

EFEITO DA MANIPULAÇÃO NA RESPOSTA CONTRÁTIL DA AORTA AO ESTRESSE

IC PUC-CAMPINAS

Adriana Cristina D'Orásio

Faculdade de Enfermagem
Centro de Ciências da Vida
email acd1000@terra.com.br

Maria José Costa Sampaio Moura

Faculdade de Ciências Biológicas
Centro de Ciências da Vida
email mourazz@puc-campinas.edu.br

Resumo: *O objetivo deste estudo foi avaliar a efeito da manipulação na resposta contrátil da aorta ao estresse. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) Controle, 2) Manipulação, 3) Estresse e 4) Estresse + Manipulação. Durante sete semanas o grupo 2 foi submetido ao protocolo de manipulação e os grupos 3 e 4, ao protocolo de estresse. Nos grupos submetidos à manipulação (Grupos 2 e 4), as sessões foram aplicadas da 1ª a 7ª semana e nos grupos submetidos ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível (Grupos 3 e 4), a aplicação dos estímulos estressores foi realizada nas semanas 3, 4 e 5. Posteriormente os animais foram sacrificados e a aorta torácica foi isolada e de cada uma foi retirado um anel (3-5 mm). Os anéis foram montados em cuba para órgão isolado em solução de Krebs-Henseleit para obtenção de curvas concentração-efeito à fenilefrina e a sensibilidade da aorta torácica avaliada através da determinação do valor pD_2 , que corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina um efeito igual a 50% da resposta máxima. Concluímos que o estresse promoveu uma supersensibilidade em resposta à fenilefrina na aorta torácica dos ratos e que a manipulação exerceu um efeito atenuante nas respostas induzidas pelo estresse e que este resultado foi dependente da presença do endotélio.*

Palavras-chave: *aorta, manipulação, estresse, rato*

Área do Conhecimento: *Fisiologia – Fisiologia de Órgãos e Sistemas*

FAPIC/REITORIA.

1. INTRODUÇÃO

Na sociedade moderna o estresse tem se apresentado como importante contribuinte para o desenvolvimento de disfunções metabólicas, doenças cardiovasculares, distúrbios emocionais e obesidade [30,6].

A complexa resposta do organismo a estímulos aversivos ou situações desconhecidas é definida como reação de estresse e o agente causador desta

reação é definido como agente estressante ou estressor [36,33]. A adaptação dos seres vivos aos estímulos estressores ambientais é essencial para a sua sobrevivência e na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na reação de estresse, vários modelos animais têm sido utilizados como importante ferramenta experimental complementar ao estudo em humanos.

Estudos em ratos comprovaram que estes animais podem adaptar-se à aplicação repetida de estímulos estressores, porém esta adaptação pode não ocorrer quando os animais são submetidos ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI), que consiste na exposição repetida a diferentes estímulos [43,16]. Esta constatação é sustentada por estudos que comprovaram a elevação mantida nos níveis séricos de prolactina e corticosterona, aumento na pressão arterial e frequência cardíaca e indução de anedonia nestes animais [32,11,21,12].

As respostas fisiológicas desencadeadas pelo organismo frente a agentes estressores podem produzir alterações de sensibilidade adrenérgica em tecidos isolados, como foi observado em ratos submetidos a estresse por frio [3], choques [44], imobilização [5], natação [22,46] ou estímulos variados [31].

Entretanto, os organismos podem apresentar diferentes respostas adaptativas de acordo com o ambiente em que vivem e diferenças neuroendócrinas e comportamentais em resposta ao estresse podem também ser atribuídas ao cuidado maternal [8]. Estudos clínicos mostram que crianças e adolescentes que sofrem eventos negativos (estressantes) podem ficar predispostos a distúrbios emocionais e comportamentais, como ansiedade e depressão, na vida adulta [17, 29,28]. Estudos com macacos Rhesus demonstraram que fêmeas filhas de mães que gastaram maior tempo em contato físico com sua prole tornaram-se mães que apresentavam o mesmo comportamento de cuidado maternal [7]. Por outro lado, mães que rejeitaram sua prole eram filhas que haviam sofrido rejeição materna [1].

Em roedores, um fator ambiental que pode provocar tais alterações e simular o cuidado maternal é

a manipulação (estimulação tátil). A manipulação pode alterar a habilidade do organismo em responder e adaptar-se a estímulos estressores, resultando em alterações fisiológicas e comportamentais que persistem na vida adulta [20,39,4].

Observa-se, em ratos, após vinte e quatro horas de separação materna, elevações naturais nos níveis de ACTH e glicocorticóides. No entanto, reinsertando algum tipo de cuidado, como a manipulação, estes efeitos provocados pela separação materna podem ser revertidos [25].

A manipulação favorece ainda que estes animais apresentem menor ansiedade, menor comportamento de medo, e maior comportamento exploratório em ambiente desconhecido [26,20,34,31,39].

No sistema neurológico foi constatado que a manipulação potencializou os efeitos do tratamento pré e pós-natal em ratos, com 5 metoxitriptamina, um agonista serotoninérgico. Este tratamento resultou em um aumento no nível de atividade e no número de respostas corretas, além de um decréscimo no número de erros de memória ao serem submetidos a um exercício de aprendizado associativo objeto/lugar (Can test) [3].

Considerando os dados indicativos de que a manipulação neonatal pode alterar a resposta funcional e comportamental ao estresse, nossa proposta foi estudar, em ratos adultos, o efeito da manipulação na resposta contrátil da aorta torácica ao estresse.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley, com dois meses de idade no início do experimento, divididos em quatro grupos: Controle, Manipulação, Estresse e Estresse + Manipulação. Durante sete semanas o grupo 2 foi submetido ao protocolo de manipulação e os grupos 3 e 4, ao protocolo de estresse. Nos grupos 2 e 4 as sessões foram aplicadas da 1ª a 7ª semana e nos grupos 3 e 4, a aplicação dos estímulos estressores foi realizada nas semanas 3, 4 e 5. O protocolo de ECMI consiste na aplicação de diferentes estímulos estressores e o protocolo de manipulação consiste acomodar o animal entre as mãos e com o polegar realizar movimentos no sentido da cabeça a cauda na região dorsal do animal.

Na oitava semana, os animais foram sacrificados e anéis (3-5 mm) foram retirados da aorta torácica e montados em câmara para órgão isolado, para registro das contrações. Foram obtidas curvas concentração-efeito à fenilefrina e a sensibilidade da aorta foi avaliada pela determinação do valor pD₂,

que corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina um efeito igual a 50% da resposta máxima. Os resultados de pD₂ foram comparados por análise de variância (ANOVA) e teste t de Student, sendo considerados estatisticamente significantes os valores de p menores que 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliou-se a sensibilidade das aortas torácicas provenientes de animais do Grupo Controle (Ct), do Grupo Manipulação (M), do Grupo Estresse (ES) e do Grupo Estresse + Manipulação (ESM), com (+E) ou sem (-E) endotélio. Nos anéis sem endotélio, não se observou alteração de sensibilidade em razão do estresse (valores de pD₂: Ct -E = 7,63 ± 0,11; ES -E = 7,47 ± 0,11) ou da manipulação (valores de pD₂: Ct -E = 7,63 ± 0,11; M -E = 6,78 ± 0,11). A Figura 01 ilustra este resultado.

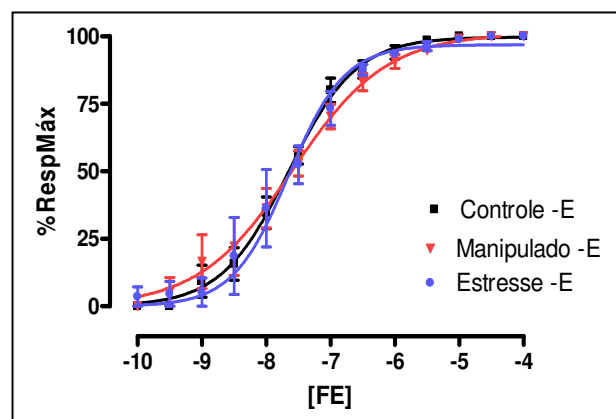


Figura 01: Curvas concentração-efeito à fenilefrina (FE) obtidas de anéis com remoção mecânica do endotélio (-E) de aorta torácica de ratos do Grupo Controle (Ct), Estresse (ES) e Manipulação (M).

Contudo, nos anéis com endotélio observou-se um aumento de sensibilidade à fenilefrina em razão do estresse (valores de pD₂: Ct = 6,82 ± 0,09; ES = 7,45 ± 0,26). A Figura 02 ilustra este resultado.

Ainda nos anéis com endotélio intacto a manipulação atenuou o efeito do estresse sobre a resposta contrátil da aorta (valores de pD₂: Ct +E = 6,82 ± 0,09; ES +E = 7,45 ± 0,26; ESM +E = 7,104 ± 0,11), como mostra a Figura 03.

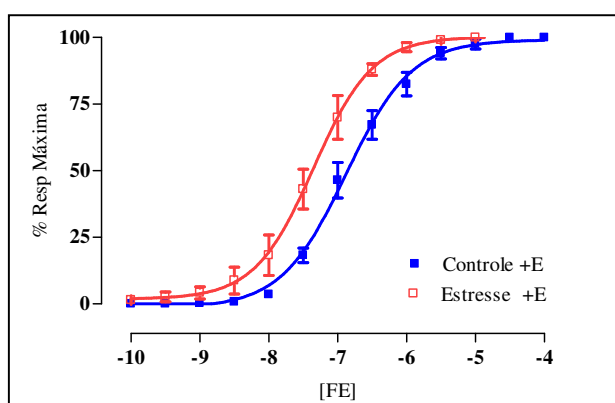


Figura 02: Curvas concentração-efeito à fenilefrina (FE) obtidas de anéis com endotélio intacto (+E) provenientes de aorta torácica de ratos do Grupo Controle (Ct) e do Grupo Estresse (ES).

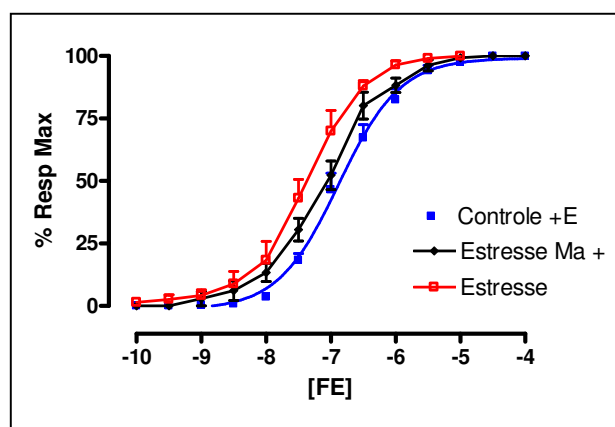


Fig.03: Curvas concentração-efeito à fenilefrina (FE) obtidas de anéis com endotélio intacto (+E) provenientes de aorta torácica de ratos do Grupo Controle (Ct), Grupo Estresse (ES) e do Grupo Estresse Manipulado (ESM).

Vários estudos mostram os efeitos benéficos da manipulação (estimulação tátil) sobre o comportamento e parâmetros fisiológicos em animais.

Assim, estudos realizados em porcos demonstraram que a manipulação cuidadosa do criador resultou em aumento da taxa de crescimento e melhor desempenho reprodutivo [13], assim como gado criado de forma amigável e interativa com o criador pode elevar a produção de leite quando comparado ao animal criado de forma adequada, porém sem o estabelecimento de uma relação amigável com seu criador [35].

Foi observado em ratos Sprague-Dawley adultos, através de teste de labirinto em cruz elevado, um aumento da ansiedade, nos ratos submetidos ao isolamento neonatal (separação materna) e diminuição da ansiedade nos animais submetidos à estimulação tátil neonatal em relação ao controle [15].

A separação materna por um período de três horas durante as três primeiras semanas de vida demonstrou também, em ratos, elevação da ansiedade e um decréscimo no peso dos animais após o desmame (22º dia), sugerindo que eventos estressantes durante o desenvolvimento inicial contribuem tanto para ansiedade como para outras desordens, como anorexia nervosa, bulimia e obesidade [19].

Estas constatações estão de acordo com os relatos sobre a influência do cuidado materno na resposta estressora desencadeada pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Uma revisão da literatura possibilitou a constatação que o eixo HHA pode ser programado para ser hiporresponsivo ou hiperresponsivo de acordo com o tempo da separação materna e que a interação do animal neonato com a mãe tem efeitos permanentes a longo prazo [15]. Embora não se encontre dados na literatura relacionando a manipulação em ratos adultos jovens, com alterações no processo de aprendizado e memória, alterações no comportamento de ansiedade têm sido relacionadas com o protocolo de ambiente enriquecido, que consiste na combinação de interação social e objetos (brinquedos) colocados nas gaiolas dos animais, e tem sido demonstrado que diferentes condições ambientais provocam alterações neurobiológicas e comportamentais [14].

Neste contexto, a exposição do animal a um ambiente estressante pode ser responsável por alterações nas respostas fisiológicas. O estresse, seja ele de natureza física, psicológica ou social, é composto de um conjunto de reações fisiológicas que se exageradas em intensidade ou duração podem levar a um desequilíbrio no organismo. Porém, reação ao estresse é uma atitude biológica necessária para a adaptação a situações novas. Também fatores individuais tais como características genéticas, sexo, ciclo reprodutivo e idade influenciam a reação de estresse [18,27]. Entretanto, o fator mais importante parece ser a percepção que o indivíduo tem do estímulo que lhe é apresentado. Esta percepção depende das experiências previamente vivenciadas pelo mesmo ou filogeneticamente adquiridas pela espécie, e da novidade ou previsibilidade do estímulo [41,10,9].

A ausência de adaptação ao estresse acarreta prejuízo fisiológico, inclusive ao sistema cardiovascular, como constatado em estudos com ratos de laboratório, evidenciando o desenvolvimento de hipertensão [16], subsensibilidade aos efeitos das catecolaminas no marcapasso cardíaco [17] e na aorta torácica [24] isolados de ratos submetidos a estresse repetido, e supersensibilidade aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina [38], após estresse agudo por sessão única de natalção.

Sabe-se que no tecido vascular, alterações de sensibilidade às catecolaminas, causadas pelo estresse podem estar associadas à função endotelial. Assim, em aorta isolada de ratos submetidos a várias sessões de exercício em esteira, observou-se o desenvolvimento de subsensibilidade endotélio-dependente à noradrenalina [37]. Uma sessão de natação induziu uma diminuição de sensibilidade à fenilefrina, em anéis de aorta torácica de ratos, sendo também esta subsensibilidade dependente do endotélio [23,5].

Também no presente trabalho, observou-se aumento de sensibilidade à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos submetidos ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível e esta resposta foi dependente do endotélio. Contudo, a manipulação diminuiu esta resposta, no mesmo modelo experimental.

Assim, mesmo nos animais adultos, a estimulação tátil, simulando o cuidado maternal pode ser capaz de prevenir ou atenuar os efeitos danosos do estresse em parâmetros funcionais, como a reatividade vascular.

4. CONCLUSÃO

O estresse crônico, moderado e imprevisível promoveu uma superpersensibilidade em resposta à fenilefrina na aorta torácica dos ratos submetidos a este protocolo experimental enquanto que a manipulação exerceu um efeito atenuante nas respostas induzidas pelo estresse e este resultado foi dependente da presença do endotélio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BERMAN CM. Immature siblings and mother-infant relationships among free-ranging rhesus monkeys on Cayo Santiago. *Anim Behav*, 44:247-258, 1992.
- [2] CABRAL A. Efeito do trauma sub-aquático e da estimulação tátil na resposta de exploração do labirinto em cruz elevado em ratos desnutridos [dissertação]. Ribeirão Preto USP/Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Riberão Preto; 2003.
- [3] CALLIA ML, DE MORAES S. Heterogeneity of beta-adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230: 450-454, 1984.
- [4] CANNIZZARO C, PLESCIA F, GAGLIANO M, CANNIZZARO G, PROVENZANO G, MANTIA G, CANNIZZARO E. Effects of pre- and postnatal exposure to 5-methoxytryptamine and early handling on an object-place association learning task in adolescent rat offspring. *Neur Res.* 59 :74–80, 2007.
- [5] CAPAZ FR, De MORAES, S. Reduction by acute restraint stress of norepinephrine sensitivity in the isolated rat pacemaker. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, 147 (2): 295-298, 1988.
- [6] COSTELA C, TEJEDOR-REAL P, MICO JA, GIBERT-RAHOLA J. Effect of neonatal handling on learned helplessness model of depression. *Physiol Behav.* Feb;57(2):407-10, 1995.
- [7] DE QUINTAL MM, MARCONDES FK, MOURA MJCS. Forced-swimming induces subsensitivity to phenylephrine in the rat thoracic aorta. VII World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Florença- Itália, 15-20/07, Anais, 2000.
- [8] EPEL EE, MOYER AE, MARTIN CD, MACARY S, CUMMINGS N, RODIN J & REBUFFESCRIVE M. Stress-induced cortisol, mood, and fat distribution in men. *Obes. Res.* 7:9-15, 1999.
- [9] FAIRBANKS LM. Individual differences in maternal style. *Adv Study Behav* 25:579-611, 1996.
- [10] FRANCIS DD & MEANEY M. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol.* Feb;9(1):128-34, 1999. Review.
- [11] GOLDSTEIN DS, KOPIN IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 10 (2): 109 – 120, 2007.
- [12] GRIFFIN JFT. Stress and immunity: a unifying concept. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 20: 263-312, 1989.
- [13] GRIPPO AJ, MOFFITT JA, JOHNSON AK. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282(5): R1333-41, 2002.
- [14] GRIPPO AJ, NA ES, JOHNSON RF, BELTZ TG, JOHNSON AK. Sucrose ingestion elicits reduced Fos expression in the nucleus accumbens of anhedonic rats. *Brain Res.* Sep 3; 1019(1-2): 259-64, 2004.
- [15] HEMSWORTH PH & BARNETT JL. Human-animal interactions. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* Jul;3(2):339-56, 1987.
- [16] HOFFMANN LC, SCHÜTTE SR, KOCH M, SCHWABE K. Effect of "enriched environment" during development on adult rat behavior and response to the dopamine receptor agonist

- apomorphine. *Neuroscience*. Dec 3, 2008. [Epub ahead of print]
- [17] IMANAKA A, MORINOBU S, TOKI S, YAMAMOTO S, MATSUKI A, KOZURU T, YAMAWAKI S. Neonatal tactile stimulation reverses the effect of neonatal isolation on open-field and anxiety-like behavior, and pain sensitivity in male and female adult Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res*. Jan 10;186(1):91-7. Epub 2007 Aug 6, 2008.
- [18] KATZ RJ, ROTH KA, CARROLL BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 5(2): 247-51, 1981.
- [19] LAU, BWK. Does the stress in childhood and adolescence matter? A psychological perspective. *J R Soc Health*, 122(4):238-244, 2002.
- [20] LEVINE S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur Journal of Pharmacology* 405: 149-160, 2000.
- [21] LLOYD-MACGILP SA, NELSON SM, FLORIN M, LO M, MCKINNELL J, SASSARD J, KENYON CJ. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid action in Lyon hypertensive rats. *Hypertension*. 34(5): 1123-8, 1999.
- [22] MARCONDES FK. Influência do sexo e das fases do ciclo estral sobre a reação de estresse em ratos. Campinas, 1995, 58p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas].
- [23] MARCONDES, FK, VANDERLEI, LCM, LANZA, LLB, SPADARI-BRATFISCH, RC. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 74: 663-669, 1996.
- [24] MARPLE DN, ABERLE ED, FORREST JC, BLAKE WH, JUDGE MD. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. *J. Anim. Sci.*, 35 (3): 576-579, 1972.
- [25] MCINTOSCH J, ANISMAN H, MERALI Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Dev Brain Res*. 113: 97-106, 1999.
- [26] MERLO P, HORVATH KM, NAGY GM, BOHUS B, KOOLHAAS JM. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol*. Dec;11(12):925-33, 1999.
- [27] MOREAU JL, JENCK F, MARTIN JR, PERRIN S, HAEFELY WE. Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT1C receptor activation in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 110(1-2): 140-4, 1993.
- [28] MOREAU JL. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale*. 23(4): 280-9, 1997.
- [29] MOURA MJCS, MARCONDES FK, ZANESCO A. Efeito do estresse por natação forçada na atividade contrátil da aorta de rato. XII Reunião anual da FeSBE, Caxambu-MG, Anais, 1997.
- [30] MOURA MJCS, MOMESSO MQ & MARCONDES FK. A natação forçada induz subsensibilidade à fenilefrina em aorta torácica de rato. *Braz. J.Pharmac. Sci*, 39 (4): 433 - 439, 2003.
- [31] NEVES VJ, MOURA MJCS, TAMASCIA ML, FERREIRA R, SILVA NS, COSTA R, MONTEMOR PL, NARVAES EAO, BERNARDES CF, NOVAES PD, MARCONDES FK. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 12 (4): 320 - 327, 2008.
- [32] OERS HJJ, KLOET RE, WHELAN T, LEVINE S. Maternal Deprivation Effect on the Infant's Neural Stress Markers Is Reversed by Tactile Stimulation and Feeding But Not by Suppressing Corticosterone. *The Journal of Neuroscience*, Dec 1, 18(23):10171-10179, 1998.
- [33] PAPAIOANNOU A, GEROZISSIS K, PROKOPIOU A, BOLARIS S, STYLIANOPOULOU F. Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and the vulnerability for depressive behaviour. *Behav Brain Res*. Feb 1;129(1-2):131-9, 2002.
- [34] PARÉ WP, REDEI E. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol. Behav.*, 54: 1179-1185, 1993.
- [35] PENZA KM, HEIM C & NEMEROFF CB. Neurobiological effects of childhood abuse: implications for pathophysiology of depression and anxiety. *Arch Womens Ment Health*, 6:15-22, 2006.
- [36] PINE DS, COHEN JA. Trauma in children and adolescents: risk and treatment of psychiatric sequelae. *Biol Psychiatry*. Apr 1;51(7):519-3, 2002. Review.
- [37] RAIKKONEN K, HAUTANEN A & DELTIKANGAS-JARVINEN L. Association of stress and depression with regional fat distribution in healthy middle-aged men. *J. Behav. Med*. 17: 605-616, 1994.

- [38] REBOUCAS RC, SCHMIDEK WR. Handling and isolation in three strains of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. *Physiol Behav.* Nov; 62(5):1159-64, 1997.
- [39] RODRIGUEZ ECHANDIA EL, GONZALEZ AS, CABRERA R, FRACCHIA LN. A further analysis of behavioral and endocrine effects of unpredictable chronic stress. *Physiol Behav.* 43(6): 789-95, 1988.
- [40] SAPOLSKY RM Stress in the wild. *Scientific American*, 106-113, 1990.
- [41] SCHMITT U, HIEMKE C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacol Biochem Behav.* Apr;59(4):807-11, 1998.
- [42] SEABROOK MF. The psychological interaction between the stockman and his animals and its influence on performance of pigs and dairy cows. *Vet Rec.* Jul 28;115(4):84-7, 1984.
- [43] SELYE H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, London, 138 (1): 32, 1936.
- [44] SPADARI-BRATFISCH RC, NUNES IS VANDERLEI, L.C.M & MARCONDES, FK. Evidence for α 2-adrenoceptors in right atria from female rats submitted to footshock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 77 (6): 432-440, 1999.
- [45] SPIER AS, LAUGHLIN MH, DELP MD. Effects of acute and chronic exercise on vasoconstrictor responsiveness of rat abdominal aorta. *Appl. Physiol.*, 87 (5): 1752-1757, 1999.
- [46] TANNO, AP, BIANCHI, FJ, MOURA, MJCS, MARCONDES, FK. Atrial supersensitivity to noradrenaline in stressed female rats. *Life Sci.* 71(25): 2973-981, 2002.
- [47] VALLÉE M, MAYO W, DELLU F, LE MOAL M, SIMON H, MACCARI S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosc.* 17 (7): 2626-2636, 1997.
- [48] VAN ROSSUM JM. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making f dose-response curves in isolated organs and the evaluation of the drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 143: 299-330, 1963.
- [49] VOGEL WH, JENSH R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. *Neurosc. Lett.*, 87: 183-188, 1988.
- [50] WEININGER O. Physiological damage under emotional stress as a function of early experience. *Science.* Feb 26;119(3087):285-6, 1954.
- [51] WILLNER P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther.* 45(3): 425-55, 1990.