? Integrating permissive, supressive, stimulatory and preparative actions. Endocr Rev. 2000 fev; 21 (1): 55-89. https://doi.org/10.1210/er.21.1.55

7. Wade CE, Lindberg JS, Cockrell JL, Lamiell JM, Caça MM, Ducey J, Jurney TH. Upon-admission: adrenal steroidogenesis is adapted to the degree of illness in intensive care unit patients. J Clin Endocrinol Metab. 1988 Aug; 67 (2):223-7. https://doi.org/10.1210/jcem-67-2-223

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

8. Nader N, Chrousos GP, Kino T. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. Trends Endocrinol Metab. 2010 May;21(5):277-86. https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.12.011

9. Zaha MA. Shedding some needed light on optical measurements. Electronics 1972; 6, 91–96.

10. Trewartha GT, Horn LH. An Introduction to Climate, 5th Edition. New York: McGraw-Hill 1980.

11. Esseveldt LKE, Lehman MN, Boer GJ. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. Brain Res Brain Res Rev. 2000 Aug;33(1):34-77. https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00025-4

12. Tomanari GY, Pine AS, Silva MTA. Ratos Wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva 2003; 5, (1), 57-71. https://doi.org/10.31505/rbtcc.v5i1.91

13. Cocchetto DM, Bjornsson TD. Methods for Vascular Access and Collection of Body Fluids from the Laboratory Rat. J Pharm Sci. 1983, maio; 72 (5): 465-92. https://doi.org/10.1002/jps.2600720503

14. Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. Neurosci Biobehav Rev. 2005; 29 (8): 1193-205. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017

15. Handley SL e Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of ‘‘fear’’-motivated behaviour. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1984 Aug; 327 (1): 1-5. https://doi.org/10.1007/BF00504983

16. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods. 1985 Ago; 14 (3): 149-67. https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7

17. Pellow S e File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plusmaze: a novel test of anxiety in the rat. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 1986; 24, 525-529. https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6

18. Rodgers RJ e Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. Neurosci Biobehav Rev. 1997 Nov; 21 (6): 801-10. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00058-9

19. Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. Pharmacol Biochem Behav. 1996 maio; 54 (1): 21-30. https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02126-4

20. Wall PM e Messier C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. Neurosci Biobehav Rev. 2001 Maio; 25 (3): 275-86. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00013-6

21. Pires GN, Tufik S, Andersen ML. Relação entre privação de sono e ansiedade na pesquisa básica. Einstein (São Paulo) vol.10 no.4 2012. https://doi.org/10.1590/S1679-45082012000400022

22. Hoff J, LVT, RLATG. Methods of Blood Collection in the Mouse. Technique, November, Lab Animal 2000; Vol. 29, 10.

23. Cardenas FP, Lamprea MR e Morato S. XPloRat: freeware for animal recording. Desenvolvido pelo Laboratório de Comportamento Exploratório da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo - campus Ribeirão Preto. Disponível: http://www.oocities.org/xplorat/. In press 2002. Acesso em 15 de outubro de 2014.

24. Amorim BR, Braz JRC, Castiglia YMM, Vianna PTG, Módulo NSP. Efeitos da efedrina sobre funções cardiovascular e renal de cães sob anestesia com pentobarbital sódico. Rev. Bras. Anestesiol. [online]. 2002, vol.52, n.4, pp.434-445. https://doi.org/10.1590/S0034-70942002000400007

25. Weiss J, Taylor GR, Zimmermann F, Nebendahl K. Collection do Body Fluids, In The Laboratory Rat. Ed. Krinke, G.J. Academic Press:

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

London 2000; pp. 485-510. https://doi.org/10.1016/B978-012426400-7/50064-9

26. Qian X, Droste SK, Lightman SL, Reul JMHM and Linthorst ACE. Circadian and Ultradian Rhythms of Free Glucocorticoid Hormone Are Highly Synchronized between the Blood, the Subcutaneous Tissue, and the Brain. Endocrinology. 2012 Sep;153(9):4346-53. https://doi.org/10.1210/en.2012-1484

27. Hall JE. Guyton & Hall - Tratado de Fisiologia Médica. 12ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier 2011; 1151 p.

28. Aslani S, Harb MR, Costa PS, Almeida OFX, Sousa N and Palha JA. Day and night: diurnal phase influences the response to chronic mild stress. Front Behav Neurosci . 2014; 8: 82. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00082

29. Bilu C and Kronfeld-Schor N. Effects of circadian phase and melatonin injection on anxiety-like behavior in nocturnal and diurnal rodents. Chronobiol Int. 2013 Jul;30(6):828-36. https://doi.org/10.3109/07420528.2013.773439

30. Griebel G, Moreau JL, Jenck F, Martin JR e Misslin R. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. Behav Processes. 1993 Apr;29(1-2):37-47. https://doi.org/10.1016/0376-6357(93)90026-N

31. Araujo JF e Marques N. Cronobiologia: uma multidisciplinaridade necessária. Margem, São Paulo, No 15, P. 95-112, Jun. 2002.

32. Huynh TN, Krigbaum AM, Hanna JJ e Conrad CD. Sex differences and phase of light cycle modify chronic stress effects on anxiety and depressive-like behavior. Behav Brain Res. 2011 Sep 12;222(1):212-22. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.038.

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).