

## Isolamento social modifica o perfil bioquímico de ratos

Karina Maria Cancellero<sup>1</sup>, Dirceu Costa<sup>2</sup> & Carlos Alberto da Silva<sup>3</sup>

### SOCIAL ISOLATION CHANGES THE BIOCHEMICAL PROFILE OF RATS

**ABSTRACT:** The purpose of this work was to evaluate in male *Wistar* rats the solid and liquid intake the hepatic (HG) and the muscular (MG) glycogen contents and the plasmatic concentration of free fatty acids (FFA), glycaemia (GLY) and corticosterone (COR) comparing a group submitted to isolation (ISO) to a group of rats contained 3 in each cage (AG). The values were evaluated by normality test followed by t - Student test ( $p < 0,05$ ). The ISO group presented a significant increase in the intake represented by 30% in the solid and 66% in the liquid and a significant increase of 32% in COR. The HG was increased in 2 times, the soleus MG in 6 times and the gastrocnemius MG 3,5 times, significantly different when compared with AG group, without alterations in GLY. The results showed that the better condition of housing for rats is three per cage because the stress and plasmatic corticosterone is reduced following the social behavior of this specie.

**Key Words:** Social privation, rats, corticosterone.

### INTRODUÇÃO

Os animais constantemente manifestam mudanças comportamentais visando vencer obstáculos, garantir a própria sobrevivência, transmitir seus genes e contribuir para a sobrevivência da espécie (FELIG *et al.*, 1987; CIPOLLA *et al.*, 1988).

Desde os tempos mais remotos, os humanos observam os animais por uma razão muito simples: sua sobrevivência sempre dependeu do conhecimento do comportamento animal, sendo que está claramente demonstrado que diferenças genéticas entre indivíduos contribui para diferenças em seus

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos, [karca@terra.com.br](mailto:karca@terra.com.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP, [dirceu@power.ufscar.br](mailto:dirceu@power.ufscar.br)

<sup>3</sup> Universidade Metodista de Piracicaba – Rodovia do Açúcar, Km 156, 13400-911, Piracicaba, SP, [casilva@unimep.br](mailto:casilva@unimep.br)

atributos fisiológicos e comportamentais. Este problema complexo requer uma análise das múltiplas interações entre o organismo, seus genes, estruturas em desenvolvimento e o meio ambiente no qual vive (PÉREZ *et al.*, 1997).

O isolamento de um animal de seu grupo para análises experimentais é uma das situações mais comuns utilizadas atualmente pelos cientistas, sem considerar o grau de estresse que isto representa ao animal que biologicamente vive em grupo (GENARO & SCHMIDEK, 2002). Diferentes experimentos demonstraram que o comportamento social influencia no desenvolvimento de ratos de laboratório, principalmente alterando as relações hormonais do eixo hipotálamo-hipófise. Esta abordagem é importante no delineamento de experimentos com ênfase em alterações fisiológicas, patológicas ou em administração de fármacos onde se prescreve que o animal deve ser mantido em privação social para minimizar reações de domínio reguladoras de ingesta (EHLERS *et al.*, 1996; GENARO *et al.*, 2004).

No que tange às relações entre a vida social e o padrão comportamental, tem sido demonstrado que ratos passam a consumir maior quantidade de álcool quando estão agrupados se comparados aos isolados (ELLISON *et al.*, 1979). Neste sentido, cabe ressaltar que o tato e o contato são extremamente importantes para a estrutura social de inúmeros animais, pois determinam vínculos, estruturam e reforçam ligações de um grupo. Assim, a integração/interação e as trocas entre os indivíduos determinam a aquisição de padrões fisiológicos homeostáticos, específicos para cada grupo (WASHBURN & RUMBAUGH, 1991).

Na década de 70, estudos endócrinos sugeriram que os organismos apresentam adaptações seqüenciais quando expostos à condição indutora de estresse, desenvolvendo reações e sintomas indicativos de irritabilidade (GERSH & FOWLES, 1979).

Estudos realizados com diferentes espécies como peixes, macacos e ratos demonstraram que os animais submetidos a isolamento apresentaram mudanças comportamentais, alterações no padrão de conduta, modificações no caráter exploratório, manifestações de agressividade, reações psicofisiológicas indutoras de ansiedade, depressão e estresse (GOMES & MORGAN, 1993; PÉREZ *et al.*, 1997; GENARO *et al.*, 2004).

Avaliações neuroendócrinas realizadas com ratos constataram que tanto as ondas eletroencefalográficas quanto à secreção de hormônios indicadores de estresse são modificadas no isolamento (EHLERS *et al.*, 1996; GENARO *et al.*, 2004). Neste sentido, estudos moleculares avaliaram a dinâmica de receptores no córtex cerebral de ratos sob isolamento, sendo observado hipersensibilidade na população de receptores adrenérgicos e redução na população de receptores dopaminérgicos, sugerindo correlação entre os diferentes circuitos neurais e o aparecimento de comportamento específico (ISOVICH *et al.*, 2001).

Recentemente CHEETA *et al.* (2001) realizaram avaliação farmacológica da ação da nicotina, que é uma substância ansiogênica, em ratos submetidos ao isolamento e verificaram elevação nas respostas de ansiedade, demonstrando potencialização da ação da nicotina na condição de privação social.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros que são freqüentemente utilizados em estudos experimentais ligados a metabolismo, como, concentração plasmática de glicose, ácidos graxos livres e corticosterona, além do conteúdo de glicogênio hepático e muscular (sóleo, gastrocnêmio) e ingesta líquida e sólida, comparando um grupo de ratos acondicionados em gaiolas coletivas contendo 3 animais com um grupo de ratos submetidos ao isolamento social (1 por caixa).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos albinos *Wistar* com idade de 3 a 4 meses, alimentados com ração (Purina® para roedores) e água *ad libitum* sob ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro, a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os ratos ficaram agrupados em gaiolas coletivas até o desmame quando foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo 1: ratos acondicionados em gaiolas coletivas (31 x 46 x 17 cm) contendo 3 animais por caixa durante 15 dias (n=15).
- Grupo 2: ratos submetidos ao isolamento social (1 animal por caixa) acondicionados em gaiola (19 x 34 x 12 cm) durante 15 dias (n= 15).

A concentração plasmática de glicose foi determinada através de *kit* de utilização laboratorial (CELM-REACTOCLIN®). Para a avaliação da concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) utilizou-se o método proposto por REGOUW *et al.* (1971), enquanto a concentração plasmática de corticosterona foi determinada através de radioimunoensaio (NISWENDER *et al.*, 1969).

Diariamente os animais foram manipulados para limpeza das caixas sendo avaliada a ingestão sólida e líquida.

O conteúdo de glicogênio foi avaliado pelo método do fenol sulfúrico segundo SIU *et al.* (1970).

A avaliação estatística dos dados foi feita através do teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e do teste t de Student com nível crítico de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Com relação ao comportamento, a comparação dos grupos acondicionados em gaiolas coletivas com o grupo submetido ao isolamento mostrou que o grupo isolado apresentou elevação de 30% na ingesta sólida e 66% na ingesta líquida, sintomas classicamente observados na ansiedade e que envolvem alterações na homeostasia hipotalâmica (Figs 1 e 2).

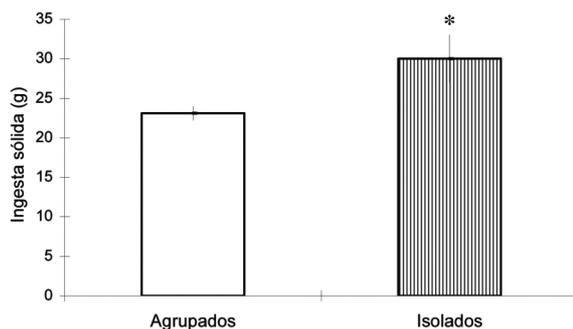
Frente ao aumento na ingesta foram avaliados os principais reservatórios de glicogênio e foi observado que o conteúdo hepático foi aumentado em 2 vezes (Fig. 3), enquanto o conteúdo muscular foi aumentado em 6 vezes no sóleo e 3,5 vezes no músculo gastrocnêmio (Fig. 4) e pode representar a inter-relação entre a condição de acondicionamento e alterações hormonais.

Tendo em vista as alterações endócrinas relatadas por outros autores, foi avaliada a concentração plasmática de corticosterona que é um importante parâmetro usado para comparar variações hormonais com ênfase no eixo hipotálamo/hipofisário/adrenal. Neste sentido, observou-se que o grupo de ratos submetidos ao isolamento apresentou elevação de 32% na concentração sérica do glicocorticóide como pode ser observado na Tabela 1.

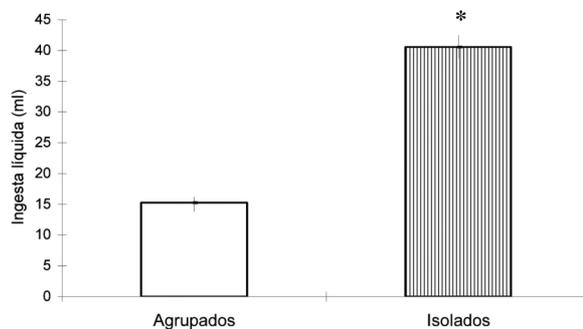
Neste sentido, recentes trabalhos demonstraram que os glicocorticóides promovem elevação na secreção de insulina. No entanto, dentro do tempo experimental não foram observa-

das alterações glicêmicas sugerindo adaptação. Outro fator importante a se considerar é que a concentração plasmática de ácidos graxos livres não apresentou modificações se comparado ao controle, sugerindo predomínio de síntese das reservas energéticas (Tab. 1).

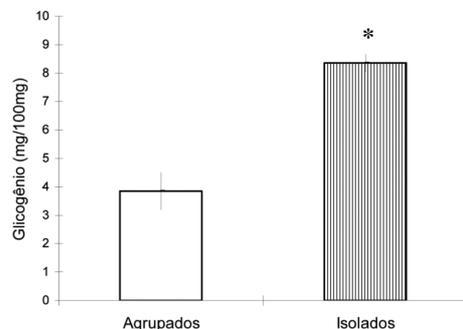
Karina  
Maria  
Cancelliero,  
Dirceu  
Costa,  
Carlos  
Alberto da  
Silva



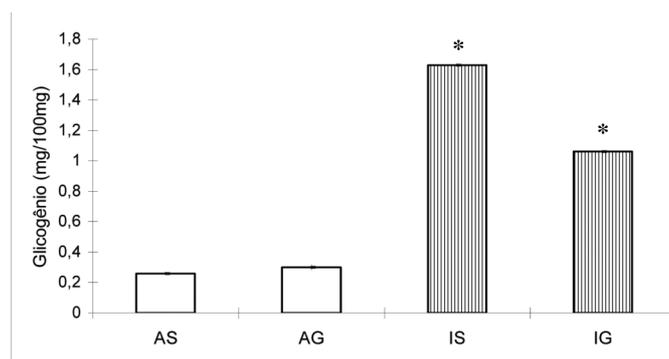
**Figura 1.** Ingesta sólida (gramas) dos animais acondicionados em gaiolas coletivas (agrupados em 3) e isolados (1 por caixa). Os valores correspondem às médias  $\pm$  epm,  $n=15$ .  $p<0,05$ , \* comparado ao grupo acondicionado em gaiolas coletivas.



**Figura 2.** Ingesta de água (ml) dos animais acondicionados em gaiolas coletivas (agrupados em 3) e isolados (1 por caixa). Os valores correspondem às médias  $\pm$  epm,  $n=15$ .  $p<0,05$ . \* comparado ao grupo acondicionado em gaiolas coletivas.



**Figura 3.** Concentração hepática de glicogênio (mg/100mg) dos animais acondicionados em gaiolas coletivas (agrupados em 3) e isolados (1 por caixa). Os valores correspondem às médias  $\pm$  epm, n=15.  $p < 0,05$ , \* comparado ao grupo acondicionado em gaiolas coletivas.



**Figura 4.** Concentração muscular de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S) e gastrocnêmio (G) dos animais acondicionados em gaiolas coletivas (A - agrupados em 3) e isolados (I - 1 por caixa). Os valores correspondem às médias  $\pm$  epm, n=15.  $p < 0,05$ , \* comparado ao grupo acondicionado em gaiolas coletivas.

**Tabela 1.** Perfil bioquímico plasmático dos animais acondicionados em gaiolas coletivas (agrupados em 3) e isolados (1 por caixa). Os valores correspondem às médias  $\pm$  epm, n=15.  $p < 0,05$ , \* comparado ao grupo acondicionado em gaiolas coletivas.

	Gaiola Coletiva	Isolamento
Glicemia (mg/dl)	118,83 $\pm$ 6,2	135,36 $\pm$ 3,2
Ácidos Graxos livres (mmol/L)	0,52 $\pm$ 0,16	0,54 $\pm$ 0,04
Corticosterona (ng/ml)	2,12 $\pm$ 0,01	2,81 $\pm$ 0,01*

## DISCUSSÃO

Inúmeros parâmetros têm sido utilizados para analisar as relações entre o isolamento social e a manutenção dos animais em grupos, merecendo destaque a atividade exploratória, a interação social, a atividade locomotora, a reatividade, o comportamento de vigilância e a vocalização (RENNER *et al.*, 1992).

Recentes trabalhos realizados em ratos demonstraram que a privação social desencadeia alterações no padrão emocional refletindo em mudanças comportamentais e endócrinas (GENARO *et al.*, 2004). Neste sentido, tem sido observado que ratos submetidos ao isolamento social apresentam modificações na homeostasia do sistema nervoso, endócrino e na sensibilidade de áreas cerebrais a diferentes hormônios.

A preservação da homeostasia requer adaptações contínuas neurais, endócrinas e comportamentais para controlar alterações causadas por estressores internos ou externos. Respostas comportamentais incluem alterações cognitivas e sensoriais, aumento do alerta, intensificação da memória seletiva, supressão de comportamentos e analgesia (McEWEN, 2000; PACAK & McCARTY, 2000).

As respostas comportamentais e fisiológicas são controladas por vários fatores como, ativação dos sistemas efetores no sistema nervoso central incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, o sistema-renina-angiotensina, mudanças nas respostas do sistema imune e alterações nas concentrações plasmáticas das  $\beta$ -endorfinas (PACAK & McCARTY, 2000).

Ao comparar os grupos experimentais, observou-se que o grupo de ratos submetidos ao isolamento apresentou concentrações plasmáticas de corticosterona maiores do que os agrupados em gaiolas coletivas. Este fato está relacionado com as alterações neuroendócrinas relatadas por EHLERS *et al.* (1996) que demonstraram que o sistema límbico, ao ser estimulado no isolamento, pode ativar o hipotálamo que recebe e integra as informações neurais, estimulando a secreção de diferentes hormônios, merecendo destaque os hormônios adrenocorticotróficos (BUCKINGHAM, 2000; OTTENWELLER, 2000; PACAK & McCARTY, 2000).

Karina  
Maria  
Cancelliero,  
Dirceu  
Costa,  
Carlos  
Alberto da  
Silva

Rev. bras.  
Zoociências  
Juiz de Fora  
V. 7 Nº 2  
Dez/2005  
p. 247-257

É sabido que os glicocorticóides promovem alterações na sensibilidade à insulina. Porém, este fato ainda é controverso na literatura, onde resultados complexos têm sido produzidos em estudos com ratos e camundongos tratados com dexametasona, principalmente no que se refere à secreção de insulina *in vitro*. Neste sentido, o aumento na secreção tem sido relatado (MALAISSE *et al.*, 1967; KAWAI & KUZUYA, 1977; OGAWA *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1994)

A exposição a ambientes desconhecidos é condição estressora de fundo neuropsíquico que afeta profundamente os processos emocionais e pode provocar mudanças comportamentais como ansiedade ou frustração (HALLER *et al.*, 1999; ZELENA *et al.*, 1999). Neste sentido, a maioria dos estressores utilizados na pesquisa com animais de laboratório incluem estímulos que apresentam simultaneamente componentes físicos, químicos e emocionais (KVETŇANSKY & McCARTY, 2000).

Frente a estes estímulos, há necessidade de desencadear respostas adaptativas essenciais no restabelecimento do balanço homeostático (WURBEL, 2001). Durante uma resposta adaptativa, os processos fisiológicos redirecionam a utilização de energia entre vários órgãos e podem seletivamente inibir ou estimular a mobilização das reservas energéticas (PACAK & McCARTY, 2000).

Ao observar o grupo submetido ao isolamento, foi verificado que houve elevação nas reservas hepáticas e musculares de glicogênio. Neste sentido, o aumento nas reservas energéticas na presença de elevação na concentração plasmática do glicocorticóide aponta para ativação tanto de áreas hipotalâmicas responsáveis pela elevação na ingestão quanto de processos citosólicos que induzem a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, refletindo na ativação dos processos ligados à síntese de glicogênio (FABRIS *et al.*, 1996). Esta elevação na secreção de insulina decorre de processo de ativação gênica direta na célula  $\beta$  pancreática e revela efeito importante, pois há elevação na formação de reservatórios energéticos insulino-dependentes a curto prazo. Porém, já foi demonstrado que a longo prazo há dessensibilização tecidual e resistência à insulina (BOSQUEIRO *et al.*, 2003). Cabe salientar que o grupo submetido ao isolamento não apresentou elevação significativa na concentração plasmática dos ácidos

graxos livres, evento que aponta para o domínio dos fenômenos de formação dos reservatórios energéticos.

Frente aos resultados sugere-se que as modificações deflagradas pelo isolamento representam alterações nas funções hipotalâmicas, alterações endócrinas representadas por acúmulo de substratos metabolizáveis nos principais reservatórios e modificações na homeostasia de áreas cerebrais que possivelmente coordenam a ingesta. Desta forma, o acondicionamento dos animais no padrão três ratos por caixa mostrou ser o mais efetivo por apresentar baixo índice de estresse, representado por pequenas concentrações plasmáticas de corticosterona e acompanhar os ajustes biossociais característicos da espécie (EINON & MORGAN, 1976).

### CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho mostram a importância dos estudos comportamentais associados a avaliações metabólicas para refinamento na avaliação de respostas químio-metabólicas. Neste contexto, a manutenção de ratos agrupados em três por caixa, mostrou interação social com baixos níveis de estresse representados por concentrações plasmáticas de corticosterona dentro da normalidade, preservando o equilíbrio homeostático.

### AGRADECIMENTOS

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOSQUEIRO, J.R.; S. BORDIN; A.V. DELGUINGARO; E.M. CARNEIRO & A.C. BOSCHERO. 2003. Modulation of gene expression profile by dexamethasone in rat pancreatic islets. XXI Congresso da Associação Latino Americana de Ciências Fisiológicas – ALACF. Ribeirão Preto, SP, 172p.
- BUCKINGHAM, J.C. 2000. Effects of stress on glucocorticoids. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**. USA: Academic Press, v.2.
- CIPOLLA, N.; N. MARQUES & L. MENNA-BARRETO. 1988. **Introdução ao Estudo da Cronobiologia**. Icone Editora, 270p.
- CHEETA, S.; E. IRVINE & S.E. FILE. 2001. Social isolation, modifies nicotine's effects in animal tests of anxiety. **Br. J. Pharmacol.** 132 (7): 1389-1395.
- EHLERS, C.L.; W.M. KANEBO; M.J. OWENS & NEMEROFF, C.B. 1996. Effect of social isolation on electroencephalogram and neuroendocrine parameters in rats. **Biological. Psychiatry.** 33 (5): 358-366.

Karina  
Maria  
Cancelliero,  
Dirceu  
Costa,  
Carlos  
Alberto da  
Silva

Rev. bras.  
Zoociências  
Juiz de Fora  
V. 7 Nº 2  
Dez/2005  
p. 247-257

- EINON, D. & M. MORGAN. 1976. Habituation of object contact in socially-reared and isolated rats. **Animal. Behavior.** 24: 415-420.
- ELLISON, G.; F. DANIEL & R. ZORASTER. 1979. Delayed increases in alcohol consumption occurs in rat colonies but not in isolated rats. **Experimental. Neurology.** 65:608-615.
- FABRIS, S.E.; A. THORBURN; A. LITCHFIELD & J. PROIETTO. 1996. Effect of parasympathetic denervation of liver and pancreas on glucose kinetics in man. **Metabolism.** 45: 987-991.
- FELIG, P.; J.D. BAXTER; A.E. BROADUS & L.A. FROHMAN. 1987. **Endocrinology and Metabolism.** 2 ed., New York, McGraw Hill Book Company.
- GENARO G. & W.R. SCHMIDEK. 2002. Exploratory activity of rats in three different environment. **Physiol. Behav.** 75: 681-688.
- GENARO G.; W.R. SCHMIDEK & C.R. FRANCI. 2004. Social condition affects hormone secretion and exploratory behavior in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 37: 833-840.
- GERSH, F.S. & D.C. FOWLES. 1979. **Neurotic depression; the concept of anxious depression.** In: **Depression: The Psychobiology of the depressive disorders,** New York, Academic Press, p. 81-104.
- GOMES-LAPLAZA, L.M. & E. MORGAN. 1993. **Social isolation, aggression and dominance in attacks in juvenile angelfish, *pterophyllum scalare.*** **Aggres. Behav.** 9 (3): 213-222.
- HALLER, J.; E. FUCHS; J. HALASZ & G.B. MAKARA. 1999. Defeat is a major stressor in male while social instability is stressful mainly in female: Toward the development of a social stress model in female rats. **Brain Res. Bull.** 50 (1): 33-39.
- ISOVICH, E.; M. ENGELMANN; R. LANDGRAF & E. FUCHS. 2001. Social isolation after a single defeat reduces striatal dopamine transporter binding. **Eur. J. Neurosci.** 13 (6): 1254-1256.
- KAWAI, A. & N. KUZUYA. 1977. On the role of glucocorticoid in glucose-induced insulin secretion. **Horm. Metab. Res.** 9: 361-365.
- KVETŇANSKY, R. & R. MCCARTY. 2000. Immobilization stress. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress.** USA: Academic Press, v.2.
- MALAISSÉ, W.J.; F. MALAISSÉ-LAGAE; E.F. MCCRAW & P.H. WRIGHT. 1967. **Insulin secretion in vivo by pancreatic tissue from normal, adrenalectomized and cortisol-treated rats.** **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 124: 924-928.
- McEWEN, B.S. 2000. Definitions and concepts of stress. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress.** USA: Academic Press, v.2.
- NISWENDER, G.D.; C.L. CJEN; A.R. MIDGLEY & J. MEITES. 1969. Radioimmunoassay for rat. **Proceedings Soc. Experim. Biol. Medicine.** 130: 793-797.
- OGAWA, A.; J.H. JOHNSON; M. OHNEDA; C.T. McALLISTER; L. INMAN; T. ALAN. & R.H. UNGER. 1992. Role of insulin resistance and b-cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes. **J. Clin. Invest.** 90: 497-504.
- OTTENWELLER, J.E. 2000. Animal Models (Nonprimate) for human stress. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress.** USA: Academic Press, v.2,.
- PACAK, K. & R. MCCARTY. 2000. Acute Stress response: Experimental. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress.** USA: Academic Press, v.2,
- PÉREZ, C.; J.R. CANAL; E. DOMINGUEZ; J.E. CAMPILLO; M. GUILLÉN & M.D. TORRES. 1997. Individual housing influences certain biochemical parameters in the rat. **Laboratory. Animal.** 31: 357-361.

- REGOUW, B.J.M.; P.J.H.C. CORNELISSEM; R.A.P. HELDER; J.B.F. SPIJKERS & M.M. WEEBER. 1971. Specific determination of the free fatty acid in plasma. **Clin. Chem. Acta.** **31**:187-95.
- RENNER, M.J.; A.J. BENNETT & J.C. WHITE. 1992. Age and sex as factors influencing spontaneous exploration and object investigation by pre adult rats (*Rattus norvegicus*). **J. Comp. Physiol.** **106**: 217-227.
- SIU, L.O.; J.C. RUSSEAU & A.W. TAYLOR. 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl Physiol.** **28** (2): 234-236.
- ZELENA, D.; J. HALLER; J. HALASZ & G.B. MAKARA. 1999. Social stress of variable intensity: Physiological and behavioral consequences. **Brain. Res. Bull.** **48** (3): 297-302.
- WANG, Z.; W.M. BENNER; M. WANG; M.A. GHATEI & S.R. BLOOM. 1994. Evidence of a paracrine role of neuropeptide-Y in the regulation of insulin release from pancreatic islets of normal and dexamethasone-treated rats. **Endocrinology.** **135**: 200-206.
- WASHBURN, D.A. & D.M. RUMBAUGH. 1991. Impaired performance from brief social isolation of rhesus monkeys (*Macaca mulata*) a multiple video-task assessment. **J. Comparative. Psychology.** **105** (2): 145-151.
- WURBEL, H. 2001. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behavior. **Trends. Neurosci.** **24** (4): 207-211.

Recebido: 01/02/05

Aceito: 05/07/05

Karina  
Maria  
Cancelliero,  
Dirceu  
Costa,  
Carlos  
Alberto da  
Silva

Rev. bras.  
Zoociências  
Juiz de Fora  
V. 7 Nº 2  
Dez/2005  
p. 247-257