

Renata Cristina Nunes Marchette

**Resiliência e vulnerabilidade ao estresse social e suas
implicações neurobiológicas**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thereza Christina Monteiro de Lima
Coorientador: Prof. Dr. Geison Souza Izídio

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Marchette, Renata Cristina Nunes
Resiliência e vulnerabilidade ao estresse social
e suas implicações neurobiológicas / Renata Cristina
Nunes Marchette ; orientadora, Thereza Christina
Monteiro de Lima, coorientador, Geilson Souza Izídio,
2017.

149 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

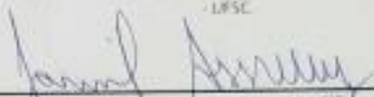
1. Farmacologia. 2. Resiliência. 3.
Vulnerabilidade. 4. Derrota Social. 5. Eixo HPA. I.
de Lima, Thereza Christina Monteiro. II. Izídio,
Geilson Souza. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
IV. Título.

**"Resiliência e vulnerabilidade ao estresse social e suas implicações
neurobiológicas"**

Por

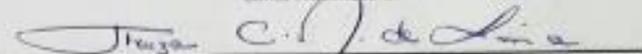
Renata Cristina Nunes Marchetto

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca
Examinadora (11/PPGFM/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
- LFSC.

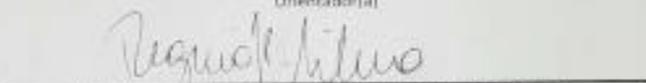


Prof(a). Dr(a). Jamil Assereuy Filho
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

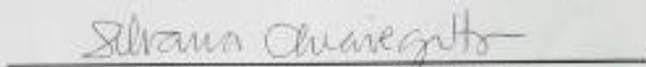
Banca examinadora:



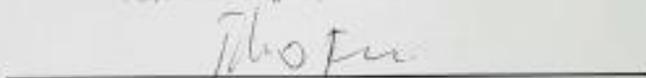
Dr(a) Theresia Christina Monteiro de Lima (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Regina Helena da Silva (Universidade Federal de São Paulo)



Dr(a) Silvana Chiavegatto (Universidade de São Paulo)



Dr(a) Juliano Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Ana Cristina Guerra de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Aurora Elizabeth Linder (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 27 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Valdir e Terezinha, por todo o apoio e amor. Sem vocês nada teria sido possível! “*Anywhere I go you go, my dear, and whatever is done by only me is your doing, my darling*” – E.E. Cummings.

À minha irmã Juliana, por sua paciência, sensatez, por ser tão diferente de mim e ainda assim compartilhar comigo desde as futilidades à visão idealista de mundo “*Loving you the way I do/ I know we're gonna make it through/ And I will go to the ends of the earth/ 'cause darling, to me that's what you're worth You never know how it's all gonna turn out/ But that's ok/ Just as long as we're together / We can find a way*” – Carole King.

À minha orientadora professora Thereza de Lima, não apenas pela orientação nos últimos seis anos, mas, sobretudo por ter me introduzido a todos os diferentes aspectos da vida acadêmica, da bancada à burocracia. Muito obrigada pela confiança (e dicas de viagem)!

Ao meu co-orientador professor Geison Izídio, por tantas discussões científicas e filosóficas, pelo exemplo de idealismo e integridade e por manter vivo o ‘brilho nos olhos’ por essa carreira apesar de todas as adversidades.

Ao meu orientador no período ‘sanduíche’ professor Raymond Mongeau, por me receber no *Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale*, pela orientação e por me ensinar a argumentar e defender minhas ideias.

Aos professores Beth Linder, Jamil Assreuy, Juliano Ferreira, Regina Silva, Silvana Chiavegatto, Tadeu Lemos e à doutora Ana Cristina Guerra, pela disponibilidade e disposição de avaliar e contribuir para este trabalho.

À Evelyn Santos, pela amizade, conselhos, desabafos e, principalmente, por ter me convidado a colaborar no seu trabalho de doutorado se tornando a colaboradora vital deste trabalho.

À Maíra Bicca, dona da gargalhada mais deliciosa, pela amizade, pelas opiniões sempre sinceras e por todas as imunos lindas (e as não tão lindas) que fizemos nos últimos quatro anos!

À Débora Luckemeyer, pela colaboração, pelo ombro amigo e pelo exemplo de integridade e competência.

Ao Filipe Matheus, pela colaboração neste trabalho e pela amizade.

À Claudini, por ser a alma mais linda, empática, sensível e, ao mesmo tempo, forte e idealista que tive a chance de conhecer. Sou

imensamente grata ao universo por ter me presenteado com alguém como você e aonde eu for te levo comigo no coração.

Às minhas queridas amigas Nati, Pam e Rach, nem consigo imaginar como teria sido minha volta à Floripa sem vocês. O carinho e amizade de vocês, sempre mantendo o respeito às nossas muitas diferenças, me deram forças, foco e uma vontade absurda que o tempo passasse mais devagar. Não importa onde eu esteja sempre estarei com vocês no coração e sendo presente mesmo que ausente. “Não é sobre ter/ Todas as pessoas do mundo pra si/ É sobre saber que em algum lugar/ Alguém zela por ti É sobre ser abrigo/ E também ter morada em outros corações/ E assim ter amigos contigo/ Em todas as situações” – Ana Vilela

À Isabela, por esses 25 anos de amizade. Que venham outros 25 anos onde nem a distância nem o tempo mudem o carinho, o respeito e a consonância de ideais.

Aos meus amigos do Laboratório de Neurofarmacologia, em todas as suas conformações nestes 6 anos: Alexandre, Ana Cláudia, Ana Paula, Andressa, Bruna, Camila, Claudini, Crístielle, Ericks, Evelyn, Felipe, Filipe, Gilliard, Júlia, Maíra, Marcelo, Matheus, Murilo, Nayana, Pablinny e Vagner, pela amizade, bolos, pizzas, festinhas e trabalho em equipe.

Aos meus parisienses favoritos, Aléssia, Andreas, Anielle ‘Noni’, Márcia, Marina, Martina, Maurício, Rudolf, Tânia e Valéria, por fazerem Paris um lugar tão mágico: sem vocês seria ‘apenas’ uma cidade.

Ao Laboratório de Genética do Comportamento (e família estendida), que me acolheu tão bem nestes 4 anos: Ana, Eduarda, Elisa, Fernanda, Gabriela, Guilherme, Gustavo, Jerônimo, Jéssica, Mayara, Natalli, Pâmela, Rachel, Rafaela, Renata e Ricardo.

Aos colegas do *Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale*, Célia, Kahina, Kristin, Márcia, Martina, Matti, Toufik, Valéria e Zhang, por me ensinarem tanto de suas próprias culturas, me ajudarem no francês e pelos inúmeros momentos agradáveis que passamos juntos naqueles 7 meses. *Vous me manquez beaucoup!*

Aos meus amigos Marília, Thiago, Vagner e Flora, que foram tão presentes e são tão especiais nesse caminho.

Aos meus amigos Ágatha, Carol, Chris, Karen, Giani, Richa e Wagner, por tantos bons momentos na mesa 33.

Aos meus amigos do PPGFarmacologia, Alessandra, Ana Cristina, Arthur ‘Bauru’, Camila, Cristina, Franklin, Katiane, Lucas, Matheus, Paulo, Stefânia e Vanessa.

Aos meus amigos da vida toda: Bruno 'Take', Felipe 'Brito', Gabriel 'Zinho', Guilherme, Gustavo 'G', Laís, Lucas 'Ceará', Marina, Vinícius 'Chico' e, especialmente, ao Lucas 'Milio', pela companhia em Paris e ao Fred por fazer a figura 4.

À equipe do *Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale* por me receberem tão bem (apesar do meu francês deplorável), especialmente à Catherine, Claire, Virginie, Nicole, Bérard e Bruno.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia, por sua dedicação e ensinamentos.

Aos professores do Centro de Ciências Biológicas que, pelo exemplo, me ensinaram que para ser realizado e bem sucedido nessa profissão o amor pela ciência e o zelo por uma educação pública de qualidade deve sempre vir acima do ego e das adversidades do dia a dia.

À Mara e ao João de Pieri, por abrirem sua casa pra mim e me acolherem de Natal a hóspede semifixa.

À minha família, por todo o amor, desejo de sucesso e por aceitarem meu 'wanderlust' mesmo que isso signifique estar distante a maior parte do tempo.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq.

*“Face your life
Its pain, its pleasure.
Leave no path untaken.”*

Neil Gayman
The graveyard book

RESUMO

O estresse social é um importante fator na gênese de transtornos psiquiátricos. Entre os diversos modelos disponíveis para o estudo do estresse social, a derrota social é o mais proeminente. Estes modelos se baseiam no comportamento territorialista e na hierarquia social característica de roedores machos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) ao longo do tempo, no protocolo de derrota social utilizado e investigar a resiliência e a vulnerabilidade a esse estressor e as alterações neurobiológicas subjacentes a estes fenótipos. Para tal, nós utilizamos um modelo de derrota social em camundongos onde machos da linhagem C57BL/6 são expostos a um residente da linhagem *Swiss* por três horas em três dias consecutivos. Dentro dessas três horas, residente e intruso foram deixados em contato direto por dois minutos ou 10 ataques, o que ocorresse primeiro. A principal medida comportamental utilizada foi a exploração da área da barreira no teste de partição realizado no quarto dia.

Para a padronização da ativação do eixo HPA e secreção de mediadores pró-inflamatórias, grupos independentes de animais foram submetidos a uma, duas ou três sessões de derrota social. Onde, observamos que o estresse causado pela derrota social levou a uma ativação inicial do eixo HPA, inibindo a expressão de TNF- α em um mecanismo provavelmente dependente do receptor mineralocorticoide. Porém, com a repetição do protocolo por dois ou três dias há evidência da modulação negativa da atividade do eixo em um mecanismo dependente dos receptores glicocorticoides.

Observamos que durante o ataque físico as estratégias comportamentais mais frequentemente adotadas pelos intrusos frente ao ataque físico foram a postura de submissão e a tentativa de fuga. Porém, quando analisadas separadamente as populações resilientes e vulneráveis diferem quanto à estratégia com os vulneráveis exibindo imobilidade durante o ataque físico. Essa separação foi feita de acordo com o comportamento dos animais no teste de partição. Na investigação dos mecanismos subjacentes às diferenças comportamentais encontradas, observamos que a transcrição aumentada do gene *Fkbp5* no hipocampo, está associada à resiliência devido a um mecanismo de retroalimentação negativa do eixo HPA eficiente. Por outro lado, o excesso de substância P no hipocampo promove vulnerabilidade à derrota social por uma via independente do receptor NK₁.

Com este trabalho evidenciamos o potencial do modelo de derrota social repetido por três dias no estudo das consequências neurobiológicas, endócrinas e comportamentais do estresse social. Também demonstramos, pela primeira vez, nesse modelo, a influência da variação individual, dentro da mesma linhagem, levando a fenótipos resilientes e vulneráveis, associados a marcadores biológicos.

Palavras-chave: derrota social; camundongos; eixo HPA; resiliência; vulnerabilidade.

ABSTRACT

Social stress is an important factor in the onset of psychiatric disorders. Among the animal models to study the social stress, social defeat is the most prominent. The social defeat models are based in the territorial behavior and social hierarchy of male rodents. The aim of this thesis was to characterize the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis throughout the defeat protocol and investigate the underlying neurobiological alterations in resilience and vulnerability to social stress. We have been using a short social defeat model that consists in allocating male mice from the C57BL/6 strain into the home cage of Swiss mice for 3h during 3 consecutive days. In each session, at a random hour, both mice are in direct contact for 2 min or 10 attacks, whichever came first. The main behavioral measure is the partition zone exploration in the partition test (on the 4th day).

To understand the temporal activation of the HPA axis the pro-inflammatory mediator secretion through the protocol, independent animal groups were exposed to one, two or three social defeat sessions. Initially, the social defeat lead to an activation of HPA axis and an inhibition of pro-inflammatory cytokines (TNF- α) release in the hippocampus, probably due to mineralocorticoid receptor activation. With the repetition of the protocol for two and three days there is evidence of effective negative feedback control through glucocorticoid receptors.

We have observed that the most frequently adopted behavioral strategy when facing the attack were submission posture and escape attempt. When the resilient and vulnerable subpopulations were compared it could be noted that they adopted different strategies, where only the vulnerable group exhibit immobility when facing the attack. This separation was done accordingly with their behavior in the partition test. Through the investigation of the subjacent mechanism in the hippocampus we found that the increase transcription of *Fkbp5* is associated with resilience due to the efficient negative feedback control of the HPA axis. On the other hand, higher concentration of the neuropeptide substance P in the hippocampus leads to vulnerability in a mechanism independent of its main receptor, the NK₁ receptor.

Therefore, we emphasize the importance of this three days social defeat protocol to study the neurobiology, endocrinology and behavioral aspects of resilience and vulnerability to social stress. We have demonstrated for the first time in this protocol the influence of individual variation associated with biological markers, within the same strain, leading to resilient and vulnerable phenotypes.

Keywords: social defeat; mice; HPA axis; resilience; vulnerability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ativação do eixo HPA e efeitos dos glicocorticoides no organismo.....	32
Figura 2: Representação esquemática do protocolo de derrota social.....	45
Figura 3: Esquema do protocolo experimental para investigação da progressão temporal da ativação do eixo HPA e expressão de marcadores pró-inflamatórios no protocolo de derrota social.....	46
Figura 4: Comportamento dos intrusos frente ao ataque.....	47
Figura 5: Esquema do protocolo experimental para investigação de resiliência e vulnerabilidade à derrota social.....	48
Figura 6: Esquema temporal do experimento para avaliar efeito do antagonismo por via sistêmica do receptor NK ₁ anteriormente à derrota social.....	49
Figura 7: Decurso temporal dos níveis de corticosterona plasmática ao longo do protocolo de conflito social.....	59
Figura 8: Decurso temporal dos níveis de ACTH no soro e corticosterona no hipocampo ao longo do protocolo de conflito social.....	60
Figura 9: Decurso temporal da translocação nuclear do GR no hipocampo ao longo do protocolo de conflito social.....	61
Figura 10: Decurso temporal da proporção MR/GR no núcleo de extratos de hipocampo ao longo do protocolo de conflito social.....	62
Figura 11: Decurso temporal dos níveis de TNF- α e IL-1 β no hipocampo ao longo do protocolo de conflito social.....	63
Figura 12: Decurso temporal da expressão de iba1 no hipocampo dorsal ao longo do protocolo de conflito social.....	64
Figura 13: Prevalência das estratégias comportamentais adotadas durante o ataque físico.....	65
Figura 14: Tempo de exploração da área da barreira camundongos C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de conflito social seguido do teste de partição.....	67
Figura 15: Prevalência das estratégias comportamentais adotadas durante o ataque físico pelas subpopulações resiliente e vulnerável e seu escore comportamental.....	68

Figura 16: Respostas comportamentais de camundongos C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de conflito social seguido do teste de partição.....	69
Figura 17: Respostas comportamentais de camundongos C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de conflito social seguido do teste de partição.....	70
Figura 18: Níveis de corticosterona plasmática em camundongos C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de conflito social.....	71
Figura 19: Expressão gênica relativa ao grupo controle no hipocampo de camundongos resilientes e vulneráveis ao estresse social.....	72
Figura 20: Efeito do tratamento com L-703,606 sobre a exploração da área da barreira de camundongos C57BL/6 machos no teste de partição.....	73
Figura 21: Efeito do tratamento com L-703,606 sobre a locomoção de camundongos C57BL/6 machos no teste de partição.....	74
Figura 22: Efeito do tratamento com L-703,606 sobre a dosagem de substância P no hipocampo de camundongos C57BL/6 machos.....	76
Figura 23: Efeito do tratamento com L-703,606 sobre os níveis de GR, SERT e BDNF no hipocampo de camundongos C57BL/6 machos.....	77
Figura 24: Relação entre os comportamentos-traço com a reatividade ao estresse e a estratégia de enfrentamento.....	85
Figura 25: Mecanismo de regulação da resposta glicocorticoide pela proteína FKBP5.....	87
Figura 26: Sumário gráfico dos resultados.....	90
Figura S1: Controle de carregamento do <i>Western blotting</i> para amostras de citoplasma e núcleo.....	109
Figura S2: Teste de integridade do RNA extraído.....	109
Figura S3: <i>Western blotting</i> para MR em amostras de citoplasma e núcleo.....	110

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Proteínas-alvo e especificações dos anticorpos utilizados para o Western blotting.....	52
Quadro 2: Características dos iniciadores utilizados para a PCR em tempo real.....	56
Tabela 1: Correlação entre o escore comportamental de derrota social com os comportamentos no teste de partição.....	66
Tabela 2: Efeito do tratamento com L-703,606 sobre os parâmetros comportamentais não exploratórios no teste de partição.....	75
Tabela 3. Relação entre os grupos derrotado e controle após uma sessão de derrota social nos marcadores avaliados.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
ACTH	Corticotropina
AMY	Amígdala
ANOVA	Análise de variância
AP1	Proteína ativadora 1, do inglês <i>activator protein 1</i>
AVP	Vasopressina
BCA	Ensaio do ácido bicinrônico, do inglês <i>bicinchoninic acid assay</i>
BDNF	Fator neurótico derivado do cérebro, do inglês <i>brain derived neurotrophic factor</i>
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês bovine serum albumin
BST	Núcleo do leito da estria terminal, do inglês <i>bed nucleus of the stria terminalis</i>
CA1	Corno de Amon 1
CA2	Corno de Amon 2
CA3	Corno de Amon 3
CBG	Globulina ligadora de corticosteroide, do inglês <i>corticosteroid-binding globulin</i>
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DSM-5	Manual estatístico e diagnóstico de transtornos mentais, do inglês <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DT	Grupo derrotado
EC	Estímulo condicionado
ELISA	Ensaio imuno-absorvente ligado a enzima, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FJB	Fluorjode b
FKBP5	Proteína ligadora de FK506
GCs	Glicocorticoides
GD	Giro denteado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial, do inglês <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GR	Receptor glicocorticoide
GRE	Elementos responsivos a glicocorticoides, do inglês <i>glucocorticoid-responsive elements</i>
GSK3β	Cinase glicogênio sintetase 3 beta, do inglês <i>glycogen synthase kinase-3 beta</i>
HIP	Hipocampo
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HPG	Eixo hipotálamo-pituitária-gonadal

HSP-90	Proteína de choque térmico 90, do inglês <i>heat shock protein 90</i>
Iba1	Molécula ionizada de adaptador de ligação a cálcio 1, do inglês <i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
ICC	Impacto cortical controlado
IF	Imunofluorescência
IL-1β	Interleucina 1beta
JNKs	Cinases c-Jun NH2-terminal, do inglês <i>c-Jun NH2-terminal kinases</i>
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTP	Potenciação de longo prazo, do inglês <i>long term potentiation</i>
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno, do inglês <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MR	Receptor mineralocorticoide
NF-κB	Fator nuclear kappa B, do inglês <i>nuclear factor κB</i>
NK1	Receptor de taquicininas do tipo 1
PBS	Salina tamponada com fosfato, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PFC	Córtex pré-frontal
PI3K	Cinase 3-fosfoinositídeo, do inglês <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PR	Receptor de progesterona
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SAG	Síndrome da adaptação geral
SERT	Transportador de serotonina
SNAS	Sistema nervoso autônomo simpático
SP	Substância P
TBS	Salina tamponada com tris, do inglês <i>Tris-buffered saline</i>
TCE	Traumatismo crânio-encefálico
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Teste de partição
TRκB	Receptor para cinase B de tropomiosina, do inglês <i>tropomyosin receptor kinase B</i>
WB	<i>Western blotting</i>

SUMÁRIO

Prefácio.....	23
Introdução	25
Modulação do eixo HPA em resposta ao estresse	26
1. Glicocorticoides	27
2. Receptores de glicocorticoides	28
Ativação do eixo HPA e neuroinflamação	30
Estresse social.....	33
Alostase e carga alostática	33
Resiliência e vulnerabilidade ao estresse social.....	34
Modelos animais de estresse social	37
Hipótese	41
Objetivo geral	41
Objetivos específicos.....	41
Material e métodos.....	43
1. Animais	43
2. Considerações éticas	43
3. Derrota Social	43
4. Coleta de tecidos	49
5. Preparo das amostras.....	50
6. Western blotting	51
7. ELISA	52
8. Imunofluorescência.....	53
9. PCR em tempo real.....	54

10. Análises estatísticas	57
Resultados	59
Protocolo experimental 1: Ativação do eixo HPA ao longo do protocolo de derrota social	59
Protocolo experimental 2: Estratégia comportamental frente ao ataque físico e identificação das subpopulações resiliente e vulnerável	65
Discussão	79
Modulação do eixo HPA pelo protocolo de derrota social.....	79
Resiliência e vulnerabilidade à derrota social	82
Sumário gráfico dos resultados	90
Considerações finais	91
Referências bibliográficas.....	93
Apêndice A: Figuras suplementares	109
Apendice B: A combinação da derrota social com o traumatismo crânio encefálico como um modelo de TEPT	111
Anexo I: aprovação do comitê de ética em pesquisa animal	148

Prefácio

Esta tese é fruto de quatro anos de doutorado e apresenta etapas distintas que vão desde a padronização do protocolo de derrota social utilizado até a proposição de um modelo para o estudo de endofenótipos do transtorno de estresse pós-traumático, passando pela caracterização de fatores de resiliência e vulnerabilidade ao estresse social.

A introdução salienta a importância em se estudar o estresse social, revisando desde o histórico da neurobiologia do estresse até os modelos animais utilizados na pesquisa científica. Neste capítulo abordamos o trabalho de cientistas proeminentes no estudo da resposta fisiológica ao estresse como Walter Cannon, Hans Selye, Bruce McEwen, Natalia Kudryavtseva, Robert Sapolsky, Ron de Kloet, Marian Joëls, Eric Nestler, entre outros.

Além disso, revisamos o conhecimento atual sobre ativação do eixo HPA em resposta ao estresse psicológico e o recrutamento de mediadores pró-inflamatórios em resposta ao estresse social. Na primeira etapa apresentamos a continuação da padronização do protocolo de derrota social iniciado na tese da Evelyn Santos, onde avaliamos a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e o recrutamento de mediadores pró-inflamatórios ao longo do protocolo utilizado.

Na segunda etapa, que também é o cerne desta tese, passamos à dualidade da resposta comportamental ao estresse que é representada nos conceitos de vulnerabilidade e resiliência. A partir da distinção comportamental fizemos a busca de marcadores moleculares que estivessem correlacionados a estes comportamentos e que possibilitassem uma intervenção farmacológica.

Ademais, no apêndice, estão apresentados os resultados do meu estágio doutoral (“sanduíche”) na Universidade Paris Descartes, onde propomos um modelo para o endofenótipo ‘sintomas intrusivos’ do transtorno de estresse pós-traumático, através da combinação do estresse social com um traumatismo crânio encefálico (TCE) leve. Nele abordamos a neurobiologia do TCE e sua implicação na vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos, além de discutir as características dos diferentes modelos animais de TCE.

Introdução

Atualmente a definição mais ampla e aceita para o termo estresse é a de Seymour Levine que, em tradução livre, afirma: o estresse é uma composição, um construto multidimensional, no qual três componentes interagem: (i) o estímulo, quando o estressor é percebido e avaliado; (ii) o processamento da informação estressante; e (iii) a resposta ao estresse propriamente dita. Os três componentes interagem via um complexo sistema de retroalimentação negativa e positiva, que é autorregulado com o objetivo de reestabelecer a homeostase através de adaptações fisiológicas e comportamentais (Levine, 2005). Este conceito é fruto da evolução do conhecimento acerca da resposta fisiológica e comportamental ao estresse, que teve início nas décadas de 1920 e 1930.

Em seu livro 'The stress of life', Hans Selye narra de maneira autobiográfica os eventos que levaram à publicação de seu primeiro artigo, em 1936 (*A syndrome produced by diverse noxious agents*). Neste, ele descreve a tríade de efeitos provocados, em ratos, pela injeção sistêmica de diversos extratos teciduais e revisa todo o conhecimento gerado em quatro décadas de pesquisa. Baseado em seus achados iniciais, Selye descreve a Síndrome de Adaptação Geral (SAG), desenvolvida a partir dos princípios de internal milieu e homeostase, descritos por Claude Bernard (1865) e Walter Cannon (1929), respectivamente. Ele justifica a escolha dos termos estresse e estressores para caracterizar os diversos agentes nocivos e a resposta fisiológica a eles. Cannon (1929), por sua vez, havia descrito a resposta de 'luta ou fuga' e a ativação do sistema nervoso autônomo frente a estressores, sendo que ele e Selye são considerados os pais da neurobiologia do estresse (Sapolsky, 2004).

Nos trabalhos iniciais de Selye a tríade de sinais em resposta ao estresse era composta por um aumento das glândulas adrenais, a involução do timo e linfonodos e a presença de úlceras gástricas (Selye, 1936). Em seus estudos posteriores, ele observou que durante a reação de alarme, a medula da glândula adrenal secreta grânulos contendo hormônios. No entanto, esta resposta cessa durante a fase de adaptação (Selye, 1950). Esta pode ser considerada a primeira descrição do que hoje conhecemos como ativação e mecanismo de retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em resposta ao estresse, que será revisado a seguir.

Apesar de a teoria de Selye sobre a resposta fisiológica ao estresse ter sido o fio condutor deste campo, em dois pontos, podemos afirmar que sua interpretação inicial estava equivocada. O primeiro ponto é a presunção de que com a continuação do estresse todos os organismos entrariam na fase de exaustão, devido a uma depleção dos mecanismos de defesa. Na verdade, uma resposta de estresse prolongada pode ser mais custosa ao organismo que o próprio estressor; portanto, existem alguns mecanismos de controle desta resposta, chamada de resposta adaptativa ao estresse.

O segundo ponto de equívoco da SAG é a afirmação de que os mecanismos de resposta ao estresse são os mesmos, independentemente da natureza do estressor. Na verdade, estressores diferentes podem produzir respostas distintas, devido a diferenças na intensidade e no tempo de ativação dos sistemas efetores de resposta ao estresse (Romero; Sapolsky, 1996). Além disso, a importância de um mesmo estressor varia para diferentes espécies e entre os sexos de uma mesma espécie (Blanchard; McKittrick; Blanchard, 2001). Por exemplo, as diferenças entre machos e fêmeas são atribuídas a fatores gênicos (cromossomos sexuais XX vs. XY), hormonais (estrogênio vs. testosterona) e diferenças comportamentais inatas (fêmeas de roedores são menos agressivas que machos, por exemplo) (Taylor *et al.*, 2000; Deak *et al.*, 2015).

MODULAÇÃO DO EIXO HPA EM RESPOSTA AO ESTRESSE

A resposta fisiológica ao estresse envolve a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS). A ativação desses dois sistemas envolve a participação de três classes de mediadores: monoaminas, neuropeptídeos e corticosteroides (de Kloet; Joëls; Holsboer, 2005; Ulrich-Lai; Herman, 2009). Os principais efeitos das monoaminas e dos peptídeos são efeitos sinápticos rápidos, enquanto os efeitos dos corticosteroides são efeitos genômicos tardios. No entanto, os corticosteroides podem ter efeitos rápidos quando atuam nos receptores mineralocorticoides (MRs) localizados na membrana celular, enquanto peptídeos e monoaminas podem ter efeitos tardios através da regulação de fatores de transcrição, que podem levar a alterações genômicas sustentadas (Joëls; Baram, 2009).

O eixo HPA, representado na figura 1, é composto pelo núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, cujos neurônios secretam o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e a vasopressina (AVP) na circulação portal, via eminência média. Estes

atuam sobre a glândula hipófise anterior (ou pituitária) que, por sua vez, libera a corticotropina (também conhecido como hormônio adrenocorticotrópico - ACTH, do inglês *adrenocorticotropic hormone*) na corrente sanguínea. A ACTH estimula a síntese e liberação de glicocorticoides (cortisol/corticosterona) e dehidroepiandrosterona (DHEA) pelo córtex da glândula adrenal (revisado em Reul *et al.*, 2015). O cortisol e a corticosterona (em seres humanos e roedores, respectivamente) regulam o eixo HPA atuando em estruturas do sistema límbico (hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal) e, também, através de um mecanismo de retroalimentação negativa no próprio eixo (de Kloet; Joëls; Holsboer, 2005). Já o DHEA, que é um precursor de esteroides anabólicos, pode inibir os efeitos do cortisol, ou exercer atividade antioxidante e anti-inflamatória. A glândula adrenal de roedores, porém, não produz DHEA (Baulieu; Robel, 1998; Nilsson *et al.*, 2015).

Um segundo eixo conhecido como hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) apresenta interações recíprocas com o eixo HPA. Essas interações incluem a inibição do comportamento reprodutivo em resposta ao estresse e também a ação de estrógenos e andrógenos sobre a produção de CRH, AVP, ACTH e consequente liberação de glicocorticoides (Viau, 2002). De particular interesse para os modelos de estresse social é a interação da testosterona, principal hormônio sexual masculino, com o eixo HPA e sua relação com o status social em uma hierarquia. Os níveis de testosterona são reduzidos em animais subordinados, o que pode resultar em uma menor inibição do eixo HPA, através da inibição da liberação de AVP pelo hipotálamo. Consequentemente, pode-se levar a uma maior liberação de ACTH e de corticosterona (Martinez; Calvo-Torrent; Pico-Alfonso, 1998; Viau, 2002).

1. *Glicocorticoides*

A secreção de glicocorticoides obedece ao ritmo circadiano, apresentando um pico de secreção no início da fase ativa, que é ultrapassado na resposta ao estresse (de Kloet; Joëls; Holsboer, 2005). Esse ritmo circadiano é observado também em suas ações no encéfalo, especialmente no hipocampo, e ao contrário das monoaminas e dos peptídeos, que atuam no encéfalo de uma maneira estrutura-específica, os glicocorticoides atuam em todos os tipos celulares (Joëls; Baram, 2009).

Os glicocorticoides são transportados no sangue ligados à globulina ligadora de glicocorticoides (CBG, do inglês *corticosteroid-binding globulin*). Eles atuam em todo o organismo causando uma

mobilização metabólica, através da redução da captação e utilização da glicose, da gliconeogênese, do aumento do catabolismo proteico e favorecendo a lipólise. Eles ainda podem atuar no balanço dos íons cálcio, no sistema cardiovascular, no crescimento esquelético e na reprodução (**figura 1**). Além disso, possuem efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios (Sapolsky; Romero; Munck, 2000).

Ainda, os glicocorticoides atuam na regulação da ativação do eixo HPA, através do mecanismo de retroalimentação negativa, e também na cognição e na plasticidade sináptica. Eles aumentam a consolidação de memórias, mas diminuem a evocação e a memória de trabalho (Castro-Vale *et al.*, 2016). Além disso, o estresse crônico e níveis constantemente elevados de corticosteroides levam a um prejuízo cognitivo (de Kloet; Oitzl; Joëls, 1999).

2. Receptores de glicocorticoides

Em 1968, Bruce McEwen descreveu os receptores para glicocorticoides e, em 1985, Ron De Kloet e Hans Reul descreveram a afinidade dos glicocorticoides por estes receptores, que na época eram conhecidos como glicocorticoide I e II. Posteriormente, eles foram renomeados como receptores mineralocorticoide (MR) e glicocorticoide (GR), respectivamente.

Ambos os receptores pertencem à superfamília dos receptores esteróides e à família dos fatores de transcrição ativados por ligante (Gomez-Sanchez; Gomes-Sanchez, 2014). O GR tem baixa afinidade pelos glicocorticoides. Este receptor é expresso em todo o encéfalo, sendo as áreas de maior concentração o hipocampo, o neocórtex, o PVN e o núcleo supraóptico (Reul *et al.*, 2015). Já o MR apresenta alta afinidade pelos glicocorticoides. O MR é altamente expresso nas sub-regiões hipocampais, CA2, CA1 e giro denteado, no septo lateral e no núcleo central da amígdala (Reul *et al.*, 2015).

Essa diferença na afinidade dos glicocorticoides por seus receptores implica que, em níveis basais, os glicocorticoides ocupam preferencialmente os MRs, enquanto os GRs estão livres. Porém, no pico de secreção circadiano e com a ativação do eixo HPA pelo estresse, ambos os receptores estão altamente ocupados (Reul; de Kloet, 1985), sugerindo que eles apresentam funções contrastantes na resposta ao estresse. Quando expressos nas mesmas células, MR e GR interagem no nível molecular e funcional, podendo atuar em sinergia, ou oposição (Gomez-Sanchez; Gomes-Sanchez, 2014).

As principais estruturas encefálicas envolvidas no controle da ativação do eixo HPA são as pertencentes ao sistema límbico. Sendo o hipocampo a principal estrutura encefálica para se discutir os efeitos da ativação dos receptores GR e MR, já que projeções GABAérgicas originadas no hipocampo exercem uma inibição tônica dos neurônios do PVN. Enquanto a ativação do GR regula o mecanismo de retroalimentação negativa exercido pelos glicocorticoides, a ativação do MR é responsável pela inibição tônica basal do eixo HPA (Reul *et al.*, 2015). Essa resposta bifásica do hipocampo aos glicocorticoides está presente na estimulação da potenciação de longo prazo (LTP, do inglês *long term potentiation*) e na alteração paralela da memória (Joëls, 2006).

Conseqüentemente, o hipocampo destaca-se por seu papel central em memórias declarativas e no processamento contextual. Por isso, sugere-se que modulações desta estrutura podem contribuir para a resiliência aos transtornos psiquiátricos (Bremner *et al.*, 2007). Há evidências de que um volume hipocampal reduzido estaria associado com um prejuízo na regulação neuroendócrina (Gilbertson *et al.*, 2002) e isso estaria associado a uma maior vulnerabilidade ao estresse. Confirmando este achado, estudos de imagem apontam que o hipocampo tem um maior volume de matéria cinzenta em indivíduos resilientes, quando comparados a pacientes com TEPT e depressão (Shin; Liberzon, 2010; van der Werff *et al.*, 2013).

- Receptores glicocorticoides (GR)

O GR é composto por três subunidades: uma N-terminal que é responsável pelo recrutamento da maquinaria transcripcional; a intermediária que é a região de ligação ao DNA composta por dois dedos de zinco que se ligam aos elementos responsivos a glicocorticoides (GRES, do inglês *glucocorticoid-responsive elements*) e também são implicados na translocação do receptor do citoplasma para o núcleo e na formação de dímeros; e a região C-terminal que é a região de ligação, mas que também possui um domínio de ativação para comeduladores (Cruz-Topete; Cidlowski, 2015).

Na ausência de ligantes, o GR é sequestrado no citoplasma em um complexo multiproteico, que contém imunofilinas (FKBP4 e FKBP5) e chaperonas (Hsp90 e 70 - heat shock protein 90 e 70 – e a proteína p23), e é inativo transcripcionalmente, porém com alta afinidade pelos glicocorticoides. Na presença de um ligante ocorre uma alteração conformacional o GR se desliga deste complexo e é

translocado para o núcleo. Lá ele exerce sua função como um regulador gênico, seja através da ligação direta a sequências específicas de DNA em mecanismos de transativação (GGAACAnnTGGTCT) e transrepressão (CTCC(n)0-2GGAGA). Ou ainda, através da associação a um fator de transcrição, ou da ligação direta do receptor a subunidades dos fatores de transcrição (Oakley; Cidlowski, 2013). Contudo, os GRs também exercem efeitos não-genômicos rápidos, através da interação com cinases. Por fim, eles ainda podem ser ativados de uma maneira independente de ligante (Ayroldi *et al.*, 2012; Scheschowitsch; Leite; Assrey, 2017).

-Receptores mineralocorticoides (MR)

Além dos glicocorticoides a aldosterona também é um ligante endógeno do MR e a progesterona um antagonista competitivo deste receptor (Gomez-Sanchez; Gomez-Sanchez, 2014). Em tecidos onde há alta concentração de mineralocorticoides (epitélio renal, por exemplo) a enzima 11-hydroxiesteroide dehidrogenase tipo 2 (11-HSD2) é coexpressa com o MR. Essa enzima converte os glicocorticoides a metabólitos que não tem afinidade pelo MR garantindo a ligação preferencial dos mineralocorticoides, como a aldosterona (Rogerson; Brennan; Fuller, 2004). Em células onde não há a 11-HSD2 e devido a sua alta afinidade pelos glicocorticoides, os MRs estão ocupados durante todo o ciclo circadiano e estabelecem o limiar para a ativação do eixo HPA (Heegde; de Rijk; Vinkers, 2015).

O MR, de maneira similar ao GR, permanece ligado a um complexo citoplasmático de proteínas do qual se desliga na presença de ligantes. Esse complexo é formado por imunofilinas e chaperonas. Ele é estruturalmente semelhante ao GR, apresentando um domínio carboxi-terminal de ligação aos esteroides, um grande domínio amino-terminal e um domínio de ligação ao DNA (Rogerson; Brennan; Fuller, 2004).

Porém, os glicocorticoides podem também facilitar a transmissão sináptica rápida, através da ativação de MRs presentes na membrana celular (Heegde; de Rijk; Vinkers, 2015).

ATIVAÇÃO DO EIXO HPA E NEUROINFLAMAÇÃO

Os glicocorticoides são agentes anti-inflamatórios potentes e seu efeito é atribuído à transrepressão de genes, que codificam mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas,

moléculas de adesão celular, receptores e enzimas inflamatórias, buscando resolver a inflamação e reestabelecer a homeostase (Cruz-Topete; Cidlowski, 2014).

Essa repressão é atribuída à interação do GR, com os fatores de transcrição pró-inflamatórios AP1 (do inglês, *activator protein 1*) e NF- κ B (do inglês, *nuclear factor κ B*) antagonizando sua atividade. Porém, seus efeitos anti-inflamatórios também podem ser mediados por vias não-genômicas. Ou seja, a partir da interação de subunidades do complexo citoplasmático do GR com cinases, como PI3K (do inglês, *phosphoinositide 3-kinase*), AKT (do inglês, *serine/threonine-specific protein kinase*), MAPKs (do inglês, *mitogen-activated protein kinases*), JNKs (do inglês, *c-Jun NH2-terminal kinases*) e p38s (*p38 isoforms*), levando a uma inibição da atividade da fosfolipase A2 e da liberação de ácido araquidônico (Oakley; Cidlowski, 2013).

Apesar deste papel clássico e bem estabelecido dos glicocorticoides como anti-inflamatórios, há evidências de um papel pró-inflamatório periférico, em resposta ao estresse agudo, e central, em resposta ao estresse crônico (Sorrells; Sapolsky, 2007). O receptor GR apresenta duas isoformas principais, GR α e GR β . A isoforma GR β é sugerida como um regulador negativo da GR α e apresenta um papel pró-inflamatório periférico (Marino *et al.*, 2016). Apesar dos mecanismos associados a este efeito pró-inflamatório dos glicocorticoides não estarem totalmente elucidados, os dados presentes na literatura os apontam como uma preparação do sistema imune para responder adequadamente a um dano, que é dependente do estado fisiológico do sistema imune (Cruz-Topete; Cidlowski, 2014).

O sistema imune inato no cérebro é representado pela micróglia e, portanto, quanto ativado de forma contínua tem um papel central na resposta neuroinflamatória associada com patologias (Streit; Mrak; Griffin, 2004). A micróglia faz parte da linhagem de macrófagos monocíticos e é altamente regulada pelo microambiente encefálico, respondendo rapidamente a mudanças na arquitetura e função no parênquima que as cercam. Em resposta a essas alterações elas podem liberar citocinas, proteases, espécies reativas de oxigênio, derivados do ácido araquidônico, óxido nítrico, aminoácidos excitatórios e fatores neurotróficos (Kraft; Harry, 2011).

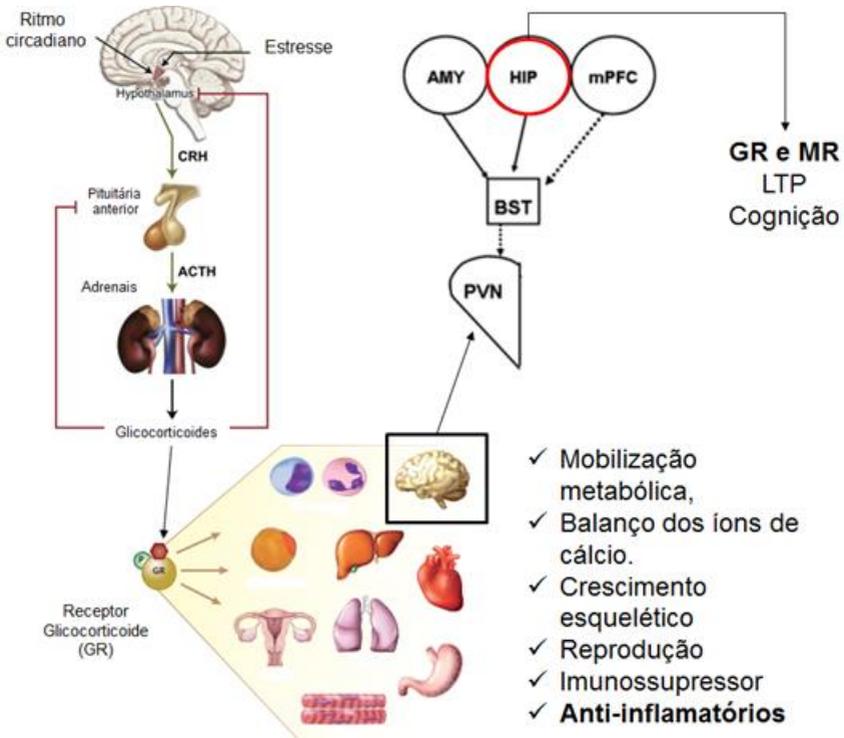


Figura 1. Ativação do eixo HPA e efeitos dos glicocorticoides no organismo. CRH: hormônio liberador da corticotropina; ACTH: corticotropina; AMY: amígdala; HIP: hipocampo; mPFC: córtex pré-frontal medial; BST: bed nucleus da stria terminalis; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; LTP: potenciação de longo prazo (Adaptado de Cruz-Topete; Cidlowski, 2014 e Solomon; Herman, 2009).

ESTRESSE SOCIAL

Os estressores sociais fazem parte da classe de estressores psicológicos, que também incluem a dor (e a antecipação de um estímulo doloroso). A outra classe é a de estressores físicos, ou fisiológicos, que inclui infecções, temperaturas extremas e hemorragia. Entre os estressores de origem social, podemos destacar a hierarquia no ambiente de trabalho, a violência urbana e o bullying. Acredita-se que nas sociedades industriais modernas o estresse social seja o estressor mais relevante (Eyer; Sterling, 1977), pois um status social baixo está associado a condições precárias de moradia e de saúde básica (Blanchard; McKittrick; Blanchard, 2001). Além disso, inúmeros trabalhos relacionam estressores psicossociais com a incidência de transtornos psiquiátricos (Kendler; Karkowski; Precott, 1999).

ALOSTASE E CARGA ALOSTÁTICA

A evolução do conceito da resposta adaptativa ao estresse começa na década de 1980 quando Peter Sterling e Joseph Eyer (1988) introduziram os conceitos de alostase e carga alostática, a partir do estudo de estressores psicossociais. Este conceito foi posteriormente expandido por Bruce McEwen e John Wingfield (2003), que incluíram também a sobrecarga alostática.

Ao contrário do conceito de homeostase, o modelo de alostase mostra que os parâmetros fisiológicos não são constantes. Além disso, o objetivo do estado alostático seria antecipar os níveis ótimos necessários para promover uma resposta fisiológica adequada, atingindo, assim, a estabilidade através da mudança (Sterling, 2004). A definição de McEwen (2006) postula alostase como uma resposta biológica que promove adaptação, usando mediadores sistêmicos que formam uma rede não linear onde cada mediador modula outros mediadores (Karatsoreos; McEwen, 2011).

No modelo alostático o cérebro é o órgão central da resposta ao estresse, que percebe e avalia a relevância do estressor e determina a resposta efetora. Quando as estratégias de enfrentamento recrutadas frente a um estressor são eficientes (*coping* positivo) a alostase é mantida. Quando estas estratégias não são adequadas há a carga alostática. E nas situações onde a própria resposta ao estresse piora ou acelera a resposta mal adaptativa (*coping* negativo) ocorre a sobrecarga alostática. Ou seja, carga e sobrecarga alostática se referem ao desgaste dos sistemas

biológicos em respostas alostáticas prolongadas ou mal reguladas (Karatsoreos; McEwen, 2011; McEwen; Gray; Nasca, 2015).

Alguns fatores relacionados ao indivíduo e seu ambiente imediato são considerados protetores contra a carga/sobrecarga alostática. Entre eles estão a integração social, o suporte social e o senso de propósito na vida (Seeman *et al.*, 2002), ressaltando a importância dos estressores sociais nas respostas mal adaptativas ao estresse.

RESILIÊNCIA E VULNERABILIDADE AO ESTRESSE SOCIAL

A resiliência se caracteriza como um conjunto de traços de personalidade associados à flexibilidade comportamental, quando o indivíduo é confrontado com situações estressantes (Laranjeira, 2007). Ou seja, ser resiliente não significa ser resistente aos efeitos negativos do estresse, mas sim vivenciá-los e demonstrar uma facilidade de recuperação (Fleshner *et al.*, 2011). Sendo assim, a resiliência também não pode ser considerada sinônimo de invulnerabilidade, mas uma resposta complementar à vulnerabilidade que leva à flexibilidade e à adaptação frente a eventos adversos (Cabral; Levandowski, 2013).

A vulnerabilidade, em contraste, diz respeito a uma maior probabilidade de se experimentar os efeitos negativos de uma situação de estresse, de forma não adaptativa, mas que não implica, necessariamente, no desenvolvimento de um transtorno psiquiátrico. Assim, a suscetibilidade seria representada por uma maior propensão a desenvolver transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse, sendo, mais aplicável a seres humanos (Wu *et al.*, 2013).

A partir destas definições observamos que o conceito de resiliência é fruto da evolução do estudo da alostase e de estratégias de enfrentamento (*coping*). Seguindo predições do filósofo grego Hipócrates, que postulava uma relação entre doença e personalidade, trabalhos da década de 1980 descrevem que pessoas que adotam um enfrentamento passivo (personalidade tipo 'C') frente a situações estressantes apresentam transtornos depressivos. Já estratégias ativas (personalidade tipo 'A') estão relacionadas a uma maior frequência de alterações cardiovasculares, uma maior expressão de comportamentos agressivos e resiliência a transtornos psiquiátricos (Folkman; Lazarus, 1980; Glass, 1982; Zozulya *et al.*, 2008).

Koolhaas e colaboradores (1999) defendem que não é a característica do estímulo, mas sim sua interpretação que o torna aversivo e definem *coping* como um esforço comportamental e fisiológico para controlar a situação. Assim, podemos postular a resiliência como o resultado da alostase, enquanto a vulnerabilidade é decorrente da carga alostática (Pfau; Russo, 2015).

A variação individual, em resposta a um mesmo estímulo, que é comum no reino animal, é vista como uma ferramenta adaptativa que protege as espécies em flutuações ambientais (Koolhaas *et al.*, 2010). Para avaliar esta variação individual e seu impacto nos modelos animais foi desenvolvido por Brain (1976), e modificado por Vegas e colaboradores em 2006, um etograma para avaliação do comportamento social de roedores. Ele agrupa os comportamentos agonísticos em 12 classes:

- ✓ Ataque: perseguição, aproximação, morder o oponente;
- ✓ Ameaça: limpeza agressiva, investida lateral ou vertical, bater o rabo;
- ✓ Exploração não-social: exploração do ambiente físico;
- ✓ Exploração social: exploração social do oponente por acompanhamento ou contato físico, cheirar, limpar;
- ✓ Exploração à distância: prestar atenção ao oponente de longe;
- ✓ Escavação: mover a serragem com as patas;
- ✓ Cuidado corporal: autolimpieza;
- ✓ Esquiva: permanecer a uma distância segura do oponente;
- ✓ Submissão: esquiva passiva do ataque ao exprimir sinais de submissão;
- ✓ Comportamento sexual: investigação ano-genital, monta;
- ✓ Imobilidade: permanecer em postura de congelamento;
- ✓ Fuga: correr quando o oponente se aproxima.

Essas 12 classes são utilizadas para a análise de *cluster* na qual a estratégia dos animais é definida de acordo com a classe predominante (em minutos na sessão de confronto). A partir deste *cluster* os animais são divididos em categorias para a comparação de parâmetros imunes e neuroendócrinos.

Em um modelo bidirecional de confronto social, ou seja, onde há animais residentes, subordinados e dominantes, e intrusos, também subordinados e dominantes, Bartolomucci e colaboradores

(2004) classificam os comportamentos ofensivos em ataque, perseguição e *grooming* agressivo. Já os comportamentos subordinados são classificados em vocalização aguda ou 'squeaking', postura de submissão, fuga, imobilidade durante o ataque ou durante a interação, sendo que fuga e postura de submissão são os comportamentos subordinados mais comuns deste estudo. Os comportamentos de agressão e subordinação são consonantes àqueles descritos no etograma de Brain e independem do *status* de residente do animal, ressaltando a robustez destas medidas etológicas.

A observação da estratégia comportamental adotada pelos animais frente ao confronto social é importante no estudo dos efeitos fisiológicos e comportamentais do estresse social, pois pode se tornar um fator de confusão que influencia nas respostas cardiovasculares, neuroendócrinas e imunes (Stefanski; Engler, 1998). Animais com estratégia passiva têm uma menor ativação do sistema nervoso autônomo simpático, do sistema imune e uma maior ativação do eixo HPA. Por outro lado, a estratégia ativa está relacionada a uma maior ativação do sistema nervoso autônomo simpático e menor ativação do eixo HPA (Zozulya *et al.*, 2008).

Apesar da relação entre as estratégias de enfrentamento e a ativação do eixo HPA ter sido demonstrada, a relação entre resiliência e o eixo HPA ainda não está clara (Russo *et al.*, 2012). Contudo, os glicocorticoides, que regulam a transcrição de diversos genes, são agentes pleiotrópicos e modulam estruturas límbicas através da modulação de monoaminas (de Kloet; Joëls; Holsboer, 2005), entre outros mecanismos. Isso torna os componentes do eixo HPA e agentes que modulam sua ação excelentes candidatos-alvo na mediação da resiliência ao estresse.

Com o advento da teoria neuroinflamatória da depressão, o papel das citocinas pró-inflamatórias ganhou destaque na resiliência ao estresse. Por exemplo, alguns estudos mostram a ligação entre a ativação da via de transdução formada pela cinase inibidora de kappa e pelo fator nuclear ativador da cadeia leve kappa de células B ativadas (I κ K-NF- κ B) e a vulnerabilidade ao estresse (Pfau; Russo, 2015). Além disso, em resposta ao estresse e à ativação do eixo HPA e do SNAS, o recrutamento de células do sistema imune e a liberação de citocinas pró-inflamatórias estão diminuídos no grupo passivo/vulnerável em relação ao ativo/resiliente (Stefanski, 1998; de Miguel *et al.*, 2011). Esta diferença entre animais resilientes e vulneráveis parece não existir em um nível basal, sem estresse, de ativação do sistema imune.

Entre as substâncias que controlam a atividade do eixo HPA estão os neuropeptídeos, que têm sido investigados como potenciais alvos para a farmacoterapia de transtornos relacionados ao estresse (Kormos; Gaszner, 2013; Bali; Singh; Jaggi, 2014). Dentre os neuropeptídeos destaca-se o papel da substância P, um undecapeptídeo (H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂), identificado pela primeira vez em tecidos de cavalo (Von Euler; Gaddum, 1931). A substância P tem papel importante em diversos processos fisiológicos como a inflamação, nocicepção, emese, proliferação celular. No sistema nervoso central, ela também está envolvida na resposta ao estresse, no controle de emoções e na dependência a substâncias psicoativas (Steinhoff *et al.*, 2014). Estudos anteriores do nosso grupo mostraram a participação do sistema taquicinérgico no modelo de conflito social. Uma redução das respostas defensivas, no teste de partição, e da ativação do eixo HPA foi encontrada após o antagonismo por via sistêmica do receptor NK₁ (Santos, 2015).

MODELOS ANIMAIS DE ESTRESSE SOCIAL

Em animais de laboratório, os estressores psicossociais são uma ferramenta importante para o estudo etológico das respostas ao estresse (Martinez; Calvo-Torrent; Pico-Alfonso, 1998; Sakai; Tamashiro, 2005). Os principais estressores sociais em roedores são a superlotação, o isolamento, a instabilidade social e a subordinação. Enquanto a superlotação precisa ser extrema para provocar alterações significativas, onde o fator determinante é a área ocupada, para machos e o número total de animais, para fêmeas. O isolamento depende da idade de início, da duração e do sexo, pois parece ser mais estressante para fêmeas do que para machos (Brown; Grunberg, 1995). Os modelos de instabilidade social, como o sistema visível de toca (VBS, do inglês *visible burrow system*), permitem o estudo da influência da hierarquia social sobre o comportamento e fatores neuroendócrinos de uma forma naturalística ao longo do tempo. Porém, são utilizados apenas em machos, enquanto a instabilidade social altamente estressante para fêmeas é gerada por uma alternância entre isolamento e superlotação (Blanchard; McKittrick; Blanchard, 2001; Palanza; Gioiosa; Parmigiani, 2001; Tamashiro; Neuyen; Sakai, 2005; Beery; Kaufer, 2015).

A derrota social é o protocolo mais proeminente de estresse social em roedores, pois permite o estudo da resposta a estressores

tanto agudos quanto prologandos (Beery; Kaufer, 2015). É comum encontrarmos na literatura resultados contrastantes para um mesmo parâmetro devido a heterogeneidade de protocolos utilizados. Porém, todos os protocolos apresentam características comuns: a ausência de controle sobre o ambiente social, a utilização predominante de machos e a exposição a ataques físicos de um indivíduo coespecífico (Martinez; Calvo-Torrent; Pico-Alfonso, 1998).

Os protocolos de derrota social podem ser compostos apenas de ataque físico, ou da combinação de ataque físico com uma fase de ameaça de ataque. Aqueles que apresentam apenas o ataque físico são geralmente utilizados em estudos agudos. A duração destes protocolos é determinada por um período pré-estabelecido de tempo, ou pelo comportamento do agressor (número de ataques), ou do intruso (comportamento de submissão). Protocolos combinados apresentam ataque físico (obedecendo aos mesmos parâmetros descritos anteriormente) e um estressor psicossocial (a ameaça de ataque, onde intruso e agressor estão separados por uma barreira física, mas são mantidos em contato sensorial). A duração desta segunda fase pode variar de alguns minutos à coabitação por diversas semanas (Martinez; Calvo-Torrent; Pico-Alfonso, 1998; Bartolomucci *et al.*, 2004; Golden *et al.*, 2011).

A utilização dos diferentes protocolos de derrota social em roedores (camundongos, ratos e cobaias, principalmente) permitiu o entendimento da neurobiologia da resposta ao estresse social. Através de estudos imunohistológicos com o gene de expressão rápida c-Fos sugeriu-se que o estresse causado pela derrota social ativa estruturas do sistema límbico (córtex pré-frontal, o septo lateral, os núcleos medial e central da amígdala), estruturas mesocefálicas (núcleos da rafe, o locus coeruleus, o núcleo do trato solitário e a matéria cinzenta periaquedutal) e estruturas prosencefálicas (o núcleo da estria terminal e o núcleo paraventricular do hipotálamo) (Kollack-Walker; Watson; Akil, 1997; Martinez; Phillips; Herbert, 1998; Kollack-Walker *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2009).

Baseado nesses achados e com o advento da optogenética foi possível identificar os principais circuitos cerebrais implicados na resposta à derrota social, sendo os circuitos de medo e o da recompensa os mais bem estudados até o momento (Russo *et al.*, 2012). A via dopaminérgica mesolímbica (Krishnan *et al.*, 2007) e a projeção serotoninérgica do núcleo dorsal da rafe para o córtex pré-frontal (Challis; Beck; Berton, 2014) têm sido apontadas como moduladores chave da resiliência ao estresse social crônico.

Diversos trabalhos utilizando protocolos de derrota social buscam avaliar apenas as alterações neuroendócrinas causadas pelo estresse. Aqueles que buscam a avaliação comportamental muitas vezes utilizam testes que são utilizados costumeiramente na triagem de substâncias com efeito ansiolítico (campo aberto e labirinto em cruz elevado, por exemplo) e antidepressivo (testes de anedonia e nado forçado, por exemplo). Porém, uma importante medida dos efeitos do estresse por derrota social são os testes de medo e esquiva social. Enquanto um evento agudo de derrota social leva ao medo social direcionado ao agressor, protocolos repetidos ou crônicos levam à generalização desta resposta a qualquer indivíduo coespecífico (Toth; Neumann, 2013).

O teste de partição é um teste de esquiva social que foi originalmente descrito por Kudryavtesva (1994). Nesse uma barreira ou partição transparente e perfurada é posicionada, em uma caixa, isolando um animal de cada lado da barreira. O tempo de investigação da área próxima a essa partição é considerada a área de interação social entre os animais e a exploração reduzida desta área representa uma medida de esquiva social.

Hammamieh e colaboradores (2012) propuseram um modelo de derrota social para o estudo do transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) que consiste de cinco ou dez dias de derrota social por 6h em cada dia. Neste estudo, os pesquisadores encontraram alterações pronunciadas no comportamento dos intrusos (comportamento tipo-ansioso e uma redução na marcação de território) e alterações histopatológicas cardíacas. Além de alterações fisiológicas consistentes com a ativação repetida do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA; densidade de espinhas dendríticas reduzidas no córtex pré-frontal medial) e do sistema nervoso autônomo simpático (alterações na contagem de células sanguíneas). Trabalhos posteriores deste grupo identificaram fenótipos vulneráveis e resilientes, através da utilização de diferentes linhagens de camundongos, onde a linhagem C57BL/6J se mostrou mais vulnerável enquanto a linhagem DBA/2J se mostrou resiliente (Chakraborty *et al.*, 2015). Em estudos de expressão gênica foram encontradas alterações na expressão dos genes *Bdnf*, *Ngf*, *Zwint*, *Cckbr*, *Slc6a4* e *Fkbp5*, no hemisfério esquerdo do cérebro, que em humanos são relacionados ao TEPT (Chakraborty *et al.*, 2015). Ainda, através da análise genômica em estruturas do sistema límbico foram demonstradas alterações na expressão de genes envolvidos na mediação de respostas de medo e sinalização neuronal, onde as alterações na amígdala são mais

evidentes após o estressor enquanto no hipocampo e córtex pré-frontal medial as alterações são tardias (Muhie *et al.*, 2015).

Baseado no modelo proposto por Hammamieh e colaboradores (2012), e nos achados posteriores do mesmo grupo, um protocolo de três dias derrota social, utilizando camundongos machos da linhagem C57BL/6 como intrusos, foi estabelecido em nosso laboratório (Laboratório de Neurofarmacologia, CCB, UFSC - Santos, 2015). Para tal, foram testadas sessões de uma, três ou seis horas diárias de derrota social com o teste de partição um, sete ou 30 dias após a terceira sessão. As sessões de treino com duração de três horas e avaliação comportamental 24 h após, promoveram respostas comportamentais defensivas mais robustas, caracterizadas por uma redução do tempo de aproximação na barreira e um aumento do comportamento de avaliação de risco. Portanto, este protocolo foi o escolhido para a avaliação bioquímica e molecular. Os resultados sugerem ainda que há a liberação de substância P em decorrência do estresse social e que esta liberação induz degeneração neuronal, provavelmente por ativação de vias neuroinflamatórias específicas. Já que ocorre uma maior expressão de astrócitos e micróglia nas mesmas regiões do hipocampo em que há evidência de sofrimento celular e prejuízo da neurogênese.

De uma maneira geral, nosso trabalho procurou avaliar se o envolvimento diferencial do eixo HPA e, conseqüente ativação de citocinas pró-inflamatórias, geram animais resilientes e vulneráveis ao estresse social.

HIPÓTESES

Assim, na primeira etapa do trabalho nossa hipótese foi que a ativação do eixo HPA e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, causadas pelo estresse social, obedecem a um padrão temporal.

Na segunda etapa do trabalho, nossas hipóteses foram: a derrota social e o antagonismo sistêmico do receptor NK_1 geram animais resilientes e vulneráveis; e estes fenótipos estão associados a alterações neurobiológicas.

OBJETIVO GERAL

Na primeira etapa do trabalho, nosso objetivo foi investigar o padrão temporal da ativação do eixo HPA em grupos independentes de animais submetidos a uma, duas ou três sessões de derrota social.

Na segunda etapa do trabalho, o objetivo geral foi identificar subpopulações vulneráveis e resilientes ao protocolo de derrota social no teste de partição.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar as concentrações de corticosterona no plasma e no hipocampo após uma, duas ou três sessões de derrota social;
- ✓ Avaliar a concentração de ACTH no soro após uma, duas ou três sessões de derrota social;
- ✓ Avaliar a translocação do receptor GR do citoplasma para o núcleo no hipocampo dos camundongos após uma, duas ou três sessões de derrota social;
- ✓ Avaliar a expressão proporcional nuclear dos receptores GR e MR no hipocampo dos camundongos após uma, duas ou três sessões de derrota social;
- ✓ Avaliar a concentração das citocinas pró-inflamatórias IL- 1β e TNF- α no hipocampo após uma, duas ou três sessões de derrota social;

- ✓ Avaliar a expressão de micróglia (Iba1) em fatias de hipocampo dorsal após uma, duas ou três sessões de derrota social.
- ✓ Avaliar a estratégia comportamental adotada pelos intrusos durante o ataque físico;
- ✓ Identificar subpopulações resiliente e vulneráveis no teste de partição e quantificar os níveis de corticosterona plasmática nessas subpopulações;
- ✓ Investigar a expressão dos genes *Fkbp5*, *Tac1* e *Tacr1* no hipocampo dos grupos resiliente e vulnerável;
- ✓ Tratar os intrusos, por via sistêmica, com um antagonista do receptor NK₁ antes das sessões de derrota social e investigar seu potencial em torná-los mais vulneráveis ou resilientes à derrota social.

Material e métodos

1. *Animais*

Foram utilizados camundongos adultos machos das linhagens Swiss (4 a 7 meses de idade) e C57BL/6 (10 a 14 semanas de idade). Os animais da linhagem Swiss foram alojados individualmente a partir dos três meses de idade, e por toda a duração dos experimentos. Já os camundongos da linhagem C57BL/6 foram alojados agrupados (3 a 5 animais por gaiola - 27 x 16 x 13 cm) até uma semana antes do início do protocolo, quando foram alojados isoladamente.

Os camundongos da linhagem Swiss eram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), enquanto os da linhagem C57BL/6 eram provenientes de nossa colônia, que é derivada daquela da Universidade do Vale do Itajaí (Univali). As caixas moradias foram forradas com maravalha de *Pinus sp.* e a higienização foi realizada uma vez por semana. Todos os animais tiveram acesso à água filtrada e ração (Biobase alimentação animal, Bio-Tec, Brasil) ad libitum e foram mantidos em um ciclo de claro-escuro de 12-12h com luzes acesas às 7h. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas (Alesco®), separados de acordo com a linhagem, em uma sala mantida a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo, entre 13h e 17h.

2. *Considerações éticas*

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões internacionais de bem-estar dos animais recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) e pela *Society for Neuroscience* (SfN) e obedecendo a lei nacional nº 11.794. Foram utilizadas amostras de tamanho mínimo e adequado para as análises estatísticas e extraíndo-se o máximo de informações relevantes em cada protocolo experimental, todos esses aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo de pesquisa 798 – Anexo I).

3. *Derrota Social*

Os residentes, camundongos da linhagem *Swiss*, foram alojados isoladamente por pelo menos quatro semanas antes do início do protocolo para exacerbar sua característica de demarcação territorial. Já os intrusos foram isolados de cinco a sete dias antes do início do protocolo, para evitar a influência da hierarquia social da colônia (Kudryavtseva; Bakshtanovskaya; Koryakina 1991; Hammammieh *et al.*, 2012; Santos, 2015).

Os intrusos foram apresentados a diferentes residentes ao longo de três dias em sessões de três horas. Em todas as sessões treino cada intruso foi colocado em uma caixa metálica fechada (19 x 15 x 8 cm) alocada dentro da caixa moradia do animal residente (41 x 34 x 16 cm), essa caixa metálica oferecia proteção ao intruso, mas permitia o contato visual e de odor com o animal residente. Dentro desse período de três horas, em horários aleatórios, entre os dias de repetição, a caixa de proteção era retirada e o intruso deixado em contato direto com o animal residente durante dois minutos ou dez ataques (**figura 2A**).

O grupo controle foi exposto a uma caixa (41 x 34 x 16 cm) com maravalha limpa e na ausência do residente, nas mesmas condições dos animais derrotados. Ou seja, alocados dentro da caixa metálica por 3h em cada dia da qual foram retirados por 2 min, em horários aleatórios entre os dias de protocolo, e puderam explorar livremente toda a caixa.

A principal medida comportamental realizada após o protocolo de derrota social foi o teste de partição (TP), que foi descrito detalhadamente por Kudryavtesva (1994). O TP foi realizado 24h após a última sessão de condicionamento. O intruso (linhagem C57BL/6) foi colocado na caixa moradia de um animal residente, sem a caixa de proteção, mas separado por uma barreira física. A barreira de separação era composta por uma placa perfurada de acrílico transparente que evitava o contato físico direto, mas permitia que os animais enxergassem, ouvissem e sentissem o cheiro um do outro. O grupo controle foi colocado em uma caixa com maravalha limpa e na ausência do residente.

O comportamento do intruso foi registrado durante cinco minutos com o auxílio de um sistema de vigilância por vídeo, para posterior análise no *software* Anymaze® (Stoelting, EUA). A zona de interação foi definida como uma área retangular próxima à partição e correspondente a um quinto da área total do compartimento do intruso. Foram avaliados comportamentos pertencentes ao repertório defensivo dos camundongos, tais como: exploração da área da barreira (frequência de entradas, tempo de permanência e distância percorrida), comportamento de avaliação de risco,

levantamentos e locomoção total (**figura 2B**). A exploração da barreira foi contabilizada automaticamente pelo *software* a partir dos parâmetros pré-estabelecidos: a entrada na área da barreira só foi considerada quando pelo menos 33% da área total do animal estava na região, a saída quando menos de 25% da área do total do animal permanecia na região e a locomoção total foi calculada a partir do ponto médio do animal. Os comportamentos de avaliação de risco e levantamento foram analisados manualmente por um observador experiente, e cegado para o grupo experimental, através da atribuição de chaves no programa.

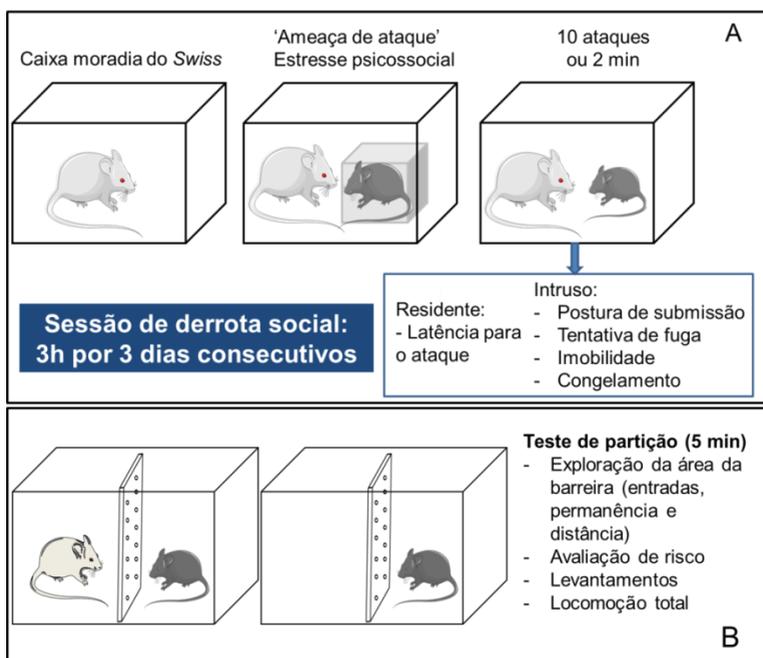


Figura 2: Representação esquemática do protocolo de derrota social. Camundongos Swiss machos são alojados isolados por, pelo menos, um mês antes do início do protocolo. Os intrusos, da linhagem C57BL/6, são colocados dentro de uma gaiola metálica que é alocada dentro da caixa do residente (A). Em um momento não previsível da sessão de 3h intruso e residente ficam em contato direto por 2 min, ou até que ocorram 10 ataques. Depois, os intrusos retornam para a gaiola metálica. O protocolo é repetido por três dias. No quarto dia, os intrusos são avaliados no teste de partição por cinco minutos. Uma barreira de acrílico perfurada é inserida na caixa moradia do animal residente, de maneira a separá-los física, mas não sensorialmente do intruso (C57BL/6). Os comportamentos de exploração da

área da barreira, avaliação de risco, levantamento e locomoção foram avaliados apenas no animal intruso (B). O grupo controle é exposto ao mesmo protocolo, mas sem a presença do residente em todas as etapas.

Protocolo experimental 1: Ativação do eixo HPA ao longo do protocolo de derrota social

Grupos independentes de animais (50 camundongos no total) foram submetidos a um, dois ou três dias de derrota social. Todos os animais foram eutanasiados 30 min após o fim da sessão. Visando a padronização metodológica todos os grupos foram expostos ao ataque físico, no final da sessão no dia da eutanásia.

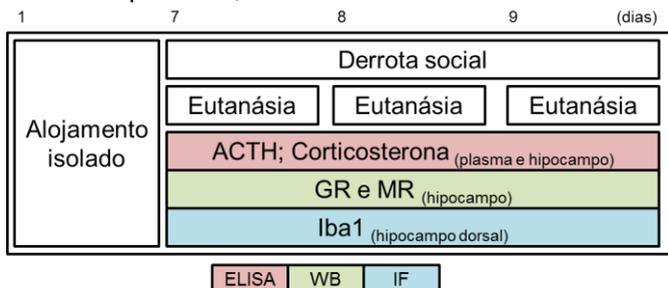


Figura 3: Esquema do protocolo experimental para investigação da progressão temporal da ativação do eixo HPA e expressão de marcadores pró-inflamatórios no protocolo de derrota social. 56 camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de derrota social, por 1, 2 ou 3 dias, apenas um grupo foi submetido aos 3 dias e ao teste de partição. Em todas as etapas houve um grupo controle não exposto ao agressor e o número de animais por grupo variou de 3 a 5.

Protocolo Experimental 2: Estratégia comportamental frente ao ataque físico e identificação das subpopulações resiliente e vulnerável

Para avaliar se existiam subpopulações resilientes e vulneráveis ao estresse, 22 camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de derrota social. Neste experimento, durante a fase de ataque, em todos os dias do protocolo, o comportamento do intruso foi classificado de acordo com as estratégias do repertório comportamental defensivo (Bartolomucci *et al.*, 2004; de Miguel *et al.*, 2011) dos camundongos em:

- ✓ não recebeu ataque: quando o residente exibiu comportamentos ofensivos (ameaça) como ataque de face e investigação social, mas não houve briga ou perseguição;
- ✓ imobilidade: quando o animal não esboçou resposta frente ao ataque;
- ✓ congelamento: imobilidade completa, exceto pelos movimentos respiratórios durante o ataque;
- ✓ tentativa de fuga: pulos e/ou corrida de forma a evitar o agressor;
- ✓ postura de submissão: postura vertical que expunha o abdômen ao agressor, 'rendição', que comumente fazia cessar o ataque.

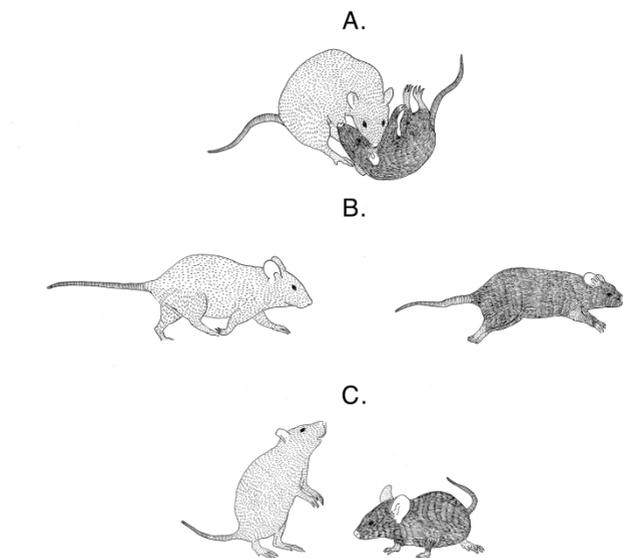


Figura 4: Comportamento dos intrusos frente ao ataque. O comportamento dos intrusos foi classificado em tentativa de fuga (A), postura de submissão (B), imobilidade (C).

A prevalência de cada comportamento foi descrita em porcentagem em relação ao número total de episódios de ataque físico (3 ataques por animal, logo 66 episódios de ataque, no total). Além disso, a estes comportamentos foram atribuídas notas de acordo com a prevalência dos comportamentos, já que devido à brevidade dos encontros agonísticos (duração média de 40 s) não

foi possível realizar uma análise de *cluster*. A maior nota (4) foi atribuída ao comportamento mais frequente e a nota zero foi atribuída aos episódios onde não houve ataque, os demais foram numerados em ordem decrescente de acordo com sua prevalência. A partir da soma das notas nos três dias de protocolo foi estabelecido um escore que foi posteriormente correlacionado aos comportamentos no teste de partição. Quando um animal apresentou mais de um comportamento frente ao ataque no mesmo dia, sua pontuação daquele dia foi a soma das duas notas atribuídas.

Os animais derrotados (DT) foram divididos em dois subgrupos de acordo o tempo de exploração da área da barreira no momento do teste de partição. Os cinco animais de cada extremo, alto ou baixo tempo de aproximação da área da barreira, foram selecionados. A este respeito, outros grupos já utilizam esta mesma classificação de vulnerabilidade (menor exploração da área de interação com o residente) e resiliência (exploração maior ou igual a do grupo controle) (Berton *et al.*, 2007; Chou; Huang; Hsu, 2014; Dulka *et al.*, 2015).

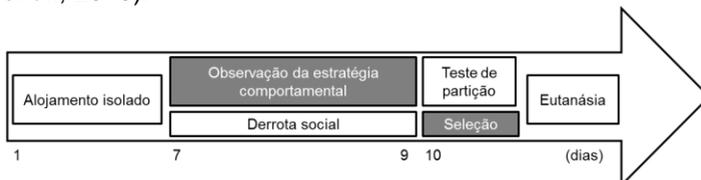


Figura 5: Esquema do protocolo experimental para investigação de resiliência e vulnerabilidade à derrota social. 22 camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de derrota social. O comportamento do intruso frente ao ataque foi observado. No teste de partição, o parâmetro tempo de exploração da área da barreira foi utilizado para a seleção de cinco animais, de cada extremo, para constituírem as subpopulações resiliente e vulnerável. Os demais animais não foram utilizados para a análise bioquímica e de expressão gênica.

Protocolo Experimental 3: Efeito do antagonismo do receptor NK_1 antes da derrota social

Imediatamente antes de cada sessão de derrota social, grupos independentes de animais receberam injeções sistêmicas (i.p.) de veículo ou L-703,606 (L119, Sigma-Aldrich, USA), um antagonista não peptídico do receptor NK_1 , nas doses 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg diluídos em uma solução de DMSO a 0,5% em salina, sendo esta solução utilizada como veículo (**Figura 6**). As doses foram escolhidas a partir do estudo prévio de Santos (2015) que encontrou

um efeito tipo-ansiolítico do antagonista NK₁ na dose de 10 mg/kg. Logo, para evitar o viés do efeito ansiolítico durante o ataque físico, escolhemos doses sub-efetivas do antagonista. Além destes quatro grupos experimentais submetidos à derrota social, adicionou-se mais um grupo controle que não foi tratado e não foi exposto ao agressor em nenhuma etapa do protocolo, totalizando assim cinco grupos experimentais e 35 animais (n = 7-8/grupo).

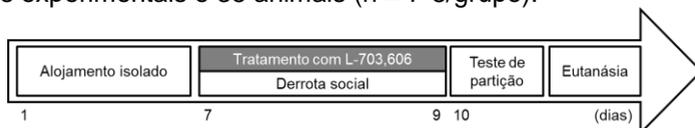


Figura 6: Esquema temporal do experimento para avaliar efeito do antagonismo por via sistêmica do receptor NK₁ anteriormente à derrota social. Os animais foram tratados com um antagonista não-peptídico do receptor NK₁ (L-703,606), antes da exposição à derrota social, e avaliados no teste de partição, 24h após a última sessão de derrota social. 30 min após o teste de partição foi realizada a eutanásia para a dissecação do hipocampo.

4. Coleta de tecidos

Imediatamente após o teste de partição, ou da sessão de derrota social, os animais foram levados para uma sala específica para a eutanásia, onde:

(i) foram anestesiados em uma câmara saturada com 2 mL de isoflurano (Isoflurine®, Brasil) e após a perda do reflexo de retirada de pata, decapitados. O sangue do tronco foi coletado em microtubos e armazenado em gelo enquanto o encéfalo foi rapidamente removido do crânio para a dissecação bilateral do hipocampo feita sobre uma placa de gelo. Os microtubos, previamente identificados, contendo os dois hemisférios hipocâmpais foram congelados em gelo seco e posteriormente transferidos para um freezer -80°C até o momento da extração celular;

(ii) foram anestesiados com uma solução de acepromazina (1 mg/kg), cetamina (100 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a perda do reflexo de retirada da pata, a caixa torácica foi aberta e o coração exposto, uma agulha (32 G) foi inserida no ventrículo esquerdo até a entrada da artéria aorta e o fígado foi lacerado. Os animais foram perfundidos com tampão PB 0,2M por 5 min e, em seguida, com paraformaldeído 4% (pH = 7,4) por 5 min. A seguir, os cérebros foram removidos cuidadosamente do crânio e mantidos em solução de paraformaldeído 4% durante

24h. Após este período os cérebros foram colocados em soluções de sacarose em concentrações crescentes (10 a 30%) para crioproteção. Posteriormente os cérebros foram congelados a -20°C (gelo seco) e armazenados em freezer -80°C até o momento da secção.

5. Preparo das amostras

- Plasma e soro

O sangue foi coletado em microtubos plásticos de 1,5 mL (soro) ou contendo 40 μl de uma solução de heparina 10% (plasma) e mantidos em gelo até o momento em que foram centrifugados por 15 minutos a uma velocidade de 10.000 r.p.m. Após a centrifugação o plasma/soro foi separado e armazenado em freezer -80°C até o momento da análise.

- Extrato celular fracionado

Foram adicionados 300 μl de tampão A (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 2 mM, EDTA 1 mM, NaF 1 mM) aos microtubos contendo o hipocampo, o tecido foi macerado com auxílio de um pistilo plástico e incubado em gelo por 15 min e então centrifugado a 14.000 rpm por 30 min. O sobrenadante, que continha a fração citoplasmática, foi coletado em um novo microtubo previamente identificado, que foi armazenado em gelo. Ao pellet foi adicionado 150 μl de tampão B (Tampão A + Triton X-100 1%) este foi ressuspenso e homogeneizado, após o período de incubação em gelo (15 min) foi novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante desta segunda centrifugação, contendo a fração das membranas, foi coletado em novos microtubos identificados e armazenados no gelo. Ao pellet foi adicionado 150 μl de tampão C (HEPES 20 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 2 mM, EDTA 1 mM, NaF 1 mM, NaCl 420 mM, Glicerol 25%) e o procedimento repetido, este último sobrenadante contém a fração nuclear. A todos os tampões foi adicionado coquetel inibidor de protease (1:50, Promega, EUA).

A quantificação de proteínas de todas as frações foi realizada através do método BCA (Pierce). A leitura de absorbância (540 nm) foi realizada em um leitor de placas *Infinite M200 TECAN* no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – LAMEB 3. A concentração de proteínas foi normalizada para uma concentração final de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (ELISA) ou 2,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Western blotting). As amostras para Western blotting, após a normalização da concentração de

proteínas, foi adicionado o tampão de Laemmli (2% SDS; 5% 2- β -mercaptoetanol; 10% glicerol; 0.002% azul de bromofenol; 0,62 M Tris HCl) e as amostras foram fervidas por 5 min (Dwivedl *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2005; Casu *et al.*, 2007).

- Extrato celular total

Para a obtenção do extrato celular total, os tecidos, mantidos em gelo, foram macerados com 150 μ l de tampão de lise (RIPA: Triton X-100 1%, SDS 0,1%, Deoxicolato de sódio 0,5%, NaCl 150 mM, Tris 50 mM), ao qual foi adicionado coquetel inibidor de proteases (1%, Sigma, P8340, EUA) e incubados em gelo por 30 min. O lisato foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi utilizado nos experimentos.

A quantificação de proteínas foi realizada através do método BCA (Pierce), a leitura de absorbância (540 nm) foi realizada em um leitor de placas *Infinite M200 TECAN* no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – LAMEB 3 e a concentração de proteínas foi normalizada para uma concentração final 5,55 μ g/ μ l, foi adicionado o tampão de Laemmli e as amostras foram fervidas por 5 min.

- Secções para imunofluorescência

Os encéfalos foram removidos do freezer -80°C e aclimatados por 1h no criostato a -25°C e então foram realizadas secções coronais na porção dorsal (-1,7 μ m do *bregma*) do hipocampo. Os cortes teciduais de espessura de 25 μ m foram preservados em solução anticongelante (sacarose 15%, propilenoglicol 30% em tampão PB 0,1M) e mantidos a -20°C.

6. *Western blotting*

Alíquotas contendo 20 μ g de proteínas foram carregadas e submetidas à eletroforese em gel dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% (150 V, 300 mA, 1h30) e transferido (100 V, 300 mA, 2h) para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As membranas foram bloqueadas com uma solução de BSA 5% preparada em solução TBS-Tween 0,5% (TBS-T) durante 1h, sob agitação, a 4°C.

Em seguida, foram expostas aos anticorpos primários contra as proteínas discriminadas no **quadro 1**:

Quadro 1: Proteínas-alvo e especificações dos anticorpos utilizados para o Western blotting.

Proteína	Empresa	Código	Clonalidade	Espécie	PM (kDa)	[]
GR	Sigma	sab4501309	Policlonal	Coelho	90	1:2000
MR	Pierce	ma1620	Monoclonal	Camundongo	100	1:1000
H3	Bioss	bs-0349R	Policlonal	Coelho	18	1:1000
BDNF	ABCAM	ab6201	Policlonal	Coelho	14*	1:1000
SERT	Millipore	ab9322	Policlonal	Coelho	71	1:1000
β -actina	SCBT	sc-81178	Monoclonal	Camundongo	43	1:500

*a banda do dímero (28 kDa) foi a mais proeminente e portanto a que foi quantificada
PM: peso molecular; []: concentração

A exposição aos anticorpos primários foi realizada overnight a 4°C, sob agitação constante. Após, as membranas foram lavadas com TBS-T durante 30 min (cinco vezes de cinco minutos cada) e incubadas com anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo conjugados à peroxidase (*Cell Signaling*, #7074 ou #7076 1:10000) por, pelo menos, 2h à temperatura ambiente.

A reatividade foi detectada com o uso de potencializadores de quimioluminescência autorradiográfica (*SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate*, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, EUA) e reveladas em um fotodocumentador automático *Chemidoc®* (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA). As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o programa *ImageJ* (NIH, EUA) e normalizadas em relação à β -actina (fração citoplasmática ou total) ou ao H3 (fração nuclear), a figura representativa (**Figura S1**) dos controles de carregamento está no apêndice A.

7. ELISA

As quantificações das proteínas IL-1 β (Life Technologies, EUA), TNF- α (Life Technologies, EUA), substância P (Enzo Biotechnologies, EUA) e corticosterona (Enzo Biotechnologies, EUA) foram realizadas, em duplicata, utilizando alíquotas de 100 μ g de proteína do citosol por imunoensaio enzimático ELISA 'sanduíche' de acordo com as instruções dos fabricantes dos kits. A dosagem de corticosterona (Enzo Biotechnologies, EUA) e ACTH (Enzo Biotechnologies, EUA) foi realizada nas amostras de plasma e soro,

respectivamente, por ELISA sanduíche de acordo com as instruções dos fabricantes dos kits.

A leitura de absorbância foi realizada em um leitor de placas *Infinite M200 TECAN* no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – LAMEB 3 e a quantificação feita em relação à curva padrão utilizando o método de quantificação por 4PL (*4 Parameter Logistic Curve Fitting*) utilizando a ferramenta *on line My Assays®*.

8. Imunofluorescência

Os cortes histológicos foram lavados três vezes em TBS e então foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos (peróxido de hidrogênio 3%, metanol 10% em TBS), com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas e, depois de lavadas em TBS, foram incubadas com uma solução de extração (triton X-100 0,3%). Após a extração os cortes foram bloqueados por, pelo menos, 40 min (BSA1% em triton X-100 0,3%) e, então, incubados overnight a 4°C com os anticorpos contra as proteínas de interesse anti-substância P (1:1000, AB1566, anticorpo policlonal feito em coelho, Chemicom, EUA) e anti-iba1 (1:3000, ab5076, anticorpo policlonal feito em cabra, Abcam, EUA). Após a incubação os cortes foram lavados e então incubados com os anticorpos secundários anti-coelho (1:2000, Alexa Fluor® 647, ab150075, Abcam, EUA) e anti-cabra (1:1000, Alexa Fluor® 488, ab150129, Abcam, EUA) fluorescentes por 2h à temperatura ambiente e no escuro. Após este período os tecidos foram novamente lavados e as lâminas montadas com meio de montagem contendo DAPI (*Prolong Diamond Antifade*, LifeTechnologies, P36962, EUA).

A imunomarcagem foi avaliada na porção dorsal do hipocampo. Imagens do corte total foram adquiridas no escaneador de lâminas *Axio Scan* (Zeiss, Alemanha) do Laboratório Multiusuário para Estudos em Biologia – LAMEB 2, utilizando as objetivas de 10 e 40X. A análise de densitometria foi realizada nas três subáreas do hipocampo: giro denteado (GD), CA1 e CA3, utilizando o software de imagens *ImageJ* (NIH, EUA), a marcação inespecífica (fundo) foi subtraída das medidas. Como as imagens adquiridas no escaneador têm tamanhos diferentes, a densitometria foi corrigida pela área de cada imagem. Os resultados foram expressos como a porcentagem de pixels por centímetro quadrado de tecido. Os dados gráficos representam os valores médios das três sub-regiões do hipocampo dorsal em cada animal.

9. PCR em tempo real

- Extração do RNA:

Para a extração do RNA foi adicionado TRIzol® (Life Technologies, EUA) a cada microtubo contendo o hipocampo. O tecido foi homogeneizado por pipetagem 'up-and-down' e agitado vigorosamente em vórtex. Em seguida, adicionou-se 200 µl de clorofórmio 98 % (Vetec, Brasil) às amostras, as quais foram agitadas por inversão por 15 s, mantidas em temperatura ambiente por 2 min e, então, centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. Após a centrifugação há a formação de três fases, a superior aquosa que contém o RNA, a intermediária branca que contém o DNA e a fase orgânica rosa inferior que contém as proteínas. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, onde foi acrescida de 500 µl de isopropanol (Vetec, Brasil) para a precipitação do RNA total e novamente submetida à centrifugação a 12.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 ml de etanol 75 %, gelado, através de centrifugação a 7.500 x g por 5 min a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo o RNA total foi seco, invertendo-se os tubos sobre papel por aproximadamente 10 min em temperatura ambiente. O RNA total foi então solubilizado em água ultrapura livre de nucleases (DNAse e RNAse) (Gibco, EUA) e incubado por 10 min a 60°C. A integridade do RNA extraído foi verificada em um gel de agarose, utilizando Gel Red® (VWR, EUA) como intercalante (**Figura S2**), onde se puderam observar as duas bandas correspondentes às frações ribossomais (18S e 28S). A quantificação e a pureza foram avaliadas no aparelho Nanodrop® (Thermo Scientific, EUA), observando-se as relações de absorvância 260/280 nm e 260/230 nm. A concentração de RNA foi normalizada em 500 ng de RNA por µL.

A fim de eliminar qualquer DNA contaminante inadvertidamente purificado durante o processo de extração de RNA, as amostras de RNA (1 µg) foram submetidas a tratamento com DNAse I® (Invitrogen, Carlsbad, Reino Unido), na razão de 1 unidade por µg de RNA extraído. A reação foi realizada durante 15 min em temperatura ambiente, na presença de tampão recomendado pelo fabricante. A inativação da enzima ocorreu com a adição de EDTA na concentração final de 2,5 mM e aquecimento à 65 °C por 10 min.

- Síntese do cDNA:

Após o tratamento com DNase I, o RNA foi convertido a cDNA utilizando um kit comercial (abm, Canadá). Para tal, o mix (tampão 1x, dNTP 125 µM, *random primer* 2x, transcriptase reversa 50 U, inibidor de RNase 1x, água DEPC) foi adicionado às amostras (150 ng de RNA/µL) e então se incubou a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. O cDNA obtido (20 µL) foi armazenado em freezer -20°C até o momento do uso.

- Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR):

Para utilização como molde na qPCR, o cDNA foi diluído dez vezes em água ultrapura livre de nucleases. As reações ocorreram na presença do reagente SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as orientações do fabricante, e concentrações específicas de cada par dos iniciadores (descrito no **Quadro 1**). Elas foram montadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems), em volume final de 10 µL. As placas, cobertas por selante óptico MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, EUA) foram analisadas em equipamento ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB–UFSC). As reações tiveram início com uma etapa de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (95 °C por 15 s) e uma etapa de ligação dos iniciadores e extensão (60 °C por um min). Ao final, foi incluída uma etapa para obtenção da curva de dissociação (95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s e, novamente, 95 °C por 15 s). Em cada placa adicionou-se um controle negativo para cada par de iniciadores, composto por todos os reagentes necessários à amplificação, à exceção do cDNA molde.

A eficiência da qPCR com cada par de iniciadores foi calculada através da diluição seriada 1:2 da mistura de cDNA das amostras (diluídas 1:10) (cinco pontos em duplicata). A inclinação da reta, obtida a partir da função entre o C_q (ciclo de quantificação, do inglês, Cycle quantification) e cada ponto da diluição, foi aplicada à equação:

$$E = 10e^{-1/\text{slope}} - 1$$

Equação 1

Nesta equação, E representa a eficiência da qPCR e slope é o valor de inclinação da reta. O valor de E é obtido como fração de uma unidade.

A sequência dos iniciadores senso e antissenso, o tamanho do produto amplificado esperado, a concentração dos iniciadores e a eficiência de cada iniciador está apresentada no Quadro 2.

Quadro 2: Características dos iniciadores utilizados para a PCR em tempo real

Gene		Sequência	Tama- nho	Concentração dos iniciadores (μM)*	Eficiência
<i>Tac1</i>	S	ACCAGATCAAGGAGGCAATG	167 pb	0,15	97 %
	AS	GCCCATTAGTCCAACAAAGG			
<i>Tacr1</i>	S	TGTGTGGACTTCCTGCTCTG	231 pb	0,6	99 %
	AS	GTTCTTGGCTCTTGGCAGAC			
<i>Fkbp5</i>	S	GATTGCCGAGATGTGGTGTTCG	141 bp	0,7	109 %
	AS	GGCTTCTCCAAAACCATAGCGTG			
β - <i>actina</i>	S	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG	138 bp	0,3	114 %
	AS	TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG			
<i>GAPDH</i>	S	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	153 bp	0,3	111 %
	AS	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG			

S – Sequência Senso

SA – Sequência Antissenso

pb – pares de bases

*concentração no volume final de reação de 10 μl

- Análise dos resultados e análises estatísticas:

Os experimentos de qPCR foram analisados pelo software SDS 2.4 (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). Para avaliar a variação relativa nos níveis de cada transcrito entre as amostras analisadas, utilizou-se o método da quantificação relativa (Livak; Schmittgen, 2001), comparando o Cq apresentado para cada gene alvo à média dos Cq dos genes de referência (*Gapdh* e β -*actina*), escolhendo-se aqueles com menor variância interna.

O programa *RefFinder*® (disponível em <http://fulxie.0fees.us/?type=reference>) foi utilizado para a escolha do melhor gene de referência entre os dois genes selecionados previamente: GAPDH e β -actina. Para cada gene foi calculado um índice de estabilidade que leva em consideração a variação dos valores de Cq entre as diferentes condições. Assim, quanto menor o valor do índice de estabilidade, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais.

Os cálculos necessários para obtenção dos valores de abundância relativa foram realizados em planilha do Excel® (Microsoft Office), através das seguintes equações:

$$\Delta Cq = Cq \text{ (gene alvo)} - Cq \text{ (gene de referência)} \quad \text{Equação 2}$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ (amostra)} - \Delta Cq \text{ (calibrador)} \quad \text{Equação 3}$$

$$QR = 2e^{-\Delta\Delta Cq} \quad \text{Equação 4}$$

Nestas equações o calibrador é a amostra a partir da qual as demais serão comparadas (grupo controle não submetido à derrota social) e QR é o valor de quantificação relativa. O valor de QR médio do calibrador é sempre próximo a 1.

10. Análises estatísticas

Todos os resultados obtidos foram submetidos primeiramente à análise de normalidade com o teste Kolmogorov-Smirnov. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes. Todos os gráficos foram produzidos no programa *GraphPad Prism®* v 5.01 (*GraphPad Software Inc.*, EUA).

A análise das quantificações das amostras ao longo do protocolo de derrota social foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, onde os fatores independentes foram a repetição (dias) e o grupo (controle vs derrotado), seguida do teste post hoc de Newman-Keuls quando apropriado. Utilizamos em todas as análises o software *Statistica* v.7 (*StatSoft Inc.*, EUA). Para a confecção da tabela 2 realizamos o teste *t* de *Student* não pareado utilizando o software *GraphPad Prism®* v 5.01 (*GraphPad Software Inc.*, EUA).

A comparação entre as subpopulações resiliente e vulnerável foi realizada através de teste *t* de *Student* não pareado, utilizando o software *GraphPad Prism®* v 5.01 (*GraphPad Software Inc.*, EUA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m.).

Para a qPCR foi utilizado o teste estatístico *one-sample T test*, onde o valor de cada amostra é comparado ao valor teórico do grupo controle (1,00), utilizando o software *GraphPad Prism®* v 5.01 (*GraphPad Software Inc.*, USA).

A análise dos efeitos do tratamento com o antagonista NK₁R foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post hoc de Newman-Keuls quando apropriado, utilizando o software *Statistica* v.7 (*StatSoft Inc.*, EUA).

Resultados

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1: ATIVAÇÃO DO EIXO HPA AO LONGO DO PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL

A ANOVA de duas vias (**figura 7**) mostra uma redução da concentração de corticosterona plasmática quando considerado o fator tempo [$F(2,17)=7,684$; $p=0,004$; 3 dias < 1 e 2 dias]. O grupo submetido a três sessões de derrota (3D) apresenta uma menor concentração de corticosterona plasmática que os grupos submetidos a uma e duas sessões, indicando que há adaptação do eixo HPA ao longo do protocolo. Além disso, há uma diferença global na concentração entre os grupos controle e derrotado [$F(1,17)=6,7043$, $p=0,019$; controle < derrotado], mas sem apresentar uma interação significativa entre os dois fatores, grupo e tempo [$F(2,17)=0,222$; $p=0,80$].

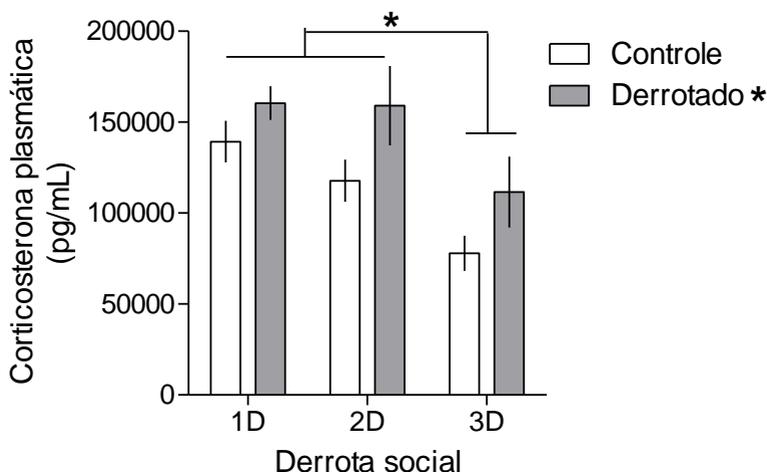


Figura 7: Decurso temporal dos níveis de corticosterona plasmática ao longo do protocolo de conflito social. Comparação dos níveis de corticosterona plasmática em animais submetidos a 1, 2 e 3 dias de conflito social. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguida do post hoc de Newman-Keuls * $p < 0,05$ ($n = 3-4$ /grupo).

A análise dos níveis de ACTH (**figura 8**) no soro revelou uma maior concentração nos grupos submetidos à derrota social que nos controles [$F(1,21)=7,288$; $p=0,013$; controle<derrotado]. Porém, não há uma diferença significativa relativa à duração do protocolo [$F(2,21)=2,020$; $p=0,16$] nem da interação entre os fatores [$F(2,21)=0,308$; $p=0,74$]. A concentração de corticosterona no citoplasma do hipocampo apresentou um aumento não significativo nos grupos derrotados [$F(1,21)=3,134$; $p=0,09$], mas também não apresentou alterações significantes em relação à duração [$F(2,21)=1,070$; $p=0,36$] e na interação entre os dois fatores [$F(2,21)=1,955$; $p=0,17$].

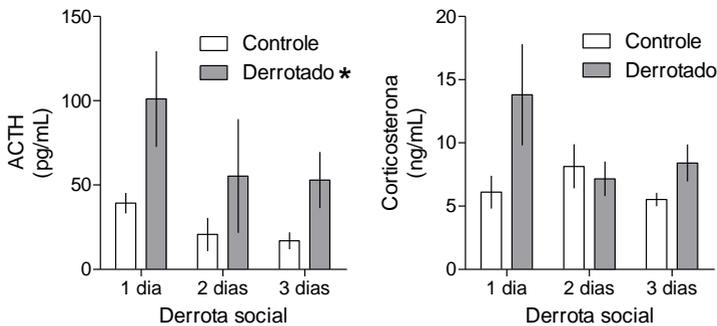


Figura 8: Decurso temporal dos níveis de ACTH no soro e corticosterona no hipocampo ao longo do protocolo de conflito social. Comparação dos níveis de ACTH no soro e de corticosterona no hipocampo em animais submetidos a 1, 2 e 3 dias de conflito social. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguida do post oc de Newman-Keuls * $p < 0,05$ em comparação ao controle ($n= 4-5$ /grupo).

A translocação do receptor GR do citoplasma para o núcleo (**figura 9**) apresentou uma tendência de redução ao longo do protocolo [$F(2,19)=3,212$; $p=0,062$], porém não houve diferença entre os grupos [$F(1,19)=0,805$; $p=0,38$] e a interação entre os dois fatores não foi significativa [$F(2,19)=3,042$; $p=0,071$].

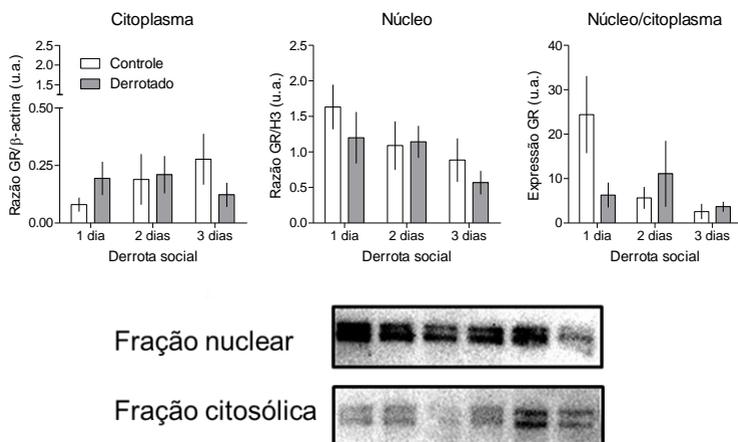


Figura 9: Decurso temporal da translocação nuclear do GR no hipocampo ao longo do protocolo de conflito social. Comparação da expressão, por *Western blotting*, do receptor GR no núcleo em relação ao citoplasma de amostras de hipocampo de animais submetidos a 1, 2 e 3 dias de conflito social, e em seus respectivos controles não expostos ao agressor. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguida do post hoc de Newman-Keuls. ($n = 4-5$ /grupo).

Não foram observadas quaisquer diferenças na relação entre a expressão nuclear dos receptores MR e GR (**figura 10**) no hipocampo [grupo: $F(1,21)=2,101$; $p=0,16$; duração do protocolo: $F(2,21)=1,213$; $p=0,32$; interação: $F(2,21)=1,503$; $p=0,24$].

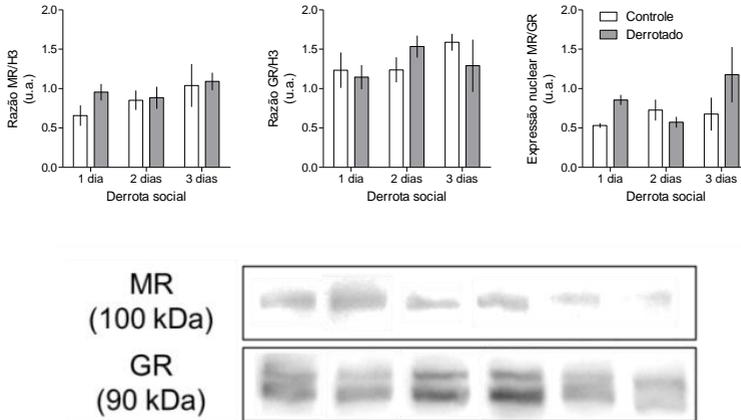


Figura 10: Decurso temporal da proporção MR/GR no núcleo de extratos de hipocampo ao longo do protocolo de conflito social. Comparação da expressão, por *Western blotting*, do receptor MR em relação ao receptor GR no núcleo de amostras de hipocampo de animais submetidos a 1, 2 e 3 dias de conflito social e em seus respectivos controles não expostos ao agressor. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguida do post hoc de Newman-Keuls ($n=4-5$ /grupo).

A expressão de citocinas pró-inflamatórias, quantificada por ELISA, no citoplasma do hipocampo (**figura 11**) apresentou um efeito da duração do protocolo. Os níveis de TNF- α tem uma tendência a aumentar no terceiro dia do protocolo [$F(2,21)=3,197$; $p=0,061$] enquanto a maior quantidade de IL-1 β é encontrada após uma sessão [$F(2,21)=6,458$; $p=0,006$; 1 dia > 2 e 3 dias]. Porém, não há diferença significativa entre os grupos [TNF- α : $F(1,21)=0,087$; $p=0,77$; IL-1 β : $F(1,21)=0,941$; $p=0,34$] nem interação entre os fatores [TNF- α : $F(2,21)=2,179$; $p=0,14$; IL-1 β : $F(2,21)=0,220$; $p=0,80$].

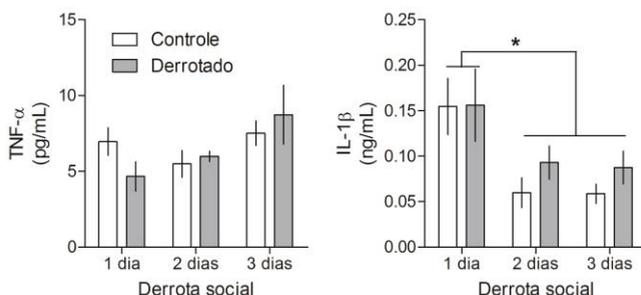


Figura 11: Decurso temporal dos níveis de TNF- α e IL-1 β no hipocampo ao longo do protocolo de conflito social. Comparação dos níveis de TNF- α e IL-1 β em animais submetidos a 1, 2 e 3 dias de conflito social. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguida do post hoc de Newman-Keuls * $p < 0,05$ ($n = 4-5$ /grupo).

A análise qualitativa da expressão de iba1 (**figura 12**), por imunofluorescência no hipocampo dorsal, sugere que há um aumento na recrutação de micróglia em ambos os grupos. Porém com cinética diferente, pois no segundo dia há um aumento de expressão no grupo derrotado, tanto em relação ao grupo controle, quanto ao grupo derrotado no primeiro dia.

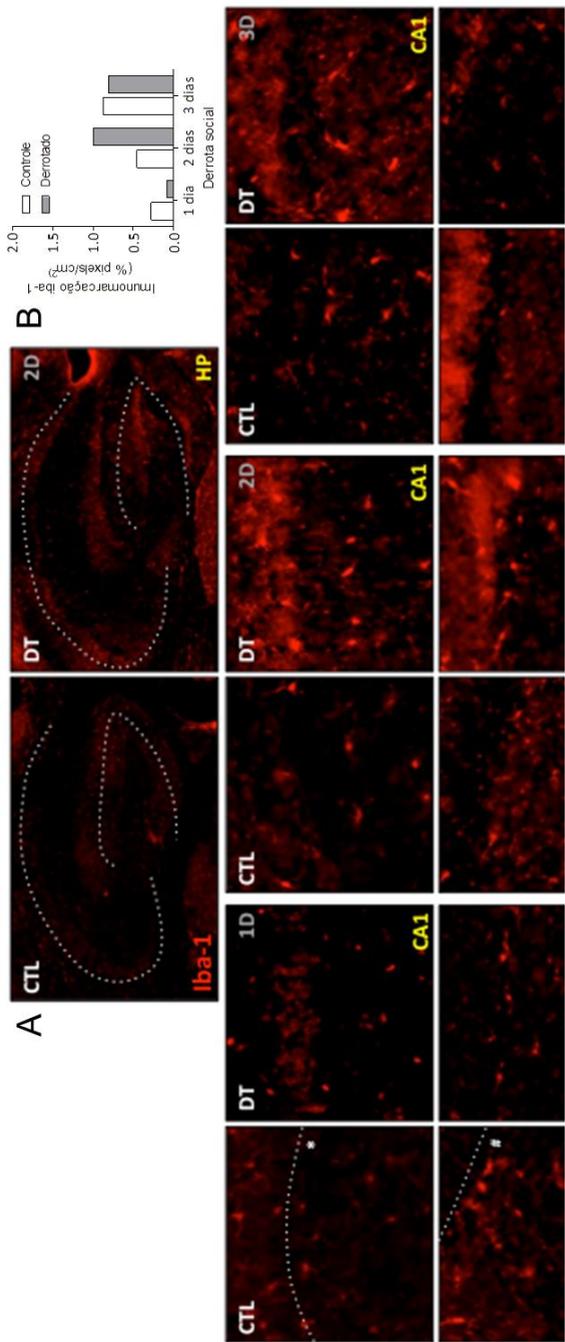


Figura 12: Decurso temporal da expressão de Iba1 no hipocampo dorsal ao longo do protocolo de conflito social. Comparação da expressão de Iba1 no hipocampo em animais submetidos a 1, 2 e 3 dias de conflito social. (A) Figuras representativas hipocampo (HP) após dois dias de derrota social (B) Quantificação da fluorescência resultados expressos como a porcentagem de pixels pela área (%pixels/mm²), plotados como média da imunomarcagem nas três sub-regiões do hipocampo (n = 1/grupo). Na parte inferior do painel, figuras representativas das regiões CA1 e GD após 1, 2 e 3 dias de derrota social nos grupos controle e derrotoado. CTL: grupo controle; DT: grupo derrotoado; HP: hipocampo; 1D: 1 dia de derrota social; 2D: 2 dias de derrota social; 3D: 3 dias de derrota social; *: camada piramidal do CA1; #: camada granular do GD; escala = 50 μ m.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2: ESTRATÉGIA COMPORTAMENTAL FRENTE AO ATAQUE FÍSICO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES RESILIENTE E VULNERÁVEL

As estratégias comportamentais ativas foram as mais frequentemente adotadas pelos intrusos, como podemos observar na **figura 13**, sendo a postura de submissão expressa em 67% dos ataques, seguida de tentativa de fuga (41%), e em 29% destes episódios postura de submissão e tentativa de fuga estiveram presentes concomitantemente. As estratégias comportamentais passivas foram menos frequentes sendo que a imobilidade esteve presente em 14 % dos ataques e apenas três animais apresentaram congelamento (4,5 %). Além disso, houve apenas quatro episódios (com animais diferentes) em que não ocorreu ataque (6 %).

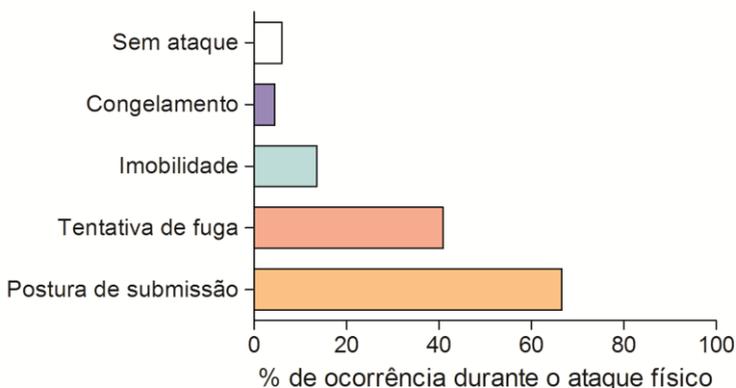


Figura 13: Prevalência das estratégias comportamentais adotadas durante o ataque físico. As estratégias comportamentais dos intrusos frente ao ataque foram classificadas como postura de submissão, tentativa de fuga, congelamento e imobilidade.

Logo, para a análise do escore comportamental foram atribuídos os seguintes valores: 4= postura de submissão, 3= tentativa de fuga, 2= imobilidade, 1= congelamento 0= sem ataque. O escore comportamental variou entre seis e 21 e apresentou correlações positivas fracas ($0,3 < r < 0,5$) com os parâmetros autolimpeza, entradas e tempo na área da barreira e correlações negativas fracas com os comportamentos de avaliação de risco e escavação da serragem (**tabela 1**), destas correlações fracas apenas aquela entre as entradas na área da barreira e o escore foi significativa ($p=0,035$).

Tabela 1: Correlação entre o escore comportamental de derrota social com os comportamentos no teste de partição.

Comportamento	Pearson r	Intervalo de confiança	r ²	Valor de P
Distância percorrida (m)	0,1783	-0,263 a 0,558	0,032	0,427
Levantamentos (n)	0,2360	-0,206 a 0,598	0,056	0,290
Avaliação de risco (n)	-0,3693	-0,684 a 0,062	0,136	0,091
Autolimpeza (s)	0,3511	-0,083 a 0,673	0,123	0,109
Escavação da serragem (s)	-0,3673	-0,683 a 0,064	0,135	0,093
Área da Barreira:				
Entradas (n)	0,4507	0,036 a 0,733	0,203	0,035*
Tempo (s)	0,3415	-0,094 a 0,667	0,117	0,120
Distância percorrida (m)	0,2970	-0,142 a 0,639	0,088	0,180

Variabilidade comportamental: identificando e comparando subpopulações resilientes e vulneráveis

Conforme descrito (página), os cinco animais de cada extremo foram selecionados. Ou seja, os animais que passaram mais de 140 s na área da barreira foram considerados resilientes e os animais que passaram menos de 15 s nesta área foram considerados vulneráveis, devido a sua maior expressão de comportamentos defensivos (**figura 14**).

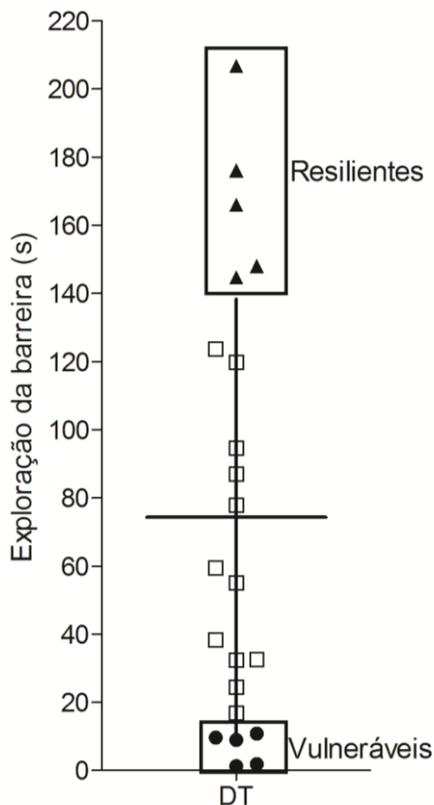


Figura 14: Tempo de exploração da área da barreira camundongos C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de conflito social seguido do teste de partição. Os cinco animais com maior tempo de exploração (triângulos, superior a 140 s) foram considerados resilientes, enquanto os cinco animais com menor exploração (círculos, inferior a 15 s) da área da barreira foram considerados vulneráveis, os demais animais estão representados por quadrados. A barra horizontal representa a média e a vertical o e.p.m. DT = animais que passaram pela derrota social (n=22).

Como podemos observar na **figura 15**, as subpopulações resiliente e vulnerável não diferiram significativamente em relação ao escore comportamental [$T(8)=1,542$; $p=0,16$], porém apenas os animais vulneráveis apresentaram imobilidade, em 27% dos eventos, frente ao ataque físico.

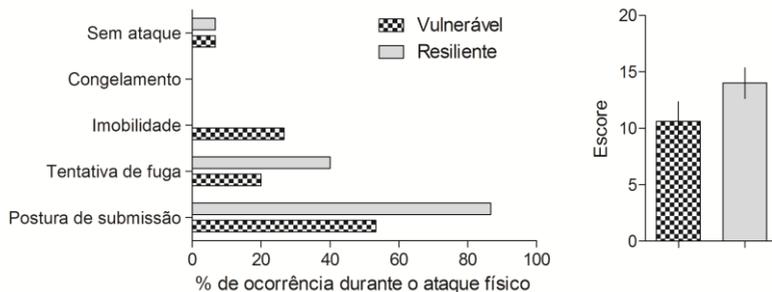


Figura 15: Prevalência das estratégias comportamentais adotadas durante o ataque físico pelas subpopulações resiliente e vulnerável e seu escore comportamental. As estratégias comportamentais dos intrusos frente ao ataque foram classificadas como 4= postura de submissão, 3= tentativa de fuga, 2= imobilidade, 1= congelamento 0= sem ataque.

No painel apresentado na **figura 16**, os círculos representam o grupo selecionado como vulnerável e os triângulos identificam o grupo resiliente. Neste painel estão representados os demais comportamentos aferidos no teste de partição: frequência de entradas na área da barreira, frequência de levantamentos, tempo desprendido escavando a serragem, frequência dos comportamentos de avaliação de risco direcionados à partição, duração do comportamento de autolimpeza e a distância total percorrida.

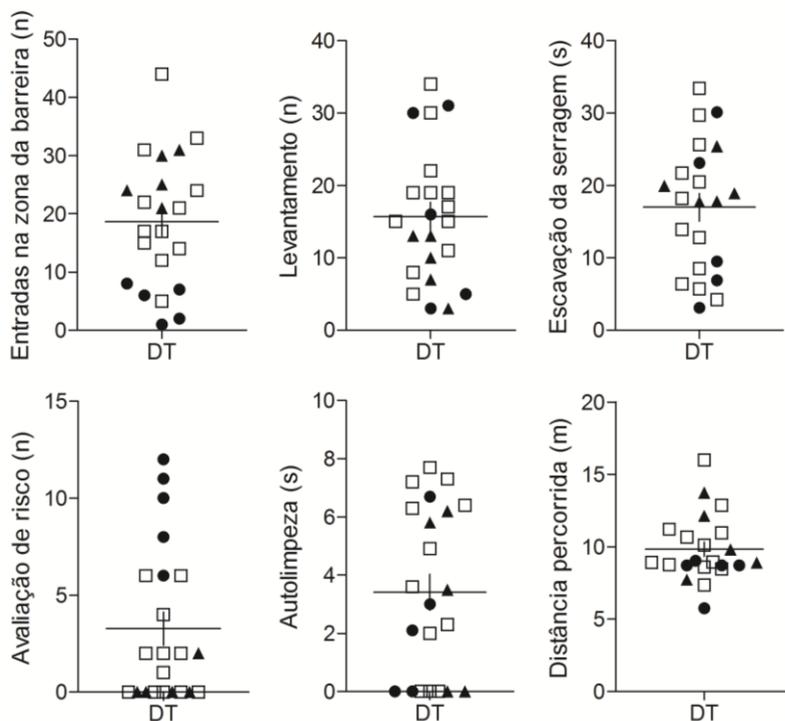


Figura 16: Respostas comportamentais de camundongos C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de conflito social seguido do teste de partição. Os triângulos representam os animais com tempo de exploração superior a 140 s (resilientes), enquanto os círculos representam os animais com exploração da área da barreira inferior a 15 s (vulneráveis). Os demais animais estão representados por quadrados vazados. A barra horizontal representa a média e a vertical o e.p.m. em cada gráfico (n=22).

Quando comparamos o comportamento dos subgrupos resiliente e vulnerável no teste de partição (**figura 17**) encontramos, as diferenças esperadas nos parâmetros de exploração da área da barreira, onde o grupo resiliente apresenta maior exploração e maior permanência nesta área, como observado nos parâmetros: tempo [$T(8)=14,18$; $p<0,0001$], entradas [$T(8)=9,14$; $p<0,0001$] e distância percorrida [$T(8)=8,51$; $p<0,0001$]. Além disso, o grupo resiliente apresenta uma menor frequência dos comportamentos de avaliação de risco [$T(8)=7,83$; $p<0,0001$] direcionados à partição que o grupo vulnerável. No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada nos parâmetros de exploração: distância total [$T(8)=1,82$; $p=0,11$] e levantamento [$T(8)=1,25$; $p=0,25$], nem nos comportamentos de autolimpeza [$T(8)=0,40$; $p=0,70$] e escavação da serragem [$T(8)=1,01$; $p=0,34$].

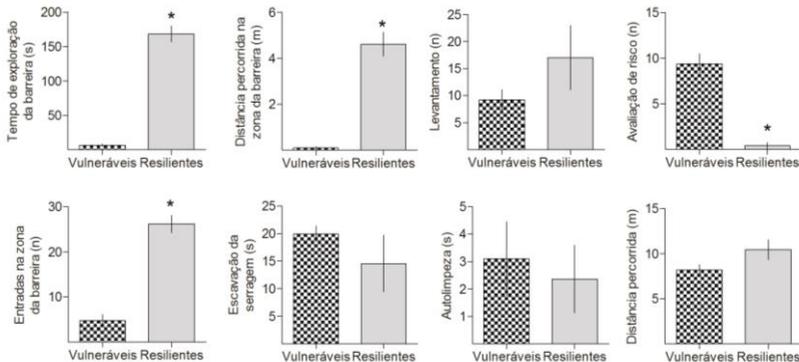


Figura 17: Respostas comportamentais de camundongos C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de conflito social seguido do teste de partição. Comparação entre os cinco animais com tempo de exploração superior a 140 s (resilientes - cinza) e os cinco animais com exploração da área da barreira inferior a 15 s (vulneráveis - quadriculado). No painel superior, da esquerda para a direita: tempo de exploração da área da barreira, distância percorrida na área da barreira, frequência de levantamentos, frequência dos comportamentos de avaliação de risco. No painel inferior, da esquerda para a direita: frequência de entradas na área da barreira, tempo escavando a serragem, duração dos comportamentos de autolimpeza e distância total percorrida. Resultados expressos como média \pm e.p.m. e analisados pelo teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ ($n = 5$).

Em relação aos níveis de corticosterona plasmática (**figura 18**), o grupo vulnerável (quadriculado) apresentou um aumento de 18% em relação ao grupo resiliente (cinza), porém esta diferença não é significativa [$T(8)=1,35$; $p=0,21$].

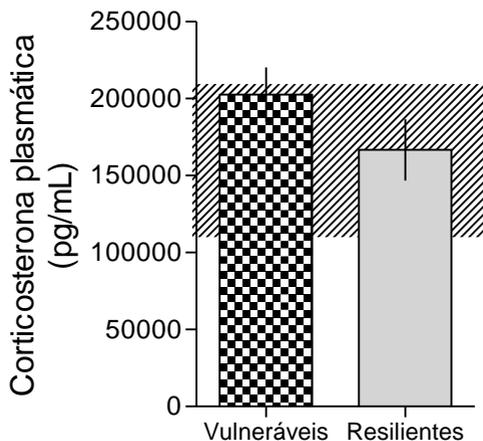


Figura 18: Níveis de corticosterona plasmática em camundongos C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de conflito social. Comparação entre os cinco animais com tempo de exploração superior a 140 s (resilientes = cinza) e os cinco animais com exploração da área da barreira inferior a 15 s (vulneráveis = quadriculado). A barra hachurada representa a média \pm e.p.m. de um grupo controle não exposto à derrota social como referência ($n=4$). Resultados expressos como média + e.p.m. e analisados pelo teste *t* de Student não pareado ($n = 5$ /grupo).

Na **figura 19** observamos a análise da expressão gênica média dos grupos vulnerável e resiliente em relação ao grupo controle que foi feita através do one-sample t test. O grupo resiliente apresenta uma expressão média 50% maior do gene *Fkbp5* [$T(4)=2,40$; $p=0,07$], enquanto o grupo vulnerável apresenta expressão relativa média 30% menor do gene *Tacr1* [$T(4)=2,03$; $p=0,11$], em comparação ao grupo controle. O grupo resiliente (em cinza) apresentou uma maior expressão de todos os genes no hipocampo que o grupo vulnerável (no quadriculado).

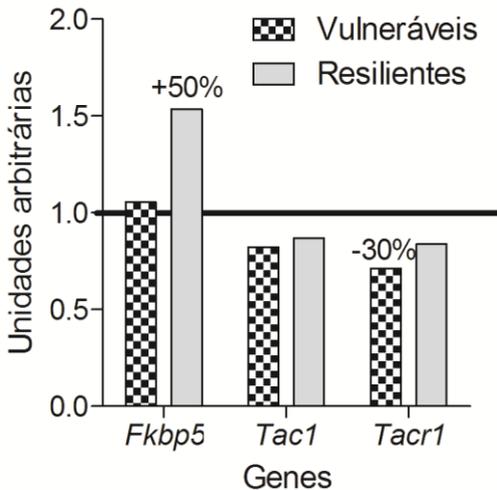


Figura 19: Expressão gênica relativa ao grupo controle no hipocampo de camundongos resilientes e vulneráveis ao estresse social. Camundongos C57BL/6 machos submetidos ao protocolo de derrota social seguido do teste de partição, onde foram classificados como resilientes (cinza) e vulneráveis (quadriculado) de acordo com seu tempo de exploração da barreira. Os animais foram sacrificados imediatamente após o teste de partição e tiveram o hipocampo dissecado. A expressão relativa dos genes *Fkbp5*, *Tac1* e *Tacr1* foi calculada através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, e a β -actina e o *Gapdh* foram utilizados como controles internos, a barra horizontal em 1,0 representa um grupo de animais controle ($n=4$), não submetidos à derrota social, contra o qual os outros grupos são comparados em porcentagem ($n=5$ /grupo).

O bloqueio sistêmico do receptor NK₁ anteriormente à derrota social promove um comportamento tipo-vulnerável

A ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Newman Keuls aponta uma redução na frequência de entradas na área da barreira [$F(3,24)=3,60$; $p=0,03$] e um menor tempo de exploração desta zona [$F(3,24)=2,95$; $p=0,05$] no grupo tratado com L-703,606, antagonista do receptor NK₁, na dose de 0,3 mg/kg (**figura 20**).

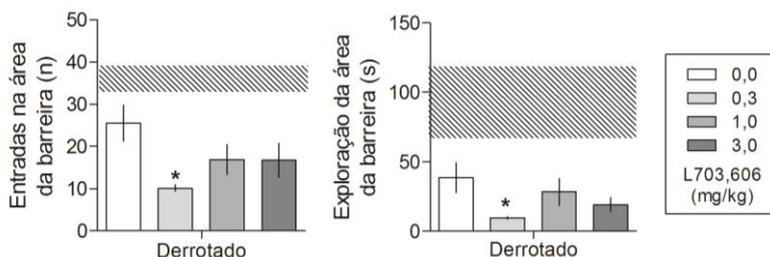


Figura 20: Efeito do tratamento com L-703,606 sobre a exploração da área da barreira de camundongos C57BL/6 machos no teste de partição. Os animais foram tratados com um antagonista não peptídico do receptor NK₁, antes da exposição à derrota social, avaliados no teste de partição 24h após a última sessão de derrota social. Resultados expressos como média \pm e.p.m. ANOVA de uma via seguida do post hoc Newman Keuls. * $p < 0,05$ em comparação ao veículo ($n = 7-8$ /grupo). A barra hachurada representa a média \pm e.p.m. do grupo controle não tratado e não exposto à derrota social como referência ($n=5$).

Na atividade locomotora, ilustrada na **figura 21**, a ANOVA mostrou uma redução na distância total percorrida [$F(3,24)=5,06$; $p=0,007$], em metros, do grupo tratado com 0,3 mg/kg de L-703,606. O mapa ocupacional gerado pelo software ANYMAZE® mostra as regiões em que grupo passou mais tempo, representado pelas cores quentes, e as menos ocupadas, representadas pelas cores frias.

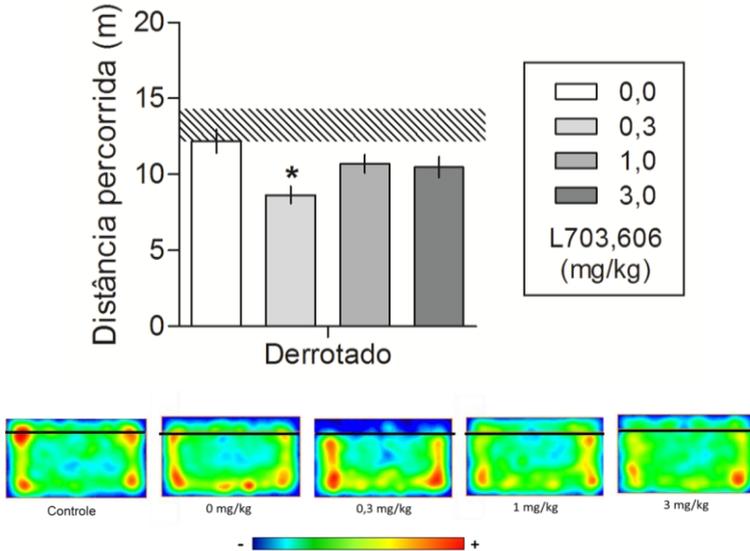


Figura 21: Efeito do tratamento com L-703,606 sobre a locomoção de camundongos C57BL/6 machos no teste de partição. Os animais foram tratados com um antagonista não-peptídico do receptor NK_1 , antes da exposição à derrota social e avaliados no teste de partição 24h após a última sessão de derrota social. Resultados expressos como média \pm e.p.m. ANOVA de uma via seguida do post hoc de Newman Keuls. * $p < 0,05$ em comparação ao veículo ($n = 7-8$ /grupo). A barra hachurada representa a média \pm e.p.m. do grupo controle não tratado e não exposto à derrota social como referência ($n=5$). No painel inferior está representado o mapa ocupacional obtido no software Anymaze® onde as cores frias representam as áreas menos exploradas e as cores quentes as mais exploradas pelo grupo.

Nos parâmetros comportamentais não exploratórios (**tabela 2**), a ANOVA não revelou nenhuma diferença na frequência de levantamentos [$F(3,24)=1,93$; $p=0,15$], na duração dos comportamentos de autolimpeza [$F(3,24)=0,36$; $p=0,78$], no tempo de escavação da serragem [$F(3,24)=2,02$; $p=0,14$] e na frequência de avaliação de risco [$F(3, 24)=0,63$; $p=0,60$].

Tabela 2: Efeito do tratamento com L-703,606 sobre os parâmetros comportamentais não exploratórios no teste de partição.

Parâmetro	Controle	L-703,606 (mg/kg)				P
		0,0	0,3	1,0	3,0	
Levantamentos (n)	23,6±5,9	12,7±2,4	7,0±1,6	9,3±3,1	5,3±1,4	0,15
Autolimpeza (s)	4,6±1,5	5,6±0,9	6,0±2,4	4,1±1,0	6,2±0,8	0,78
Escavação da serragem (s)	17,7±4,5	12,8±5,7	9,8±3,3	2,2±0,9	12,4±2,8	0,14
Avaliação de risco (n)	0,0±0,0	6,2±1,8	8,7±1,5	6,4±1,8	8,1±1,3	0,60

Os camundongos C57BL/6 machos foram tratados com um antagonista não peptídico do receptor NK_1 nas doses 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, antes da exposição à derrota social (3 dias consecutivos) e avaliados no teste de partição 24h após a última sessão de condicionamento. O grupo controle não foi tratado nem exposto à derrota social e foi adicionado apenas como referência (n=5).

A dosagem de substância P (**figura 22**), por ELISA, indicou um aumento, não significativo, no grupo tratado com o antagonista NK₁R na menor dose [T(11)=1,98; p=0,07].

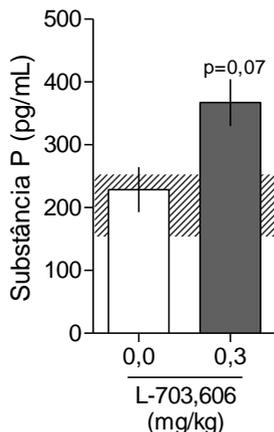


Figura 22: Efeito do tratamento com L-703,606 sobre a dosagem de Substância P no hipocampo de camundongos C57BL/6 machos. Os animais foram tratados com veículo (DMSO 5%) e um antagonista não peptídico do receptor NK₁ na dose 0,3 mg/kg, antes da exposição à derrota social (3 dias consecutivos) e avaliados no teste de partição, após o qual tiveram o hipocampo dissecado e o macerado total, após a normalização da quantidade de proteínas, foi utilizado para o ELISA sanduíche. Resultados expressos como média ± e.p.m. Teste t de Student não pareado. A barra hachurada horizontal representa a média ± e.p.m. de um grupo controle não exposto à derrota social (n=5).

Já a análise por *Western blotting* (figura 23) não mostrou diferença na expressão do GR, após a extração celular total [0,0 vs 0,3: $T(7)=0,99$; $p=0,35$; 0,0 vs controle: $T(7)=0,88$; $p=0,41$]. A expressão do transportador de serotonina (SERT), por sua vez, está reduzida nos animais tratados [$T(7)=2,38$; $p=0,049$] e é maior nos animais derrotados que nos controles [$T(7)=4,98$; $p=0,002$]. A expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro também está reduzida após o tratamento [$T(7)=2,67$; $p=0,32$] com o antagonista NK_1 , mas não é modificada em relação ao controle [$T(7)=1,64$; $p=0,14$].

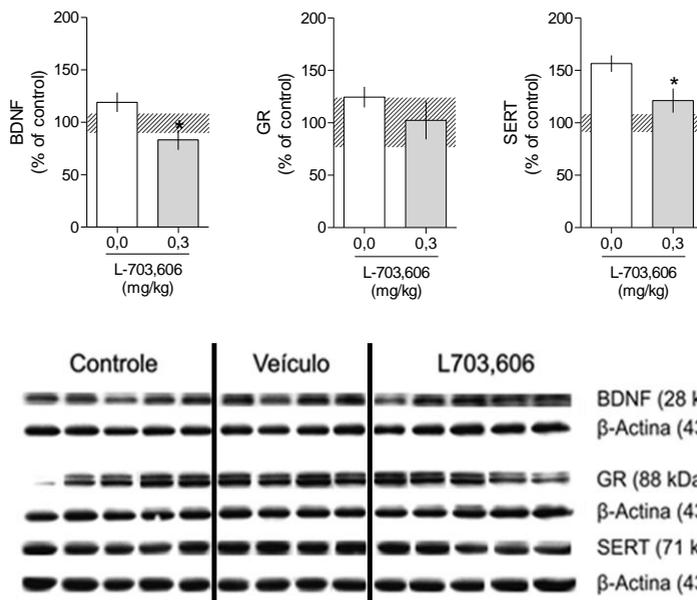


Figura 23: Efeito do tratamento com L-703,606 sobre os níveis de GR, SERT e BDNF no hipocampo de camundongos C57BL/6 machos. Os animais foram tratados com veículo (DMSO 5%) e um antagonista não peptídico do receptor NK_1 (L-703,606) na dose 0,3 mg/kg, antes da exposição à derrota social (3 dias consecutivos) e avaliados no teste de partição, após o qual tiveram o hipocampo dissecado e preparado para *Western blot*. Os resultados foram normalizados em relação à expressão de proteína do grupo controle, que não passou pelo estresse, que está representado (média \pm e.p.m.) pela barra horizontal. Resultados expressos como média \pm e.p.m. Teste t de Student não pareado, * $p < 0,05$ ($n = 4-5$ /grupo). No painel inferior estão representadas as bandas obtidas para cada proteína de interesse e utilizadas para a quantificação de densitometria óptica com o software *ImageJ* (NIH).

MODULAÇÃO DO EIXO HPA PELO PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL

Os animais submetidos à derrota social apresentaram maior concentração de corticosterona e ACTH na circulação e uma tendência a uma maior concentração de corticosterona no hipocampo (**figuras 7 e 8**), que é mais pronunciada no primeiro dia. Além disso, o grupo derrotado apresenta uma menor translocação do GR para o núcleo no primeiro dia do protocolo (**figura 9**). A expressão dos receptores MR em relação aos GR (**figura 10**) e a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β (**figura 11**) não foram alteradas pela derrota social.

Em um trabalho anterior do Laboratório de Neurofarmacologia, Santos (2015) mostrou que não há diferença nos níveis de corticosterona dos animais submetidos à derrota social, em comparação ao controle, quando avaliados 24h após a última sessão. Porém, existe uma redução na expressão do GR no córtex frontal e no hipocampo, avaliada por Western blotting (extrato celular total) e imunofluorescência na região dorsal do hipocampo, que já foi relatada na literatura (Bartolomucci *et al.*, 2004).

A partir destes resultados deduzimos que as alterações na ativação do eixo HPA ocorrem no início do protocolo. Mas devido a uma impossibilidade metodológica de avaliar os níveis de corticosterona e ACTH circulantes nos mesmos animais ao longo do protocolo, delineamos esta etapa do trabalho em dois experimentos distintos. Assim grupos independentes de animais foram submetidos ao protocolo de derrota social por um, dois ou três dias e ao protocolo completo (os três dias de derrota seguidos do teste de partição no quarto dia). Esses animais foram então anestesiados, sangue foi coletado do fígado para análise de corticosterona e eles foram submetidos à perfusão transcardíaca para coleta dos encéfalos para análise imunohistológica. No segundo experimento, grupos independentes de animais foram submetidos ao protocolo de derrota social por um, dois ou três dias e eutanasiados por decapitação para coleta do sangue e dissecação do hipocampo.

Animais submetidos aos diversos protocolos de derrota social presentes na literatura, em geral, apresentam concentrações maiores de ACTH e corticosterona, indicando uma maior ativação do eixo HPA (Martinez; Calvo-Torrent; Pico-Alfonso, 1998; Kudryavtseva; Avguninovich, 1998; Walker *et al.*, 2009; Wagner *et*

al., 2012; Jochems *et al.*, 2015). Essa diferença independe do status do animal, apontando para o efeito do estresse social per se, e não da subordinação, na ativação do eixo HPA (Bartolomucci *et al.*, 2004).

Keeney e colaboradores (2006) mostraram um perfil bifásico da ativação do eixo HPA, onde há maior concentração sistêmica de ACTH e corticosterona, após um episódio de derrota social. Porém, nos protocolos de uma e duas semanas não há diferença nos níveis de corticosterona plasmática, entre controles e derrotados e, após três semanas de derrota social, há um aumento expressivo no grupo derrotado. Os resultados de corticosterona plasmática são correlacionados a uma maior expressão do RNA mensageiro de CRH e de AVP no PVN dos grupos agudo e crônico, respectivamente.

Em nossos resultados podemos observar que há habituação com a repetição do protocolo. Visto que o grupo controle apresenta uma redução dos níveis de corticosterona com a repetição do protocolo, efeito que é mais discreto em relação aos níveis de ACTH. Porém, como esses dois hormônios foram aferidos em amostras diferentes é impossível traçar uma relação direta entre eles.

Visualmente, após uma sessão de derrota social as diferenças entre os grupos são mais aparentes. Desta forma para facilitar a discussão, compilamos uma tabela (**tabela 3**) com a direção das diferenças entre os grupos controle e derrotado nos parâmetros avaliados no segundo experimento: ACTH, corticosterona no hipocampo (CORT), expressão de GR e MR, IL-1 β e TNF- α , apenas após um dia de derrota social.

Tabela 3. Relação entre os grupos derrotado e controle após uma sessão de derrota social nos marcadores avaliados

Derrotado vs controle#:	
ACTH	↑
CORT hipocampo	↑
GR núcleo/citoplasma	↓
MR/GR núcleo	↑
IL-1β	-
TNF-α	↓

#As diferenças anotadas foram resultado de uma análise com teste t de Student. Foram compiladas as respostas apenas das medidas realizadas nos mesmos grupos de animais.

A concentração de corticosterona no hipocampo tem um perfil inverso da translocação nuclear do GR na mesma estrutura nos grupos controle e derrotado no primeiro dia. Essa diferença parece contraditória já que a translocação do GR para o núcleo coincide com o pico de corticosterona plasmática (Jochems *et al.*, 2015). Porém, tal fato pode ser parcialmente explicado pelo atraso (cerca de 25 min) do pico de concentração de corticosterona no encéfalo, em relação ao pico plasmático após o estresse, fato que se deve a ligação da corticosterona à CBG no sangue (Reul *et al.*, 2015).

Outra explicação é a ação da corticosterona via MRs, já que a expressão de MR está aumentada, no núcleo do hipocampo, em relação ao GR nas mesmas amostras. Reforçando o papel dos MRs, temos a observação de que não há qualquer expressão de MR no citoplasma, como demonstrado na **figura S3**. Porém, não avaliamos a expressão destes receptores na membrana celular.

Os níveis de MR e GR no hipocampo parecem ter um papel fundamental na resposta bifásica aos glicocorticoides, já que estes efeitos são pronunciados no hipocampo, especificamente na região CA1, mas não no PVN. Pois, neste núcleo são expressos apenas GR, enquanto no CA1 há uma alta expressão de GR e MR (Joëls, 2006). Acredita-se que o estresse social altera a proporção de expressão MR/GR no hipocampo e conseqüentemente influencia essa resposta bifásica (Buwalda *et al.*, 2001; Veenema *et al.*, 2003).

Porém, não podemos descartar mecanismos de ação da corticosterona não mediados via MR ou GR, como, por exemplo, via receptor de membrana para glicocorticoides, descrito na última década, mas ainda não clonado e identificado, que está ligado à produção de endocanabinóides em resposta ao estresse (Hill; Tasker, 2012). Ou à ativação transitória do receptor de BDNF, TRkB, de forma ligante independente (Karatsoreos; McEwen, 2011).

As citocinas são agentes pleiotrópicos, redundantes e cooperativos e sua liberação em resposta ao estresse depende do tipo de estressor. Essa liberação é mediada pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático e coincide com o pico de liberação de glicocorticoides (Hueston; Deak, 2014). O estresse causado pelo choque elétrico nas patas aumenta a expressão de IL-1 β e diminui a expressão de TNF- α , um padrão oposto ao que nós encontramos. Isso sugere que os estressores de natureza psicossocial apresentam um perfil de neuroinflamação distinto daquele descrito para estressores físicos (Hueston; Deak, 2014; Deak *et al.*, 2015).

Os níveis elevados de IL-1 β após uma sessão de derrota social em relação àqueles após duas e três sugerem que a neofobia

e, potencialmente, a ativação do sistema nervoso autônomo simpático (De Miguel *et al.*, 2011; Hueston; Deak, 2014), influenciam esta liberação e que esta resposta sofre uma adaptação com a repetição do protocolo.

A proliferação de micróglia pode ser mediada via glicocorticoides e seus receptores e glutamato via receptor NMDA (García-Bueno; Caso; Leza, 2008). Além disso, o estresse causado pela derrota social aumenta o tráfego de monócitos e macrófagos para o cérebro onde se diferenciam em células positivas para iba1 (Reader *et al.*, 2015).

Níveis baixos de expressão de citocinas pró-inflamatórias tem papel neurotrófico e neuroprotetor, porém a superprodução dessas citocinas leva a doenças (McEwen, 2012). Os mecanismos de controle da resposta neuroimune ao estresse dependem do sexo, idade, genética e história prévia, pois envolvem múltiplos mediadores, entre eles a noradrenalina, o ATP, padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*), a microbiota, os glicocorticoides e a progesterona (Deak *et al.*, 2015).

Logo, podemos concluir nesta etapa do estudo que o estresse causado pela derrota social leva a uma ativação do eixo HPA. No início levando à inibição da expressão de TNF- α em um mecanismo provavelmente dependente de MR. E com a continuação do protocolo por dois ou três dias há evidência da modulação da atividade do eixo em um mecanismo dependente de GR, confirmando nossa hipótese.

RESILIÊNCIA E VULNERABILIDADE À DERROTA SOCIAL

A estratégia comportamental mais frequentemente adotada frente ao ataque físico, no protocolo de derrota social, foi a postura de submissão, seguida da tentativa de fuga e da imobilidade (**figura 13**), e o escore comportamental estabelecido através de valores arbitrários atribuídos às estratégias de acordo com a prevalência apresentou uma correlação positiva significativa apenas com a frequência de entradas na área da barreira (**tabela 1**). Porém apresentou correlação fraca positiva também com o tempo de exploração da área da barreira e com a duração do comportamento de autolimpeza, indicando que quanto maior o escore maior a exploração da área aversiva no teste de partição. Ainda, encontramos correlações fracas negativas com os comportamentos de avaliação de risco e escavação da serragem, ou seja quanto maior o escore menor a frequência destes comportamentos

defensivos. Nenhuma correlação com os parâmetros locomotores (distância percorrida e frequência de levantamentos) foi observada.

A partir dos dados apresentados, neste capítulo, identificamos subpopulações, que quando expostas ao mesmo protocolo de derrota social, apresentaram comportamento contrastante no teste de partição (**figura 14**). Elas apresentam uma exploração (entradas, permanência e distância percorrida) da área da barreira bastante distinta (resiliente > vulnerável), frequências diferentes de execução dos comportamentos de avaliação de risco (resiliente < vulnerável), mas sem apresentar diferenças na locomoção geral (distância percorrida e levantamentos) e nos comportamentos de autolimpeza e escavação da serragem. Apesar das subpopulações não apresentarem escore comportamental diferente frente à derrota social, apenas a subpopulação vulnerável apresentou o comportamento de imobilidade frente ao ataque (**figura 15**).

Ainda, os grupos selecionados não apresentaram diferença nos níveis de corticosterona plasmática (**figura 18**), mas o grupo resiliente apresentou uma maior expressão relativa ao grupo controle dos genes *Fkbp5* (49%), *Tac1* (5%) e *Tac1r* (13%) que o grupo vulnerável (**figura 19**).

Além disso, corroborando a redução da expressão do gene *Tac1r* (em relação ao controle) no grupo vulnerável, o bloqueio sistêmico do receptor NK₁ anteriormente à exposição ao estresse por derrota social reproduziu o fenótipo vulnerável (**figura 20**) e provocou uma redução do comportamento exploratório (**figura 21**). Estas alterações comportamentais estão acompanhadas de uma maior concentração de substância P (**figura 22**), uma expressão reduzida do transportador de serotonina (SERT) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo, mas sem diferença na expressão do receptor glicocorticoide (GR) (**figura 23**).

Nossa observação sobre a frequência de comportamentos defensivos dos intrusos, frente ao ataque físico, corrobora aquela descrita por Bartolomucci e colaboradores (2004). Eles relataram que a postura de submissão e a tentativa de fuga são os comportamentos mais frequentemente apresentados por animais subordinados. Porém, os comportamentos observados em nosso protocolo de derrota social não podem ser considerados naturalísticos, já que a limitação de espaço força os animais a adotarem posturas defensivas que só são observadas em situações inescapáveis (Blanchard; McKittrick; Blanchard, 2001).

Todos os comportamentos expressos pelos animais frente ao ataque físico podem ser considerados parte de uma estratégia comportamental reativa. Porém, dentro deste cenário de agressão

inescapável, os três comportamentos predominantes tem valências distintas. A tentativa de fuga representa a ativação do sistema nervoso autônomo através da resposta clássica de luta ou fuga e pode ser considerada uma estratégia ativa. A imobilidade corresponde a uma estratégia passiva frente à mesma situação. Enquanto a postura de submissão tem uma característica ambivalente, pois denota a subordinação, ao mesmo tempo em que faz cessar, ou ao menos, pausar o ataque (Bartolomucci *et al.*, 2004; Zozulya *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2009; Koolhaas *et al.*, 2010)

Diversos trabalhos utilizando ratos como animais de experimentação estabelecem correlações diretas entre os perfis proativos e reativos frente à derrota social e seus parâmetros neuroendócrinos (Walker *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2010), imunes (Stefanski, 1998), inflamatórios (Wood *et al.*, 2015), cardiovasculares (Wood *et al.*, 2012) e comportamentais (Wood *et al.*, 2010). Em geral, animais que levam um maior tempo para assumir uma postura de submissão são considerados 'ativos' e/ou resilientes e aqueles que 'se rendem' rapidamente são considerados 'passivos' e/ou vulneráveis.

Apesar de camundongos e ratos terem uma organização de sua estrutura social consideravelmente diferente (enquanto camundongos vivem agrupados em colônias, ratos marcam e defendem seu território - Crowcroft; Rowe, 1963; Barnett, 1975) e seu comportamento diferir consideravelmente em protocolos de derrota social, alterações neuroendócrinas semelhantes às de ratos são encontradas em camundongos (Veenema; Neumann, 2007; de Miguel *et al.*, 2011). A principal diferença entre as espécies é em relação à postura de submissão, já que em ratos há a distinção entre a postura ereta e a de submissão, que é considerada quando o animal se coloca em decúbito dorsal, expondo o ventre ao agressor, enquanto em camundongos as duas posturas fazem parte de um mesmo comportamento de submissão (Miczec *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, a seleção dos grupos vulnerável e resiliente foi feita a partir de uma medida quantitativa de emocionalidade (tempo de exploração da área de interação com o agressor) e não apresentou uma correlação clara e expressiva com a medida qualitativa da estratégia de enfrentamento. Koolhaas e colaboradores (2010), aplicando um modelo humano a animais, preveem tal situação onde a mudança em um eixo de resposta não provoca necessariamente uma mudança no outro, de tal forma que se poderiam identificar quatro comportamentos-traço: tímido, ousado, dócil e reativo. A relação destes comportamentos-traço com

a responsividade ao estresse e a estratégia de enfrentamento fica mais claramente explicada na **figura 24**.

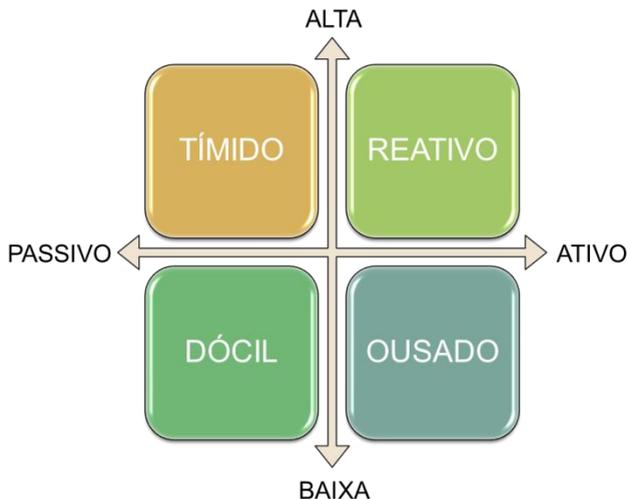


Figura 24: Relação entre os comportamentos-traço com a reatividade ao estresse e a estratégia de enfrentamento. O eixo horizontal representa as estratégias de enfrentamento, medidas de forma qualitativa, variando de passiva à ativa. O eixo vertical representa as medidas quantitativas de reatividade ao estresse, esta medida pode ser comportamental ou hormonal (adaptado de Koolhass *et al.*, 2010).

A resiliência é um processo complexo e que depende de múltiplas variáveis, que podem ser divididas nas seguintes camadas: o ambiente no início na vida, a exposição prévia a estressores de curta duração (inoculação) e fatores de proteção ao estressor (Berry; Kaufer, 2015). Ao longo do desenvolvimento os fatores de risco familiares passam a ter uma menor importância, enquanto os fatores genéticos individuais passam a ser mais relevantes (Kendler, 1995).

Entre os fatores individuais, que podemos destacar, a resposta aos glicocorticoides é essencial para a sobrevivência e a adaptação ao estresse, e tanto a hipo quanto a hipersecreção geram respostas fisiológicas e comportamentais anormais (Herman, 2013). Isso devido ao fato que os glicocorticoides têm um papel importante na formação de memórias traumáticas, pois apesar de aumentarem a consolidação também diminuem a evocação. Qualquer desbalanço neste processo pode levar a respostas fisiológicas e

comportamentais inadequadas frente ao estressor (Castro-Vale *et al.*, 2016).

A ausência de diferença significativa nos níveis de corticosterona plasmática, entre os grupos de animais vulneráveis e resiliente, nos indica que os níveis de glicocorticoides circulantes talvez não sejam uma boa medida fisiológica para resiliência/vulnerabilidade comportamental à derrota social. Ao menos quando medida no teste de partição, o que corrobora o achado de Jochems *et al.* (2015). No entanto, a ausência de diferença nos níveis circulantes de glicocorticoides não descarta completamente uma modulação central do eixo HPA na resiliência/vulnerabilidade, com alterações na expressão ou sensibilidade dos receptores GR e MR, por exemplo.

Um fator chave na modulação da atividade do GR é a expressão da proteína FKBP5, já que mutações do gene que a codifica, em humanos, têm sido apontadas como um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (revisado em Zannas *et al.*, 2016). A FKBP5 é uma imunofilina de 51 kDa da família das proteínas ligantes de FK506. Ela atua como uma co-chaperona que muda o dobramento e a atividade de outras proteínas, além de modular a sensibilidade do GR atrasando sua translocação nuclear. Também se sugere que a superexpressão de *Fkbp5* pode estar relacionada à resistência tecidual aos glicocorticoides (Binder, 2009; Zannas *et al.*, 2016).

Portanto, alterações nesta proteína podem levar a uma redução na eficiência do mecanismo de retroalimentação negativo, prolongando assim o tempo de ativação do eixo HPA (Mizoguchi *et al.*, 2003). Além disso, os GRs e a FKBP5 formam um sistema de controle recíproco formando uma alça de retroalimentação negativa ultracurta. Nesse a ativação de GR induz a expressão de *Fkbp5* que, por sua vez, age como regulador negativo deste receptor, por impedir sua translocação para o núcleo (Binder, 2009).

Em camundongos, a expressão desse gene está aumentada no hipocampo após o estresse por contenção (Scharf *et al.*, 2011) e após 21 dias de um protocolo de derrota social, e este aumento coincide com uma maior translocação do GR para o negativamente correlacionado aos níveis de corticosterona plasmática (Wagner *et al.*, 2012). Dados de camundongos *knockout* para o gene *Fkbp5*, apontam que a deleção de FKBP5 favorece estratégias de enfrentamento ativas frente ao estresse. Por exemplo, maior tempo de natação, maior flexibilidade cognitiva, níveis de corticosterona mais baixos, tanto no basal quanto em resposta ao estresse, e uma

maior expressão de GR e CRH (Touma *et al.*, 2011; Hartmann *et al.*, 2012; Sabbagh *et al.*, 2014).

Desta forma, temos evidências de que a regulação da atividade do eixo HPA no hipocampo é importante para a resiliência ao estresse social. A maior concentração de mRNA *Fkbp5* no hipocampo, sem alteração nos níveis circulantes de corticosterona, do grupo resiliente sugerem uma maior eficiência do mecanismo de retroalimentação negativo do eixo HPA via GR, como ilustrado na **figura 25**. O aumento na expressão de *Fkbp5* nos animais resilientes, sem a alteração dos níveis de corticosterona plasmática, sugere que a FKBP5 esteja atuando em diferentes vias e não apenas na regulação negativa do GR.

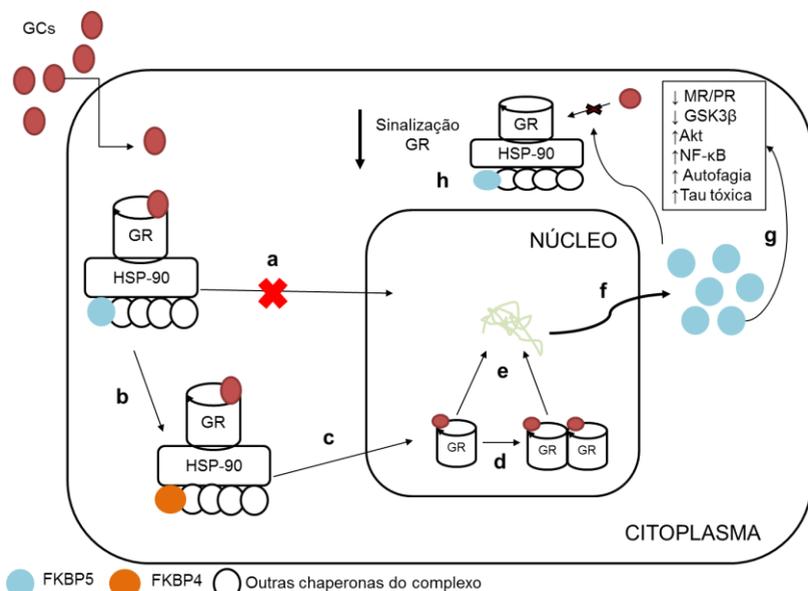


Figura 25: Mecanismo de regulação da resposta glicocorticoide pela proteína FKBP5. A proteína FKBP5 faz parte do complexo de co-chaperonas ligadas ao receptor GR, esta proteína atrasa a translocação nuclear do GR (a), na presença de glicocorticóides ela é substituída pela FKBP4 (b) e o complexo é translocado para o núcleo (c). No núcleo o GR modula a transcrição de diversos genes (ativando ou suprimindo) (e) seja por interagir com fatores de transcrição ou formando um homodímero (d) que se liga a elementos responsivos aos glicocorticóides (GRE), dentre estes genes está o *Fkbp5*. O RNA mensageiro *Fkbp5* é translocado ao citoplasma (f) onde é traduzido a FKBP5, a proteína pode atuar nas diversas vias exemplificadas na figura (g), mas também inibe a atividade do GR (h), formando uma alça de retroalimentação negativa intracelular

ultracurta da atividade do GR (Adaptado de Binder, 2009 e Zannas *et al.*, 2016).

Conforme relatado na introdução, os neuropeptídeos são uma classe de mediadores relevantes para a resposta ao estresse e para a neurobiologia dos transtornos psiquiátricos. Dentre os peptídeos de interesse, a substância P (SP) se destaca devido a seu envolvimento na modulação de emoções e da resposta ao estresse (Papathanassoglou *et al.*, 2010). Sabe-se que o estresse estimula a liberação de SP em estruturas encefálicas (septo lateral, o locus coeruleus, a amígdala e o núcleo accumbens) envolvidas na resposta ao estresse (Ebner *et al.*, 2008) e a ativação do eixo HPA promove a transcrição do gene *Tac1*, via GR (Hay *et al.*, 2014). O gene *Tac1* codifica alguns dos peptídeos da família das taquicininas: substância P, neurocinina A, neuropeptídeo K e neuropeptídeo γ (Steinhoff *et al.*, 2014).

O domínio carboxi terminal da SP está relacionado às suas atividades agonísticas (Mussap; Geraghty; Burcher, 1993). Enquanto o domínio amino terminal confere seletividade aos diferentes tipos de receptores – NK₁, NK₂ e NK₃ (para revisão ver Otsuka; Yoshioka, 1993; Regoli; Boudon; Fauchère, 1994), sendo o NK₁ o principal receptor pelo qual a SP exerce seus efeitos (Maggi *et al.*, 1993; Stables *et al.*, 1994; Patacchini; Maggi, 1995; Culman; Unger, 1995). Estudos morfológicos apontam uma abundância dos receptores taquicinérgicos em estruturas do sistema límbico (amígdala, formação hipocampal e córtex pré-frontal) e em estruturas que regulam a ativação do eixo HPA, como os núcleos hipotalâmicos (Griebel; Holsboer, 2012).

A ausência de diferença na expressão do GR, tanto em resposta ao protocolo quanto ao tratamento, pode ser devida a uma questão metodológica, já que analisamos a expressão de proteínas no extrato celular total do hipocampo. Isso impediu a investigação de diferenças na translocação nuclear deste receptor, que poderia nos fornecer informações interessantes. Desta forma, não se pode descartar o papel modulador da substância P sobre o eixo HPA, com base neste resultado.

Um dos mecanismos propostos para a modulação da resposta ao estresse é a modulação da transmissão serotoninérgica, com a ativação de autorreceptores 5-HT_{1A} e o aumento da liberação, do efluxo e da liberação de serotonina (5-HT). Porém, ainda existem dúvidas se esta modulação ocorre de forma direta (colocalização) ou indireta, via interneurônios GABAérgicos, ou pela modulação de fibras noradrenérgicas do *locus coeruleus* (Santarelli *et al.*, 2001;

Ebner *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram um aumento expressivo do transportador de serotonina (SERT), indicando que a transmissão serotoninérgica pode ter um papel importante na resposta ao protocolo de conflito social utilizado, contudo esse aumento está reduzido no grupo tratado com o antagonista do receptor NK₁. Assim a transmissão serotoninérgica pode ter um papel importante na resposta à derrota social e sua redução através do bloqueio do sistema taquicinérgico pode estar envolvida na vulnerabilidade ao estresse.

Além disso, as taquicinininas estão implicadas na regulação da sobrevivência e degeneração neuronal (Marriot, 2004). Assim como nosso achado de uma redução na expressão de BDNF no hipocampo, no grupo tratado com L-703,606, outros pesquisadores relataram uma diminuição do NK₁R e de BDNF no hipocampo, após o estresse por contenção e após um estímulo nociceptivo periférico (Duric; McCarson, 2005, 2006, 2007).

Ademais, a ligação da substância P ao receptor NK₁ provoca a internalização do complexo, com a degradação do ligante e depleção no receptor da superfície celular, promovendo a liberação de substância P na célula, Assim, o tratamento com antagonistas não promove a internalização dos receptores e previne a internalização provocada pela ligação da substância P (Garland *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2007).

Logo, com a maior liberação de substância P no hipocampo em resposta ao estresse causado pela derrota social, e devido ao bloqueio sistêmico dos receptores NK₁, a substância P pode ser clivada em peptídeos menores. Assim a sua porção carboxi-terminal, que apresenta maior afinidade pelos receptores NK₃, poderia agir como antagonista e levar, conseqüentemente, a um aumento das respostas defensivas (Duarte *et al.*, 2016).

Portanto, é possível concluir, que mecanismos de modulação da atividade do eixo HPA no hipocampo são importantes tanto para a vulnerabilidade, quanto para a resiliência ao estresse social. Encontramos evidências de que a translocação nuclear do GR, com a conseqüente transcrição de *Fkbp5*, estão associados à resiliência devido a um mecanismo de retroalimentação negativo eficiente. Por outro lado, o excesso de substância P no hipocampo, um neuropeptídeo capaz de ativar a atividade do eixo HPA, promove vulnerabilidade à derrota social por uma via independente do receptor NK₁, envolvendo a transmissão serotoninérgica, corroborando o papel deste receptor na resiliência.

SUMÁRIO GRÁFICO DOS RESULTADOS

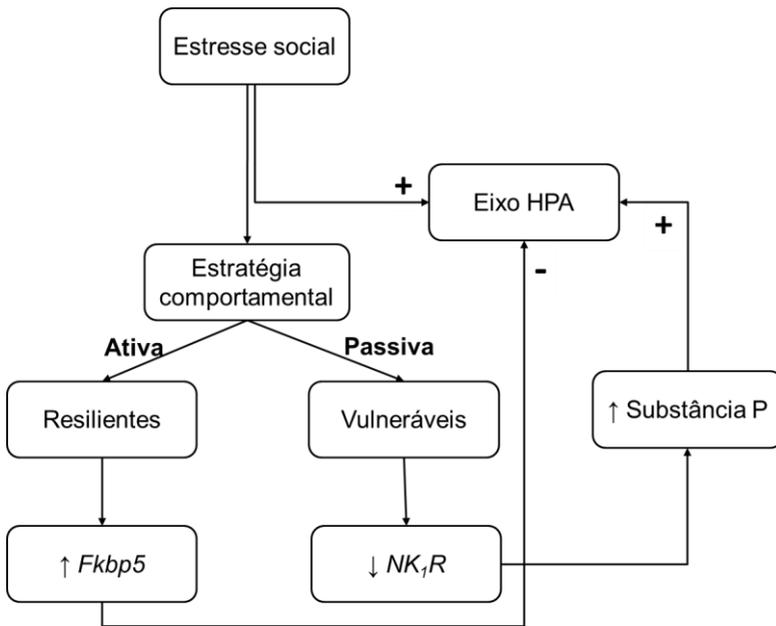


Figura 26: O estresse social causado pela derrota social leva à ativação do eixo HPA após o primeiro episódio e a sua modulação negativa com a repetição do protocolo. Através da observação da estratégia comportamental frente ao ataque físico é possível identificar estratégias ativas que estão relacionadas a um comportamento resiliente enquanto estratégias passivas estão associadas a um comportamento vulnerável. Os animais resilientes apresentam uma maior expressão do gene *Fkbp5* no hipocampo que indica uma modulação negativa do eixo HPA. Já comportamentos vulneráveis estão associados a uma redução na expressão do gene *Tacr1* no hipocampo ou com o antagonismo farmacológico (por via sistêmica) deste receptor que quando associados a níveis altos de substância P no hipocampo levam a ativação do eixo HPA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho evidenciamos o potencial do modelo de derrota social repetido por três dias no estudo das consequências neurobiológicas, endócrinas e comportamentais do estresse social. Com nossos achados lançamos a base para uma investigação farmacológica que manipule as diferenças individuais da ativação do eixo HPA levando a fenótipos resilientes e vulneráveis, seja através da manipulação direta dos receptores GR ou através de neuropeptídeos, como a substância P, que regulam a ativação do eixo HPA. Trabalhos futuros devem focar nas alterações presentes em outras estruturas do sistema límbico como a amígdala, o córtex pré-frontal e o núcleo accumbens e sua relação com a ativação do eixo HPA.

Referências bibliográficas

- AYROLDI, E. *et al.* Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. **The FASEB Journal**, v. 26, p. 4805–4820, 2012.
- BALI, A.; SINGH, N.; JAGGI, A.S. Neuropeptides as therapeutic targets to combat stress-associated behavioral and neuroendocrinological effects. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 347–368, 2014.
- BARNETT, S.A. **The rat. A study in behavior**. Chicago: University of Chicago Press; 1975.
- BARTOLOMUCCI, A. *et al.* Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, p. 899–910, 2004.
- BAULIEU, E.E.; ROBEL, P. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 4089–4091, 1998.
- BEERY, A.K.; KAUFER, D. Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 116–127, 2015.
- BENI-ADANI, L. *et al.* A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates injury response in closed head injury in mice. **Journal of Pharmacology Experimental Therapy**, v. 296, n. 1, p. 57–63, 2001.
- BERTON, O. *et al.* Induction of Δ FosB in the Periaqueductal Gray by Stress Promotes Active Coping Responses. **Neuron**, v. 55, n. 2, p. 289–300, 2007.
- BINDER, E.B. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34 (Suppl. 1), S186–S195, 2009.

- BLANCHARD, R.J.; MCKITTRICK, C.R.; BLANCHARD, D.C. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 3, p. 261–271, 2001.
- BRAIN, P. The rat: A study in behavior. In: Barnett, S. A. The University of Chicago Press: Chicago, revised edition 1976, pp 318. **Aggressive Behavior**, v. 2, n. 2, p. 164–165, 1976.
- BRASIL. **Lei nº11794**, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato20072010/2008/lei/11794.htm
- BREMNER, J.D. Neuroimaging in Posttraumatic Stress Disorder and Other Stress-Related Disorders. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 17, n. 4, p. 523–538, 2007. .
- BROWN, K.J.; GRUNBERG, N.E. Effects of housing on male and female rats: crowding stresses males but calms females. **Physiology & Behavior**, 58, p. 1085–1089, 1995.
- BUWALDA, B., et al. Temporal and spatial dynamics of corticosteroid receptor down-regulation in rat brain following social defeat. **Physiology & Behaviour**, v. 72, p. 349-354, 2001.
- CABRAL, S.A.; LEVANDOWSKI, D. A. Resiliência e psicanálise: aspectos teóricos e possibilidades de investigação. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental** v. 16, n. 1, p. 42-55, 2013.
- CASTRO-VALE, I. *et al.* Genetics of glucocorticoid regulation and posttraumatic stress disorder--What do we know? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 63, p. 143-57, 2016.
- CASU, M.A. *et al.* Effects of acute and chronic valproate treatments on p-creb levels in the rat amygdala and nucleus accumbens. **Brain research**, v. 1141, p.15-24, 2007.
- CENQUIZCA, L.A.; SWANSON, L.W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the

- cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, v. 56, p. 1–26, 2007.
- CHAKRABORTY, N. *et al.* Gene and stress history interplay in emergence of PTSD-like features. **Behavioural Brain Research**, v. 292, p. 266–277, 2015.
- CHALLIS, C.; BECK, S.G.; BERTON, O. Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v.8, p. 8-43, 2014.
- CHO, J. *et al.* Molecular evidence of stress-induced acute heart injury in a mouse model simulating posttraumatic stress disorder. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 8, p. 3188-93, 2014.
- CROWCROFT, P.; ROWE, F. P. Social organization and territorial behavior in the. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 140, n. 3, p. 517–531, 1963.
- CRUZ-TOPETE, D.; CIDLOWSKI, J.A. One Hormone, Two Actions: Anti and Pro-Inflammatory Effects of Glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, p. 20–32, 2015.
- CULMAN, J.; UNGER, T. Central tachykinins: mediators of defense and stress reactions. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 885-891, 1995.
- DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 13 jun. 2005.
- DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S.; JOELS, M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? **Trends in Neurosciences**, v. 22, p. 422–426, 1999.
- DE MIGUEL, Z. *et al.* Behavioral coping strategies in response to social stress are associated with distinct neuroendocrine, monoaminergic and immune response profiles in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 2, p. 554–561, 2011.
- DEAK, T. *et al.* Neuroimmune mechanisms of stress: sex differences, developmental plasticity, and implication for

pharmacotherapy of stress-related disease. **Stress**, v. 18, n. 4, p. 367-380, 2015.

Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. — 5th ed. **American Psychiatric Association**, 2013.

DOULAMES, V.M. *et al.* Social interaction attenuates the extent of secondary neuronal damage following closed head injury in mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, n. 275, p.1-10, 2015.

DUARTE, F. S. *et al.* Evidence for involvement of NK3 receptors in the anxiogenic-like effect of SP6-11(C-terminal), a metabolite of substance P, in rats evaluated in the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 303, p. 168–175, 2016.

DULKA, D. *et al.* Phenotypic responses to social defeat are associated with differences in cued and contextual fear discrimination. **Behavioural Processes**, v. 118, p. 115-122, 2015.

DURIC, V.; MCCARSON, K.E. Neurokinin-1 (NK-1) receptor and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is differentially modulated in the rat spinal dorsal horn and hippocampus during inflammatory pain. **Molecular Pain**, v. 3, n. 32, p. 1-9, 2007.

DURIC, V.; MCCARSON, K. E. Effects of Analgesic or Antidepressant Drugs on Pain- or Stress-Evoked Hippocampal and Spinal Neurokinin-1 Receptor and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Expression in the Rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 3, 2006.

DURIC, V.; MCCARSON, K. E. Hippocampal neurokinin-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor gene expression is decreased in rat models of pain and stress. **Neuroscience**, v. 133, n. 4, p. 999–1006, 2005.

DWIVEDI, Y.; RIZAVI, H.S.; PANDEY, G.N. Differential effects of haloperidol and clozapine on [(3)H]cAMP binding, protein kinase A (PKA) activity, and mRNA and protein expression of selective regulatory and catalytic subunit isoforms of PKA in rat brain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 301, p. 197-209, 2002.

- EBNER, K. *et al.* Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1144, pp. 61–73, 2008.
- EYER, J.; STERLING, P. Stress-related mortality and social organization. **Review of Radical Political Economics**, v. 9, n.1, p. 1-44, 1977.
- FERREIRA, J. *et al.* Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain**, v.117, p. 171-181, 2005.
- FLESHNER, M. *et al.* The neurobiology of the stress-resistant brain. **Stress**, v. 14, n. 5, p. 498-502, 2011.
- FOLKMAN, S.; LAZARUS, R.S. An Analysis of Coping in a Middle-Aged Community Sample. **Journal of Health and Social Behavior**, v. 21, n. 3, p. 219, set. 1980.
- FOX, L.C. *et al.* Differential effects of glucocorticoid and mineralocorticoid antagonism on anxiety behavior in mild traumatic brain injury. **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 362-365, 2016.
- GÁRCIA-BUENO, B.; CASO, J.R.; LEZA, J.C. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 6, p. 1136-51, 2008.
- GARLAND, A.M. *et al.* Agonist-induced internalization of the substance P (NK1) receptor expressed in epithelial cells. **Biochemical Journal**, v. 303, n. 1, 1994.
- GILBERTSON, M.W. *et al.* Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 1242–1247, 2002.
- GLASS, D.C. Psychological and physiological responses of individuals displaying type A behaviour. **Acta Medica Scandinavica**, v. 660, n. S660, p. 193–202, 24 abr. 1982.
- GOLDEN, S.A. *et al.* A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, p. 1183–1191, 2011.

- GOMEZ-SANCHEZ, E.; GOMEZ-SANCHEZ, C.E. The Multifaceted Mineralocorticoid Receptor. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 965–994, 2014.
- GOTTESMAN, I.I.; SHIELDS, J. Genetic theorizing and schizophrenia. **British Journal of Psychiatry**, v. 122, p. 15–30, 1973.
- GRIEBEL, G.; HOLSBOER, F. Neuropeptide receptor ligands as drugs for psychiatric diseases: the end of the beginning? **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 11, p. 462–478, 2012.
- HAMMAMIEH R., *et al.* Murine model of repeated exposures to conspecific trained aggressors simulates features of post-traumatic stress disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 235, n. 1, p. 55–66, 2012.
- HARTMANN, J. *et al.* The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 332–339, 2012.
- HAY, C. W. *et al.* Functional effects of polymorphisms on glucocorticoid receptor modulation of human anxiogenic substance-P gene promoter activity in primary amygdala neurones. **Psychoneuroendocrinology**, v. 47, p. 43–55, 2014.
- HEEGDE, F.; DE RIJK, R.H.; VINKERS, C.H. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 92–110, 2015.
- HERMAN, J.P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 74–85, 2013.
- HILL, M.N.; TASKER, J.G. Endocannabinoid signaling, glucocorticoid- mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Neuroscience**, v. 204, p. 5–16, 2012.
- HOLMES, A.; SINGEWALD, N. Individual differences in recovery from traumatic fear. **Trends in Neuroscience**, v. 36, n. 1, p. 23–31, 2013.
- HUESTON, C.M.; DEAK, T. The inflamed axis: the interaction between stress, hormones, and the expression of inflammatory-related genes within key structures comprising

- the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **Physiology and Behaviour**, v. 124, p. 77–91, 2014.
- Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, D.C.: National Academy Press; 2010: 248.
- JOCHEMS, J. *et al.* Enhancement of Stress Resilience Through Histone Deacetylase 6–Mediated Regulation of Glucocorticoid Receptor Chaperone Dynamics. **Biological Psychiatry**, v. 77, p. 345–355, 2015.
- JOËLS, M. Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 27, p. 244–250, 2006.
- JOËLS, M.; BARAM, T.Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 459–66, 2009.
- KARATSOREOS, I.L.; MCEWEN, B.S. Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 15, n. 12, 2011.
- KEENEY, A. *et al.* Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic–pituitary–adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, p. 330–338, 2006.
- KENDLER, K.S. Genetic epidemiology in psychiatry. Taking both genes and environment seriously. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, p. 895–899, 1995.
- KENDLER, K.S.; KARKOWSKI, L.M.; PRESCOTT, C.A. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. **The American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 6, p. 837–841, 1999.
- KOLLACK-WALKER, S. *et al.* Differential Expression of c-fos mRNA Within Neurocircuits of Male Hamsters Exposed to Acute or Chronic Defeat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 7, p. 547–559, 1999.
- KOLLACK-WALKER, S.; WATSON, S.J.; AKIL, H. Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. **The Journal of neuroscience**, v. 17, n. 22, p. 8842–8855, 1997.

- KOOLHAAS, J. *et al.* Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p. 925–935, 1999.
- KOOLHAAS, J. M. *et al.* Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, n. 3, p. 307–321, 2010.
- KORMOS, V.; GASZNER, B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: From animals to humans. **Neuropeptides**, v. 47, n. 6, p. 401–419, 2013.
- KRISHNAN, V. *et al.*, Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 391-404, 2007.
- KRAFT, A.D.; HARRY, G.J. Features of Microglia and Neuroinflammation Relevant to Environmental Exposure and Neurotoxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 7, p. 2980–3018, 2011.
- KUDRYAVTSEVA, N.N. Experience of defeat decreases the behavioural reactivity to con-specifics in the partition test. **Behavioural Processes**, v. 32, n.3, p. 297–304, 1994.
- KUDRYAVTSEVA, N.N.; AVGUSTINOVICH, D.F. Behavioral and physiological markers of experimental depression induced social conflicts (DISC). **Aggressive Behaviour**, v. 24, p. 271-286, 1998.
- KUDRYAVTSEVA, N.N.; BAKSHTANOVSKAYA, I.V.; KORYAKINA, L.A. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 38, n. 2, p. 315–320, 1991.
- LARANJEIRA, C.A.S.J. Do invulnerável ser ao resiliente envelhecer: revisão de literatura. **Psicologia: teoria e pesquisa**, v. 23, n. 3, p. 327-332, 2007.
- LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, p. 939–946, 2005.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

- MAGGI, C.A. *et al.* Evidence for the presence of a septide-sensitive tachykinin receptor in the circular muscle of the guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 235, n. 2–3, p. 309–311, 1993.
- MARINO, J.S. *et al.* Glucocorticoid receptor β induces hepatic steatosis by augmenting inflammation and inhibition of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, p. 9383–94, 2016.
- MARRIOT, I. The role of tachykinins in the CNS inflammatory responses. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 2153-2165, 2004.
- MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A.; PICO-ALFONSO, M.A. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: A review. **Aggressive Behavior**, v. 24, p. 241-256, 1998.
- MARTINEZ, M.; PHILLIPS, P. J.; HERBERT, J. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 20–33, 1998.
- MCEWEN, B.; WEISS, J.; SCHWARTZ, L. Selective retention of corticosterone by limbic structures in the rat brain. **Nature**, v. 220, p. 911–912, 1968.
- MCEWEN, B.S. Brain on stress: how the social environment gets under the skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, s. 2, p. 17180-5, 2012.
- MCEWEN, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 873–904, 2007.
- MCEWEN, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, p. 367–381, 2006.
- MCEWEN, B.S.; WINGFIELD, J.C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 2–15, 2003.

- MCEWEN, B.S.; GRAY, J.D.; NASCA, C. Neurobiology of Stress Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 1-11, 2015.
- MICZEC, F.A. *et al.* Aggression and defeat: persistent effects on cocaine self-administration and gene expression in peptidergic and aminergic mesocorticolimbic circuits. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n.8, p. 787-802, 2004.
- MIZOGUCHI, K. *et al.* Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the pre-frontal cortex and hippocampus. **Neuroscience**, v. 119, p. 887-897, 2003.
- MUSSAP, C. J.; GERAGHTY, D. P.; BURCHER, E. Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, p. 1987-2009, 1993.
- NILSSON, M. E. *et al.* Measurement of a comprehensive sex steroid profile in rodent serum by high-sensitive gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Endocrinology**, v. 156, n. 7, p. 2492-502, 2015.
- OAKLEY, R.H.; CIDLOWSKI, J.A. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.132, n. 5, p. 1033–1044, 2013.
- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiological Reviews**, v. 73, p. 229-308, 1993.
- PALANZA, P.; GIOIOSA, L.; PARMIGIANI, S. Social stress in mice. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 3, p. 411–420, jun. 2001.
- PAPATHANASSOGLU, E. *et al.* Potential effects of stress in critical illness through the role of stress neuropeptides. **Nursing in critical care**, v. 15, n. 4, p. 204-216, 2010.
- PATACCHINI, R.; MAGGI, C.A. Tachykinin receptors and receptor subtypes. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 329, p. 161-184, 1995.
- PFAU, M.L.; RUSSO, S.J. Peripheral and central mechanisms of stress resilience. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 66-79, 2015.
- READER, B.F. *et al.* Peripheral and Central Effects of Repeated Social Defeat Stress: Monocyte Trafficking, Microglial

- Activation, and Anxiety. **Neuroscience**, v. 289, p. 429–442, 2015.
- REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHÉRE, J. L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacology Reviews**, v. 46, p. 551-599, 1994.
- REUL, J.M.H.M. et al. Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience, **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 44-59, 2015.
- REUL, J.M.H.M., DE KLOET, E.R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v. 117, p. 2505-2512, 1985.
- ROGERSON, F.M.; BRENNAN, F.E.; FULLER, P.J. Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 217, n. 1-2, p. 203-12, 2004.
- ROMERO, L.; SAPOLSKY, R. Patterns of ACTH secretion in response to psychological stimuli. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, n. 4, p. 243-258, 1996.
- RUSSO, S.J. *et al.* Neurobiology of resilience. **Nature Neuroscience Reviews**, v. 15, n. 11, p. 1475-1484, 2012.
- SABBAGH, J.J. *et al.* Age-Associated Epigenetic Upregulation of the FKBP5 Gene Selectively Impairs Stress Resiliency. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107241, 2014.
- SAKAI, R.R.; TAMASHIRO, K.L.K. Social hierarchy and stress. In: STECKLER, T.; KALIN, N.H.; REUL, J.M.H.M. (Eds.) **Handbook of Stress and the Brain, Part 2 Stress: Integrative and clinical aspects**, cap. 1.6, v. 15, p. 113-132, Elsevier, 2005.
- SANTARELLI, L. *et al.* Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 1912-1917, 2001.
- SANTOS, E.C.S. Ativação astrocitária e envolvimento do sistema taquicinérgico em um modelo animal de transtorno de estresse pós-traumático. Tese de doutorado, UFSC, Florianópolis, 2015.

- SAPOLSKY, R.M. **Why zebras don't get ulcers?** 3rd edition, St. Martin's Press: New York, NY, USA, 2004.
- SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.
- SCHARF, S.H. *et al.* Expression and regulation of the Fkbp5 gene in the adult mouse brain. **PLoS One**, v. 6, e16883, 2011.
- SCHESCHOWITSCH, K.; LEITE, J.A.; ASSREUY, J. New insights in glucocorticoid receptor signaling - More than just a ligand-binding receptor. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 16, p.1-10, 2017.
- SCHOENFELD, T.J.; GOULD, E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 12–21, 2012.
- SEEMAN, T.E. *et al.* Social relationships, gender, and allostatic load across two age cohorts. **Psychosomatic Medicine**, v. 64, n. 3, p. 395-406, 2002.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.
- SELYE, H. *The Physiology and Pathology of Exposures to Stress.* **Acta Medica Publ.**, Montreal, 1950.
- SELYE, H. **The stress of life.** Revised edition, McGraw Hill, USA, 1978.
- SHIN, L.M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 169-91, 2010.
- SORRELLS, S.F.; SAPOLSKY, R.M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 3, p. 259–272, 2007.
- STABLES, J.M. *et al.* GR138676, a novel peptidic tachykinin antagonist which is potent at NK3 receptors. **Neuropeptides**, v. 27, p. 333-341, 1994.
- STEFANSKI, V.; ENGLER, H. Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. **Physiology & Behavior**, v. 64, n. 5, p. 733–741, 1998.

- STEINHOFF M. S. *et al.* Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 265-301, 2014.
- STERLING, P. Principles of allostasis: optimal design, predictive regulation, pathophysiology and rational therapeutics. In: SCHULKIN, J. **Allostasis, Homeostasis, and the Costs of Adaptation**. Cambridge University Press, 2004.
- STERLING, P.; EYER, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: FISHER, S.; REASON, J., (eds) **Handbook of life stress, cognition and health**, p. 629-649, John Wiley & Sons, 1988.
- STREIT, W.J.; MRAK, R.E.; GRIFFIN, W.S.T. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. **Journal of Neuroinflammation**, v. 1, n. 14, p. 1-4, 2004.
- TANG, H. *et al.* Activation of the neurokinin-1 receptor by substance P triggers the release of substance P from cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. **Molecular pain**, v. 3, n. 42, p. 1-10, 2007.
- TAYLOR, S. *et al.* Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not flight-or-fight. **Psychological Review**, v. 107, n. 3, p. 411-429, 2000.
- TOTH, I.; NEUMANN, I. Animal models of social avoidance and social fear. **Cell Tissue Research**, v. 354, p. 107-118, 2013
- TOUMA, C. *et al.* FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: Modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 10, p. 928-936, 2011.
- ULRICH-LAI, Y.M.; HERMAN, J.M. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 397-409, 2009.
- VAN DER WERFF, S.J.A. *et al.* Neuroimaging resilience to stress: a review. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 21-34, 2013.
- VEENEMA, A.H.; NEUMANN, I.D. Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse

- and rat selection lines. **Brain, behavior and evolution**, v. 70, n. 4, p. 274–85, 2007.
- VEENEMA, A.H. *et al.* Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 197-204, 2003.
- VEGAS, O. *et al.* Social stress, coping strategies and tumor development in male mice: behavioral, neuroendocrine and immunological implications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, p. 69–79, 2006.
- VIAU, V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and –adrenal axis. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 14, p. 506-513, 2002.
- WAGNER, K.V. *et al.* Differences in FKBP51 Regulation Following Chronic Social Defeat Stress Correlate with Individual Stress Sensitivity: Influence of Paroxetine Treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, p. 2797–2808, 2012.
- WALKER, F.R. *et al.* Coping with defeat: acute glucocorticoid and forebrain responses to social defeat vary with defeat episode behaviour. **Neuroscience**, v. 162, n. 2, p. 244–253, 2009.
- WOOD, S.K. *et al.* Depressive and cardiovascular disease comorbidity in a rat model of social stress: a putative role for corticotropin-releasing factor. **Psychopharmacology**, v. 222, n. 2, p. 325–336, 2012.
- WOOD, S.K. *et al.* Individual differences in reactivity to social stress predict susceptibility and resilience to a depressive phenotype: Role of corticotropin-releasing factor. **Endocrinology**, v. 151, n. 4, p. 1795-1805, 2010.
- WOOD, S.K. *et al.* Inflammatory Factors Mediate Vulnerability to a Social Stress-Induced Depressive-like Phenotype in Passive Coping Rats. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 1, p. 38–48, 2015.
- WU, G. *et al.* Understanding resilience. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 6-20, 2013.
- YANG, R. *et al.* Core modular blood and brain biomarkers in social defeat mouse model for post traumatic stress disorder. **BMC Systems Biology**, 7:80, p. 1-12, 2013.

- ZANNAS, A.S *et al.* Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 261-74, 2016.
- ZOZULYA, A.A. *et al.* Personality, Coping Style, and Constitutional Neuroimmunology. **Journal of Immunotoxicology**, v. 5, n. 2, p. 221–225, 2008.

APÊNDICE A: FIGURAS SUPLEMENTARES

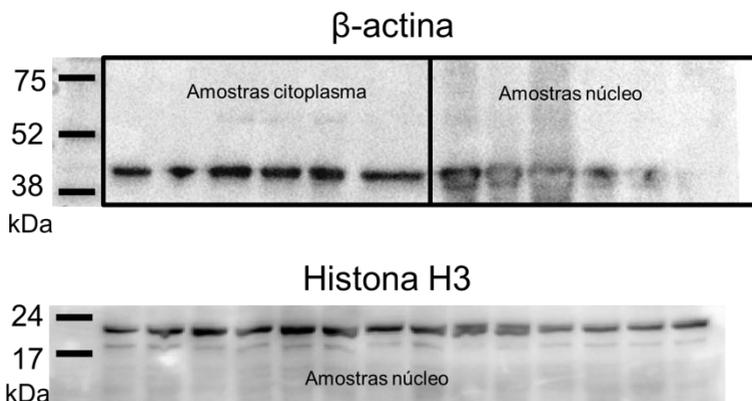


Figura S1: Controle de carregamento do *Western blotting* para amostras de citoplasma e núcleo. Níveis de β -actina e Histona 3, por *Western blotting*, no núcleo e no citoplasma de amostras de hipocampo de animais submetidos a 1, 2 e 3 dias de conflito social e em seus respectivos controles não expostos à derrota social.

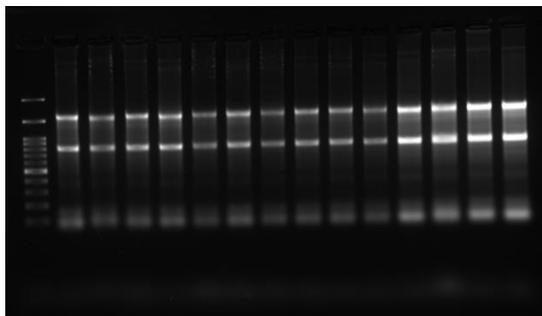


Figura S2: Teste de integridade do RNA extraído. A integridade do RNA extraído foi verificada em um gel de agarose, utilizando Gel Red® (VWR, EUA) como intercalante, onde se puderam observar as duas bandas correspondentes às frações ribossomais (18S e 28S), quando o RNA está degradado há a formação de um arraste 'nuvem'.

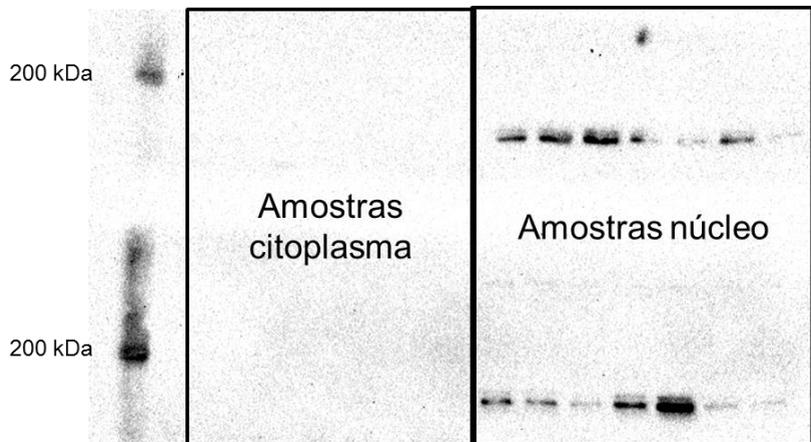


Figura S3: Western blotting para MR em amostras de citoplasma e núcleo. Níveis de MR, por *Western blotting*, no núcleo e no citoplasma de amostras de hipocampo de animais submetidos a 1, 2 e 3 dias de conflito social e em seus respectivos controles não expostos à derrota social.

APENDICE B: A COMBINAÇÃO DA DERROTA SOCIAL COM O TRAUMATISMO CRÂNIO ENCEFÁLICO COMO UM MODELO DE TEPT

INTRODUÇÃO

O conceito de endofenótipo foi introduzido na psiquiatria em 1973 por Irving Gottesman e J. Shields. Ele é definido como um processo interno que pode ser medido objetivamente, idealmente de forma robusta e confiável, uma característica que está frequentemente ausente no estudo do transtorno como um todo. O estudo de endofenótipos de transtornos psiquiátricos apresenta resultados mais confiáveis em relação aos achados biológicos sem, contudo, apresentar uma influência genética mais simplista que aquela observada para o transtorno em si (Flint; Munafò, 2007).

A extinção de respostas de medo condicionado é sugerida como modelo de um endofenótipo do transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), pois está relacionada principalmente ao critério B, definido na quinta edição do Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-5, American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders). Este transtorno é classificado no DSM-5 como um transtorno relacionado ao trauma e ao estresse e estabelece cinco critérios principais para o diagnóstico de TEPT: (A) exposição a um evento traumático como, por exemplo, morte, ameaça de morte, um ferimento sério ou violência sexual; (B) presença de sintomas intrusivos, que podem se manifestar como memórias intrusivas do evento traumático, sonhos angustiantes (pesadelos), reações dissociativas ou flashbacks e respostas fisiológicas e psicológicas intensas a pistas do trauma; (C) esquiva de estímulos que se assemelhem ao evento traumático; (D) alterações negativas de humor e cognição; (E) alterações evidentes na excitação e na reatividade associadas ao evento traumático. Os critérios adicionais para o diagnóstico estipulam que os sintomas devem durar pelo menos mais de um mês, causar sofrimento significativo e não estar relacionado ao uso de nenhuma substância ou condição médica.

Logo, entender como um evento traumático gera uma memória que é tão intensa e perturbadora é central para a investigação dos mecanismos neurobiológicos do TEPT e para a pesquisa de novas opções de tratamento. Neste sentido, como a inibição de uma memória de medo está prejudicada em pacientes com TEPT, o paradigma clássico de medo associativo tem sido

amplamente utilizado para modelar aspectos do TEPT, como a resposta de medo condicionado exagerada, generalização da resposta de medo e prejuízos de extinção e retenção da extinção (Daskalakis; Yehuda; Diamond, 2013; Holmes; Singewald, 2013).

Diversos fatores biológicos podem predispor ao TEPT. Um dos fatores mais importantes é o traumatismo crânio-encefálico (TCE), que está presente em 48% dos veteranos militares com TEPT nos EUA (DSM-V) e é a principal causa de morte de jovens do sexo masculino em países desenvolvidos (Maas; Stocchetti; Bullock, 2008; Boto *et al.*, 2009). O TCE é definido como 'uma alteração da função cerebral, ou outra evidência de patologia encefálica, que é causada por uma força externa'. Onde a alteração da função cerebral pode ser:

- ✓ perda ou redução no nível de consciência,
- ✓ perda de memória,
- ✓ deficits neurológicos e
- ✓ alterações no estado mental no momento da lesão;

Quanto à força externa, existem quatro possibilidades principais: (1) a cabeça ser atingida/atingir um objeto; (2) o encéfalo sofre um movimento de aceleração/desaceleração; (3) uma lesão penetrante; (4) forças geradas por uma explosão. O terceiro fator, no diagnóstico do TCE, não é tão claramente definido e as evidências de patologia cerebral podem incluir exames visuais, neuroradiológicos ou de laboratório que comprovem dano encefálico (Menon *et al.*, 2010). Entre os parâmetros que confirmam dano encefálico o mais utilizado é a investigação de alterações na densidade ou na integridade de matéria branca através de exames de imagem, como a ressonância magnética (Daniels *et al.*, 2013).

A fisiopatologia do TCE envolve uma lesão primária e uma lesão secundária. A lesão primária pode ser uma lesão focal ou uma lesão axonal difusa dependendo do tipo de força externa causadora. A lesão focal ocorre quando a cabeça atinge ou é atingida por um objeto e pode se apresentar como hemorragia e/ou contusão, tanto no sítio do impacto quanto no pólo oposto (golpe-contragolpe). A lesão axonal difusa por sua vez está presente após lesões por aceleração/desaceleração e explosão e envolve a torção e compressão de axônios podendo levar a completa ruptura destes (Laskowski; Creed; Raghupathi, 2015). Já a lesão secundária envolve processos que são comuns a outras patologias tanto neurológicas quanto psiquiátricas como a excitotoxicidade glutamatérgica, a neuroinflamação e o estresse oxidativo (Loane; Kumar, 2016).

Como TEPT e TCE podem apresentar sintomas em comum, principalmente relacionados à cognição, quando eles ocorrem no mesmo paciente (em um acidente automobilístico ou uma agressão sexual, por exemplo) é necessário que haja um diagnóstico diferencial entre as duas patologias. Os pontos principais de distinção entre elas são os sintomas relacionados ao evento traumático. Os sintomas intrusivos e a esquiva de pistas do trauma são específicos do TEPT, enquanto desorientação persistente e confusão são mais características do TCE (DSM-5). Porém, como mencionado anteriormente, as características da lesão secundária do TCE também são encontradas no TEPT, como estresse oxidativo aumentado, baixo grau de inflamação crônica e excitotoxicidade glutamatérgica (Prasad; Bondy, 2015). Ainda, ambos TEPT e TCE apresentam alterações neuroanatômicas, como uma redução no volume hipocampal (Menon *et al.*, 2010).

Além disso, há evidências de que um TCE leve e o TEPT tem um potencial aditivo em termos de sinais e sintomas, e o TCE é um risco adicional para o desenvolvimento de TEPT. Principalmente quando associado a fatores genéticos, ambientais e psicológicos que contribuem na perturbação de vias neurais (Bahraini *et al.*, 2014).

Devido à natureza heterogênea dos agentes causais do TCE esperam-se diversos modelos animais, enquanto alguns modelos tentam reproduzir aspectos biomecânicos do traumatismo outros focam nas alterações moleculares que se desenvolvem a partir do impacto. Modelos que tentam reproduzir os aspectos biomecânicos apresentam problemas de reprodutibilidade dos dados, pois há uma grande variação entre os indivíduos. Já aqueles que buscam reproduzir as alterações moleculares requerem uma extensa craniotomia e, conseqüentemente, não reproduzem situações reais (Xiong; Mahmood; Chopp, 2013). Os principais modelos de TCE utilizados na literatura estão listados na **tabela 1** e há a comparação entre a necessidade de craniotomia, a reprodutibilidade e a taxa de mortalidade de cada um deles.

Tabela 1. Comparação entre os principais modelos de TCE disponíveis. Os modelos são comparados em relação à necessidade de se realizar uma craniotomia, sua reprodutibilidade e taxa de mortalidade (baseado em Xiong; Mahmood; Chopp, 2013).

Modelo	Craniotomia necessária?	Reprodutibilidade	Mortalidade
Queda de peso (Shohami)	não	baixa	baixa
Queda de peso (Marmarou)	não	baixa	alta
Percussão por fluido	sim	alta	alta
Impacto Cortical Controlado	sim	alta	baixa
Explosão	não	Precisa de padronização	baixa

O modelo de queda de peso pode produzir um TCE de diferentes intensidades com a variação da altura e do peso do projétil e tem grande similaridade à situação em humanos. A grande diferença entre os modelos de queda de peso de Feeney e Shohami em relação ao de Marmarou é que no último uma placa metálica é fixada ao crânio para que o impacto seja distribuído por toda a cabeça do animal e para prevenir a fratura do crânio. Os maiores inconvenientes dos modelos de queda de peso são a grande variabilidade entre os indivíduos, pois fatores como o peso corpóreo parecem ser determinantes na gravidade da lesão e na influência das alterações de pressão intracraniana (Badri *et al.*, 2012; Lafrenaye; McGinn; Povlishock, 2012).

O modelo de TCE por impacto cortical controlado (ICC) é altamente reproduzível em termos de localização e extensão da lesão. Porém é necessária uma extensiva craniotomia (4 mm de diâmetro) e trabalhos mostram que a craniotomia sozinha leva a um perfil de resposta neuroinflamatória similar mas menos intensa do que aquele provocado pelo TCE (Lagraoui *et al.*, 2012). Na **tabela 2** podemos comparar a correlação das características induzidas por cada modelo em relação à condição humana.

Tabela 2. Comparação entre os modelos de queda de peso e impacto cortical controlado (ICC) em relação às principais alterações patológicas encontradas no TCE.

Modelo de TCE	Concussão	Contusão	Lesão axonal	Hemorragia	Fratura do crânio
Queda de peso	++	+	++	+	+/-
ICC	+	++	+	++	-

++: alta correlação com a condição humana; +: replica a condição humana +/-: pode replicar a condição humana -: não replica a condição humana

Considerando que a natureza mais comum de estressores para humanos é a psicossocial, modelos combinando um estressor psicológico com medidas de medo condicionado tem grande relevância. Hammamieh e colaboradores (2012) propõem o estresse por derrota social repetido como um modelo de TEPT per se, pois ele promove alterações persistentes de comportamentos de medo e tipo ansiedade que são similares aos sintomas do TEPT (correspondendo aos critérios D e E do DSM-5), além de alterações cardíacas e neurogenéticas. Logo a combinação do protocolo de derrota social com modelos de TCE tem potencial aditivo para se apresentar como um bom modelo para o estudo do TEPT associado ao TCE.

HIPÓTESE

A hipótese principal desta etapa do trabalho é que a combinação do estresse causado pela derrota social com o traumatismo crânio-encefálico levaria a prejuízos de extinção de uma memória de medo condicionado a uma pista sonora.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste capítulo foi estabelecer um modelo para o endofenótipo de prejuízo de extinção de uma memória aversiva através da associação da derrota social com o TCE.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar a resposta de medo condicionado em animais previamente expostos à derrota social.
- ✓ Aferir a concentração de corticosterona e mediadores pró-inflamatórios no hipocampo 24h após o TCE causado pela queda de peso.
- ✓ Estabelecer o modelo de derrota social no laboratório EA4475, *Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale* da Universidade Paris Descartes.
- ✓ Avaliar o efeito da combinação da derrota social com o TCE causado pelo ICC sobre a extinção de uma memória de medo condicionado, após três semanas.
- ✓ Avaliar o efeito da combinação da derrota social com o TCE causado pelo ICC sobre a marcação para FluoroJade B®, após 24h.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos adultos machos das linhagens Swiss (4 a 7 meses de idade) e C57BL/6 (10 a 14 semanas de idade). Os animais da linhagem Swiss eram alojados individualmente a partir dos três meses de idade e por toda a duração dos experimentos.

Nos experimentos realizados no Laboratório de Neurofarmacologia (Florianópolis, Brasil), os camundongos Swiss eram provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), enquanto os C57BL/6 foram provenientes de nossa colônia, que é derivada daquela da Universidade do Vale do Itajaí (Univali). As caixas moradias estavam forradas com maravalha de *Pinus sp.* e a higienização foi realizada uma vez por semana. Todos os animais tiveram acesso à água filtrada e ração (BioBase, Bio-Tec, Brasil) ad libitum e foram mantidos em um ciclo de claro-escuro de 12-12h com luzes acesas às 7h. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas (Alesco®), separados de acordo com a linhagem, em uma sala mantida a $22\pm 2^\circ\text{C}$. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram alojados isoladamente uma semana antes do início do protocolo e por toda sua duração.

Para os experimentos realizados no *Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale* (Paris, França) todos os animais utilizados eram provenientes do Janvier Labs (França) e permaneceram uma semana no biotério deste laboratório para aclimação, antes do início dos experimentos. As caixas moradias estavam forradas com lascas de faia (*Fagus sp.*) com higienização uma vez por semana. Todos os animais tiveram livre acesso a água filtrada e ração (SAFE, França) ad libitum e foram mantidos em um ciclo de claro-escuro de 12-12h, com luzes acesas às 8h. Os animais foram mantidos em estantes abertas em uma sala com temperatura mantida constante a $22\pm 2^\circ\text{C}$. Os camundongos da linhagem C57BL/6J foram alojados agrupados (8-10 animais por gaiola) devido a uma restrição do comitê de ética local e respeitando a área mínima por animal preconizada pelo Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition).

Todos os protocolos utilizados foram previamente aprovados pelo comitê de ética local (CEUA PP893) e francês.

Derrota Social

O protocolo de derrota social foi realizado conforme descrito no material e métodos (páginas 47 a 49), porém a dimensão das caixas moradia foi ligeiramente diferente.

TRAUMATISMO CRÂNIO ENCEFÁLICO (TCE)

- Impacto Cortical Controlado

O impacto cortical controlado (ICC) é um dos modelos de TCE mais utilizados, atualmente, ele envolve uma contusão diretamente sobre a dura-máter que recobre o córtex parietal. Os animais foram anestesiados em uma câmara de indução contendo 3% de isoflurano em 100% de ar. Após dois minutos nesta câmara eles foram transferidos para uma moldura estereotáxica (**figura 1**), composta com uma máscara para manutenção da anestesia com 1,5% de isoflurano envolvendo a presilha nasal. Uma mesa estereotáxica coberta com uma manta aquecedora foi acoplada a uma probe retal para o monitoramento da temperatura dos camundongos ($37 \pm 1^\circ\text{C}$). Nesta moldura, foram fixados através de barras de cabeça, de forma que os tímpanos sejam preservados. Após a fixação, a pele foi desinfetada com uma solução de iodopovidona a 10% (Betadin®) e uma incisão única longitudinal, de aproximadamente um centímetro, foi realizada com um bisturi cirúrgico. No lado esquerdo do crânio exposto foi realizada uma craniotomia de quatro milímetros lateral à sutura sagital e entre *Bregma* e *Lambda*, com auxílio de uma broca dental e com especial cautela para não danificar a dura-máter.

Após a craniotomia a mesa estereotáxica foi inclinada em 45° e foi realizado o impacto com um pistilo pneumático controlado por um sistema digital, o impactor possuía três milímetros de diâmetro e comprimiu o córtex em uma velocidade de 3,5 milissegundos com uma profundidade de um milímetro e tempo de contato de 50 milissegundos. Imediatamente após o impacto, o córtex foi resfriado com uma solução de salina estéril, a craniotomia foi coberta com cera óssea e a pele suturada. Os camundongos receberam reposição volêmica de 0,25 mL de salina 0,9% e puderam se recuperar em uma câmara aquecida a 28°C com livre acesso à água e ração. Como controles, temos um grupo de animais naïve que não foi submetido a nenhum protocolo cirúrgico e um grupo que foi apenas craniotomizado. Esses foram pareados quanto ao tempo de

procedimento (tempo médio: 18 min) aos animais que receberam o impacto.

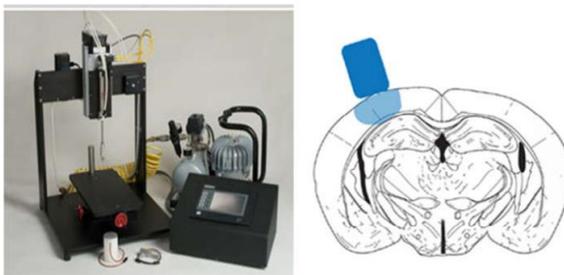


Figura 1: Representação esquemática do procedimento do ICC. A imagem da esquerda ilustra o aparato utilizado para o ICC e a imagem da direita representa o sítio da lesão em uma figura esquemática de uma secção coronal do encéfalo de camundongos. Os camundongos são fixados na moldura estereotáxica através de barras de cabeça, uma craniotomia de 4 mm é realizada no hemisfério esquerdo entre Bregma e Lambda. O impactor de 3 mm de diâmetro é centrado na craniotomia e a velocidade, profundidade e tempo de contato do impacto são controlados por um computador. Após o impacto a craniotomia é coberta com cera óssea e a pele é suturada.

- Queda de peso

Um segundo modelo de TCE amplamente utilizado é a queda de peso, neste modelo a indução anestésica é obtida com uma mistura de isoflurano em oxigênio medicinal. Após confirmação de anestesia, foi realizada uma incisão no escalpo com bisturi cirúrgico para expor o crânio. Esta incisão permitiu a identificação precisa do local anatômico de impacto, evitando a variabilidade entre os animais. Imediatamente após a incisão, os animais foram transferidos para o aparato de queda de peso (**figura 2**), que consistia em um tubo de aço inoxidável (1 m de comprimento por 12 mm de diâmetro) através do qual um projétil de alumínio (diâmetro 10 mm e massa de 5 g) foi solto em queda livre de uma altura de 0,7 m, com impacto na região parietal esquerda, lateral à sutura sagital e posterior à sutura coronal. A ponta do projétil tinha três milímetros de diâmetro, era livre de imperfeições e era revestida em borracha macia a partir de 0,5 mm da extremidade, evitando assim um afundamento maior que 0,5 mm no crânio. O sistema possui uma mira que torna o erro para o ponto de impacto inferior a um milímetro.

Logo após o TCE, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma superfície plana e o tempo para o endireitamento postural (isto é, o posicionamento sobre as quatro patas), foi medido. Este parâmetro é considerado o equivalente da perda de consciência em humanos (Franks, 2008). Imediatamente após a recuperação do reflexo postural, os animais receberam fentanil na dose de 0,05 mg/kg (i.p.), para analgesia.

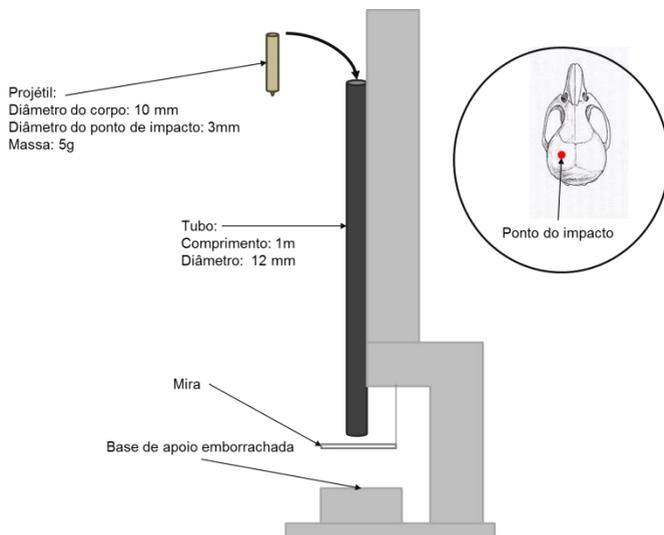


Figura 2: Representação esquemática do aparato de queda de peso. O aparato é composto por uma base de apoio emborrachada posicionada abaixo de um tubo de aço inoxidável com 1 m de comprimento e 12 mm de diâmetro. Através deste tubo um projétil de alumínio com 10 mm de diâmetro, massa de 5 g e com uma ponta de três milímetros de diâmetro foi solto em queda livre de uma altura de 0,7 m, com impacto na região parietal esquerda, lateral à sutura sagital e posterior à sutura coronal - ilustrado no detalhe (Figura baseada em Oliveira, 2013).

Uma hora após o TCE todos os camundongos foram submetidos ao Escore Neurológico de Severidade (Neurological Severity Score), que é uma escala de avaliação sensório-motora utilizada em modelos animais de TCE (Beni-Adani *et al.*, 2001; Flierl *et al.*, 2009). A escala é composta por 10 itens relacionados a reflexos, marcha, força motora e equilíbrio, sendo que a falha em completar um item soma um ponto. Quanto mais alto o escore total final, maior o comprometimento neurológico. Um camundongo

saudável tende a realizar todas ou quase todas as tarefas com facilidade.

Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE, Lister, 1990) consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 15 cm), também opostos, elevados a 45 cm do nível do chão. Os braços abertos apresentam uma barra lateral de 0,25 cm como proteção, evitando a queda dos animais; os animais foram colocados individualmente no centro do LCE com a cabeça voltada para um dos braços abertos e seu comportamento avaliado durante 5 min utilizando uma câmera infravermelha e o *software ViewPoint®*. Os parâmetros comportamentais avaliados foram: número de entradas e tempo de permanência dos animais nos braços abertos e fechados do aparato.

Medo condicionado contextual

- Protocolo experimental – Brasil:

Para testar a aquisição, a expressão e a extinção de memórias aversivas utilizou-se um paradigma de condicionamento Pavloviano em uma caixa de esquiwa ativa (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), com piso gradeado, três paredes de acrílico opaco cinza e parede frontal e tampa de acrílico transparente. No primeiro dia, após um período de habituação de três minutos, os animais foram expostos a seis choques elétricos nas patas (0,5 mA, 2 s), o intervalo entre as tentativas foi de 30s. A caixa foi limpa com uma solução de baunilha em álcool 70% entre os animais. No segundo dia os animais foram reexpostos à caixa de condicionamento, porém na ausência de choques e do tom, neste dia a caixa foi novamente limpa com uma solução de baunilha em álcool 70% (medo condicionado ao contexto).

- Protocolo experimental – França:

Os animais foram posicionados individualmente em uma das quatro caixas de condicionamento alocadas dentro de uma câmara ventilada de isolamento sonoro. Esta câmara foi higienizada com álcool 70% e um odor de baunilha a 0,01% foi adicionado às câmaras de condicionamento. Após o período de habituação de três minutos os camundongos foram expostos a seis pareamentos de

estímulos condicionados (2.5 kHz, 85 dB, 30 s) e incondicionados (2 s, 0.5 mA), o intervalo entre os pareamentos foi de dois minutos. No dia seguinte os animais foram expostos a uma nova câmara, sem o odor de baunilha, onde foi testado o medo associado à pista auditiva e a sua extinção, para tal foram utilizadas 40 exposições ao estímulo condicionado com um intervalo de 5 s entre as exposições. Este procedimento foi repetido após 24h para testar a retenção da extinção da memória de medo (**figura 3**).

A medida comportamental utilizada foi o congelamento, sendo que na aquisição este comportamento foi medido por uma observadora treinada e cega para os grupos experimentais, para as medidas no novo contexto foi utilizada uma câmara infravermelha e o *software ViewPoint®*.

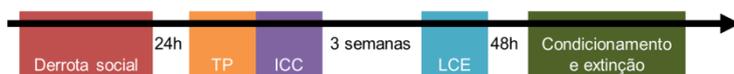


Figura 3: Esquema do protocolo experimental para avaliação dos déficits de extinção em camundongos submetidos à derrota social e ao TCE por ICC. TP: Teste de Partição; ICC: impacto cortical controlado; LCE: labirinto em cruz elevado.

Ensaio biológicos

- Análise histoquímica

Os animais foram perfundidos com solução salina 0,9% e EDTA 5 mM por cinco minutos seguidos da perfusão com paraformaldeído 4% (em tampão fosfato, pH=7,4) por cinco minutos. Em seguida, os cérebros foram removidos e mantidos em solução de sacarose 30% (em tampão fosfato) por 24h para crioproteção. Posteriormente, os cérebros foram congelados em uma solução de 2-metilbutano e então mantidos em freezer -80°C até o momento da secção. Os encéfalos foram cortados, toda a extensão da lesão no nível de Bregma -0.82 a -3.82 (**figura 4**), em criostato (Leica, Alemanha) a uma espessura de 35 µm e coletados em lâminas previamente gelatinizadas (cinco cortes por lâmina) as lâminas foram secas em temperatura ambiente por 20 min e então armazenadas em freezer -20°C.

Os cortes fixados às lâminas através de um banho em solução de PFA 4% (em tampão fosfato (PBS), pH=7,4) e, posteriormente, lavadas duas vezes em PBS e então foram secos em uma chapa quente à 50°C por 30 min. Após a lavagem, os cortes foram re-hidratados em banhos subsequentes de etanol nas

concentrações 100, 70 e 35% por 5 min em cada solução seguidos de 5 min em água milli-Q. Para reduzir o fundo (background) todas as lâminas foram submersas em uma solução de permanganato de potássio (KMnO₆ 0.06%) por 10 min sob leve agitação e depois lavadas duas vezes em água milli-Q por 2 min. Então, as lâminas foram transferidas para cubetas de porcelana onde foram incubadas com a solução 0.0004% de FluoroJade B (FJB, Millipore, ref. AG310, 2584444) em ácido acético 0,1% acrescida de DAPI a 0,01% (Millipore, ref. 268298) por 20 min. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em água milli-Q por 1 min e foram secas em uma placa quente a 50°C por 15 min, ao abrigo da luz. Quando secos, os cortes foram clarificados por imersão em tolueno e montadas com o meio DPX (Schmued; Hopkins, 2000).

A marcação foi avaliada em uma seção de cada lâmina e em todas as lâminas e as regiões analisadas foram o córtex e o hipocampo esquerdo (ipsilateral à lesão). As imagens foram adquiridas utilizando o escâner *Axio Scan*® (Zeiss, Alemanha). A quantificação das células positivas foi realizada de forma semi-automatizada no *software Zen blue edition* (Zeiss, Alemanha), onde assinalamos as células positivas que foram contabilizadas pelo software.

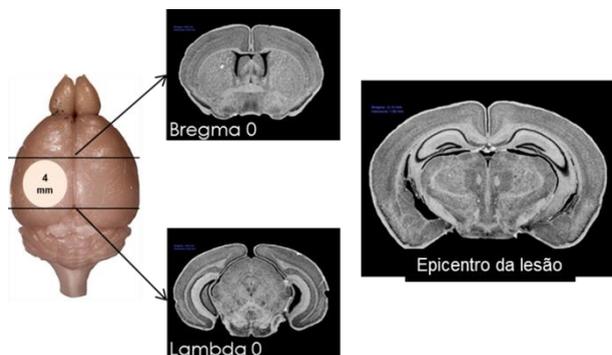


Figura 4: Representação esquemática da região cerebral analisada pela técnica histológica FJB. A região contendo o sítio da lesão de 3 mm, no córtex parietal esquerdo, entre Bregma e Lambda, foi cortado no sentido coronal em criostato (Leica®). As fotomicrografias representam o início (*Bregma 0*) e o final (*Lambda 0*) da área de interesse, o epicentro da lesão em *Bregma -2.0*, também está representado (imagens adaptadas do MBL mouse brain atlas, disponíveis em www.mbl.org).



Figura 5: Esquema do protocolo experimental para avaliação de FluoroJade B® em camundongos submetidos à derrota social e ao TCE por ICC. TP: Teste de Partição; ICC: impacto cortical controlado; FJB: FluoroJade B

- Dosagem de corticosterona, substância P e citocinas

As medidas de corticosterona, substância P, IL-1 β e TNF- α nos hemisférios hipocâmpais contra e ipsilateral à lesão foram realizadas através da utilização de kits comerciais conforme descrito nas páginas 55 a 57 (**figura 6**).

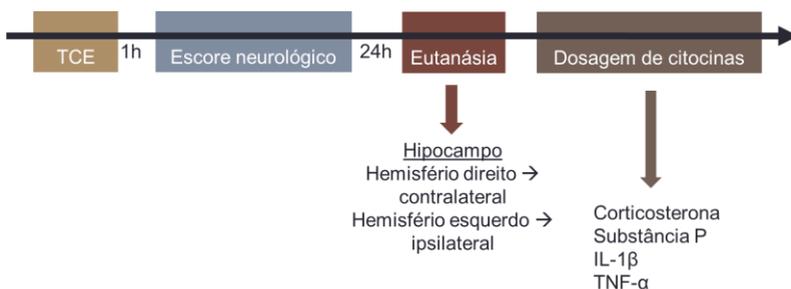


Figura 6: Esquema do protocolo experimental para investigação da inflamação desencadeada pelo TCE.

Análises estatísticas

Todas as medidas foram analisadas em relação à distribuição e normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em casos onde a distribuição não foi normal foi realizada a exclusão de outliers através do método de média aparada (animais acima ou abaixo de dois desvios padrões da média são excluídos). A análise do escore neurológico e do teste de partição foi realizada através de test t de Student não pareado, utilizando o *software GraphPad Prism® v 5.01 (GraphPad Software Inc., EUA)*.

As análises do comportamento no LCE e no medo condicionado foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, onde as variáveis independentes foram o estresse (controle vs derrotado) e a cirurgia (naïve vs craniotomia vs

TCE). A contagem das células FJB positivas no córtex e o tamanho da área da lesão foram analisadas por ANOVA de duas onde as variáveis independentes foram o estresse (controle vs derrotado) e a cirurgia (craniotomia vs TCE). Já a contagem de células FJB positivas nas sub-regiões do hipocampo foi analisada pelo teste de Kruska-Wallis seguido do teste de Dunn.

A análise da expressão de mediadores pró-inflamatórios após o TCE foi realizada através de uma ANOVA de duas vias, onde os fatores independentes foram o hemisfério cerebral (ipsi vs contralateral) e a lesão (sham vs TCE).

As ANOVAS foram seguidas do teste post hoc de Newman-Keuls quando apropriado, utilizando o *software Statistica* v.7 (StatSoft Inc., EUA) e valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

Todos os gráficos foram produzidos no programa *GraphPad Prism*® v 5.01 (GraphPad Software Inc., EUA).

RESULTADOS

Caracterização da resposta de medo condicionado em animais previamente expostos à derrota social

Os animais submetidos à derrota social apresentam maior expressão de medo contextual (**figura 7**) nos primeiros cinco minutos de teste [$F(3,39)=6,299$; $p<0,00001$] quando submetidos ao condicionamento 48h (A) após a derrota social mas não após 21 dias (B) [$F(3,39)=1,691$; $p=0,18$]. A resposta de congelamento reduz ao longo do protocolo em ambos os testes [A: $F(3,39)=158,45$; $p<0,00001$; B: $F(3,39)=27,273$; $p<0,00001$] mas não apresenta efeito geral do estresse [A: $F(1,13)=4,080$; $p=0,06$; B: $F(1,13)=2,088$; $p=0,17$].

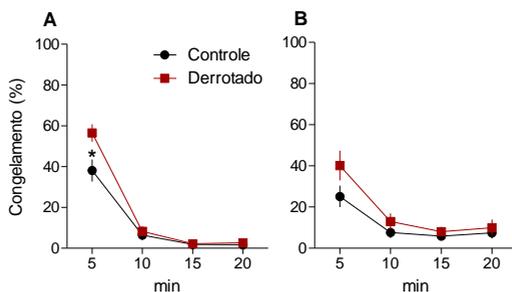


Figura 7: Resposta de congelamento ao contexto em camundongos submetidos ao protocolo de derrota social 2 (A) e 21 dias (B) antes do condicionamento de medo. Camundongos C57BL/6 machos foram submetidos ao protocolo de derrota social, seguido do teste de partição e posteriormente expostos ao condicionamento de medo contextual e a avaliação da expressão e extinção da resposta de medo ao contexto. Resultados expressos como média \pm e.p.m. e analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc de Newman-Keuls. * $p<0,05$ ($n=7-8$ /grupo).

Concentração de corticosterona e mediadores pró-inflamatórios no hipocampo 24h após o TCE

O escore neurológico é uma ferramenta validada para confirmar a ocorrência do TCE no modelo de queda de peso, como demonstrado na **figura 8** o escore de prejuízo neurológico aumenta nos animais que sofreram o TCE [T(15)=2,773; p=0,01]. O tempo de recuperação, que é relacionado ao tempo de perda de consciência em humanos, também está aumentado no grupo que sofre o TCE [T(15)=2,829; p=0,01].

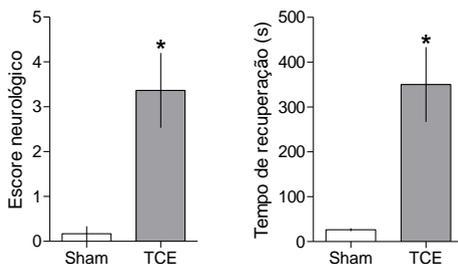


Figura 8: Escore neurológico e tempo de recuperação de camundongos que sofreram um TCE comparado ao seu controle apenas anestesiado. Camundongos C57BL/6 machos de 3 meses de idade foram anestesiados em uma câmara saturada com isoflurano por 30 s, tiveram o crânio expostos e foram submetidos ao TCE por queda de peso, nos animais sham o peso estava ausente. Imediatamente após o impacto os animais foram colocados em decúbito dorsal e o tempo para recuperação do reflexo postural foi contabilizado. Após 1h todos os animais foram testados em uma bateria de testes neurológicos para o estabelecimento do escore, a falha em realizar uma tarefa soma 1 ponto. Resultados expressos como média \pm e.p.m. e analisados por um teste t de Student não pareado. *p<0,05 (N=6-8/grupo).

Não foram encontradas diferenças entre os hemisférios [$F(1,8)=0,379$; $p=0,55$], nem entre os grupos [$F(1,8)=1,829$; $p=0,21$] em relação aos níveis de corticosterona no hipocampo (**figura 9**), também não houve interação entre os fatores [$F(1,8)=0,333$; $p=0,58$].

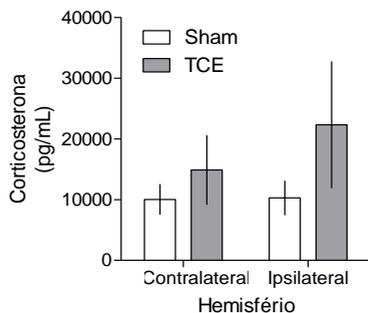


Figura 9: Análise da concentração de corticosterona no hipocampo de camundongos que sofreram TCE. Camundongos C57BL/6 machos de 3 meses de idade foram anestesiados em uma câmara saturada com isoflurano por 30 s, tiveram o crânio expostos e foram submetidos ao traumatismo crânio-encefálico (TCE) por queda de peso, nos animais sham o peso estava ausente. 24h após o TCE os animais foram eutanasiados e os hemisférios hipocampais coletados para análise por ELISA (n=3/grupo).

Os níveis de substância P estão aumentados no hemisfério ipsilateral ao TCE [$F(1,8)=4,32$; $p=0,07$], a ANOVA revela um efeito do hemisfério analisado [$F(1,8)=16,11$; $p=0,004$] porém não do fator independente grupo [$F(1,8)=1,99$; $p=0,19$]. Em relação às citocinas pró-inflamatórias TNF- α [trauma: $F(1,8)=1,853$; $p=0,22$; hemisfério: $F(1,8)=2,021$; $p=0,20$; interação: $F(1,8)=0,026$; $p=0,87$] e IL-1 β [trauma: $F(1,8)=0,021$; $p=0,88$; hemisfério: $F(1,8)=0,0009$; $p=0,97$; interação: $F(1,8)=0,00$; $p=0,95$] não foram encontradas quaisquer diferenças (**figura 10**).

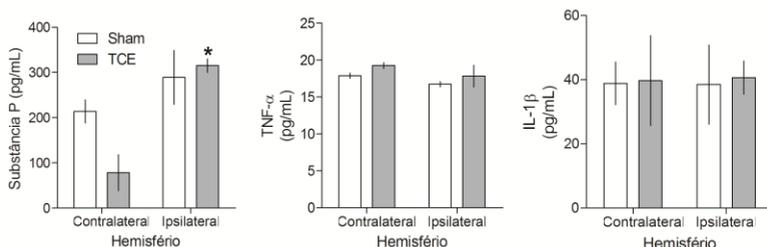


Figura 10: Análise da concentração de substância P, TNF- α e IL-1 β no hipocampo de camundongos que sofreram traumatismo crânio-encefálico (TCE). Camundongos C57BL/6 machos de 3 meses de idade foram anestesiados em uma câmara saturada com isoflurano por 30 s, tiveram o crânio expostos e foram submetidos ao TCE por queda de peso, nos animais sham o peso estava ausente. 24h após o TCE os animais foram eutanasiados e os hemisférios hipocâmpais coletados para análise por ELISA ($n=3$ /grupo).

Estabelecendo o modelo de derrota social no Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale

A estratégia comportamental adotada pelos intrusos foi anotada ao longo dos três dias de derrota social e observamos uma frequência similar àquela observada no Brasil, onde o comportamento mais frequente é a postura de submissão (60%), seguida da tentativa de fuga (36%), sendo que estas duas estratégias co-ocorreram em 14% dos casos. Em 7% dos confrontos não houve ataque e as estratégias menos frequentemente adotadas foram a imobilidade (9%) e o congelamento (1%). Utilizando os mesmos valores previamente estabelecidos obtivemos o escore comportamental dos animais frente à derrota social (**figura 11**).

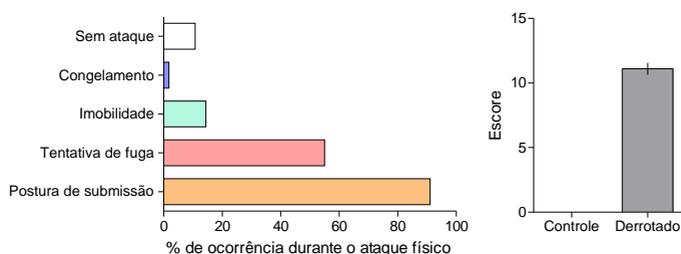


Figura 11: Estratégia comportamental adotada pelos intrusos quando frente ao ataque físico. 56 camundongos machos da linhagem C57BL/6J foram submetidos à derrota social ao longo de três dias, a partir da soma das notas atribuídas a cada comportamento obtivemos um escore comportamental médio de 11 pontos a todos os animais submetidos à derrota social.

No dia seguinte à última derrota social foi realizado o teste de partição (**figura 12**), onde o teste t de Student revelou uma redução na frequência de entradas [$T(78)=2.284$; $p=0,02$] e no tempo de permanência [$T(76)=2.430$; $p=0,009$] na área da barreira no grupo derrotado em relação ao controle. Imediatamente após o teste de partição, os animais foram subdivididos entre naïve, craniotomia e TCE. Os grupos craniotomia e TCE foram submetidos ao procedimento de craniotomia e craniotomia seguida do ICC, respectivamente.

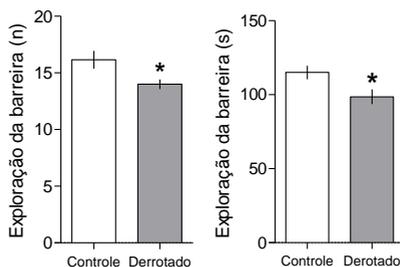


Figura 12: Exploração da barreira por camundongos submetidos ao protocolo de derrota social. Os animais foram submetidos a 3 dias de derrota social por 3h seguidos pela análise no teste de partição no quarto dia. Resultados expressos como média \pm e.p.m. e analisados por teste T de Student não pareado * $p<0,05$ ($n=36-44$ /grupo).

Após três semanas, todos os grupos foram testados no labirinto em cruz elevado por 5 min. A ANOVA de duas vias revelou uma redução no tempo de permanência nos braços abertos (**figura 13**) causado pelo estresse [$F(1,56)=4,708$; $p=0,03$; derrotado < controle], mas nenhum efeito da cirurgia [$F(2,56)=0,91$; $p=0,41$], ou da interação entre os fatores [$F(2,56)=0,32$; $p=0,73$] foi encontrado. além disso, nenhuma diferença foi encontrada na frequência de entradas nos braços abertos [estresse: $F(1,56)=3,581$; $p=0,06$; cirurgia: $F(1,56)=0,613$; $p=0,58$; interação: $F(2,56)=0,781$; $p=0,46$] e fechados [estresse: $F(1,56)=0,005$; $p=0,95$; cirurgia: $F(1,56)=2,363$; $p=0,10$; interação: $F(2,56)=0,317$; $p=0,73$] do LCE.

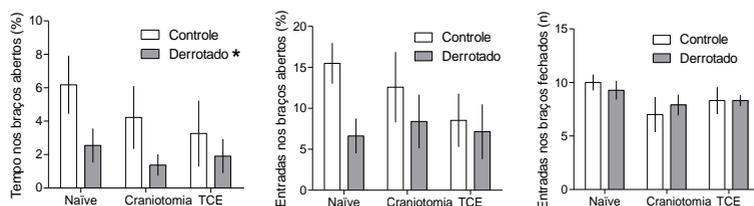


Figura 13: Exploração dos braços abertos e fechados do LCE três semanas após a derrota social e o traumatismo crânio-encefálico (TCE). Tempo gasto e entradas nos braços abertos, em porcentagem, e frequência de entradas nos braços fechados de camundongos C57BL/6J 3 semanas após a derrota social e o TCE. Resultados expressos como média \pm e.p.m. e analisados por ANOVA de duas vias * $p<0,05$. (n= 9-11/grupo).

Combinação da derrota social com o TCE causado pelo ICC sobre a extinção de uma memória de medo condicionado, após três semanas.

Dois dias após o LCE todos os animais foram submetidos ao condicionamento de medo associado a um tom (**figura 14**), todos os grupos adquiriram a resposta de medo à pista auditiva, chamado de estímulo condicionado (EC) [$F(5,270)=77,490$; $p<0,0001$] sem que houvesse diferença entre os grupos [$F(10,270)=0,732$; $p=0,50$]. Nos dois dias subsequentes, os animais foram testados em um novo contexto para a resposta de medo condicionada ao EC. Todos os grupos apresentam uma alta resposta de congelamento no início da sessão que decai ao longo da exposição ao EC [$F(11,594)=46,214$; $p=0,00001$], mas não há diferença entre os grupos [$F(2,54)=2,144$; $p=0,13$]. No terceiro dia, os dois primeiros minutos são utilizados como parâmetro de retenção da extinção dessa memória, mas

também neste parâmetro nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos [$F(2,54)=0,861$; $p=0,43$].

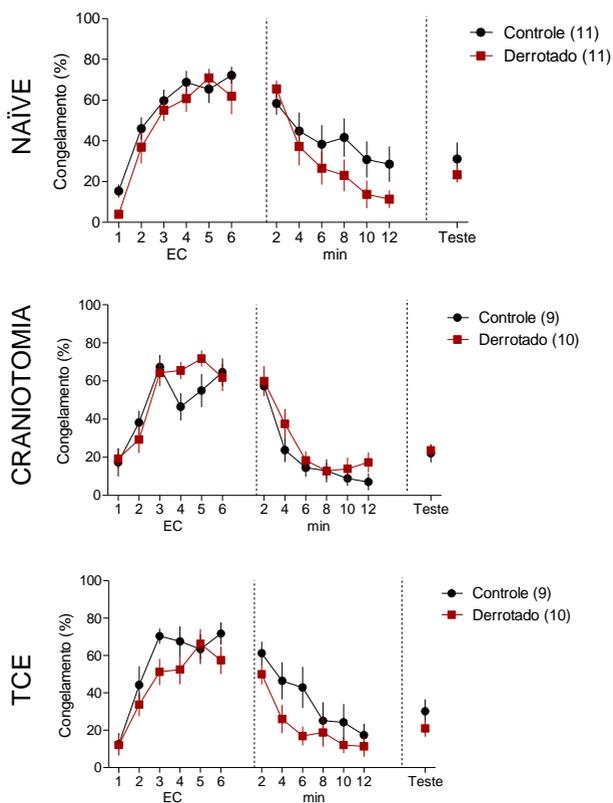


Figura 14: Resposta de medo à pista auditiva condicionada, ao longo do condicionamento e durante as sessões de teste. Após três semanas da derrota social e do traumatismo crânio-encefálico (TCE), foi avaliada a resposta de congelamento ao estímulo condicionado (EC) sonoro durante o condicionamento e durante a sessão de treinamento de extinção. Resultados expressos como média \pm e.p.m. e analisados por ANOVA de duas vias e com medidas repetidas para o condicionamento e treinamento de extinção.

Para analisar se ocorreram deficits de extinção da memória de medo associativa foi calculado um índice de extinção que é a diferença média da resposta de congelamento nos 6 primeiros minutos da sessão um em relação a segunda (**figura 15**). A ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito significativo [$F(2, 54)=0,545$; $p=0,58$].

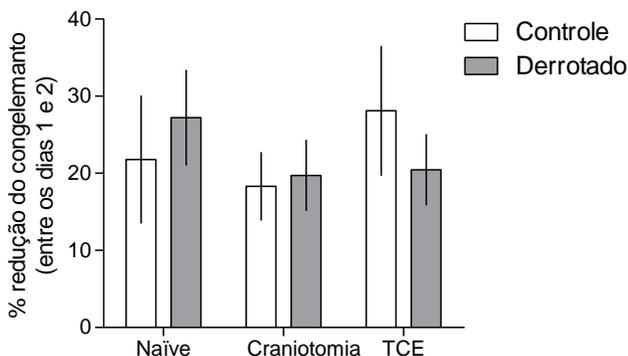


Figura 15: Índice de retenção da extinção. Redução, em porcentagem, entre a primeira e a segunda sessão de treinamento de extinção da resposta de medo associada à pista auditiva em camundongos submetidos à derrota social e traumatismo crânio-encefálico (TCE) três semanas antes. Resultados expressos como média \pm e.p.m. e analisados por ANOVA de duas vias ($n=9-11$ /grupo).

Efeito da combinação da derrota social com o TCE causado pelo ICC sobre a marcação para FluoroJade B

A expressão de FJB em células no córtex e hipocampo esquerdos (ipsilateral à lesão) foi analisada 24h após o TCE. Á área da lesão cortical contendo as células FJB positivas foi delineada e medida, quando comparamos a extensão da lesão entre os grupos observamos um efeito claro do grupo [$F(1, 25)=38,102$; $p=0,000001$; TCE > craniotomia], mas sem efeito significativo do estresse [$F(1, 25)=2,829$; $p=0,10$] e apenas com uma tendência à interação entre os fatores [$F(1, 25)=3,477$; $p=0,07$], conforme representado no gráfico superior direito da **figura 16**. O número de células FJB positivas foi contado de maneira semi-automatizada e apresenta efeito significativo da cirurgia [$F(1, 25)=19,191$; $p=0,0002$; TCE > craniotomia], mas não do estresse [$F(1, 25)=0,385$; $p=0,54$] ou da interação entre os dois fatores [$F(1, 25)=1,312$; $p=0,26$].

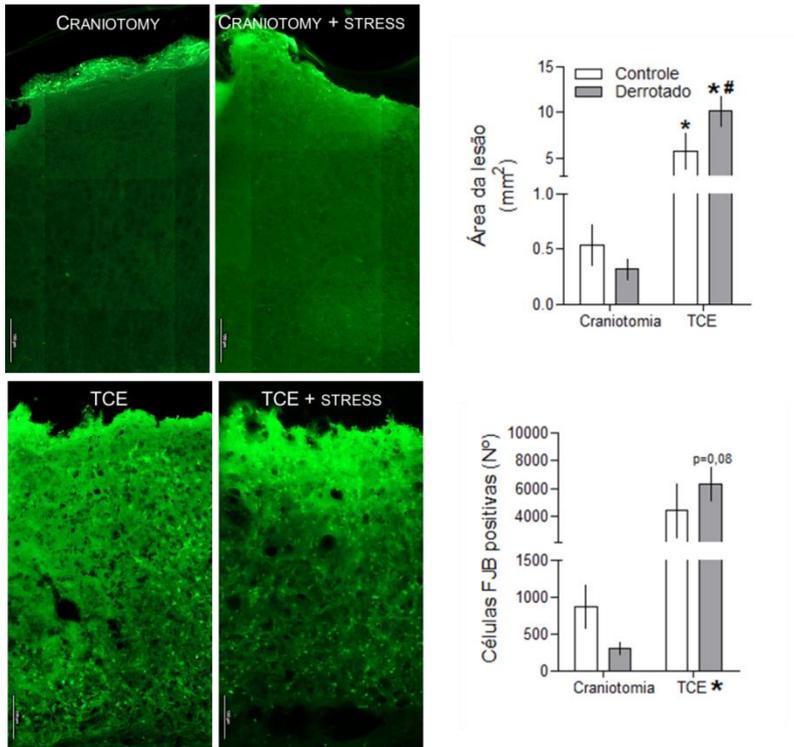


Figura 16: Expressão de células positivas para a coloração por FluoroJade B® (FJB) e quantificação das células positivas e da área que as contém. Camundongos C57BL/6J foram submetidos à derrota social, seguida do TCE e utilizados para a avaliação da expressão de FJB no córtex e hipocampo ao longo da lesão. Resultados expressos como média \pm e.p.m. e analisados por ANOVA de duas vias seguida do post hoc de Newman-Keuls quando apropriado. * $p < 0,05$ em relação ao grupo craniotomia # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (n=7-8/grupo).

As células positivas presentes no hipocampo ipsilateral à lesão também foram contadas (**figura 17**), e a análise Kruskal-Wallis revelou efeito significativo da cirurgia [$H(3,30)=19,684$; $p=0,0002$; TCE > craniotomia].

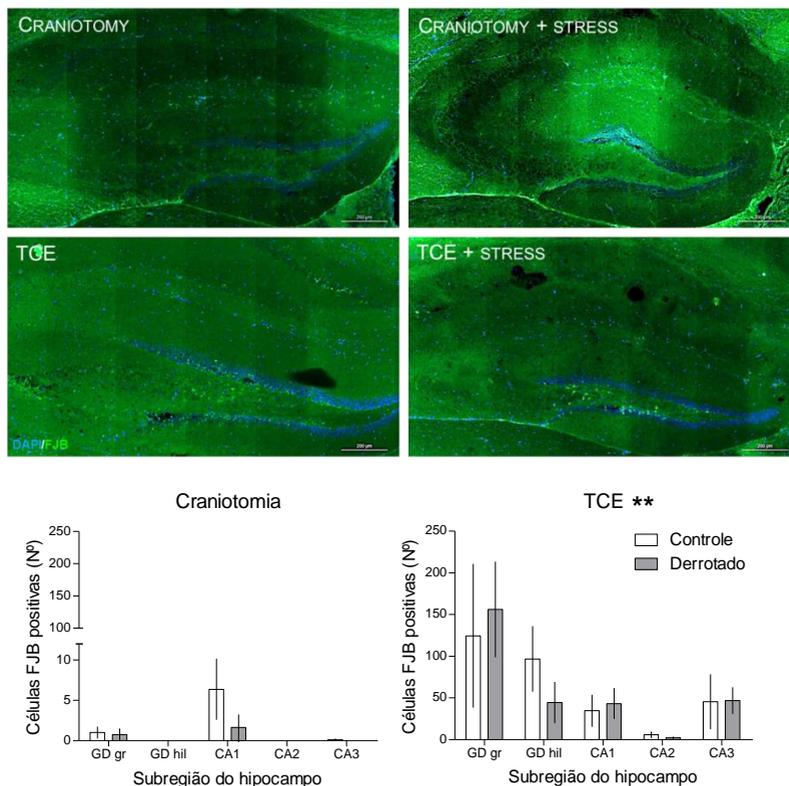


Figura 17: Expressão e quantificação de células positivas para a coloração por FluoroJade B® (FJB) no hipocampo esquerdo. Camundongos C57BL/6J foram submetidos à derrota social, seguida do traumatismo crânio-encefálico (TCE) e utilizados para a avaliação da expressão de FJB no hipocampo ao longo da lesão. Resultados expressos como mediana \pm intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguida do teste post hoc de Dunn. ** $p < 0,001$ em relação ao grupo craniotomia ($n=7-8$ /grupo). GD gr: camada granular do giro dentado; GD hil: hilus do giro dentado; TCE: traumatismo crânio encefálico.

DISCUSSÃO

Nós observamos que o estresse social sensibiliza os animais em relação ao medo contextual (**figura 7**) quando os protocolos são realizados em sequência, mas esta resposta não persiste com um intervalo de três semanas entre os protocolos. Ainda pudemos estabelecer com sucesso o modelo de TCE pela queda de peso na linhagem C57BL/6 (**figura 8**) e observamos uma alta concentração de substância P no hipocampo ipsilateral à lesão, sem, contudo alterar a expressão de glicocorticoides e citocinas pró-inflamatórias (**figuras 9 e 10**).

Durante o período de estágio de doutorado no Laboratório de Farmacologia da Circulação Cerebral da Universidade Paris Descartes pudemos estabelecer o mesmo protocolo de derrota social utilizado no Laboratório de Neurofarmacologia (**figuras 11 e 12**) e demonstramos pela primeira vez que o efeito tipo ansiogênico da derrota social persiste até 18 dias após à derrota social (**figura 13**).

A combinação entre o estresse social e o TCE causado pelo impacto cortical controlado não provocaram alterações na aquisição, expressão e extinção de uma memória de medo associada a um estímulo sonoro condicionado (**figuras 14 e 15**). Porém, 24h após o trauma, há uma maior proporção de células em sofrimento no grupo TCE do que no grupo apenas craniotomizado, tanto no córtex quanto no hipocampo esquerdo (**figuras 16 e 17**). Além disso, a combinação do estresse social com o ICC parece levar a uma maior lesão cortical.

A diferença de congelamento entre os grupos controle e derrotado nos primeiros cinco minutos da exposição ao contexto condicionado sugere uma maior expressão da memória contextual aversiva, no grupo exposto previamente ao estresse social. Porém, sem causar prejuízos na extinção desta memória ao longo da sessão. Outros grupos também mostraram alterações nas respostas de medo condicionado após a derrota social, onde animais vulneráveis à derrota social apresentam uma maior resposta de medo condicionado à pista auditiva após 10 dias (Chou; Huang; Hsu, 2014). No entanto, os animais derrotados discriminaram melhor entre ambientes neutros e condicionados do que animais controle e resistentes a dois dias de derrota social (Dulka *et al.*, 2015). Como a memória de medo contextual é hipocampo-dependente (Phillips; LeDoux, 1992) e a resposta não persiste quando há um intervalo de três semanas entre o estresse social e o condicionamento, podemos inferir que esta resposta é dependente dos glicocorticoides, pois

estes facilitam a formação de uma memória aversiva contextual através dos GRs (McEwen, 2007).

A partir de ajustes na distância e na massa do projétil pudemos estabelecer o modelo de TCE pela queda de peso, em colaboração com o Laboratório de Ciências Médicas – CCS – UFSC, na linhagem de camundongos C57BL/6. Apesar de não termos encontrado diferenças nos níveis de corticosterona, IL-1 β e TNF- α , provavelmente devido à janela temporal investigada, pudemos observar que há uma maior expressão de substância P no hemisfério da lesão. Outros grupos já demonstraram uma maior expressão de substância P no encéfalo de ratos submetidos ao TCE (Donkin *et al.*, 2009; Carthew; Ziebell; Vink, 2012) e os benefícios do tratamento com antagonistas do principal receptor da substância P, NK₁ (Donkin *et al.*, 2011; Corrigan *et al.*, 2012). Além disso, os níveis de substância P no líquido cefalorraquidiano são utilizados como parâmetros clínicos para prever a severidade e mortalidade após um TCE (Lorente *et al.*, 2015).

Infelizmente, não tivemos animais em número suficiente para realizar o protocolo comportamental combinando a derrota social e o TCE experimental pela queda de peso e investigar a influência dos níveis elevados de substância P em longo prazo e sua potencialização pelo estresse social no presente trabalho.

O protocolo de derrota social apresentou características comportamentais semelhantes no *Laboratoire de Pharmacologie de la Circulation Cérébrale* daquelas encontradas no Laboratório de Neurofarmacologia. As estratégias adotadas frente ao ataque físico apresentaram o mesmo perfil de prevalências com postura de submissão e tentativa de fuga sendo os comportamentos mais comumente expressos. No teste de partição, apesar da alta exploração alta da área da barreira pelo grupo derrotado ela é ainda menor que a do grupo controle. Esta maior exploração da barreira parece ser devida aos diferentes materiais utilizados (placa de acrílico transparente perfurado vs. placa aramada), pois a placa aramada pode ser escalada e representa uma possível estratégia de fuga para os animais.

O protocolo de derrota social levou a um perfil comportamental tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado, como observado pela redução no tempo de permanência nos braços aberto e uma tendência à redução da frequência de entradas (**figura 13**). Esse achado corrobora dados prévios de nosso laboratório, onde Santos (2015) mostrou um perfil tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado 24h após a derrota social. A ansiedade generalizada é

uma característica do TEPT e, portanto, reforça o potencial deste protocolo para o estudo de características do TEPT.

Contudo, um prejuízo na extinção de memórias de medo é uma característica mais específica ao TEPT que a ansiedade generalizada (Bleichert *et al.*, 2007), visto que é parte do espectro de sintomas intrusivos (DSM-5). Trabalhos prévios do grupo de Raymond Mongeau, nosso colaborador na Universidade Paris Descartes, mostram que o TCE experimental utilizando o modelo de ICC produz prejuízos na extinção de uma memória de medo associativa em longo, mas não de curto prazo (**figura 18**). Além disso, seus dados observam um aumento nos comportamentos de risco e um prejuízo na velocidade do processamento cognitivo (medido no teste de Barnes). Ainda, alterações na matéria branca cerebral foram encontradas em estruturas do sistema límbico, como hipocampo e amígdala três meses após o TCE, essas alterações podem estar correlacionadas com as alterações comportamentais observadas (Mongeau *et al.*, 2015), como mostrado abaixo.

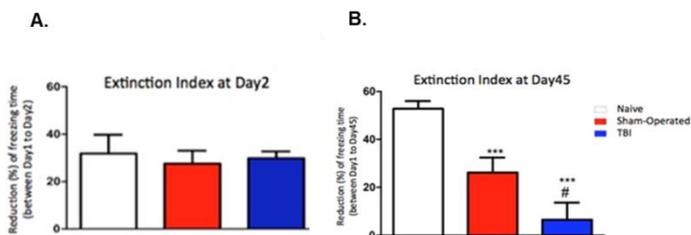


Figura 18: Índice de extinção dois dias (A) e seis semanas (B) após o condicionamento. Redução da resposta de congelamento de camundongos C57BL/6J machos que sofreram ICC ou craniotomia quando comparados aos animais naïves. Resultados expressos como média + e.p.m. e analisado por ANOVA de uma via seguida do post hoc de Newman-Keuls *** $p < 0.001$ em comparação ao grupo naïve # $p < 0.05$ em comparação ao grupo craniotomia (reproduzido com permissão do autor - Mongeau *et al.*, Eur. Col. Neuropsychopharmacol., 2015).

Outro grupo demonstrou recentemente a influência do estresse social na resposta ao TCE no comportamento (ansiedade e memória), nível de monoaminas, parâmetros de estresse oxidativo e ativação do eixo HPA. Interações sociais positivas atenuam a lesão secundária do TCE quando comparadas a camundongos isolados ou subordinados socialmente (Doulames *et al.*, 2015). Em ratos, a

ativação de GRs pelos glicocorticoides liberados em resposta à derrota social leva a um comportamento tipo-ansioso (Davies *et al.*, 2016) e a potencialização das respostas tipo-ansiosas, de medo condicionado e gerou prejuízo na extinção da memória de medo contextual associadas com uma elevação nos níveis de monoaminas nas estruturas do sistema límbico (Fox *et al.*, 2016).

A partir destes dados elaboramos a hipótese de que a associação do estresse social com o TCE levaria ao aparecimento deste déficit em um menor intervalo, após o trauma. Porém, em nossas condições experimentais, o TCE não alterou a aquisição ou extinção das memórias de medo associativo. Embora o ICC permita que os parâmetros do impacto sejam consistentes, principalmente no eixo dorsoventral, podem ocorrer pequenas variações na posição anteroposterior.

Essas variações na exata localização da lesão podem explicar a variabilidade encontrada nos grupos que sofreram TCE. Pois a região da craniotomia compreende toda a extensão do hipocampo e as porções ventral e dorsal do hipocampo tem funções distintas. O hipocampo dorsal está relacionado à função cognitiva e identificação de padrões enquanto o ventral é mais relacionado com emoções e a resposta ao estresse (Fanselow; Dong, 2010; Kesner, 2013). Além disso, regiões mais laterais do hipocampo dorsal (CA2) tem sido implicadas na memória social (Hitti; Siegelbaum, 2014). Desta forma, o epicentro da lesão na região dorsal do hipocampo pode atrapalhar a discriminação de padrão levando a uma generalização da resposta de medo. Já o epicentro na porção ventral do hipocampo interfere com o processamento emocional, a resposta ao estresse e ativação do eixo HPA. Ainda, a lesão de conexões neurais entre o hipocampo e o córtex frontal pode impedir a influência do estresse social sobre a extinção da resposta de medo (Cenquizca; Swanson, 2007).

Em paralelo com o experimento ao experimento comportamental, grupos independentes de animais foram eutanasiados 24h após o TCE para análise histológica da expressão de FJB.

É importante mencionar que os efeitos biológicos associados com a lesão secundária associada ao TCE são mediados, ao menos em parte, por uma combinação de respostas inflamatórias e processos excitotóxicos. Isso poderia levar a um excesso de glutamato liberado pelas células danificadas, o que causa um aumento no influxo de íons cálcio e sódio acompanhado de uma sobrecarga de radicais livres que podem levar ao sofrimento e morte celular (Bales *et al.*, 2009).

O estresse social por sua vez produz alterações fisiológicas que são consistentes com a estimulação repetida do eixo HPA e do sistema nervoso autônomo simpático, além de apresentar células em sofrimento no hipocampo em curto prazo (Hammamieh *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014; Chakraborty *et al.*, 2015; Santos, 2015) e uma redução das espinhas dendríticas dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal a longo prazo (Hammamieh *et al.*, 2012).

Logo, nós supomos que uma potencialização dos processos neurodegenerativos induzidos pelo TCE seria induzida pelo estresse social que poderia ser observada em curto prazo após o TCE. O FJB é um corante anionico que é específico para neurônios em degeneração (Hopkins, Wang, Schmued, 2000; Schmued; Hopkins, 2000; Ye *et al.*, 2001), e outros grupos demonstraram uma maior marcação de FJB após o TCE (Sato *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2005; Helmich *et al.*, 2005). Logo, este foi o marcador escolhido para avaliar o efeito da associação entre o estresse social e o TCE no córtex e hipocampo no hemisfério esquerdo.

Observamos um grande número de células positivas no córtex e no hipocampo dos grupos TCE em relação aos grupos craniotomia. O grupo craniotomia tem células positivas mais localizadas próximo à região da craniotomia e no limite do córtex, os grupos TCE apresentam uma lesão extensa no córtex esquerdo e pudemos medir a área, mostrando que nesta medida o estresse teve um efeito discreto em aumentar a lesão cortical sem aumentar significativamente o número de células positivas.

O estresse não teve influência no número de células FJB positivas no hipocampo, mas há uma discrepância entre as sub-regiões hipocampais em relação ao número de células. A predominância de células no giro denteado pode ser explicada pelo fato que esta região hipocampal recebe a maior parte das aferências corticais e subcorticais, sendo a primeira região a receber projeções de outras estruturas do sistema límbico em resposta ao estresse (Fa *et al.*, 2014). Além disso, a camada subgranular do giro denteado é um importante centro de neurogênese espontânea, e os novos neurônios são altamente suscetíveis ao estresse (Schoenfeld; Gould, 2012).

Dados preliminares de imunomarcação para a proteína ácida fibrilar da glia (GFAP, do inglês *glial fibrillary acidic protein*) indicam uma astrogliose quatro semanas após o ICC, quando comparados aos outros grupos. Portanto, há a possibilidade que a perda de neurônios observada 24h após o trauma seja compensada pela astrogliose.

É importante levar em consideração o intervalo entre o estresse social e o TCE, e, no nosso caos, nós utilizamos um intervalo de 24h. É possível que um intervalo mais longo pudesse produzir respostas comportamentais bastante diferentes devido a cinética dos mediadores da resposta ao estresse e a ativação do sistema nervoso autônomo que podem influencia na resposta inflamatória (Pfau; Russo, 2015; Joëls; Baram, 2009).

O que podemos concluir com essa etapa do trabalho é que o estresse social e o TCE tem potencial aditivo, porém a cinética desta interação precisa ser mais bem explorada. Como, por exemplo, expor os animais ao estresse social após o TCE, como um gatilho, pois já mostramos o efeito do estresse sobre respostas de medo condicionado contextual com um menor intervalo de tempo entre a derrota social e o condicionamento pavloviano. Ainda, a lesão secundária após o TCE envolve uma inflamação crônica (Jin *et al.*, 2012; Lagraoui *et al.*, 2012) que pode ser potencializada pelo estresse social, já que este também leva a uma resposta inflamatória (Reader *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, K. J. *et al.* Regional distribution of Fluoro-Jade B staining in the hippocampus following traumatic brain injury. **Experimental Neurology**, v. 193, p. 125–130, 2005.
- BAHRAINI, N.H. *et al.* Traumatic Brain Injury and Posttraumatic Stress Disorder. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 37, p. 55–75, 2014.
- BALES, J. W. *et al.* Persistent cognitive dysfunction after traumatic brain injury: A dopamine hypothesis. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 33, p. 981-1003. 2009.
- BLECHERT, J. *et al.* Fear conditioning in posttraumatic stress disorder: Evidence for delayed extinction of autonomic, experiential, and behavioural responses. **Behaviour Research and Therapy**, v. 45, p. 2019–2033, 2007.
- BORGENS, R. B.; LIU-SNYDER, P. Understanding secondary injury. **Q. Rev. Biol.**, v. 87, p. 89–127, 2012.
- BOTO, G.R. *et al.* A historical analysis of severe head injury. **Neurosurgical Review**, v. 32, n. 3, p. 343-53, 2009.
- CARTHEW, H.L.; ZIEBELL, J.M.; VINK, R. Substance P-induced changes in cell genesis following diffuse traumatic brain injury. **Neuroscience**, v. 12, n. 214, p. 78-83, 2012.
- CENQUIZCA, L. A.; SWANSON, L. W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, v. 56, p. 1–26, 2007.
- CHAKRABORTY, N. *et al.* Gene and stress history interplay in emergence of PTSD-like features. **Behavioural Brain Research**, v. 292, p. 266–277, 2015.
- CHOU, D.; HUANG, C.-C.; HSU, K.-S. Brain-derived neurotrophic factor in the amygdala mediates susceptibility to fear conditioning. **Experimental Neurology**, v. 255, p.19-29, 2014.
- CORRIGAN, F. *et al.* A substance P antagonist improves outcome in female Sprague Dawley rats following diffuse traumatic brain injury. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v.18, n. 6, p. 513-5, 2012.

- DANIELS, J. K. *et al.* White matter integrity and its relationship to PTSD and childhood trauma--a systematic review and meta-analysis. **Depression and anxiety**, v. 30, p. 207-216, 2013.
- DASKALAKIS, N.P.; YEHUDA, R.; DIAMOND, D.M. Animal models in translational studies of PTSD. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, p. 1895-1911, 2013.
- DAVIES, D.R. *et al.* Mild traumatic brain injury with social defeat stress alters anxiety, contextual fear extinction and limbic monoamines in adult rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, n. 71, p. 1-13, 2016.
- Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. — 5th ed. American Psychiatric Association, 2013.
- FA, M. *et al.* Stress modulation of hippocampal activity – Spotlight on the dentate gyrus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 112, p. 53–60, 2014.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, p. 7-19, 2010.
- FLIERL, M.A. *et al.* Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. **Nature Protocols**, v. 4, n. 9, p. 1328-37, 2009.
- FLINT, J.; MUNAFÒ, M.R. The endophenotype concept in psychiatric genetics. **Psychological Medicine**, v. 37, p. 163–180, 2007.
- GRUNDY, P. L. *et al.* Glucocorticoids modulate BDNF mRNA expression in the rat hippocampus after traumatic brain injury. **Molecular Neuroscience**, v. 11, n. 15, 2000.
- HAMMAMIEH, R. *et al.* Murine model of repeated exposures to conspecific trained aggressors simulates features of post-traumatic stress disorder. **Behavior Brain Research**, v. 235, p. 55–66, 2012.
- HELLMICH, H.L. *et al.* Dose-dependent neuronal injury after traumatic brain injury. **Brain Research**, v. 1044, p.144–154, 2005.
- HITTI, F.L.; SIEGELBAUM, S.A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. **Nature**, v. 508, n. 7494, p. 88-92, 2014.

- HOPKINS, K. J.; WANG, G.; SCHMUED, L. C. Temporal progression of kainic acid induced neuronal and myelin degeneration in the rat forebrain. **Brain Research**, v. 864, p. 69–80, 2000.
- JANKORD, R. *et al.* Stress activation of IL-6 neurons in the hypothalamus
Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 299, R343–R351, 2010.
- JIN, X. *et al.* Temporal Changes in Cell Marker Expression and Cellular Infiltration in a Controlled Cortical Impact Model in Adult Male C57BL/6 Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, e41892, 2012.
- JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 459-66, 2009.
- KESNER, R.P. An analysis of the dentate gyrus function. **Behavioural Brain Research**, v. 254, p. 1–7, 2013.
- LAGRAOUI, M. *et al.* Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics. **Frontiers in Neurology**, v. 3, a. 155, p. 1-14, 2012.
- LASKOWSKI, R.A.; CREED, J.A.; RAGHUPATHI, R. Pathophysiology of Mild TBI: Implications for Altered Signaling Pathways. In: KOBEISSY F.H. (ed.) **Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects**. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2015.
- LEUNER, B.; GOULD, E. Structural Plasticity and Hippocampal Function. **Annual Review of Psychology**, v. 61, p. 111–140, 2010.
- LOANE, D.J.; KUMAR, A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. **Experimental Neurology**, v. 275, p. 316-327, 2016.
- LORENTE, L. *et al.*, Serum substance P levels are associated with severity and mortality in patients with severe traumatic brain injury. **Critical Care**, v.19, n. 1, p. 1-8, 2015.

- MAAS, A.I.R.; STOCCHETTI, N.; BULLOCK, R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. **Lancet Neurology**, 7, p. 728–41, 2008
- MARCHETTE, R. C. N.; SANTOS, E. C. S.; LIMA, T. C. M. P.1.h.033 Influence of housing conditions on social defeat paradigm in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. S288-S289, 2014.
- MBL Brain atlas <http://www.mbl.org/atlas170/atlas170_frame.html>
- MENON, D. K. *et al.* Position statement: definition of traumatic brain injury. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 91, n. 11, p.1637–40, 2010.
- MONGEAU, R. *et al.* Traumatic brain injury increases PTSD-like behaviors in mice: possible role of white matter alterations. 9th **IBRO World Congress**, Rio de Janeiro, 2015.
- OLIVEIRA, P.A. **O traumatismo cranioencefálico como fator de predisposição à doença de Parkinson: evidências obtidas em um modelo experimental.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2012.
- PFAU, M. L.; RUSSO, S. J. Peripheral and central mechanisms of stress resilience. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 66-79, 2015.
- PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, p. 274–285, 1992.
- PRASAD K. N.; BONDY, S. C. Common biochemical defects linkage between post-traumatic stress disorders, mild traumatic brain injury (TBI) and penetrating TBI. **Brain research**, v. 1599, p. 103-114, 2015.
- READER, B. F. *et al.* Peripheral and Central Effects of Repeated Social Defeat Stress: Monocyte Trafficking, Microglial Activation, and Anxiety. **Neuroscience**, v. 289, p. 429–442, 2015.

- ROSTAMI, E. *et al.* Alteration in BDNF and its receptors, full-length and truncated TrkB and p75(NTR) following penetrating traumatic brain injury. **Brain Res.**, v. 1542, p. 195-205, 2014.
- SANTOS, E.C.S. Ativação astrocitária e envolvimento do sistema taquicinérgico em um modelo animal de transtorno de estresse pós-traumático. Tese de doutorado, UFSC, Florianópolis, 2015.
- SATO, M. *et al.* Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: time course and regional variability. **Brain Research**, v. 917, p. 45–54, 2001.
- SCHMUED, L. C.; HOPKINS, K. J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. **Brain Research**, v. 874, p. 123–130, 2000.
- SCHOENFELD, T. J.; GOULD, E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 12–21, 2012.
- STICKROD G, SOYKE J, WEEKS JR. Cyanoacrylate ester adhesive: a versatile tool in experimental surgery. **Physiology Behavior**, v. 32, n. 4, p. 695-6, 1984.
- XIONG, Y.; MAHMOOD, A.; CHOPP, M. Animal models of traumatic brain injury. **Nature Reviews Neuroscience**, v.14, n. 2, p. 128-42, 2013.
- YE, X. *et al.* Fluoro-Jade and silver methods: application to the neuropathology of scrapie, a transmissible spongiform encephalopathy. **Brain Research Protocols**, v. 8, p.104–112, 2001.

ANEXO I: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo
 PPO0798
Título
 METODOLOGIAS UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA
Data de Entrada
 11/09/2012

Resultado:
 Aprovado
Data / Prazo
 21/12/2012

Considerações

Ofício nº 126/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- RECURSO aprovado ad referendum por quatro anos, para a utilização de sete mil ratos (*Rattus Norvegicus*) e doze mil camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: BIC-UFSC

Revoga-se o Ofício nº 108/CEUA/PRPE/2012

Data/Prazo:

01/11/2012

Considerações:

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou pelo indeferimento devido a várias inconsistências no preenchimento do protocolo.

A CEUA recomenda a observação dos pareceres em anexo quando da submissão de um novo protocolo de modo a facilitar sua apreciação.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
 Data 21/03/2016

Data 21/12/2012

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
 PRESIDENTE