

EFEITOS DO DIAZEPAM SOBRE A RESPOSTA COMPORTAMENTAL AO ESTRESSE EM RATAS NULÍPARAS E PRIMÍPARAS¹

CLÁUDIA FERNANDA RIBEIRO GARCIA²,
ERICA ENGELBERG TEIXEIRA DA SILVA HUCKE³

¹ Projeto de Pesquisa – Bolsa de Iniciação Científica FAPESP (Proc. N° 2008/54797-9)

² Graduanda do 3º ano de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/nº, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.

³ Docente do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos s/nº, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.

RESUMO: A experiência reprodutiva (ER), ou seja, o conjunto de gestação, parto e lactação, está associada a alterações na secreção de hormônios reduzindo, como por exemplo, os esteróides e a prolactina, possivelmente para o resto da vida de uma fêmea. Tem-se demonstrado que as respostas ao estresse relacionam-se à expressão comportamental da ansiedade no labirinto em cruz elevado, uma vez que o estresse tem um efeito ansiogênico nesse modelo experimental, e que ambas as respostas, ao estresse e à ansiedade, podem ser modificadas em função da ER de maneira permanente. Além disso, já foi demonstrado anteriormente que a sensibilidade de fêmeas primíparas ao estresse pode ser reduzida. Assim, este projeto de pesquisa tem o objetivo de dar continuidade a estudos anteriores em nosso laboratório à cerca da ER e sua relação com a ansiedade e o estresse, por meio do estudo do comportamento de ratas no labirinto em cruz elevado, avaliando o efeito do diazepam.

PALAVRAS-CHAVE: Ansiedade, Comportamento, Diazepam, Estresse, Experiência Reprodutiva.

INTRODUÇÃO

A experiência reprodutiva (ER), ou seja, o conjunto de gestação, parto e lactação, está associada a alterações na secreção de hormônios reduzindo, por exemplo, as concentrações séricas de esteróides e prolactina (MUSEY et al., 1987; BYRNES e BRIDGES, 2005), possivelmente pelo resto da vida da fêmea. Como consequência da mudança de secreção hormonal, alguns autores comentam sobre a redução da incidência de câncer de mama em mulheres e ratas (MUSEY et al., 1987). Além disso, a ER prévia induz mudanças tanto no perfil neuroquímico quanto comportamental (HUCKE et al., 2001).

Recentemente, tem-se demonstrado que a ER parece reduzir a expressão comportamental da ansiedade no labirinto em cruz elevado e no campo aberto (BYRNES e BRIDGES, 2006a). A ansiedade é uma emoção semelhante ao medo, porém, enquanto no medo há uma ameaça definida, na ansiedade, a fonte do perigo é incerta ou desconhecida. A ansiedade manifesta-se em diferentes planos: psicológico, fisiológico e comportamental (GRAEFF, 1997). No estudo da psicobiologia da ansiedade os modelos animais são úteis, auxiliando na compreensão da sua fisiopatologia e tratamento. No modelo do labirinto em cruz elevado, é possível verificar o grau de “ansiedade” do animal, que é corroborado pela verificação de um grande número de drogas ansiolíticas, que aliviam a ansiedade no homem e parecem ter efeito semelhante nos ratos e camundongos neste modelo animal (DAWSON e TRICKLEBANK, 1995). As drogas mais utilizadas nos teste no labirinto em cruz elevado são os benzodiazepínicos, de ação agonista gabaérgica, que inibe a neurotransmissão excitatória, amplamente prescritos na clínica médica no tratamento da ansiedade por suas propriedades tranqüilizante, ansiolítica e antidepressiva, além de serem indicados no alívio de distúrbios passageiros causados por situações estressantes, tanto no homem como em animais. A atividade ansiolítica dos benzodiazepínicos também influencia outros sistemas de neurotransmissão, tais como, o noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico, mostrando que a atividade desses fármacos depende da ativação de neurotransmissores mediada via sistema gabaérgico. Também foi observada sua ação, provavelmente periférica, que induz aumento dos níveis de corticosterona em ratos (PAULINO, 1997).

Já foi demonstrado que a ER é capaz de modificar a expressão do receptor gabaérgico, sendo que esta modulação é dependente do ciclo estral e da região cerebral, o que poderia explicar a modificação do efeito dos benzodiazepínicos em fêmeas experientes

(BYRNES et al., 2007). Em primíparas, os efeitos ansiolíticos das drogas podem ser aumentados, enquanto que os efeitos sedativos são diminuídos (BYRNES e BRIDGES, 2006 a,b). Ainda, a ER pode modificar o comportamento no labirinto em cruz elevado (BYRNES e BRIDGES, 2006 a,b; LEITE et al., 2006), sendo que durante o proestro, fêmeas primíparas gastam mais tempo e tendem a caminhar maiores distâncias nos braços abertos quando comparadas às nulíparas de mesma idade. Desta maneira, a expressão comportamental da ansiedade pode ser diminuída durante o proestro nas fêmeas experientes, um efeito contrário é observado nas fêmeas primíparas mais velhas. Estudos anteriores têm sugerido que ambos o estradiol e a prolactina podem ser ansiolíticos, o que poderia estar relacionado à redução da ansiedade em fêmeas primíparas na tarde do proestro, considerando que esta fase do ciclo ocorre em apenas um dia, em períodos da manhã e tarde. O fato de a ovariectomia abolir este efeito em ambas as fêmeas jovens e de meia-idade, certamente sugere que os ovários têm um papel neste fenômeno (BYRNES e BRIDGES, 2006 a,b).

No mesmo sentido, a avaliação do comportamento geral em campo aberto e no labirinto em cruz elevado sugere que as fêmeas experientes são menos sensíveis ao estresse (BYRNES e BRIDGES, 2006a; LEITE et al., 2006). O estresse, por sua vez, tem efeito ansiogênico no labirinto em cruz elevado (MORILAK et al., 2005). O estresse é um agente causador de modificações adaptativas no sistema nervoso central, que eleva a liberação do hormônio adrenocorticotrópico ou corticotropina (ACTH), estimulando o córtex adrenal, que por sua vez, secreta glicocorticóides em resposta a vários tipos de agentes estressores. O organismo responde a uma demanda física ou psíquica pela liberação de ACTH da hipófise anterior, glicocorticóides pelo córtex adrenal, adrenalina a partir da medula adrenal e noradrenalina originada dos nervos simpáticos. Estes hormônios servem para adaptar o organismo aos agentes estressores que podem induzir desde leves alterações psicológicas até intensas agressões físicas, afetando os sistemas cardiovascular, imune e a produção energética (FRANCI, 2005). Em ratas, sabe-se que o ciclo estral pode interferir na resposta ao estresse, fato que pode ser relacionado a alterações na secreção de esteróides e prolactina. Na manhã do proestro, observa-se um aumento na secreção de prolactina induzida pelo estresse, que coincide com o pico diurno de secreção deste hormônio. Já no final da tarde, coincidindo com o pico noturno de secreção deste hormônio, observa-se uma diminuição da secreção de prolactina, tanto em ratas ciclando como em fêmeas castradas tratadas com estradiol. Este fenômeno paradoxal parece depender, pelo menos em parte, da secreção de corticosteróides adrenais. De fato, a secreção de prolactina induzida pelo estresse é marcada pela atuação do estradiol, que exerce um papel estimulatório sobre a secreção desse hormônio, assim como sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (GALA e HAISENLEDER, 1986).

Estes fatos tomados em conjunto são sugestivos que as respostas ao estresse relaciona-se à expressão comportamental da ansiedade e que essas podem ser modificadas em função da ER de maneira permanente. Assim, este projeto de pesquisa tem o objetivo de dar continuidade a estudos anteriores em nosso laboratório à cerca da ER e sua relação com a ansiedade e o estresse (LEITE et al., 2006), por meio do estudo do comportamento no labirinto em cruz elevado, avaliando os efeitos do diazepam em ratas nulíparas e primíparas submetidas ao estresse por contenção. O presente trabalho não é estático e pode ser complementado de acordo com os resultados obtidos ou dados novos de literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Serão utilizadas ratas Wistar obtidas no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEOB. Água e comida serão fornecidas *ad libitum*. Para o estudo do comportamento serão utilizadas ratas nulíparas e primíparas da mesma idade, obtidas a partir de um grupo inicial de animais, que será dividido em dois, sendo um deles acasalado com machos, passando por uma ER, ou seja, gestação (+ ou - 21 dias), parto e lactação (21 dias), desmame (21º dia) e finalmente um período de descanso de 15 dias antes do início do procedimento experimental. O grupo de nulíparas ficará aguardando todo este período de preparação das primíparas. Todos os procedimentos experimentais observarão as normas éticas para o uso de animais de experimentação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Curso de Medicina Veterinária da UNIFEOB e está de acordo com normas internacionais (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996, National Academy of Science/USA).

Avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado. O labirinto em cruz elevado é constituído de dois braços abertos, opostos, medindo 50 x 10 cm e dois braços fechados, medindo 50 x 10 x 40 cm com o teto aberto colocados de tal forma que os braços fechados e abertos ficam dispostos em ângulo de 90 graus. O piso do labirinto é de madeira pintada de cinza e o equipamento fica numa sala iluminada artificialmente por meio de lâmpadas fosforescente (1200 lux). O experimentador permanece na sala a uma distância de 1,5 m da extremidade do braço aberto proximal durante os registros. O labirinto em cruz elevado fica suspenso a uma altura de 50 cm do assoalho da sala através de um suporte de madeira. As ratas são colocadas no centro do labirinto e avaliadas durante 5 minutos, quando são registrados os parâmetros com a utilização de um cronômetro, quais sejam, o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados. Os testes serão realizados durante a fase clara do ciclo de luz, no período da tarde, sempre a mesma hora. O labirinto será limpo com solução de álcool a 5% após a retirada de cada animal, de maneira que o odor não interfira nas respostas comportamentais. Serão realizados dois dias consecutivos de observações comportamentais, i.e., o teste e o reteste (24 horas após o teste). Os resultados obtidos após as avaliações comportamentais serão os números de entradas nos braços abertos e fechados e os tempos de permanência nos braços abertos e fechados. O tempo de permanência na área central do labirinto será descontado dos anteriores. Importante ressaltar que o critério para se caracterizar entrada ou saída dos braços, na maioria dos estudos, é definido como a colocação das quatro patas nos braços ou no quadrado central. Além disso, será registrado o parâmetro de *risk assesment*, ou seja, o animal coloca as patas anteriores para explorar com a cabeça os braços abertos e logo após, retorna ao braço fechado.

Estresse por imobilização. Cada animal será imobilizado para indução do estresse colocando-o dentro de um tubo plástico de 5,5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento, sendo suas extremidades tampadas e com orifícios para permitir a respiração dos animais. Ao final das sessões de estresse, de acordo com o delineamento experimental, os animais serão submetidos à observação comportamental no labirinto em cruz elevado.

Citologia Vaginal. A determinação do ciclo estral será realizada com o objetivo de padronizar a fase do ciclo estral durante os procedimentos experimentais. A fase do ciclo estral escolhida será a manhã do proestro, uma vez que a participação dos esteróides e da prolactina pode interferir sobre as respostas comportamentais (BRIDGES e BYRNES, 2006a). O diagnóstico da fase do ciclo estral será realizado por observações microscópicas diárias do lavado vaginal, que será realizado sempre no mesmo horário, pois o ciclo estral sofre influência de picos hormonais e dos ritmos circadianos, responsáveis pelas diferenças histológicas entre as fases e que ocorrem em intervalos regulares de tempo. Será utilizado 20µl de solução salina (NaCl 0,9%), aplicada com auxílio de pipeta na vulva das fêmeas previamente contidas. O líquido aplicado será aspirado logo em seguida e colocado sobre uma lâmina para ser avaliado sob microscópio óptico.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

EXPERIMENTO 1: Efeitos do diazepam sobre o comportamento de ratas no labirinto em cruz elevado após o estresse por contenção. Após a obtenção de fêmeas nulíparas e primíparas, estas foram divididas em 4 grupos experimentais, quais sejam: Nulíparas submetidas ao estresse por imobilização durante 1 hora, seguida da avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado durante 5 min após a injeção de diazepam (n=10; 2,0 mg/kg) ou salina (n=10); ambas pela via subcutânea (SC). Primíparas submetidas ao estresse por imobilização durante 1 hora, seguida da avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado durante 5 min após a injeção de diazepam (n=10; 2,0 mg/kg) ou salina (n=10); ambas pela via SC. O reteste será realizado 24 horas após o teste inicial, durante os mesmos 5 minutos, porém sem uma nova imobilização do animal e nem a injeção de diazepam. O reteste tem o objetivo de avaliar o efeito do estresse inicial induzido, sem que haja o efeito da novidade, que ocorre no primeiro dia.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para obtenção das estatísticas descritivas, bem como, para verificação da normalidade, assimetria, curtose e homogeneidade de variância entre os grupos comparativos, será utilizado o procedimento PROC UNIVARIATE do programa Statistical Analysis System, versão 6.12 (SAS, 1995). O delineamento experimental a ser utilizado será o inteiramente casualizado, sendo que, cada grupo comparativo (GC) representará um tratamento. Quando for verificado efeito significativo ($P < 0,05$) na análise de variância entre os grupos comparativos para as diferentes variáveis estudadas, será utilizado o Teste de Tukey para discriminar as diferenças e/ou igualdades entre as médias dos diferentes grupos avaliados.

REFERÊNCIAS

BYRNES, E.M.; BRIDGES, R.S. Lactation reduces prolactin levels in reproductively experienced female rats. **Science Direct, Hormones and Behavior**, v.48, n.3, p.278-282, 2005.

BYRNES, E. M.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience alters anxiety-like behavior in the female rat. **Hormones and Behavior**, v. 50, p. 70-76, 2006a.

BYRNES, E. M.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience reduces the sedative, but not anxiolytic effects of diazepam. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, p. 988-996, 2006b.

BYRNES, E.M.; LEE, J.O.; BRIDGES, R.S. Alterations in GABA receptor $\alpha 2$ subunit mRNA expression following reproductive experience in rats. **Neuroendocrinology**, v.85, p.148-156, 2007.

DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. **Elsevier Science**, v. 16, p. 33-36, 1995.

FRANCI, C.R. Estresse: processo adaptativos e não-adaptativos. In: **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. 1ª. Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 210-223, 2005.

GALA, R.R.; HAISENLEDER, D.J. Restraint stress decreases afternoon plasma prolactin levels in female rats. Influences of neural antagonists and agonists on restraint-induced changes in plasma prolactin and corticosterone. **Neuroendocrinology**, n.43, p.115-123, 1986.

GRAEFF, F.G. **Neurobiologia das doenças mentais**. 5ªed. Lemos Editorial, São Paulo, 1997.

HUCKE, E.E.T.S.; CRUZ-CASALLAS, P.E.; SIDER, L.H.; FELICIO, L.F. Reproductive experience modulates dopamine-related behavioral responses. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 68, n. 3, p. 575-582, 2001.

LEITE, C.B.; FELICIO, L.F.; HUCKE, E.E.T.S. Influência da experiência reprodutiva sobre o comportamento de ratas no labirinto em cruz elevado após o estresse induzido por imobilização. In: **XXI Reunião Anual de Sociedades de Biologia Experimental - Fesbe**, Águas de Lindóia/SP, 2006.

MORILAK, D.A.; BARRERA, G.; ECHEVARRIA, D.J.; GARCIA, A.S.; HERNANDEZ, A.; MA, S.; PETRE, C.O.; Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Progresses in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, Epub ahead of print, 2005.

MUSEY, V.C.; COLLINS, D.C.; BROGAN, D.R.; SANTOS, V.R.; MUSEY, P.I., MARTINO-SALTZMAN, D.; PREEDY, J.R.K. Long term effects of the first pregnancy on the hormonal environment: estrogens and androgens. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.64, p.111-118, 1987.

PAULINO, C. A. Influência do diazepam sobre parâmetros das respostas inflamatórias aguda e crônica de ratos submetidos ou não ao estresse pelo frio. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – USP, p. 152, 1997.