

EFEITOS DO DIAZEPAM EM RATAS NULÍPARAS E PRIMÍPARAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR CONTENÇÃO¹

José Roberto De Souza Neto²; Erica E. Teixeira Da Silva Hucke³.

1 Projeto de Pesquisa – Submetido para obtenção de Bolsa de Iniciação Científica FAPESP

2 Graduando do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB).

3 Docente do Curso de Medicina Veterinária na UNIFEOB - São João da Boa Vista/SP

RESUMO: Os benzodiazepínicos são frequentemente prescritos pelos seus efeitos ansiolítico e hipnótico. Estudos anteriores com roedores têm demonstrado experiência reprodutiva (gestação, parto e lactação), pode alterar a sensibilidade a certas drogas, incluindo o diazepam. Ao mesmo tempo, tem-se demonstrado que uma redução da ansiedade no labirinto em cruz elevado em fêmeas experientes. O objetivo do presente estudo é avaliar a influência do diazepam em ratas nulíparas e primíparas submetidas ao estresse. Dois grupos de indivíduos serão gerados, um grupo de primíparas (gestação + 21 dias de lactação) e pareados por idade, o grupo de nulíparas. Após a obtenção de fêmeas nulíparas e primíparas, os grupos experimentais serão submetidos ao estresse por contenção durante 25 minutos, seguido de 5 minutos para descanso, e logo após submetida à avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado durante 5 min. O reteste é realizado 24 horas após o teste inicial. Todos os indivíduos serão testados com diferentes doses de diazepam (0,5, 2,0 e 2,5 mg/kg). Logo após o término da avaliação comportamental, será aferida a temperatura corporal das ratas. O presente 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, assim como com relação aos efeitos do diazepam.

PALAVRAS-CHAVE: diazepam, estresse, experiência reprodutiva

INTRODUÇÃO

A experiência reprodutiva (ER), i.e., o conjunto de gestação, parto e lactação, está associada a alterações na secreção de hormônios reduzindo as concentrações séricas de esteróides e prolactina (MUSEY, 1987 a,b; BYRNES e BRIDGES, 2005), possivelmente pelo resto da vida da fêmea. Como consequência da mudança de secreção hormonal, provoca a redução da incidência de câncer de mama em mulheres e ratas (MUSEY, 1987 a,b; KINSLEY e BRIDGES, 1988; MANN e BRIDGES, 1992). Assim também, a ER prévia induz mudanças tanto no perfil neuroquímico (FELICIO *et al.*, 1996; HUCKE *et al.*, 2001; SERAFIM e FELÍCIO, 2002) quanto comportamental (HUCKE *et al.*, 2001; BYRNES *et al.*, 2001). Uma das drogas utilizadas no teste do labirinto em cruz elevado são os benzodiazepínicos. Esse tipo de estudo comportamental tem sido realizado de maneira que interferências com relação à ansiedade são possíveis de serem detectadas (PELLOW *et al.*, 1985; FILE, 1993). No entanto, esse modelo experimental pode também ser relacionado a respostas ao estresse, uma vez que essa resposta desencadeia um comportamento no labirinto em cruz elevado semelhante ao aumento da ansiedade (MORILAK *et al.*, 2005; KARL *et al.*, 2005; MITRA *et al.*, 2005). Portanto, o estresse, tem efeito ansiogênico no labirinto em cruz elevado (FILE, 1993; PELLOW *et al.*, 1985; MORILAK *et al.*, 2005; MITRA *et al.*, 2005).

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 (BOCHINI *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2006, LEITE *et al.*, 2007), assim como com relação aos efeitos do diazepam nesse contexto (HUCKE *et al.*, 2009), por meio do estudo do comportamento de ratas nulíparas e primíparas no labirinto em cruz elevado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Serão utilizadas ratas Wistar obtidas no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEOB. Os animais serão alojados em biotério de temperatura controlada por meio de

aparelhos de ar condicionado, com ciclos de luz de 12 h de claro/escuro, com luz ligada às 6:00 h. 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, i.e., gestação (+ ou – 21 dias), parto e lactação (21 dias), desmame (21^o dia) e finalmente um período de descanso de 15 dias antes do início do procedimento experimental. O grupo de nulíparas ficará aguardando durante o período de preparação das primíparas.

A fase do ciclo estral escolhida será o proestro, uma vez que a participação dos esteróides e da prolactina pode interferir sobre as respostas comportamentais. Pretende-se utilizar fêmeas na manhã e na tarde do proestro. O diagnóstico do ciclo estral será realizado por microscopia óptica do lavado vaginal, realizado sempre no mesmo horário, pois o ciclo estral sofre influência de picos hormonais e dos ritmos circadianos..

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 e avaliado sob microscópio óptico. Serão identificadas as células típicas de cada fase do ciclo estral.

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 (PELLOW et al., 1985). 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 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. 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 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. Os resultados obtidos após as avaliações comportamentais serão os números de entradas nos braços abertos (NEBA) e fechados (NEBF) e os tempos de permanência nos braços abertos (TPBA) e fechados (TPBF). O tempo de permanência na área central do labirinto será descontado dos anteriores. Estes dados serão utilizados para calcular o percentual de entradas nos braços abertos $\{ \%EBA; [NEBA/(NEBA+NEBF)] \times 100 \}$, o percentual de tempo nos braços abertos $[\%TPBA; (TPBA/300) \times 100]$ e nos braços fechados $[\%TPBF; (TPBF/300) \times 100]$. 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 (RODGERS e COLE, 1994). Além disso, será registrado o parâmetro de *risk assessment*, ou seja, o animal coloca as patas anteriores para explorar com a cabeça os braços abertos e logo após, retorna ao braço fechado.

Cada animal será imobilizado para indução do estresse por contenção, 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 submetidos à observação comportamental no labirinto em cruz elevado.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Efeitos do diazepam sobre o comportamento de ratas no labirinto em cruz elevado após o estresse por contenção

Esse experimento tem como objetivo avaliar se as respostas comportamentais estão relacionadas à dose de diazepam. Serão utilizadas 3 doses de diazepam em ratas nulíparas e primíparas, quais sejam, 0,5, 1,0 e 1,5 mg/kg s.c. ou veículo (salina) de acordo com estudos anteriores (BYRNES e BRIDGES, 2006 b). Após a obtenção de fêmeas nulíparas e primíparas, estas serão divididas em 6 grupos experimentais (n=8) submetidas ao estresse por contenção durante 25 minutos, seguido de 5 minutos para descanso, e após submetida à avaliação do

comportamento no labirinto em cruz elevado durante 5.O reteste é realizado 24 horas após o teste inicial, durante os mesmos 5 minutos, porém sem uma nova contenção do animal e nem a injeção de diazepam.

Experimento 2: Efeitos do diazepam sobre a temperatura corporal de ratas nulíparas e primíparas

A temperatura corporal das ratas submetidas ao experimento 1 será aferida logo após o final do teste realizado no labirinto em cruz elevado, utilizando um termômetro digital retal (ETI Thermometer 2001, ETI Ltd., UK).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para obtenção das estatísticas descritivas e 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. Para essas análises estatísticas, será utilizado o procedimento PROC do programa supracitado, de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + gC_i + e_{ij}$$

em que,

y_{ij} = valor observado da mensuração do j-ésimo animal, no i-ésimo grupo comparativo;

μ = média geral;

g_i = efeito do i-ésimo grupo comparativo, sendo 1= estresse mais diazepam; 2= estresse mais salina; 3= experiência reprodutiva;

e_{ij} = erro aleatório inerente à observação y_{ij} .

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

- BOCHINI, João Carlos ; FELICIO, Luciano Freitas ; HUCKE, E.E.T.S. . Efeito da adrenalectomia sobre a secreção de prolactina em ratas nulíparas e primíparas. In: **XX Reunião Anual das Sociedades de Biologia Experimental - Fesbe**, Águas de Lindóia, 2005.
- BRIDGES, R. S.; BYRNES, E. M. Reproductive experience reduces circulating 17 β -estradiol and prolactin levels during proestrus and alters estrogen sensitivity in female rats. **Endocrinology**, v. 147, n. 5, p. 2575-2582, 2006.
- 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.; BYRNES, J. J., BRIDGES, R. S. Increased sensitivity of dopamine systems following reproductive experience in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.68(3), p. 481-489, 2001.
- BYRNES, E. M.; LEE, J.O.; BRIDGES, R. S. Alterarions in GABAa receptor alfa2 subunit mRNA expression following reproductive experience in rats. **Neuroendocrinology**, v.85, p.148-156, 2007.
- FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 253-256, 1996.
- FILE, S.E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus maze. **Behavioral Brian Research**, v. 58, p. 199-202, 1993.
- 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, Luciano Freitas ; HUCKE, E.E.T.S. Influência do estresse sobre a secreção de prolactina em ratas nulíparas e primíparas. **In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - Fesbe**, Águas de Lindóia, 2007.
- MITRA, R.; VYAS, A.; CHATTERJEE, G.; CHATTARJI, S.; Chronic-stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats. **Neuroscience Letters**, n. 383, v. 3, p. 278-283, 2005.
- 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, 1987a.
- MUSEY, V. C., COLLINS, D. C.; MUSEY, P. I.; MARTINO-SALTZMAN, D.; PREEDY, J. R. K. Long-term effect of a first pregnancy on the secretion of prolactin. **New England Journal of Medicine**, v. 316, p. 229-234, 1987b.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P. FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: close arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in therat. **Journal of Neuroscience Methods**, n.14, v. 149-167, 1985.
- RODGERS, R. J. ; COLE, J. C. **Ethology and Psychopharmacology**. S.J. Cooper and C.A. Hendrie Editora, 1994.
- SANTOS, V. P. O Estresse e a Reprodução. **Seminário (Pós-Graduação)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.