

INFLUENCIA DO CICLO ESTRAL SOBRE O COMPORTAMENTO NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO EM RATAS NULÍPARAS E PRIMÍPARAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE ¹

JOSE ROBERTO DE SOUZA NETO², ERICA ZIMBERKNOPF³

1 Projeto de pesquisa – Submetido para Obtenção de Bolsa de Iniciação Científica FAPESP

2 Graduando do 4º ano de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB)

3 Docente do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB)

RESUMO: Estudos anteriores com roedores têm demonstrado experiência reprodutiva (gestação, parto e lactação), pode alterar a sensibilidade a ansiedade e ao estresse. Nesse sentido, já foi observada uma redução da ansiedade no labirinto em cruz elevado em fêmeas experientes. O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito do estresse em ratas nulíparas e primíparas em várias fases do ciclo estral. Dois grupos de indivíduos serão gerados, um grupo de primíparas (n= 8; gestação + 21 dias de lactação) e um grupo de nulíparas (n=8) pareados por idade. Após a obtenção das fêmeas, 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 será realizado 24 horas após o teste inicial. Os procedimentos experimentais serão realizados em 3 fases do ciclo estral: proestro, estro e metaestro, em grupos de fêmeas nulíparas e primíparas diferentes (n= 48). O presente projeto de pesquisa tem o objetivo de dar continuidade a estudos anteriores em nosso laboratório à cerca da experiência reprodutiva e sua relação com a ansiedade e o estresse.

PALAVRAS-CHAVE: ansiedade, estresse, experiência reprodutiva

INTRODUÇÃO

A experiência reprodutiva (ER), 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), possivelmente pelo resto da vida da fêmea. Esse fato também foi observado em mulheres e, como consequência da mudança de secreção hormonal, ocorre à redução da incidência de câncer de mama (MUSEY, 1987 a,b). Recentemente, tem sido demonstrado que a prolactina também desempenha outros papéis importantes como, por exemplo, estimulando o cuidado materno e participando da manutenção desse comportamento. Assim também, a ER prévia induz alterações tanto no perfil neuroquímico (HUCKE e FELICIO, 2008) quanto comportamental (HUCKE et al., 2001). Nesse sentido, alguns estudos demonstram que a ER parece reduzir a expressão comportamental da ansiedade no labirinto em cruz elevado e no campo aberto (HUCKE et al., 2001). Observações do comportamento no labirinto em cruz elevado são realizadas com o objetivo de estudar o grau de “ansiedade” do animal, o que é corroborado pela verificação de um grande número de drogas ansiolíticas, que aliviam a ansiedade no homem e parece ter efeito semelhante nos ratos e camundongos nesse modelo animal (FILE, 1993). Portanto, esse tipo de estudo comportamental tem sido realizado de maneira que interferências com relação à ansiedade são possíveis de serem detectadas (FILE, 1993). Ainda, a avaliação realizada no labirinto em cruz elevado pode também revelar modificações induzidas pelo estresse, uma vez que o mesmo desencadeia um comportamento semelhante ao aumento da ansiedade (FRANCI, 2005). Portanto, o estresse, tem efeito ansiogênico no labirinto em cruz elevado (MITRA et al., 2005). O estresse, por sua vez, é um importante agente causador de modificações adaptativas no sistema nervoso central (SELYE, 1973). No que diz respeito à prolactina, já é bem conhecido que a secreção desse hormônio está aumentada em consequência ao estresse em várias espécies, incluindo o rato (GALA e HAISENLEDER, 1986).

A resposta ao estresse por sua vez, pode sofrer influências do ciclo estral em ratas, assim como esse interfere sobre a secreção de prolactina (GALA e HAISENLEDER, 1986).

Estudamos anteriormente o efeito do tratamento com diazepam sobre a expressão comportamental induzida pelo estresse no labirinto em cruz elevado em função da ER

(GARCIA, 2010). A atividade ansiolítica dos benzodiazepínicos e suas modificações em fêmeas experientes têm sido estudadas nesse modelo experimental (BYRNES et al., 2007). Nesse sentido, observamos recentemente que o estresse parece mascarar diferenças sobre a resposta comportamental ao tratamento com diazepam anteriormente relatada (BYRNES e BRIDGES, 2006a), reduzindo a mesma durante o proestro e aumentado durante o metaestro (GARCIA, 2010). Essa observação é importante e nos levou a questionar qual seria o efeito do estresse sobre o comportamento no labirinto em cruz elevado, sem o tratamento com diazepam, pois, embora já tenhamos estudado essa questão após 1 hora de estresse por contenção, utilizaremos agora o protocolo utilizado nos experimentos recentemente realizado, com 25 min de estresse por contenção (GARCIA, 2010). Essa diferença de tempo pode ser significativa, uma vez que nesse trabalho anterior, sugerimos que após 1 hora de estresse o efeito agudo do mesmo pode não ter sido revelado. Assim, esse 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 (HUCKE et al., 2009; ZIMBERKNOPF et al., 2009; GARCIA, 2010), por meio do estudo do comportamento de ratas nulíparas e primíparas no labirinto em cruz elevado após a indução do estresse durante 25 min.

MATERIAIS E METODOS

Serão utilizadas ratas Wistar obtidas no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEOB. Os animais serão alojados em biotério com 12 horas de luz/dia, temperatura controlada (20 a 23°C) por meio de aparelhos de ar condicionado, água e ração serão fornecidas *ad libitum*. Serão utilizadas ratas nulíparas e primíparas da mesma idade. Todos os procedimentos experimentais observam as normas éticas para o uso de animais de experimentação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Curso de Medicina Veterinária da UNIFEOB (CEUA Institucional) e está de acordo com as diretrizes nacionais previstas na Lei Arouca (11.794/2008). A determinação do ciclo estral será realizada através da citologia vaginal. 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). 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. 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 (NEBA) e fechados (NEBF) e os tempos de permanência nos braços abertos (TPBA) e fechados (TPBF). 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. Para indução do estresse, cada animal será colocado 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 estresse sobre o comportamento de ratas nulíparas (n=8) e primíparas (n=8) no labirinto em cruz elevado após o estresse por contenção durante o proestro

Após a obtenção de fêmeas nulíparas e primíparas da mesma idade, estas serão divididas em 2 grupos experimentais (n=8) submetidas 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 minutos.

O reteste é realizado 24 horas após o teste inicial, durante os mesmos 5 minutos, porém sem submeter animal novamente ao estresse.

Experimento 2: Efeitos do estresse sobre o comportamento de ratas nulíparas (n=8) e primíparas (n=8) no labirinto em cruz elevado após o estresse por contenção durante o estro.

Esse experimento será realizado a semelhança do anterior, porém com outro grupo de fêmeas nulíparas e primíparas (n=8 cada grupo) com a diferença de que as observações comportamentais serão realizadas durante o estro.

Experimento 3: Efeitos do estresse sobre o comportamento de ratas nulíparas (n=8) e primíparas (n=8) no labirinto em cruz elevado após o estresse por contenção durante o metaestro.

Esse experimento será realizado a semelhança do anterior, porém com outro grupo de fêmeas nulíparas e primíparas (n=8 cada grupo) com a diferença de que as observações comportamentais serão realizadas durante o metaestro.

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

$$y_{ij} = \mu + gc_i + e_{ij} \text{ em que,}$$

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.

REFERENCIAS

- 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.; LEE, J.O.; BRIDGES, R. S. Alterations in GABA α 2 subunit mRNA expression following reproductive experience in rats. **Neuroendocrinology**, v.85, p.148-156, 2007.
- FILE, S.E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus maze. **Behavioral Brain Research**, v. 58, p. 199-202, 1993.
- FRANCI, C.R. Estresse: processo adaptativos e não-adaptativos. In: **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. 1^a. 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.
- GARCIA, C.F.R. Efeitos do diazepam sobre a resposta comportamental ao estresse em ratas nulíparas e primíparas. **Trabalho de conclusão de Curso**. Curso de Medicina Veterinária, UNifeob, São João da Boa Vista, SP. 30 pp. 2010.
- 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.
- HUCKE, E.E.T.S; FELICIO, L.F. Effects of prolactin on *in vivo* striatal monoaminergic activity are modulated by a previous reproductive experience. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44 (supl.), p. 71-80, 2008.

- HUCKE, E.E.T.S, GARCIA, C.F.R., FELICIO, L.F. Diazepam effects on anxiety-like behavioral responses to restrained stress in nulliparous and primiparous rats In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE 2009, 2009, Águas de Lindóia/SP. **CDROM da Reunião Anual da FeSBE 2009**. São Paulo/SP: FeSBE, 2009.
- 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.
- 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.
- SELYE, H. The evolution of the stress concept. **American Scientist**, v. 61, p. 692-699, 1973.
- ZIMBERKNOPF, E., GARCIA, C.F.R., FELICIO, L.F. Diazepam effects on anxiety-like behavioral responses to restrained stress in nulliparous and primiparous rats In: Annual Meeting of the International Behavioral Neuroscience Society, 2009, Nassau, The Bahamas. **Abstracts of the IBNS Annual Meeting**. San Antonio, Texas, USA: IBNS, 2009. v.18. p.33 - 33