

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 10 (5)

October 2017

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=464&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Efeitos do diazepam sobre a resposta comportamental ao estresse em ratas nulíparas e primíparas

### Effects of diazepam on behavioral response to stress in nulliparous and primiparous rats

Garcia, C. F. R.<sup>2</sup>, Moreira A. B.<sup>1</sup>, Hucke, E. E. T. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Sinop

<sup>2</sup>Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (Unifeob), São João da Boa Vista

Author for correspondence: [erica.hucke@gmail.com](mailto:erica.hucke@gmail.com)

**Resumo.** A experiência reprodutiva (ER), i.e., 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. Dessa forma, os resultados obtidos até o presente momento são sugestivos de que o estresse modula as respostas comportamentais ao estresse em consequência a experiência reprodutiva e que o cenário hormonal relacionado a fase do ciclo estral participa dessa modulação. Assim também, a experiência reprodutiva é capaz de reduzir a sensibilidade ao estresse, porém esse fato também sofre influência da fase do ciclo estral.

**Palavras-chave:** Experiência Reprodutiva, Diazepam, Estresse, Comportamento, Ansiedade.

**Abstract.** Reproductive experience (RE), i.e., the gestation, parturition and lactation as a whole is associated with hormonal release alterations such as reducing, for example, steroids and prolactin, possibly for the rest of a female's life. Responses to stress are related to a behavioral expression of anxiety in the elevated plus-maze, once stress has an anxiogenic effect in this experimental model; both responses, to stress and anxiety, can be permanently modified in function of the ER. Besides, reduction in primiparous females' sensibility to stress has been already demonstrated. Results obtained are suggestive of stress modulation of behavioral responses as a consequence of reproductive experience and estrous cycle hormonal profile. In other words, reproductive experience can reduce the sensibility to stress; however this fact is also influenced by the estrous cycle phase.

**Keywords:** Reproductive experience, Diazepam, Stress, Behavior, Anxiety.

#### Introdução

A experiência reprodutiva (ER), i.e., 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, 1987 a,b; 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, 1987 a,b; KINSLEY e BRIDGES, 1988; MANN e BRIDGES, 1992). Além disso, 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).

Alguns estudos demonstram que a ER parece reduzir a expressão comportamental da ansiedade no labirinto em cruz elevado e no campo aberto (WARTELLA et al., 2003; BYRNES e BRIDGES, 2006 b). 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 parece ter efeito

semelhante nos ratos e camundongos neste modelo animal (PELLOW et al., 1985; BRETT e PRATT, 1990; DAWSON e TRICKLEBANK, 1995). Uma das drogas mais utilizadas no teste no labirinto em cruz elevado são os benzodiazepínicos, cuja atividade ansiolítica também influencia outros sistemas de neurotransmissão, tais como, o noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico. 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 da droga 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,c; 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 as 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 (BYRNES e BRIDGES, 2006 a,b,c). 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 (BYRNES e BRIDGES, 2006 a,b,c).

A avaliação do comportamento geral em campo aberto e no labirinto em cruz elevado sugere que as fêmeas experientes são menos sensíveis ao estresse (WARTELLA et al., 2003; BYRNES e BRIDGES, 2006a; BOCHINI et al., 2005; LEITE et al., 2006, LEITE et al., 2007). O estresse, por sua vez, tem efeito ansiogênico no labirinto em cruz elevado (FILE, 1993; PELLOW et al., 1985; MORILAK et al., 2005; MITRA et al., 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 tarde do proestro, observa-se um aumento na secreção de prolactina (SMITH e GALA, 1977; STERN e VOOGT, 1974; GALA e HAISENLEDER, 1986). Esse pico já foi descrito há algum tempo (NEILL et al., 1971; ANSELMO-FRANCI e SZAWKA, 2005), sendo que mais recentemente descreveu-se um pico secundário que ocorre no início do estro (ANSELMO-FRANCI e SZAWKA, 2005; SZAWKA et al., 2007). Na manhã do proestro, os níveis de estradiol se elevam e mantêm-se altos até a tarde do proestro, antecedendo os picos de progesterona, LH, FSH e prolactina (UZUELLI, 2006; ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005).

Esses fatos tomados em conjunto são sugestivos de que as respostas ao estresse estão relacionadas à expressão comportamental da ansiedade e que essas podem ser modificadas em função da ER de maneira permanente. Estudos anteriores no labirinto em cruz elevado revelaram que modificações observadas em função da experiência reprodutiva ocorrem durante o proestro (BYRNES e BRIDGES, 2006), sendo essas respostas não detectáveis em fêmeas ovariectomizadas ou em outras fases do ciclo. A fase do ciclo estral pode modificar as respostas no labirinto em cruz elevado, embora existam estudos que ora conseguem revelar tais diferenças (FRYE et al., 2000; MARCONDES et al., 2001; DÍAZ-VÉLIZ et al., 1997; MORA et al., 1996; NOMIKOS e SPYRAKI, 1988), ora não conseguem (FERNANDEZ-GUASTI et al., 1999; SEVERINO et al., 2004). A experiência reprodutiva reduz a sensibilidade ao estresse (WARTELLA et al., 2003), bem como as concentrações de prolactina e estradiol, que por sua vez já foram associadas a efeitos ansiolíticos (WARTELLA et al., 2003; BYRNES e BRIDGES, 2006), sendo que respostas ao estresse são mais evidentes na presença de estrógenos (SEVERINO et al., 2004).

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), por meio do estudo do comportamento de ratas no labirinto em cruz elevado.

## Métodos

### Animais

Foram utilizadas ratas Wistar obtidas no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFEOB. Os animais foram alojados em biotério de temperatura controlada (20 a 23°C) 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 foram fornecidas *ad libitum*.

Para o estudo do comportamento foram utilizadas ratas nulíparas e primíparas da mesma idade, obtidas a partir de um grupo inicial de animais, que foi 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 (21º dia) e finalmente um período de descanso de 15 dias antes do início do procedimento experimental. O grupo de nulíparas ficou aguardando todo este período de preparação das primíparas.

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 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 (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 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 foram realizados durante a manhã do proestro. O labirinto foi limpo com solução de álcool a 5% após a retirada de cada animal, de maneira que o odor não interfira nas respostas comportamentais. Foram 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 foram 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 foi descontado dos anteriores. Estes dados foram utilizados para calcular o percentual de entradas nos braços abertos [%EBA; [NEBA/(NEBA+NEBF)] X 100], o percentual de tempo nos braços abertos [%TPBA; (TPBA/300)X 100] e nos braços fechados [%TPBF; (TPBF/300)X 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 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 contenção*

Cada animal foi 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 submetidos à observação comportamental no labirinto em cruz elevado.

### *Citologia Vaginal*

A determinação do ciclo estral foi realizada com o objetivo de padronizar a fase do ciclo estral

durante os procedimentos experimentais. A fase do ciclo estral escolhida foi a manhã do proestro, uma vez que a participação dos esteróides e da prolactina pode interferir sobre as respostas comportamentais (BRIDGES e BYRNES, 2006 a,b,c). O diagnóstico da fase do ciclo estral foi realizado por observações microscópicas diárias do lavado vaginal, que foi 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.

Foi utilizado 20µl de solução salina (NaCl 0,9%), aplicada com auxílio de pipeta na vulva das fêmeas previamente contidas. O líquido aplicado foi aspirado logo em seguida e colocado sobre uma lâmina para ser avaliado sob microscópio óptico. Foram identificadas as células típicas de cada fase do ciclo estral: no proestro, observando-se uma grande quantidade de células epiteliais nucleadas globosas, leucócitos e células queratinizadas; no estro, grande quantidade de células de descamação queratinizadas anucleadas; no metaestro, uma grande quantidade de leucócitos.

### *Delineamento experimental*

*Experimento 1: Efeitos do diazepam sobre o comportamento de ratas no labirinto em cruz elevado após o estresse por contenção na manhã do proestro (diazepam após o estresse).*

Após a obtenção de fêmeas nulíparas e primíparas, estas foram divididas em 4 grupos experimentais, quais sejam: - Nulíparas submetidas ao estresse por contenção durante 1 hora seguida da avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado durante 5 min após a injeção de diazepam (n=7; 2,0 mg/kg s.c.) ou salina (n=7) na manhã do proestro; - Primíparas submetidas ao estresse por contenção durante 1 hora seguida da avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado durante 5 min após a injeção de diazepam (n=7; 2,0 mg/kg s.c.) ou salina (n=7) na manhã do proestro. O reteste foi 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. 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 (BERTOGLIO e CAROBREZ, 2003).

*Experimento 2 Efeitos do diazepam sobre o comportamento de ratas no labirinto em cruz elevado após o estresse por contenção na manhã do proestro (diazepam antes do estresse).*

Esse experimento tem como objetivo avaliar as respostas comportamentais de acordo com o procedimento experimental proposto por (BYRNES e BRIDGES, 2006 b, modificado) que difere do experimento 1 naquele as fêmeas foram submetidas ao estresse e depois foi realizada a injeção de

diazepam. No experimento 2, a injeção de diazepam foi realizada antes da sessão de estresse. Além disso, o tempo estresse foi reduzido para 25 min, evitando-se assim possível habituação. O tempo que decorreu entre a aplicação do diazepam e a observação comportamental foi de 30 min em ambos os experimentos. Após a obtenção de fêmeas nulíparas e primíparas, estas foram divididas em 4 grupos experimentais, quais sejam: - Nulíparas na manhã do proestro com injeção de diazepam (n=10; 2,0 mg/kg s.c.) ou salina (n=10) 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 min; - Primíparas na manhã do proestro com injeção de diazepam (n=10; 2,0 mg/kg s.c.) ou salina (n=10) 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 min. 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 3: Efeitos do diazepam sobre o comportamento de ratas no labirinto em cruz elevado após o estresse por contenção na tarde do proestro (diazepam antes do estresse)*

Esse experimento tem como objetivo avaliar as respostas comportamentais de acordo com o proposto no experimento 2 e descrito por (BYRNES e BRIDGES, 2006 b, modificado), porém a diferença agora é que o experimento 3 será realizado no período da tarde do proestro. Após a obtenção de fêmeas nulíparas e primíparas, estas foram divididas em 4 grupos experimentais, quais sejam: - Nulíparas na tarde do proestro com injeção de diazepam (n=10; 2,0 mg/kg s.c.) ou salina (n=10) 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 min; - Primíparas na tarde do proestro com injeção de diazepam (n=10; 2,0 mg/kg s.c.) ou salina (n=10) 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 min. 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 4 (período de prorrogação IC): Efeitos do diazepam sobre o comportamento de ratas no labirinto em cruz elevado após o estresse por contenção no metaestro (diazepam antes do estresse)*

Esse experimento adicional tem como objetivo avaliar as respostas comportamentais à semelhanças dos experimentos 2 e 3, sendo a injeção de diazepam foi realizada antes da sessão de estresse e o tempo estresse foi de 25 min, evitando-se assim possível habituação. O tempo que decorreu entre a aplicação do diazepam e a observação comportamental foi de 30 min no labirinto em cruz elevado, porém a diferença é que a fase do ciclo estral a ser analisada é o metaestro. Após a obtenção de fêmeas nulíparas e primíparas, essas foram divididas em 4 grupos experimentais, quais sejam: - Nulíparas no metaestro com injeção de diazepam (n=10; 2,0 mg/kg s.c.) ou salina (n=10) 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 min; - Primíparas no metaestro com injeção de diazepam (n=10; 2,0 mg/kg s.c.) ou salina (n=10) 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 min. 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.

#### *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:

$$y_{ij} = \mu + g_i + e_{ij}$$

em que,

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

$\mu$  = 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.

#### **Resultados e Discussão**

Os resultados do experimento 1 (Figura 1), obtidos a partir das observações comportamentais no labirinto em cruz elevado revelaram que não existe

diferença significativa em função da experiência reprodutiva no teste e no reteste para os parâmetros avaliados de porcentagem de entradas nos braços abertos e número de tentativas (*risk assessment*). Já para o parâmetro de porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos no reteste, existe uma tendência ao aumento desse parâmetro no grupo das primíparas tratadas com diazepam no dia anterior (ANOVA,  $p=0,0638$ ,  $F_{3,24}=2,766$ ) quando comparadas às tratadas com salina, o que não ocorre no grupo das nulíparas. Assim também, para o parâmetro de porcentagem de tempo de permanência nos braços fechados no reteste, existe uma redução desse parâmetro no grupo das primíparas tratadas com diazepam (ANOVA,  $p=0,0409$ ,  $F_{3,24}=3,212$ ) no dia anterior quando comparadas às tratadas com salina, o que não ocorre no grupo das nulíparas. Essas diferenças não foram observadas durante o teste.

Os resultados obtidos no experimento 2 (Figura 2), revelaram uma diferença significativa no tempo de permanência nos braços fechados no grupo das nulíparas (ANOVA,  $p=0,0087$ ,  $F_{3,40}=4,445$ ), sendo que as fêmeas nulíparas tratadas com diazepam permaneceram menos tempo nos braços fechados do que as nulíparas após a injeção de salina, diferença não observada durante o reteste.

Com relação ao experimento 3, observou-se apenas uma tendência a uma redução no número de tentativas (*risk assessment*) no grupo de nulíparas tratadas com diazepam (ANOVA,  $p=0,0763$ ,  $F_{2,18}=4,193$ ) durante o teste (Figura 3).

Finalmente, o experimento 4 (Figura 4) realizado no metaestro revelou diferenças significantes entre os grupos de fêmeas nulíparas e primíparas observadas durante o teste no metaestro. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos estudados no reteste. Assim, no teste do grupo de primíparas verificou-se que as ratas tratadas com diazepam apresentam percentuais de número de entradas nos braços abertos (ANOVA,  $F_{3,24}=4,723$ ,  $P<0,01$ ) e tempo de permanência nos braços abertos aumentados (ANOVA,  $F_{3,24}=6,183$ ,  $P<0,0029$ ), e percentual de tempo de permanência nos braços fechados reduzido (ANOVA,  $F_{3,24}=6,518$ ,  $P<0,0022$ ), quando comparadas ao grupo controle de primíparas tratadas com salina. Essas diferenças não foram encontradas para o grupo de nulíparas nas mesmas condições. Assim também foram encontradas diferenças significantes entre primíparas e nulíparas tratadas com diazepam no teste, sendo que as fêmeas experientes apresentam um aumento no percentual de tempo de permanência nos braços abertos (ANOVA,  $F_{3,24}=6,183$ ,  $P<0,0029$ ) e uma redução no percentual de tempo de permanência nos braços fechados (ANOVA,  $F_{3,24}=6,518$ ,  $P<0,0022$ ) em relação às fêmeas não experientes. Esse dois parâmetros também estão modificados quando se compara proestro e metaestro, ou seja, fêmeas primíparas tratadas com diazepam em metaestro apresentam maior percentual de tempo de permanência nos

braços abertos, menor permanência nos braços fechados, assim como também maior percentual de entradas nos braços abertos (ANOVA,  $F_{7,64}=3,596$ ,  $P<0,0025$ ).

Os resultados apresentados foram obtidos em ratas nulíparas e primíparas submetidas ao estresse por contenção e ao tratamento com diazepam de acordo com o delineamento experimental, variando-se também a fase do ciclo estral em que as observações comportamentais ocorreram.

No primeiro experimento, foram encontradas diferenças no reteste, as primíparas tratadas com diazepam exploraram mais o labirinto em cruz elevado comparadas as nulíparas, ou seja, ocorreu uma significativa redução da porcentagem de tempo de permanência nos braços fechados e uma tendência de aumento no tempo gasto nos braços abertos durante o reteste. Sugeriu-se que esse efeito seria um efeito tardio do diazepam, pois o mesmo foi observado somente durante o reteste, o que poderia apontar para um aumento da sensibilidade a essa droga em condições de estresse induzido. Ainda nesse sentido, o fato de no dia seguinte ao teste as fêmeas estarem em outra fase do ciclo estral, ou seja, no estro, pode ter também colaborado para esse efeito observado no reteste. No entanto, durante o teste não foram observadas diferenças significantes entre os dois grupos de fêmeas em relação ao efeito ansiolítico do diazepam quando essa droga foi administrada após a sessão de estresse. Nesse desenho experimental ocorre uma diferença de tempo entre o início da sessão de estresse e a aplicação do diazepam de 1 hora, e entre o mesmo início e as observações comportamentais de 1 hora e 30 min, tempo suficiente para que qualquer efeito agudo do estresse ou do diazepam já houvesse terminado. Além disso, o efeito novidade do primeiro dia de teste ou a intensidade de resposta ao estresse agudo poderiam ser fatores que colaborariam para mascarar possíveis diferenças entre os grupos estudados, reveladas posteriormente no reteste na forma de um efeito residual ou prolongado mais intenso do diazepam em primíparas. Outro fator que pode ser importante é o tempo de estresse, pois 1 hora pode ter sido suficiente para produzir algum tipo de acomodação ao estresse, de modo que a resposta aguda não teria sido observada. Dessa forma, esse desenho experimental não colabora para revelar diferenças entre os grupos de fêmeas, como revelado em experimentos anteriores (LEITE et al., 2006, 2007; BRIDGES e BYRNES, 2006b,c). Esses estudos sugerem uma modificação na expressão comportamental da ansiedade em primíparas (BRIDGES e BYRNES, 2006; BYRNES e BRIDGES, 2006a), demonstrando que o efeito do diazepam é atenuado em função da experiência reprodutiva (BYRNES e BRIDGES, 2006a). Assim também, foi encontrada uma diferença nos receptores gabaérgicos GABA<sub>A</sub> revelada por uma diminuição na expressão gênica de sua subunidade  $\alpha 2$  em fêmeas primíparas no proestro (BYRNES et

al., 2007). Ainda nesse sentido, durante a gestação ocorrem modificações na expressão da subunidade  $\alpha_2$  do receptor GABA<sub>A</sub> (CONCAS et al., 1999), sugerindo que a gestação poderia induzir uma hiporesponsividade ou tolerância com a que ocorre após a administração por repetidas vezes de diazepam (ARNOT et al., 2001; ITIER et al., 1996). Algumas dessas modificações poderiam também ocorrer durante a lactação, já que foi anteriormente associada à redução na ansiedade e na resposta ao estresse (DOUGLAS, 2005; LONSTEIN, 2005). Essas modificações observadas durante a lactação poderiam ser permanentes (BRIDGES e BYRNES, 2006b,c).

No experimento 2 e nos demais experimentos, o diazepam foi aplicado antes da sessão de estresse, que também foi reduzida para 25 min e realizada também na manhã do proestro. Dessa forma, o objetivo foi eliminar qualquer acomodação ao estresse, assim como a diferença de tempo entre a aplicação do estresse e do diazepam. As ratas nulíparas tratadas com diazepam tiveram um menor percentual de tempo gasto nos braços fechados, sendo que este fato não ocorreu no reteste. Para o grupo das primíparas, nenhuma diferença significativa foi observada, colaborando mais uma vez para sugerir que esse grupo de fêmeas é menos sensível ao diazepam (BRIDGES e BYRNES, 2006b, c). Esse fato é sugestivo também que existe um efeito ansiolítico do diazepam em fêmeas nulíparas submetidas ao estresse. Quando esse mesmo paradigma é realizado na tarde do proestro, o efeito ansiolítico observado em nulíparas desaparece, sugerindo que a hora do dia modificou a expressão comportamental. Esse fato poderia ser relacionado ao pico vespertino de prolactina, ou seja, a prolactina secretada nesse período por si só já possui um efeito ansiolítico, portanto, mascara qualquer efeito do diazepam. Assim, observamos que a resposta ao estresse nessa hora do dia é menos intensa, com um aumento dos níveis séricos de prolactina (GALA e HAISENLEDER, 1986; SMITH e GALA, 1977; STERN e VOOGT, 1974). Ainda se encontra uma redução no número de tentativas (*risk assessment*) no grupo das nulíparas tratadas com diazepam na tarde do proestro, o que é sugestivo de uma redução na ansiedade como descrito anteriormente, sugerindo um menor efeito ansiolítico do diazepam em nulíparas, mas que ainda pode ser detectado dessa forma.

Existe uma correlação positiva entre a atividade gabaérgica do receptor GABA<sub>A</sub> e o controle da atividade de neurônios túbero-infundibulares (TIDA) do hipotálamo que levariam a modificações circadianas na secreção de prolactina (LEE e PAN, 2001), embora outros subtipos de receptores gabaérgicos também estejam envolvidos no controle da secreção de prolactina (NAKAYAMA et al., 2006; CATALANO et al., 2005). Ora, se o receptor GABA<sub>A</sub>, relacionado com a atividade dos benzodiazepínicos, é modulado pela experiência reprodutiva (BYRNES e BRIDGES, 2006c), talvez essa modulação possa

levar também a uma modificação na secreção de prolactina assim como o faz com relação à sensibilidade ao estresse e ao diazepam em fêmeas experientes.

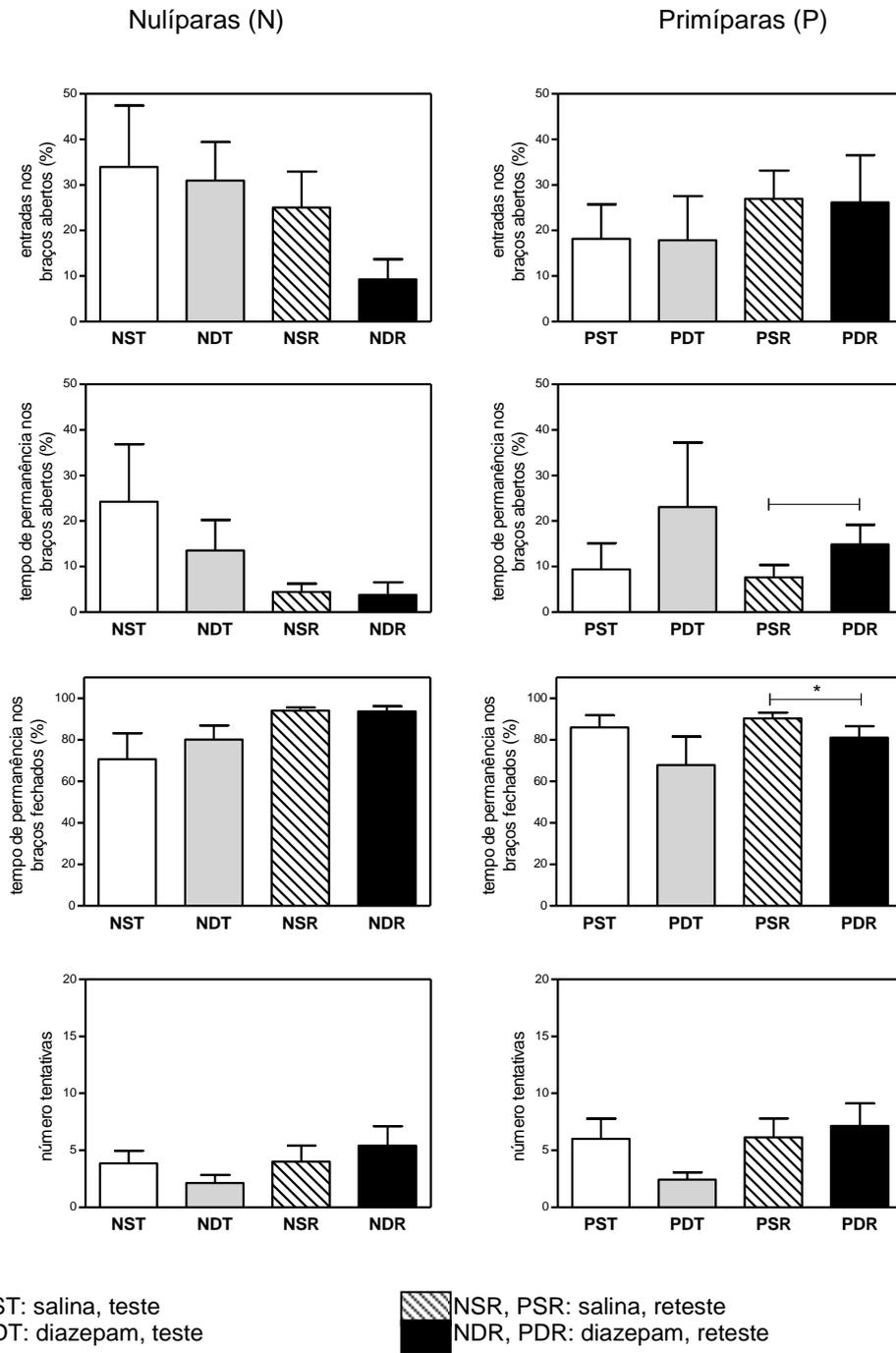
No experimento 4, realizado durante o metaestro foram reveladas diferenças significantes entre nulíparas e primíparas, sendo que o diazepam tem um efeito mais intenso em ratas experientes comparadas às não experientes. Esse fato foi observado no teste mostrando um aumento do tempo de permanência nos braços abertos e redução no tempo nos braços fechados para as primíparas em relação ao mesmo grupo tratado com salina e também em relação às nulíparas. Isso é sugestivo de que no metaestro as fêmeas experientes são mais sensíveis ao tratamento com diazepam em condições de estresse induzido, ao contrário do que ocorre no proestro quando as primíparas parecem ser menos sensíveis a essa droga. Isso pode sugerir também que o cenário hormonal modifica a sensibilidade ao estresse.

A dose de diazepam escolhida foi baseada em estudos anteriores (BYRNES e BRIDGES, 2006 b) que sugeriu uma menor sensibilidade de fêmeas experientes aos efeitos sedativos do diazepam, mas não sobre os efeitos ansiolíticos da droga. Nesse sentido, nosso estudo considerou as fêmeas experientes menos “estressáveis” com consequência de um efeito prolongado da experiência reprodutiva. O estresse, por sua vez, tem um efeito ansiogênico que pode ser observado no labirinto em cruz elevado Mitra et al., 2005; MORILAK et al., 2005; FILE, 1993; PELLOW et al., 1985). A experiência reprodutiva tem efeito ansiolítico, assim como reduz o efeito do diazepam (BYRNES e BRIDGES, 2006<sup>a,b,c</sup>; BYRNES e BRIDGES, 2007; WATELLA et al., 2003).

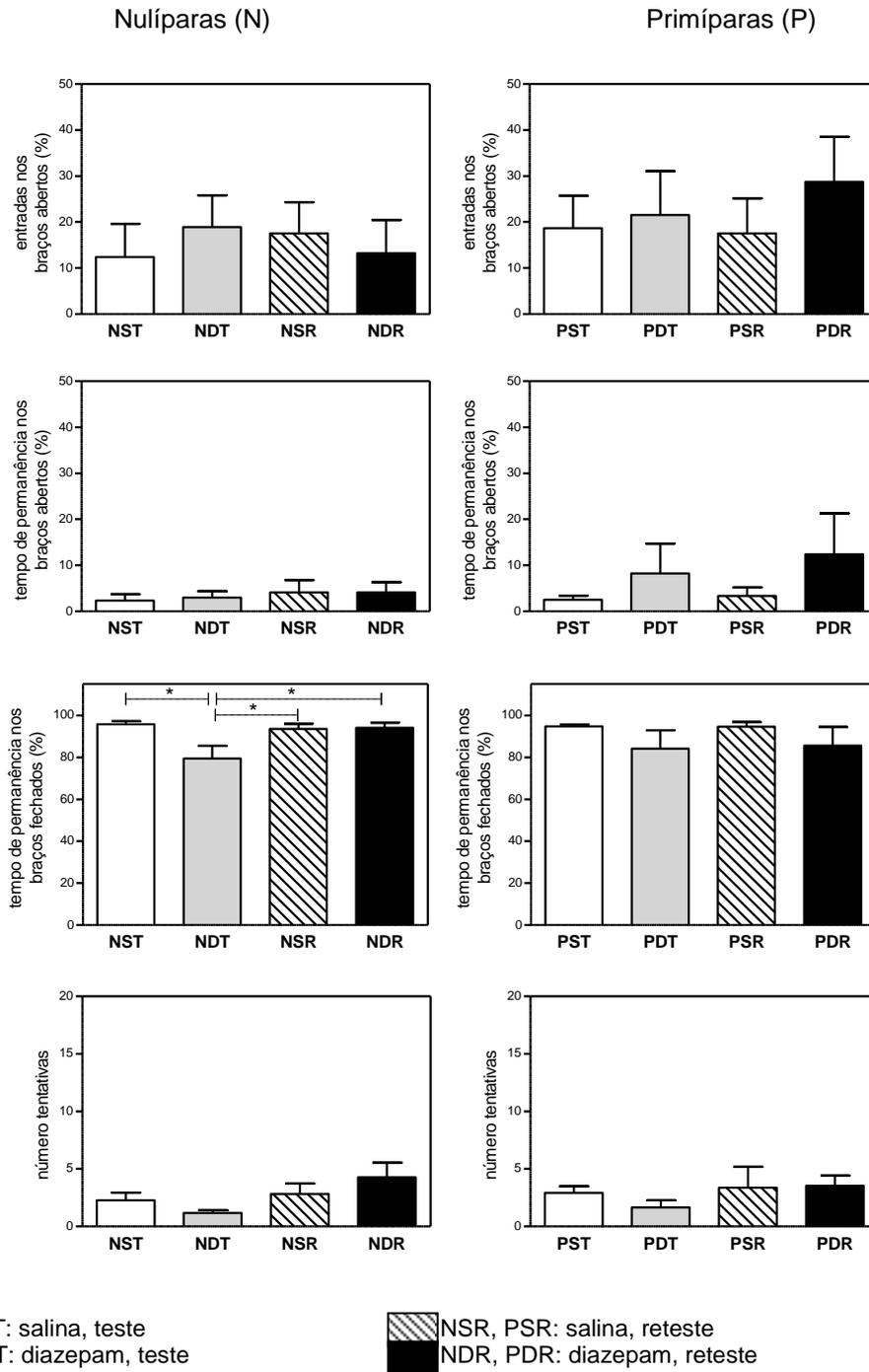
Então, nossos resultados tomados em conjunto e comparados a literatura (BRIDGES e BYRNES, 2006b,c BYRNES e BRIDGES, 2007) parecem ser sugestivas de modificações na resposta ao estresse em função da experiência reprodutiva. O estudo revela também que o momento da aplicação da droga pode ter modificado seu efeito, ou seja, se o estresse é induzido e depois é realizada a administração do diazepam (experimento 1), esse parece ter um efeito nulo sobre as respostas comportamentais em curto prazo no labirinto em cruz elevado, porém revelam uma resposta prolongada sugestiva de um aumento da sensibilidade ao diazepam prolongadamente. Quando observamos os grupos de fêmeas controle (salina) no proestro, observa-se que o estresse deve ter um efeito sobre as primíparas mais intenso, pois diferenças no labirinto em cruz elevado foram relatadas anteriormente (BRIDGES e BYRNES, 2006b,c) nessa mesma fase do ciclo estral, o que não foi observado em nosso estudo. Isso sugere que o estresse mascara as respostas comportamentais tornado-as semelhantes a nulíparas, sugerindo que as primíparas seriam mais sensíveis ao estresse a curto prazo, ao contrário do

que foi sugerido na literatura, embora a resposta a longo prazo (reteste) seja menos intensa. Então, teriam as primíparas uma resposta ao estresse aguda mais intensa a curto prazo e menos intensa a

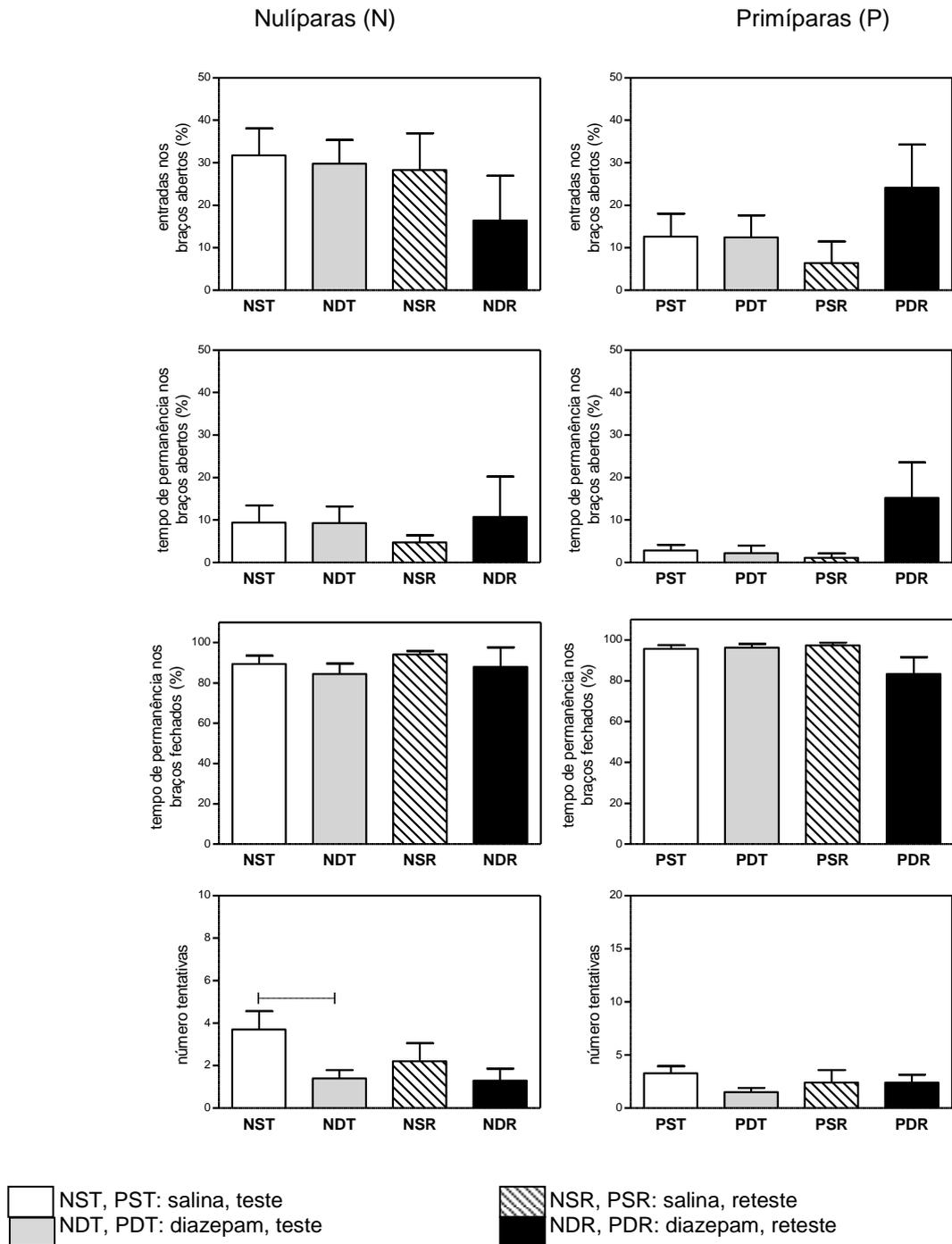
longo prazo quando comparadas as nulíparas? Haveria, portanto, uma modulação em função do tempo da intensidade de resposta ao estresse?



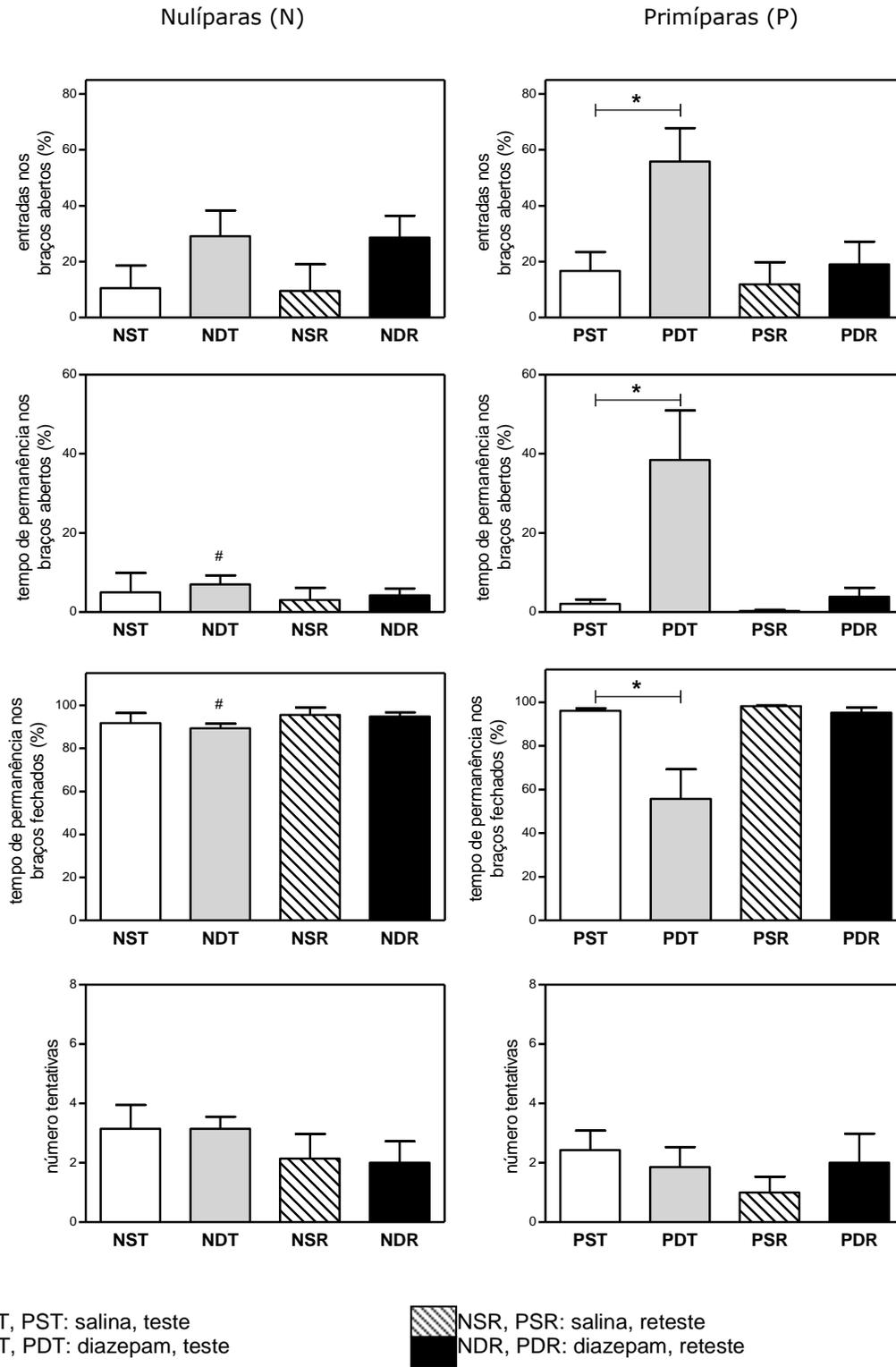
**Figura 1-** Efeitos da aplicação de salina ou diazepam (2mg/kg s.c.) no labirinto em cruz elevado em fêmeas nulíparas (N; n= 7) e primíparas (P; n= 7) **após** a indução de estresse por contenção durante 1 hora na **manhã** do proestro (T). O reteste (R) foi realizado 24 h após. Apresentam-se as médias e os respectivos erros padrões. \*indica diferença significativa entre os grupos marcados. ┌ indica tendência (p=0,0638) entre os grupos marcados.



**Figura 2-** Efeitos da aplicação de salina ou diazepam (2mg/kg s.c.) no labirinto em cruz elevado em fêmeas nulíparas (N; n= 11) e primíparas (P; n= 11) **antes** da indução de estresse por contenção durante 25 min na **manhã** do proestro (T). O reteste (R) foi realizado 24 h após. Apresentam-se as médias e os respectivos erros padrões. \*indica diferença significativa entre os grupos marcados.



**Figura 3-** Efeitos da aplicação de salina ou diazepam (2mg/kg s.c.) no labirinto em cruz elevado em fêmeas nulíparas (N; n= 10) e primíparas (P; n= 10) **antes** da indução de estresse por contenção durante 25 min na **tarde** do proestro (T). O reteste (R) foi realizado 24 h após. Apresentam-se as médias e os respectivos erros padrões. \*indica diferença significativa entre os grupos marcados.



**Figura 4-** Efeitos da aplicação de salina ou diazepam (2mg/kg s.c.) no labirinto em cruz elevado em fêmeas nulíparas (N; n= 10) e primíparas (P; n= 10) **antes** da indução de estresse por contenção durante 25 min no **metaestro** (T). O reteste (R) foi realizado 24 h após. Apresentam-se as médias e os respectivos erros padrões. \*indica diferença significativa entre os grupos marcados. #indica diferença significativa em relação as primíparas submetidas ao mesmo tratamento.

Uma sensibilidade aumentada ao diazepam em primíparas, sugerindo que os esteróides gonadais mais intensa teria sido revelada no metaestro em desempenham um papel importante nesse contexto.

No proestro, o diazepam foi capaz de induzir uma resposta ansiolítica em nulíparas e não em primíparas, sugerindo que nesse último grupo, o estresse modifica a sensibilidade ao diazepam e que de fato as primíparas seriam menos sensíveis a essa droga. No metaestro, o efeito ansiolítico do diazepam aparece de forma intensa em primíparas o que pode revelar a participação dos esteróides gonadais. Interessante notar que é o estresse que revela tais respostas no metaestro.

Finalmente, conclui-se que o diazepam modula as respostas comportamentais ao estresse de maneira diferente em consequência a experiência reprodutiva e que o cenário hormonal participa dessa modulação. Assim também, conclui-se que a experiência reprodutiva é capaz de reduzir a sensibilidade ao estresse, porém esse fato também sofre influência da fase do ciclo estral.

### Referências

ANSELMO-FRANCI, J.A.; SZAWKA, R.E. Controle neuroendócrino da reprodução feminina. *In: Neuroendocrinologia básica e aplicada*, Antunes-Rodrigues, J. (ed.), Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, págs. 318-340, 2005.

ANTUNES-RODRIGES, J.; MOREIRA, A. C.; ELIAS, L.L.K.; CASTRO, M. *Neuroendocrinologia básica e aplicada*. Guanabara koogan. Rio de Janeiro, 2005.

ARNOT, M.I.; DAVIES, M.; MARTIN, I.L.; BATESON, A.N. GABA<sub>A</sub> receptor gene expression in rat cortex: differential effects of two chronic diazepam treatment regimes. *J. Neurosci. Res.*, 64, 617–625, 2001

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. *Psychopharmacology*, v. 170, p. 335-342, 2003.

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.

BRETT, R. R.; PRATT, J. A. Chronic handling modifies the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology*, v. 178, p. 135-138, 1990.

BRIDGES, R. S.; BYRNES, E. M. Reproductive experience reduces circulating 17 $\beta$ -estradiol and prolactin levels during proestrus and alters estrogen sensitivity in female rats. *Endocrinology*, v. 147, n. 5, p. 2575-2582, 2006a.

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

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

BYRNES, E. M.; BRIDGES, R. S. Lactation reduces prolactin levels in reproductively experienced female rats. *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. Alterations in GABA<sub>A</sub> receptor alfa2 subunit mRNA expression following reproductive experience in rats. *Neuroendocrinology*, v.85, p.148-156, 2007.

CONCAS, A.; FOLLESA, P.; BARBACCIA, M.L.; PURDY, R.H.; BIGGIO, G. Physiological modulation of GABA<sub>A</sub> receptor plasticity by progesterone metabolites. *Eur. J. Pharmacol.*, 375, 225–235, 1999.

CRUZ-CASALLAS, P. E.; NASELLO, A. G.; HUCKE, E. E. T. S.; FELICIO, L. F. Dual modulation of male sexual behavior in rats by central prolactin: relationship with in vivo striatal dopaminergic activity. *Psychoneuroendocrinology*, v. 24, p. 681-693, 1999.

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.

DEIS, R. P.; LEGUIZAMON, E.; JAHN, G. A. Feedback regulation by progesterone of stress-induced prolactin release in rats. *Journal of Endocrinology*, n. 120, p. 37-43, 1989.

DÍAZ-VÉLIZ, G.; BAEZA, R.; BENAVENTE, N. D.; MORA, S. Influence of the cycle and estradiol on the behavioral effects of amphetamine and apomorphine in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 49, n. 4, p. 819-825, 1994.

DOUGLAS, A.J. Central noradrenergic mechanisms underlying acute stress responses of the hypothalamo-pituitaryadrenal axis: adaptations through pregnancy and lactation. *Stress*, 8, 5–18, 2005.

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.
- FERNANDEZ-GUASTI, A., MARTINEX-MOTA, L., ESTRADA-CAMARENA, E., CONTRERAS, C.M., LOPEZ-RUBALCAVA, C. Chronic treatment with desipramine induces an estrous-cycle-dependent anxiolytic action in the burying behavior, but not in the elevated plus-maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 63, 13–20, 1999.
- 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**. 1ª. Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 210-223, 2005.
- FRYE, C.A., PETRALIA, S.M., RHODES, M.E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha, 5alpha-THP. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 67, 587–596, 2000.
- GALA, R.R.; HAISENLEDER, D.J. Restraint stress decreases afternoon plasma prolactina levels in female rats. Influences of neural antagonists and agonists on restraint-induced changes in plasma prolactina and corticosterone. **Neuroendocrinology**, n. 43, p. 115-123, 1986.
- GOUVEIA JÚNIOR, A.; MORATO, S. Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. **Interação em Psicologia**, v. 6, n. 2, p.141-148, 2002.
- GRAEFF, F. G. **Neurobiologia das doenças mentais**. 5º ed. 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.
- ITIER, V.; GRANGER, P.; PERRAULT, G.; DEPOORTE, H.; SCATTON, B.; AVENET, P. Protracted treatment with diazepam reduces benzodiazepine1 receptor-mediated potentiation of gamma-aminobutyric acid-induced currents in dissociated rat hippocampal neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 279, 1092–1099, 1996.
- KARL, T.; BURNE, T. H.; HERZOG, H. Effect of Y (1) receptor deficiency on motor activity, exploration, and anxiety. **Behavior Brain Research**, 15, 167(1):87-93, 2006.
- KINSLEY, C. H.; BRIDGES, R. S. Parity-associated reduction in behavioral sensitivity to opiates. **Biology of Reproduction**, n. 39, p. 270-278, 1988.
- LEITE, C. B. ; FELICIO, Luciano Freitas ; 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.
- 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 Anula da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - Fesbe**, Águas de Lindóia, 2007.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p.180-185, 1987.
- LONSTEIN, J. Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. **Hormones Behav.**, 47, 241–255, 2005.
- MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Neural and endocrine sensitivities to opioids decline as a function of multiparity in the rat. **Brain Research**, n. 580. p. 241-248. 1992.
- MARCONDES, F. K.; MIGUEL, K. J.; MELO, L. L.; SPADARI-BRATFISCH,R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavioral**. v. 74, 435-440, 2001.
- MEISEL, R.L.; MULLINS, A.J. Sexual experience in female rodents: Cellular mechanisms and functional consequences. **Brain Res.** 1126, 56-65, 2006.
- 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.
- MORA, S., DUSSAUBAT, N., DIAZ-VELIZ, G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. **Psychoneuroendocrinology** 21, 609–620, 1996.
- 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.
- NEILL, J.D.; FREEMAN, M.E.; TILLSON, S.A. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrigens in the rat. **Endocrinology**, 89(6):1448-53, 1971.
- NOMIKOS, G.G., SPYRAKI, C. Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. **Neuropharmacology**, 27, 691-696, 1988.
- 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.
- PAN, J-T.; GALA, R. R. Central nervous system regions involved in the estrogen-induced afternoon prolactin surge: II. Implantation studies. **Endocrinology**, n. 117, p. 388-395, 1985.
- 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 the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, n.14, v. 149-167, 1985.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal – Modificações e Adaptações**. 4º ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1997.
- RODGERS, R. J. ; COLE, J. C. **Ethology and Psychopharmacology**. S.J. Cooper and C.A. Hendrie Editora, 1994.
- SANCHES, C. D. C.; FELÍCIO, L. F.; HUCKE, E. E. T. S. **Envolvimento do sistema de neurotransmissão dopaminérgica com o comportamento maternal e experiência reprodutiva**. Publicado no Encontro Acadêmico de Medicina Veterinária da UNIFEob, São João da Boa Vista-SP, 2006.
- SANTOS, V. P. O Estresse e a Reprodução. **Seminário (Pós-Graduação)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- SERAFIM, A.P.; FELÍCIO, L.F. Reproductive experience influences grooming behavior during pregnancy in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35(3), pp. 391-394, 2002.
- SELYE, H. The evolution of the stress concept. **American Scientist**, v. 61, p. 692-699, 1973.
- SEVERINO, G.S., FOSSATI, I.A., PADOIN, M.J., GOMES, C.M., TREVIZAN, L., SANVITTO, G.L., FRANCI, C.R., ANSELMO-FRANCI, J.A., LUCION, A.B. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. **Physiology and Behavior**, 81, 489-498, 2004.
- SMITH, W. W.; GALA, R. R. Influence of restraint on plasma prolactin and corticosterone in female rats. **Journal of Endocrinology**, n. 74, p. 303-314, 1977.
- STERN, J. M.; VOOGT, J. L. Comparison of plasma corticosterone and prolactin levels in cycling and lactating rats. **Neuroendocrinology**, n. 13, p. 173-181, 1974.
- SZAWKA, R.E.; RODOVALHO, G.V.; HELENA, C.V.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Prolactin secretory surge during estrus coincides with increased dopamine activity in the hypothalamus and preoptic area and is not altered by ovariectomy on proestrus. [Brain Research Bulletin](#), 15, 73(1-3):127-34, 2007.
- UZUELLI, F. H. P.; **Metabolismo de radicais livres durante o ciclo estral de ratas. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)**. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- VIAU, V.; MEANEY, M. J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology**, n. 129, p. 2503-2511, 1991.
- WARTELLA, J.; AMORY,E.; MACBETH, A. H.; STEVENS, L.; LAMBERT, K. G.; KINSLEY, C. H.; Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. **Physiology & Behavior**, v. 79, p. 373-381, 2003.