

Bruna Caroline Pierone

**CONFLITO SOCIAL:
UM MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRESSE PÓS-
TRAUMÁTICO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Título de
Mestre em Farmacologia
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Thereza
Christina Monteiro de Lima
Coorientador: Dr. Filipe Carvalho
Matheus

Florianópolis
2018

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

Pierone, Bruna Caroline

Conflito social: Um modelo experimental de
estresse pós-traumático em camundongos / Bruna
Caroline Pierone ; orientador, Thereza Christina
Monteiro de Lima, coorientador, Filipe Carvalho
Matheus, 2018.

76 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

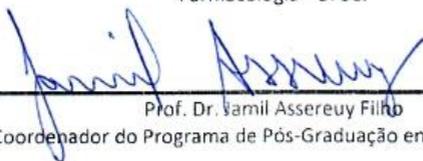
1. Farmacologia. 2. Transtorno de Estresse Pós
traumático. 3. Derrota Social. 4. Resiliência. 5.
Vulnerabilidade. I. Lima, Thereza Christina
Monteiro de . II. Matheus, Filipe Carvalho. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

“Conflito Social: um modelo experimental de estresse pós-traumático em camundongos”

Por

Bruna Caroline Pierone

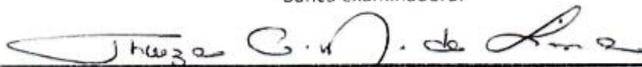
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (31/PPGPMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



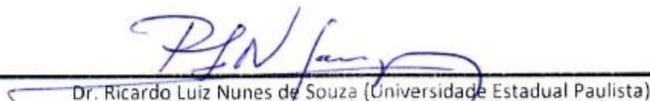
Prof. Dr. Vamil Assereuy Filho

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr.ª Thereza Christina Monteiro de Lima (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientadora



Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza (Universidade Estadual Paulista)



Dr. Geison de Souza Izidio (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho a minha família.
Vocês são minha maior motivação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Patrícia e William, por terem me criado com todo amor e carinho e por sempre respeitarem e apoiarem as minhas escolhas.

Ao meu irmão, Matheus, por ser o melhor irmão que alguém poderia ter e por sempre me encher de alegria.

Ao meu namorado, Caibe, por ser companheiro em todos os momentos. Obrigada por sempre me apoiar, por ter paciência comigo e me dar tanto amor.

À minha orientadora, Prof^a. Thereza, pela orientação, paciência e por ter depositado sua confiança em mim na realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Filipe Matheus, por ter me acolhido no início do mestrado, pela orientação e por todos os ensinamentos.

Aos professores Ricardo Nunes de Souza, Geison Izídio e Helena Cimarosti por terem gentilmente aceitado o convite de avaliar e contribuir com este trabalho.

À Renata Marchette, pelos conselhos e contribuições na realização deste trabalho.

Aos amigos de Laboratório de Neurofarmacologia, Felipe, Ericks, Ana Cláudia, Cristiele e Murilo, pelas risadas, conversas, conselhos e por toda ajuda na realização deste trabalho.

À Marina, pela amizade sincera, por todas as conversas, risadas, e conselhos mesmo de longe. Obrigada por sempre acreditar e torcer por mim.

À Barbara, pela amizade, pelas conversas, risadas, comidas compartilhadas e por toda ajuda. Obrigada por sempre cuidar de mim.

Aos meus amigos tão queridos de Londrina, principalmente à Mariana e Daniele, por sempre arranjarem um tempinho para me ver toda vez que volto para casa.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia e do Centro de Ciências Biológicas.

A todas as pessoas que não foram aqui citadas, mas que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

A todos os animais utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq.

“Um *expert* é uma pessoa que cometeu todos os erros possíveis em uma área específica”

(Niels Bohr)

RESUMO

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é um transtorno psiquiátrico desencadeado a partir da exposição a um evento traumático. Ocorre frequentemente em associação com outros transtornos psiquiátricos e seus sintomas causam redução da qualidade de vida, além de prejuízos sociais e econômicos. Embora este transtorno tenha sido amplamente estudado nas últimas décadas, muitos aspectos de sua neurobiologia ainda não foram esclarecidos, o que dificulta o desenvolvimento de novos fármacos e métodos de diagnóstico eficazes e especializados. Deste modo, faz-se necessário o desenvolvimento de modelos animais que se enquadrem nos critérios de validade vigentes e permitam estudar a neurobiologia do TEPT, bem como novos alvos terapêuticos. Atualmente, os modelos de estresse social têm sido amplamente utilizados para o estudo de transtornos psiquiátricos. Neste contexto, o paradigma de derrota social (DS) tem se destacado por ser um modelo naturalístico que se baseia em interações agonísticas entre roedores machos coespecíficos desencadeadas por disputa territorial. O objetivo deste trabalho foi otimizar um protocolo de DS para o estudo de TEPT que havia sido previamente estabelecido por nosso grupo de pesquisa. Para isso, camundongos C57BL/6 (intrusos) foram expostos a camundongos da linhagem *Swiss* (residentes) em suas caixas moradias por três ou cinco sessões de 3 h de duração, realizadas em dias consecutivos. Decorridas 24 h do término da última sessão, grupos independentes de animais intrusos foram avaliados no teste de partição (TP) ou no teste de interação social (TIS). Em um dos protocolos adotados os animais foram expostos ao protocolo de DS composto por três sessões e foram posteriormente avaliados no TIS 24 h e 10 dias após a última sessão com o objetivo de identificar e investigar diferenças nas respostas defensivas de subpopulações de animais vulneráveis e resilientes ao estresse. Em outro protocolo, os animais foram expostos a cinco sessões de DS e avaliados em uma bateria de testes comportamentais – TIS, labirinto em cruz elevado (LCE) e teste de suspensão pela causa (TSC). Não foram observadas alterações nas respostas defensivas dos camundongos expostos ao protocolo de DS de três ou cinco sessões no TP. Quando avaliadas as respostas defensivas dos animais que haviam sido expostos ao protocolo de DS de 3 sessões no TIS, foi observado que os camundongos vulneráveis apresentaram uma tendência a explorar por menos tempo a zona de interação social do aparato, quando comparado ao grupo controle e resiliente. Também foi observada uma redução da distância total percorrida e do número de entradas na ZIS entre o teste e

o reteste, sugerindo que houve habituação ao aparato. Já quando submetidos ao protocolo de DS de 5 sessões e avaliados no TIS, também foi observado que os camundongos derrotados apresentaram uma tendência a explorar por menos tempo a ZIS e a permanecer por mais tempo na zona dos cantos na presença do alvo social, parâmetros que indicam comportamento de esquiva social, sendo que não foi observado comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo, no LCE e no TSC, respectivamente. Em resumo, nossos resultados sugerem que foi estudada uma população composta predominantemente por animais que apresentavam um fenótipo de resiliência ao estresse, hipótese sustentada pelos resultados obtidos no TIS e pela ausência de alterações observadas no TP.

Palavras-chave: Transtorno de estresse pós-traumático. Derrota social. Resiliência.

ABSTRACT

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a psychiatry disorder triggered by the exposition to a traumatic event. It is frequently associated with comorbidities that result in a decrease in life quality besides social and economic losses. Thus, it is necessary the development of animal models that fit the validity criteria and allow the study of PTSD neurobiology, as well as new therapeutic targets. Nowadays, the social stress models have been largely utilized to study psychiatry disorders. In this context, the social defeat (SD) paradigm has become a naturalistic model that is based in agonistic interaction between co-specific male rodents, unleashed by territorial dispute. The goal of this study was to optimize a SD protocol previously established by our research group in order to study PTSD. C57BL/6 mice (intruder) were exposed to Swiss mice (resident) in the resident house for three or five 3 h sessions, performed in consecutive days. After 24 h of the last session independent groups of intruder animals were evaluated through the partition test (PT) or social interaction test (SIT). Aiming to identify and investigate the differences in defensive response of subpopulations of animals vulnerable or resilient to the stress, animals were evaluated in the SIT 24 h and 10 days after the last 3-days protocol session. In the 5-days protocol animals were evaluated in a behavioral test battery – SIT, elevated plus maze (EPM) and tail suspension (TS). There were no alterations observed in the defensive response among the mice exposed to the 3-days and 5-days protocol in the PT. When the defensive responses of the animals exposed to the 3-days protocol were evaluated, we observed that the vulnerable mice presented a tendency to a lower exploration of the social interaction zone (SIZ), when compared to the control and resilient groups. It was also seen a reduction of the total distance traveled and in the number of entries in the SIZ between the test and retest session, indicating a habituation to the apparatus. When subject to the SD protocol of five sessions and evaluated in the SIT, the defeated mice presented a tendency to a lower exploration of the SIZ and to stay more in the corner zone, in the presence of the social target, parameters that indicate social avoidance behavior. However, it was not observed any anxiety-like or depression-like behavior, in the EPM and TS tests, respectively. In summary, our results suggest that the studied population was mostly composed by animals that present a resilient phenotype to the stress, and this hypothesis is sustained by the results obtained in the SIT and for the lack of changes in the PT.

Keywords: Post-traumatic stress disorder. Social defeat. Resilience.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em resposta ao estresse.....	25
Figura 2. Prevalência de exposição a situações traumáticas e desenvolvimento de transtorno de estresse pós-traumático (TEPT)	29
Figura 3. Representação esquemática do protocolo de derrota social (DS)	39
Figura 4. Representação esquemática do teste de partição (TP)	40
Figura 5. Representação esquemática do aparato utilizado para realização do teste de interação social (TIS)	41
Figura 6. Classificação das estratégias comportamentais adotadas pelos animais frente ao ataque	43
Figura 7. Representação esquemática do protocolo experimental 1	43
Figura 8. Representação esquemática do protocolo experimental 2	43
Figura 9. Representação esquemática do protocolo experimental 3. ...	44
Figura 10. Avaliação das respostas comportamentais dos camundongos submetidos a 3 ou 5 sessões de derrota social (DS) no teste de partição (TP)	45
Figura 11. Mapa de ocupação média dos camundongos submetidos ao protocolo de derrota social (DS) de 3 ou 5 sessões no teste de partição (TP)	46
Figura 12. Prevalência de estratégias comportamentais adotadas frente ao ataque físico pelos camundongos submetidos ao protocolo de derrota social (DS)	47
Figura 13. Índice de interação social obtido pelos animais do grupo controle e derrotado no teste de interação social (TIS) realizado 24h e no reteste 10 dias após a última sessão de derrota social (DS).....	49

Figura 14. Avaliação de parâmetros comportamentais e locomotores de camundongos expostos ao protocolo de derrota social no teste e reteste de interação social realizados 24h e 10 dias após a última sessão de derrota50

Figura 15. Avaliação das respostas comportamentais dos camundongos intrusos no teste de interação social (TIS) após o protocolo de derrota social (DS) de 5 sessões52

Figura 16. Avaliação do comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo após o protocolo de derrota social (DS) de 5 sessões53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-V</i>) e comportamentos correspondentes em modelos animais.....	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico, do inglês *adrenocorticotropic hormone*

CRH – hormônio liberador de corticotrofina, do inglês *corticotropin releasing hormone*

DS – derrota social

DSM-V – Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5ª edição, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5 edition*

FDA – do inglês *Food and Drug Administration*

HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, do inglês *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*

ISRS – inibidores seletivos da recaptação de serotonina

LCE – labirinto em cruz elevado

SNA – sistema nervoso autônomo

SNC – sistema nervoso central

TDM – transtorno depressivo maior

TEPT – transtorno de estresse pós-traumático

TIS – teste de interação social

TP – teste de partição

TSC – teste de suspensão pela cauda

ZIS – zona de interação social

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
1.1.	TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO.....	23
1.2.	NEUROBIOLOGIA DO TEPT.....	24
1.3.	MODELOS ANIMAIS DE TEPT.....	27
1.4.	DERROTA SOCIAL (DS).....	30
2.	OBJETIVOS	35
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3.	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
3.2.	ANIMAIS	37
3.3.	DERROTA SOCIAL.....	37
3.3.1.	Alojamento e Seleção de Camundongos Residentes.....	37
3.3.2.	Alojamento de Camundongos Intrusos	38
3.3.3.	Protocolo de DS.....	38
3.4.	TESTES COMPORTAMENTAIS	39
3.4.1.	Teste de Partição	39
3.4.2.	Teste de Interação Social	40
3.4.3.	Labirinto em Cruz Elevado	41
3.4.4.	Teste de Suspensão pela Cauda	41
3.5.	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	42
3.5.1.	Protocolo Experimental 1 – Avaliação das estratégias comportamentais frente ao ataque e das respostas defensivas dos camundongos intrusos após o protocolo de derrota social no teste de partição	42
3.5.2.	Protocolo Experimental 2 – Avaliação das respostas defensivas dos camundongos intrusos após o protocolo de derrota social de 3 sessões no teste de interação social e investigação de subpopulações resilientes e vulneráveis	43
3.5.3.	Protocolo Experimental 3 – Avaliação das respostas defensivas dos camundongos intrusos após o protocolo de derrota social de 5 sessões em uma bateria de testes	44
3.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4.	RESULTADOS	45

4.1.	AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DEFENSIVAS DOS CAMUNDONGOS INTRUSOS APÓS O PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL NO TESTE DE PARTICIÇÃO	45
4.2.	AVALIAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS COMPORTAMENTAIS DOS CAMUNDONGOS INTRUSOS FRENTE AO ATAQUE DURANTE AS SESSÕES DE DERROTA SOCIAL.....	47
4.3.	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL DE 3 SESSÕES E IDENTIFICAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES RESILIENTES E VULNERÁVEIS AO ESTRESSE	48
4.4.	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DECORRENTES DO MODELO DE DERROTA SOCIAL DE 5 SESSÕES EM UMA BATERIA DE TESTES	51
5.	DISCUSSÃO	55
6.	RESUMO DE RESULTADOS.....	61
7.	CONCLUSÕES	63
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO	ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	75
		75

INTRODUÇÃO

1.1. TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é um transtorno psiquiátrico desencadeado a partir da exposição a um evento traumático que pode ter sido experimentado ou testemunhado por um indivíduo, no qual houve ameaça à vida ou à integridade física dele próprio ou de terceiros (CÂMARA FILHO & SOUGEY, 2001). Como exemplos de eventos traumáticos que podem causar TEPT, podem-se citar situações de violência urbana, como assaltos e sequestros, violência doméstica, abuso físico ou sexual, exposição a guerras, desastres naturais, acidentes automobilísticos ou de trabalho.

Na década de 1990 foi conduzido o primeiro estudo em larga escala de prevalência de transtornos mentais (denominado em inglês de *National Comorbidity Survey*) nos Estados Unidos. Este estudo estimou que a prevalência de ocorrência de TEPT no decorrer da vida é de 7,8% na população geral, sendo esta duas vezes maior em mulheres (10,4%) quando comparada àquela observada em homens (5,0%) (KESSLER *et al.*, 1995). Um estudo mais recente realizado por Kilpatrick e colaboradores (2013) estimou uma prevalência de 8,3% de ocorrência de TEPT na população geral, sendo de 11,0% em mulheres e 5,4% em homens, dados similares aos observados por Kessler e colaboradores (1995). Já no Brasil, um estudo conduzido no estado de Rio de Janeiro, revelou uma prevalência de 11,1% de ocorrência de TEPT na população geral, sendo de 15,9% em mulheres e 5,1% em homens (LUZ *et al.*, 2016).

Os sintomas do TEPT podem ser agrupados em três categorias, determinadas de acordo com os critérios estabelecidos pela 5ª Edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-V*). Ressalta-se que os sintomas característicos do transtorno devem persistir por pelo menos um mês, causar sofrimento significativo e não estar relacionados a outras condições médicas.

O primeiro grupo de sintomas engloba aqueles relacionados à reexperiência traumática, na qual o indivíduo apresenta pensamentos recorrentes e intrusivos, pesadelos ou *flashbacks* que remetem à lembrança do trauma. O segundo conjunto de sintomas envolve o comportamento de esquiva e isolamento social, isto é, o indivíduo evita situações e atividades que possam reavivar as lembranças do trauma. Por fim, o terceiro conjunto de sintomas envolve a hiperexcitabilidade

psíquica e psicomotora, englobando distúrbios de sono, dificuldade de concentração, irritabilidade e hipervigilância (APA, 2013).

Além disso, pacientes que sofrem de TEPT são mais propensos a desenvolver outros transtornos mentais, como depressão, transtornos de ansiedade ou abuso e dependência de substâncias psicoativas (ZATZICK *et al.*, 2012; APA, 2013).

Atualmente, o tratamento do TEPT se dá pela associação entre a psicoterapia e a farmacoterapia, sendo os antidepressivos, principalmente os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), os medicamentos de primeira escolha (BERGER *et al.*, 2007). Existem apenas dois medicamentos (ambos ISRS) que são indicados pelo FDA (em inglês *Food and Drug Administration*) para o tratamento de TEPT (YEHUDA *et al.*, 2015). Adicionalmente, estudos relatam que menos de um terço dos pacientes tratados com ISRS respondem adequadamente ao tratamento com esta medicação (ZOHAR *et al.*, 2002). Esta escassez de estratégias terapêuticas específicas e eficazes para o tratamento do TEPT se dá principalmente pelo fato de que ainda se conhece pouco sobre a neurobiologia do transtorno.

1.2. NEUROBIOLOGIA DO TEPT

Nas últimas décadas foram conduzidos diversos estudos que visavam elucidar os mecanismos envolvidos na neurobiologia do TEPT. Embora tenham sido realizados avanços importantes no entendimento do transtorno, ainda não foi possível compreender qual é a relação entre todos os sistemas que estão alterados no TEPT. Deste modo, os mecanismos envolvidos na origem e no desenvolvimento do transtorno ainda não foram completamente esclarecidos (LIBERZON & ABELSON, 2016).

Entre os sistemas envolvidos na neurobiologia do TEPT podemos citar o sistema neuroendócrino e o sistema nervoso autônomo (SNA), sendo que ambos estão envolvidos na resposta a situações de estresse (MCEWEN, 2002). Os estressores podem ser definidos como situações em que há uma ameaça real ou a percepção de uma ameaça à sobrevivência do indivíduo e podem ser de diferentes tipos, como físicos, psicológicos ou sociais (VAN DE KAR & BLAIR, 1999).

Quando o indivíduo é exposto a algum tipo de estressor é desencadeada uma resposta adaptativa de ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), conforme ilustrado na Figura 1. Primeiramente, os estímulos neuronais relacionados à situação de estresse são recebidos por estruturas que compõem o sistema límbico, como o hipocampo, a

amígdala e o córtex pré-frontal, sendo posteriormente convertidos à uma resposta endócrina no hipotálamo. O eixo é composto pelo núcleo paraventricular do hipotálamo que é responsável por secretar o hormônio liberador de corticotrofina (*corticotrophin-releasing hormone* - CRH) e o hormônio vasopressina. O CRH será transportado através do sistema porta hipofisário até a pituitária, também chamada de hipófise, onde irá exercer sua função de estimular a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotrophic hormone* - ACTH). O ACTH, por sua vez, após secretado, será transportado pela corrente sanguínea até a glândula adrenal, na qual irá atuar estimulando a liberação de glicocorticoides. A ativação do eixo e a consequente liberação de glicocorticoides será inibida por meio de um mecanismo de *feedback* negativo mediado por receptores que são ativados pelos próprios glicocorticoides (revisado por PHILLIPS *et al.*, 2006).

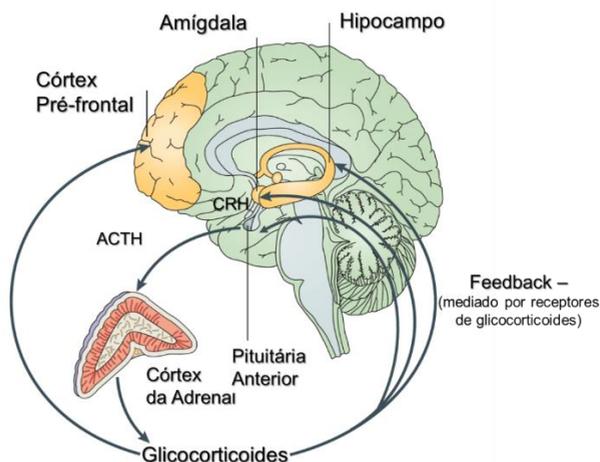


Figura 1. Ativação do eixo HPA em resposta ao estresse. O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) que será transportado até a pituitária (também chamada de hipófise) anterior, onde estimulará a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que será transportado pela corrente sanguínea até o córtex da glândula adrenal, estimulando a liberação dos glicocorticoides. Os glicocorticoides atuam por meio da ativação de seus receptores expressos em estruturas límbicas (córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo) e no eixo (hipotálamo e pituitária) modulando a resposta ao estresse. Adaptado de Krugers, Hoogenraad & Groc (2010).

Dentre os tipos de glicocorticoides existentes, o cortisol é o principal responsável por mediar as respostas fisiológicas ao estresse.

Portanto, em situações de exposição ao estresse ocorrem elevações dos níveis de cortisol por curtos períodos de tempo, que têm como finalidade preparar os sistemas do organismo para reagir contra o estressor. Entretanto, alterações prolongadas nos níveis de cortisol estão relacionadas a prejuízos cognitivos, danos em estruturas do sistema nervoso central (SNC) e a alguns transtornos psiquiátricos como o transtorno depressivo maior (TDM) e o TEPT (O'BRIEN, 1997; McEWEN, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2006).

Existem indícios de que em pacientes com TEPT ocorre uma disfunção do eixo HPA em que há um aumento da ativação do mecanismo de *feedback* negativo, essa hipótese foi sugerida a partir da observação de que pacientes com TEPT apresentam níveis reduzidos de cortisol (YEHUDA *et al.*, 1990; 1995; 1996).

Além disso, como citado anteriormente, o sistema nervoso autônomo também está alterado no TEPT. Estudos sugerem que ocorre uma hiper-reativação do sistema nervoso simpático (SOUTHWICK *et al.*, 1999) caracterizada pela liberação excessiva de norepinefrina. Esta parece ser responsável por desempenhar um papel importante mediando a formação de memórias traumáticas, e está relacionada com os sintomas de hiperexcitação e reexperimentação traumática (PITMAN *et al.*, 2012).

Além das alterações no funcionamento de sistemas que regulam a resposta ao estresse, também já foram identificadas alterações em estruturas cerebrais que fazem parte desses sistemas e que desempenham outras funções importantes como formação de memória e controle emocional, tanto em animais expostos à modelos de estresse quanto em humanos com TEPT (SHIN & LIBERZON, 2010).

Estudos realizados em animais sugerem que modelos de estresse crônico causam danos no hipocampo (SAPOLSKY *et al.*, 1990) e no córtex pré-frontal ventromedial (PITMAN *et al.*, 2012). A partir desses achados e com o desenvolvimento das técnicas de estudo de neuroimagem, como a imagem de ressonância magnética, foi possível investigar se essas mesmas estruturas se encontravam danificadas em pacientes com transtornos psiquiátricos. Deste modo, um dos achados mais consistentes em estudos conduzidos em pacientes com TEPT foi a redução do volume do hipocampo, do córtex pré-frontal ventromedial e do córtex cingulado anterior dorsal (BREMNER *et al.*, 1995; GURVITS *et al.*, 1996; STEIN *et al.*, 1997; KITAYAMA, QUINN & BREMNER, 2006; KASAI *et al.*, 2008;). Entretanto, Pitman e colaboradores (2012) ressaltaram em seu trabalho, que a origem destas alterações ainda é incerta em humanos, e que estas podem ser alterações genéticas ou de origem ambiental que já estavam presentes nos indivíduos anteriormente

à exposição ao episódio traumático e ao aparecimento dos sintomas do TEPT podendo ser, portanto, consideradas como fatores de risco.

Adicionalmente, os estudos de neuroimagem funcional também evidenciaram que há uma ativação exagerada da amígdala – uma das estruturas que compõe o sistema límbico, cuja função está relacionada a identificação de situações de ameaça, aprendizagem e expressão de medo em resposta a estímulos relacionados ao trauma e a estímulos genéricos em pacientes com TEPT (ETKIN & WAGER, 2007).

1.3. MODELOS ANIMAIS DE TEPT

Visto que muitos aspectos da neurobiologia do TEPT ainda não foram esclarecidos e que existe a necessidade de se desenvolver novos medicamentos que sejam específicos e eficazes, além de métodos que permitam o diagnóstico precoce do transtorno, os modelos de estudo animal consistem em boas ferramentas para investigar a fisiopatologia do TEPT e possíveis novos alvos farmacológicos.

Embora os modelos animais não sejam capazes de reproduzir alguns dos principais sintomas deste transtorno, como aqueles subjetivos envolvidos na reexperiência traumática (memórias e pensamentos intrusivos, pesadelos e *flashbacks* relacionados ao trauma), eles podem mimetizar outros sintomas importantes (Tabela 1), como hipervigilância e hiperexcitação, esquiva e/ou respostas exageradas a estímulos que possam lembrar o trauma (COHEN *et al.*, 2014).

Com o intuito de estabelecer um método de comparação entre diferentes modelos animais para o estudo da depressão, Willner (1986) descreveu três critérios que podem ser utilizados para validar modelos animais de diversas patologias. Estes critérios são: a validade analógica, a validade preditiva, e a validade teórica.

A validade analógica refere-se ao fato de que o modelo animal deve apresentar características semelhantes às da condição que se deseja estudar, ou seja, o modelo deve apresentar etiologia, sintomatologia e processos patológicos semelhantes aos do transtorno ou doença estudado. Já a validade preditiva refere-se à capacidade do modelo de apresentar resultados semelhantes aos observados na clínica diante de um determinado tratamento farmacológico, portanto este critério avalia se o modelo é capaz de fazer previsões a respeito dos efeitos de fármacos em humanos. E a validade teórica determina que o modelo deve apresentar um pressuposto teórico semelhante ao da doença ou transtorno estudado, como por exemplo, ser capaz de causar alterações neurobiológicas similares as observadas em humanos (revisado por STAA Y, 2006).

Tabela 1. Critérios do DSM-V e comportamentos correspondentes em modelos animais

Critérios do DSM-V	Equivalente em Modelos Animais
Comportamento intrusivo	- Memória de medo: congelamento, resposta exagerada a estressores de baixa intensidade
Esquiva	- Comportamento tipo-ansioso no LCE - Comportamento de esquiva social
Alterações negativas da cognição e do humor	- Alteração na memória espacial - Redução da interação social - Redução do consumo de sacarose - Imobilidade no teste de nado forçado
Alterações da excitação e reatividade	- Resposta exagerada no teste de sobressalto acústico - Alterações do sono - Aumento da atividade locomotora - Aumento do comportamento agressivo

Adaptado de Schöner e colaboradores (2017).

Um dos principais desafios enfrentados no desenvolvimento de um modelo para estudo de TEPT é o fato de que este transtorno é caracterizado por sintomas que são comuns a outros transtornos psiquiátricos, como o TDM (WHITAKER *et al.*, 2014). Segundo Yehuda e Antelman (1993), os estressores utilizados em um modelo de TEPT devem ser intensos e de curta duração, de forma semelhante ao que ocorre em humanos que são expostos a estressores agudos, como por exemplo, desastres naturais e acidentes automobilísticos. Deste modo, os estressores utilizados em paradigmas experimentais de TEPT, se diferenciariam daqueles utilizados na indução de comportamento tipo-depressivo em animais, que geralmente são crônicos e de baixa intensidade (SCHÖNER *et al.*, 2016).

Outro ponto importante que foi levantado por Yehuda e Antelman (1993), que deve ser considerado em um modelo animal de TEPT, é a questão da variabilidade interindividual em resposta ao estresse. Embora, a exposição a um trauma seja um critério fundamental para o diagnóstico de TEPT, vale lembrar que nem todos os humanos que são expostos a situações estressantes e traumáticas desenvolvem o transtorno (Figura 2). Sabe-se que existem fatores, que podem ser genéticos e/ou ambientais,

que precedem o trauma que podem predispor o desenvolvimento do transtorno (KESSLER *et al.*, 1995). Portanto, um bom modelo para estudo de TEPT é aquele em que o estressor não é capaz de induzir as alterações comportamentais características do transtorno em uma parcela da população estudada, de modo que se possa estudar fatores relacionados à vulnerabilidade e resiliência ao estresse.

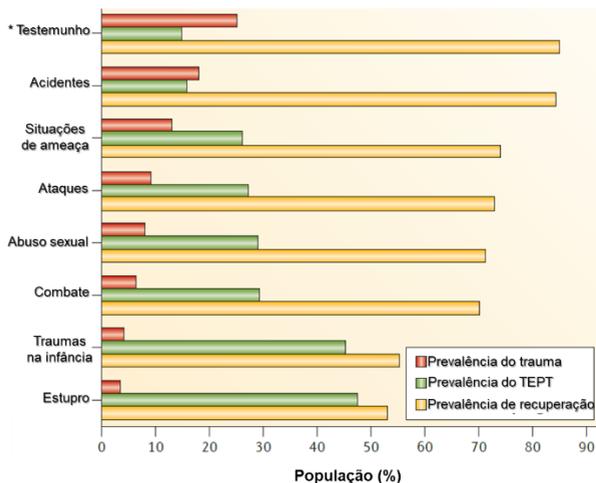


Figura 2. Prevalência de exposição a situações traumáticas e desenvolvimento de transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Barras vermelhas representam a prevalência de cada tipo de trauma na população geral. Barras verdes correspondem a prevalência de desenvolvimento do TEPT após o trauma. Barras amarelas correspondem a prevalência de recuperação após o trauma, ou seja, quando não há desenvolvimento de TEPT. *Segundo os critérios do DSM-V, indivíduos que presenciaram situações traumáticas também podem desenvolver o TEPT. Adaptado de Yehuda e colaboradores (2015).

Existem diversos modelos para o estudo de TEPT descritos na literatura que variam de acordo com o tipo de estressor (físico, social ou psicológico), a duração da exposição (agudo ou crônico) e a frequência (um único episódio ou episódios repetidos) do estímulo estressante (GOSWAMI *et al.*, 2013).

Os paradigmas que envolvem estressores físicos, como o choque inescapável nas patas, estresse por imobilização e nado forçado, embora sejam muito utilizados para o estudo de TEPT, não são bons modelos para

se avaliar a variabilidade interindividual dos animais (WHITAKER *et al.*, 2014). Já os modelos de estresse psicológico, como exposição ao predador ou ao odor do predador, nos quais os animais são expostos a um único e intenso estímulo estressante (COHEN *et al.*, 2006), embora sejam capazes de induzir algumas alterações neurobiológicas observadas no TEPT e permitam a distinção entre subpopulações de animais vulneráveis e resilientes, são paradigmas que variam muito em relação a intensidade da exposição e ao tipo de predador, de modo que alguns modelos requerem a adição de estressores secundários. Além disso, uma vez que cada laboratório adota um tipo de protocolo específico, existe uma dificuldade na avaliação da confiabilidade dos resultados (DESLAURIERS *et al.*, 2017).

Os paradigmas que utilizam estressores sociais incluem a instabilidade social, o isolamento, a separação materna e a derrota social. O uso de estressores sociais tem se destacado, pois nestes modelos os animais são expostos a condições estressantes semelhantes aos eventos que podem predispor ou causar TEPT em humanos. Por exemplo, o modelo de instabilidade social, no qual os animais são constantemente trocados de caixa moradia, mimetiza situações de instabilidade social vividas por humanos, como situações de violência doméstica, que já foram correlacionados com os sintomas de TEPT (PICO-ALFONSO, 2005; ROLLINS *et al.*, 2012; GOSWAMI *et al.*, 2013).

1.4. DERROTA SOCIAL

O paradigma de derrota social (DS) se baseia em interações agonísticas entre animais machos coespecíficos desencadeadas pelo comportamento natural e previsível de disputa territorial (HAMMELS *et al.*, 2015). É possível encontrar na literatura uma ampla variedade de protocolos de DS que variam em relação a espécie dos roedores (ratos, camundongos ou cobaias), duração e número de repetições das sessões de estresse (agudo ou crônico) e o tempo de interação entre os animais (KUDRYAVTESVA, 1994; KRISHNAN *et al.*, 2007; GOLDEN *et al.*, 2011; HAMMAMIEH *et al.*, 2012; DUQUE; VINADER-CAEROLS & MONLEÓN, 2016; MOURI *et al.*, 2018). Entretanto, todos os protocolos apresentam uma fase de interação física, na qual o animal intruso é colocado na caixa moradia do animal residente, que irá atacá-lo durante um período pré-determinado. Além disso, enquanto alguns modelos são constituídos apenas pela fase de ataque físico, outros a combinam com uma fase de estresse psicossocial, na qual o intruso é separado do residente por uma barreira física e é exposto a uma situação de ameaça de

ataque (revisado por MARTINEZ; CALVO-TORRENT; PICO-ALFONSO, 1998).

Existem poucos estudos que relatam o efeito da DS em roedores fêmeas, pois estas geralmente não apresentam comportamento territorialista (BEERY & KAUFER, 2015; HAMMELS *et al.*, 2015). Entretanto, existem algumas exceções em que fêmeas de linhagens específicas ou em situações especiais apresentam comportamento territorialista e/ou agressivo. A maior parte dos paradigmas de DS estabelecidos em fêmeas utilizam ratas que estão no período de lactação como residentes, pois estas apresentam comportamento agressivo quando são colocadas em contato com outras fêmeas (HANEY *et al.*, 1995; HOLLY *et al.*, 2012). Um outro modelo que já está bem estabelecido, utiliza fêmeas de camundongos da Califórnia (*Peromyscus californicus*) que diferentemente de fêmeas de outras linhagens de camundongos, apresentam comportamento de defesa territorial frente a um intruso do mesmo sexo (RIBBLE & SALVIONI, 1990; TRAINOR *et al.*, 2011).

Embora, a DS seja primariamente utilizada como um modelo de depressão, pois induz alterações características de comportamento tipo-depressivo, como anedonia, comportamento tipo-ansioso e esquivas sociais (AVGUSTINOVICH; KOVALENKO & KUDRYAVTSEVA, 2005; GOLDEN *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2017), existem adaptações do modelo para o estudo de TEPT (HAMMAMIEH *et al.*, 2012; SANTOS, 2015).

Um dos modelos de DS utilizados para o estudo do TEPT foi proposto por nosso grupo de pesquisa. Neste modelo, camundongos da linhagem C57BL/6 foram expostos a três sessões de 3 h de duração de DS, que foram realizadas em dias consecutivos, sendo que os animais foram posteriormente avaliados no teste de partição (SANTOS, 2015).

No teste de partição (TP), descrito por Kudryavtesva (1994), o camundongo agressor e o camundongo derrotado são colocados em compartimentos distintos de uma caixa moradia comum. Estes compartimentos são separados por uma placa transparente perfurada que funciona como uma barreira. Estudos demonstraram que o tempo gasto pelos camundongos desempenhando a atividade de exploração da área próxima a barreira está diretamente relacionada ao status social dos animais. Camundongos que experienciaram a vitória durante os episódios de conflito social gastam grandes quantidades de tempo explorando a área próxima à barreira, enquanto que camundongos que foram derrotados gastam pouco tempo explorando a mesma área (KUDRYAVTSEVA, 2003).

O paradigma de DS estabelecido em nosso laboratório foi baseado no modelo proposto por Hammamieh e colaboradores (2012), no qual os

animais eram expostos a cinco ou dez sessões de DS de 6 h, e que foi capaz de induzir comportamento tipo-ansioso e promover redução do comportamento de demarcação territorial e alterações fisiológicas relacionadas à ativação repetida do eixo HPA e do sistema nervoso autônomo. Já, em nosso laboratório, foi observado que protocolo de três sessões foi capaz promover uma diminuição do tempo de aproximação da zona da barreira e o aumento do comportamento de avaliação de risco no TP, mesmo 30 dias após o término do protocolo. Também foi observado um comportamento tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado (LCE), mas não foi observado comportamento tipo-depressivo e anedônico, nos testes de suspensão pela cauda (TSC) e preferência pela sacarose, respectivamente (SANTOS, 2015).

Como discutido anteriormente, um dos critérios importantes para validar um modelo animal para o estudo do TEPT é a possibilidade de se estudar a variabilidade interindividual dos animais expostos ao estresse. Neste contexto, é importante definir os conceitos de resiliência e vulnerabilidade ao estresse. Ser resiliente não significa que o indivíduo não é afetado pelo estresse, mas sim que o indivíduo apresenta uma habilidade de adaptar-se e recuperar-se dele (FLESHNER *et al.*, 2011). Já a vulnerabilidade representa uma situação, na qual o indivíduo está propenso a experimentar os efeitos negativos do estresse, de forma não adaptativa (WU *et al.*, 2013).

Além do TP, outro teste comumente utilizado para avaliar o comportamento de esquiva social após o protocolo de DS é o teste de interação social (TIS) que tem como principal objetivo avaliar o tempo que os animais gastam explorando uma zona pré-determinada chamada de zona de interação social (ZIS), na ausência e na presença de um animal coespecífico, não familiar, chamado de alvo social. Este teste apresenta uma vantagem na avaliação de alterações decorrentes do protocolo de DS, pois a partir dos dados obtidos nele, é possível se calcular o índice de interação social que é comumente utilizado para categorizar os animais derrotados em subgrupos de animais vulneráveis ou resilientes ao estresse. Já está bem estabelecido na literatura que animais controle exploram a ZIS na presença do alvo por um período igual ou maior ao período de tempo gasto explorando a mesma zona na ausência do alvo, consequentemente apresentam índice de IS igual ou maior que 1. Deste modo, animais derrotados que apresentam índice de IS igual ou maior a 1, são categorizados como resilientes, pois se comportam de forma semelhante à dos controles, e animais que apresentam índice menor que 1 são categorizados como vulneráveis (BERTON *et al.*, 2006; KRISHNAN *et al.*, 2007; GOLDEN *et al.*, 2011).

Uma vez que os modelos de estresse social são considerados por alguns pesquisadores como as melhores ferramentas atualmente disponíveis para o estudo de transtornos psiquiátricos (VAN KAMPEN *et al.*, 2002) e considerando o que foi exposto a respeito de outros modelos animais que utilizam tipos diferentes de estressores (físicos ou psicológicos), neste trabalho nós buscamos otimizar o protocolo de derrota social previamente estabelecido por nosso grupo de pesquisa para o estudo do TEPT.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Estabelecer um modelo experimental em camundongos C57BL/6 para o estudo do TEPT.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os tipos de estratégias de defesa adotados pelos camundongos C57BL/6 frente ao ataque durante as sessões de derrota social;
- Avaliar as respostas defensivas dos camundongos C57BL/6 após a exposição ao modelo de derrota social composto por três ou cinco sessões no teste de partição;
- Expor os camundongos C57BL/6 ao modelo de derrota social composto por três sessões e identificar subpopulações de animais vulneráveis ou resilientes ao estresse a partir do teste de interação social;
- Investigar possíveis diferenças nas respostas defensivas nas subpopulações de camundongos vulneráveis e resilientes no teste de interação social;
- Avaliar as respostas defensivas dos camundongos C57BL/6 após a exposição ao protocolo de derrota social de cinco sessões no teste de interação social, labirinto em cruz elevado e teste de suspensão pela cauda.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões de bem-estar animal recomendados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) obedecendo a lei nacional nº 11.794/2008. Além disso, ressalta-se que todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA 6798200617 – Anexo A).

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* (3 a 7 meses) provenientes da colônia do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e camundongos machos da linhagem C57BL/6 (3 a 4 meses) provenientes da colônia do Laboratório de Farmacologia Experimental localizado no Departamento de Farmacologia da UFSC, que foram originalmente adquiridos da colônia da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Os animais de ambas as linhagens foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia, onde foram alojados em caixas moradias (41 x 34 x 16 cm) forradas com maravalha que foram mantidas em estantes ventiladas (Alesco®) separadas de acordo com a linhagem, sob condições padronizadas (temperatura de 21 ± 2 °C, ciclo claro-escuro de 12h, com luzes acesas às 7h), com livre acesso a ração e água filtrada.

3.3. DERROTA SOCIAL

3.3.1. Alojamento e seleção de camundongos residentes

Os camundongos da linhagem *Swiss*, também chamados de animais residentes, foram alojados em caixas moradias individuais um mês antes do início do protocolo de DS e foram mantidos nessa condição durante todo o período de realização do protocolo, a fim de exacerbar suas características de demarcação territorial.

Ainda a fim de garantir que os animais residentes apresentariam o comportamento agressivo necessário para a realização do protocolo de DS, foi realizado um teste prévio de seleção de agressores que consistiu

em uma adaptação daquele descrito por Golden e colaboradores (2011). Durante o teste prévio, camundongos C57BL/6 (2 a 5 meses) foram colocados nas caixas moradia dos camundongos *Swiss* sem nenhum tipo de caixa de proteção, ou seja, permitiu-se que os animais interagissem livremente durante um período de três minutos diários durante três dias consecutivos. Os animais *Swiss* que apresentaram pelo menos dez ataques direcionados aos animais C57BL/6 durante dois dias consecutivos foram selecionados para participarem do protocolo de DS. Aqueles que não atenderam ao critério de inclusão e os camundongos C57BL/6 usados nas sessões de treino foram submetidos a eutanásia por exposição a dióxido de carbono (CO₂).

3.3.2. Alojamento de camundongos intrusos

Inicialmente, os camundongos C57BL/6, também chamados de animais intrusos, foram alojados em grupos de 3 a 5 animais por gaiolas, sendo que só foram colocados em isolamento na semana que precedeu o início do protocolo a fim de se evitar a influência da hierarquia social previamente estabelecida dentro da gaiola de origem (KUDRYAVTSEVA, BAKSHTANOVSKAYA & KORYAKINA, 1991; HAMMAMMIEH *et al.*, 2012). Os animais intrusos foram mantidos em isolamento durante todo o período de realização dos experimentos.

3.3.3. Protocolo de derrota social

O protocolo de DS adotado no presente trabalho foi composto por três ou cinco sessões de DS com duração de 3h realizados em dias consecutivos, nos quais os animais intrusos foram apresentados a diferentes residentes. No início de cada sessão, o animal intruso foi colocado em uma caixa de malha metálica (19 x 15 x 8 cm) que foi alocada dentro da caixa moradia do animal residente (41 x 34 x 16 cm), sendo que esta caixa metálica conferia proteção física ao intruso, porém permitia contato sensorial com o animal residente. Dentro desse período de 3 h, em um momento escolhido de modo aleatório por sessão, a caixa de proteção foi retirada e o intruso foi deixado em livre contato com o residente durante 2 min ou até que ocorressem dez ataques diretos (Figura 3).

Durante os ataques físicos foram observadas e registradas as estratégias de defesa adotadas pelos animais intrusos sendo que essas foram classificadas como: postura de submissão, tentativa de fuga,

imobilidade e congelamento. Também foram registrados parâmetros referentes aos animais residentes como a latência para o primeiro ataque, latência para a realização de dez ataques e quando não ocorreram dez ataques, o número de ataques realizados. Esses parâmetros foram registrados a fim de monitorar as características agressivas dos animais residentes e retirar do experimento os animais que apresentassem adaptação ao protocolo.

Os animais C57BL/6 pertencentes ao grupo controle foram colocados em caixas (41 x 34 x 16 cm) contendo maravalha limpa e na ausência do animal residente, porém nas mesmas condições dos animais derrotados, ou seja, foram alocados dentro de caixas metálicas por um período de 3 h que foi repetido durante três ou cinco dias consecutivos e foram retirados por 2 min, em horários aleatórios entre os dias de repetição do protocolo, para que pudessem explorar a caixa.

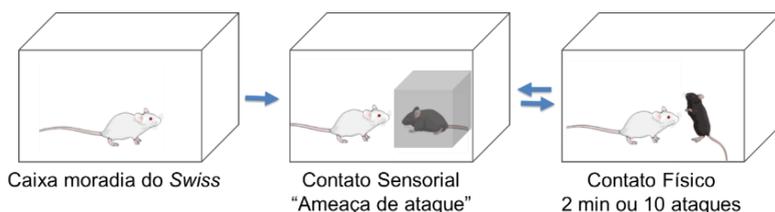


Figura 3. Representação esquemática do protocolo de Derrota Social.

3.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1. Teste de Partição

O teste de partição (TP) utilizado neste trabalho foi descrito detalhadamente por Kudryavtesva (1994). Neste teste, foi colocada uma barreira física na caixa moradia dos animais residentes de modo que estas foram divididas em dois compartimentos. A barreira física consistia em uma placa de acrílico transparente com pequenas perfurações que restringia o contato físico entre os animais, mas permitia o contato sensorial. O animal intruso foi então colocado no compartimento oposto ao que se encontrava o animal residente (Figura 4.A). Já os animais do grupo controle foram colocados em uma caixa semelhante contendo maravalha limpa e na ausência do residente (Figura 4.B). O comportamento dos animais foi filmado por 5 min e posteriormente avaliou-se o tempo de exploração da zona da barreira (uma área

retangular de 7 x 34 cm iniciando na barreira) e o comportamento de avaliação de risco (quando o animal ; B senta um comportamento de estiramento corporal direcionado à barreira) dos animais intrusos e controles com o auxílio do *software* ANY-MAZE® (Stoelting Co., IL, EUA).

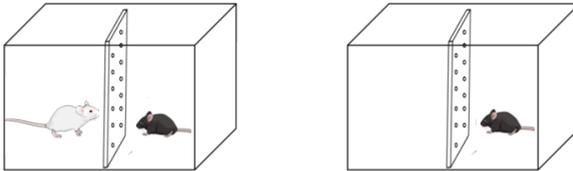


Figura 4. Representação esquemática do teste de partição (TP). (A) representa o TP de um animal derrotado, isto é, que passou por todas as etapas da derrota social na presença do animal residente e (B) representa o TP de um animal controle, ou seja, que não teve nenhum tipo de contato com o animal residente.

3.4.2. Teste de Interação Social

O aparato utilizado para a realização do teste de interação social (TIS) consistiu em uma caixa de acrílico (50 x 50 x 50) com fundo (chão) de coloração cinza, na qual havia, apoiado a uma de suas paredes, um cilindro de plástico perfurado móvel. O teste foi composto por duas etapas de 180s de duração cada. Na primeira etapa, chamada de “sem alvo”, o camundongo intruso foi colocado no centro do aparato com a cabeça voltada ao lado oposto ao que estava o cilindro vazio. Passados os 180s o animal foi retirado e o aparato foi higienizado com álcool 10%. Logo após a higienização, na segunda ou etapa “com alvo”, foi colocado um camundongo *Swiss* não familiar dentro do cilindro e o mesmo camundongo intruso foi novamente colocado no centro do aparato. Ambas as etapas foram filmadas para posterior análise pelo *software* ANY-MAZE®, no qual foi possível delimitar a zona de interação social (ZIS) e a zona dos cantos como esquematizado na Figura 5. Os parâmetros avaliados foram o tempo de permanência e o número de entradas na ZIS e na zona dos cantos na ausência e presença do alvo, o índice de interação social e a distância percorrida.

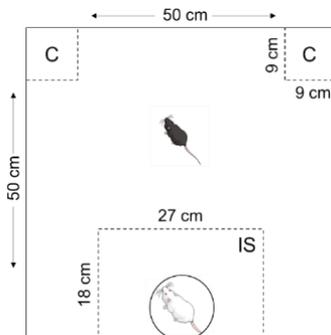


Figura 5. Esquema representativo do aparato utilizado para realização do teste de interação social. As áreas tracejadas foram delimitadas no software ANY-MAZE®. C: zona dos cantos; IS: zona de interação social.

3.4.3. Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) consistiu em um aparato de madeira pintado de cinza, elevado a 45 cm do nível do chão composto por dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 15 cm), também opostos, sendo que os braços abertos e fechados eram conectados por uma plataforma central. Os animais foram colocados individualmente no centro do LCE com a cabeça voltada para um dos braços abertos e seu comportamento foi filmado durante 5 min para posterior avaliação. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram: número de entradas e tempo de permanência dos animais nos braços abertos e fechados e tempo gasto realizando comportamento de avaliação de risco.

3.4.4. Teste de Suspensão pela Cauda

Para a realização do teste de suspensão pela cauda (TSC), os camundongos foram individualmente suspensos a 1,0 m do chão por uma fita adesiva colocada aproximadamente 1 cm do final da cauda e o comportamento exibido foi registrado por 6 min com o auxílio de uma câmera de vídeo. Posteriormente avaliou-se o tempo de imobilidade dos animais.

3.5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

A fim de avaliar as possíveis alterações no comportamento defensivo dos camundongos C57BL/6 decorrentes do modelo de DS foram adotados diferentes protocolos experimentais que foram realizados em grupos independentes de animais, conforme descrito nos itens seguintes.

3.5.1. Protocolo Experimental 1 – Avaliação das estratégias comportamentais frente ao ataque e das respostas defensivas dos camundongos intrusos após o protocolo de derrota social no teste de partição

Para a realização desse protocolo experimental, grupos independentes de camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de DS composto por 3 ou 5 sessões. Conforme descrito no item 3.3.3., durante a realização das sessões de derrota, as diferentes estratégias comportamentais adotadas pelos camundongos intrusos frente ao ataque físico foram registradas e classificadas em (Figura 6):

- Postura de submissão: quando o animal adotou uma postura vertical, expondo o abdômen ao agressor durante o ataque;
- Tentativa de fuga: quando animal correu e/ou pulou na tentativa de evitar o residente, quando este se aproximava;
- Postura de submissão + tentativa de fuga: quando o animal expressou ambos os comportamentos durante uma mesma sessão de exposição;
- Imobilidade: quando o animal não esboçou resposta enquanto era atacado pelo residente;
- Congelamento (também chamado de *freezing*): quando o animal apresentou imobilidade completa, exceto pelos movimentos respiratórios, durante o ataque do residente.

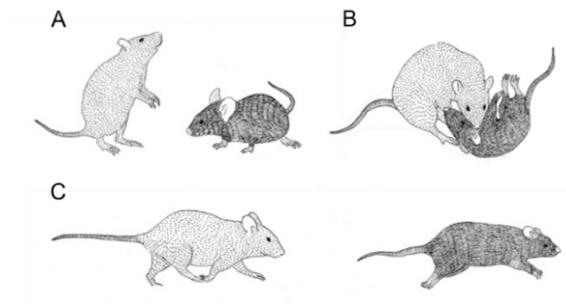


Figura 6. Classificação das estratégias comportamentais adotadas pelos animais frente ao ataque. (A) Postura de submissão, (B) imobilidade frente ao ataque e (C) tentativa de fuga. Adaptado de Marchette (2017).

Após a última sessão de DS, o comportamento defensivo dos animais foi avaliado no TP conforme esquematizado na Figura 7.

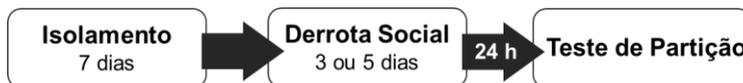


Figura 7. Representação esquemática do protocolo experimental 1.

3.5.2. Protocolo Experimental 2 – Avaliação das respostas defensivas dos camundongos intrusos após o protocolo de derrota social de 3 sessões no teste de interação social e investigação de subpopulações resilientes e vulneráveis

Visando investigar diferenças nas respostas defensivas em subgrupos vulneráveis e resilientes ao estresse, os camundongos C57BL/6 foram expostos ao protocolo de DS de 3 sessões e 24 h após a última sessão foram avaliados no TIS que foi repetido 10 dias depois conforme esquematizado na Figura 8.



Figura 8. Representação esquemática do protocolo experimental 2.

3.5.3. Protocolo Experimental 3 – Avaliação das respostas defensivas dos camundongos intrusos após o protocolo de derrota social de 5 sessões em uma bateria de testes

Com o intuito de investigar se um protocolo com mais sessões de DS seria capaz de promover respostas defensivas mais robustas no TIS, os camundongos foram expostos a 5 sessões de DS e 24 h após a última sessão foram avaliados no TIS. Além disso, os comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo foram avaliados no LCE e no TSC, respectivamente. A sequência de experimentos realizados está esquematizada na Figura 9.

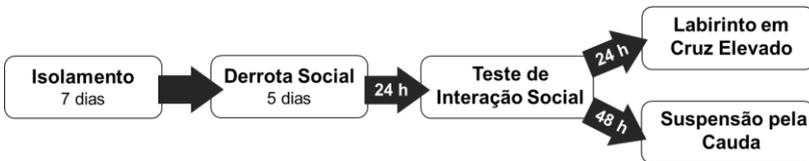


Figura 9. Representação esquemática do protocolo experimental 3. O teste interação social (TIS), o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste de suspensão pela cauda (TSC) foram realizados em nesta sequência com um intervalo de 24 h de um para outro.

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Primeiramente, foi feita uma análise exploratória para avaliar a distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) para cada variável.

Os resultados, nos quais a única variável independente foi a exposição à DS, foram avaliados por meio do teste *t* de *Student* não pareado. Já os resultados em que havia duas variáveis independentes, exposição à DS e ao TIS na presença e ausência de alvo social, utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias. Nos experimentos em que além dessas duas variáveis houve a repetição do TIS, a análise estatística foi feita por meio da ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Nos casos em que a ANOVA revelou diferenças significativas, utilizou-se o teste de *post-hoc* de Bonferroni.

Todos as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software Statistica v.7 (StatSoft Inc., EUA)* e todos os gráficos foram produzidos no *software GraphPad Prism® v.7 (GraphPad Software Inc., EUA)*. Os resultados foram expressos como média + erro padrão da média (E.P.M).

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DEFENSIVAS DOS CAMUNDONGOS INTRUSOS APÓS O PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL NO TESTE DE PARTICIÃO

Não foram observadas diferenças estatísticas no tempo de exploração da zona da barreira entre os grupos experimentais [3 sessões: $F(1, 7) = 1,141$, $p = 0,321$; 5 sessões: $F(1, 12) = 3,039$, $p = 0,107$] e no tempo gasto fazendo o comportamento de avaliação de risco [3 sessões: $F(1, 7) = 1,891$, $p = 0,211$; 5 sessões: $F(1, 11) = 2,214$, $p = 0,165$] no TP (Figura 10).

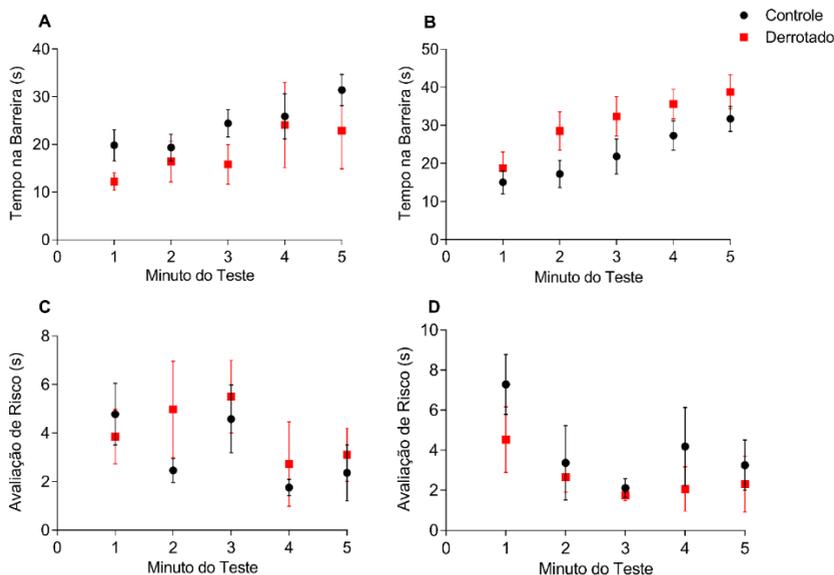


Figura 10. Avaliação das respostas comportamentais dos camundongos submetidos a 3 ou 5 sessões de derrota social (DS) no teste de partião (TP). Camundongos C57BL/6 machos foram submetidos a 3 ou 5 sessões de DS e avaliados no TP 24 h após a última sessão. (A) e (B) Tempo gasto explorando a zona da barreira em segundos, a cada minuto de teste, pelos animais submetidos a 3 e 5 sessões de DS, respectivamente. (C) e (D) Tempo gasto executando o comportamento de avaliação de risco em segundos, a cada minuto de teste, pelos animais submetidos a 3 e 5 sessões de DS, respectivamente. Dados expressos como média + E.P.M foram analisados pela ANOVA de medidas repetidas e complementados com o teste de *post hoc* de Bonferroni ($n = 5 - 8/\text{grupo}$).

Adicionalmente, com o auxílio do software ANY-MAZE® foi possível elaborar um mapa representativo da ocupação média de cada grupo experimental no aparato utilizado para a realização do TP. No mapa ocupacional, as cores quentes indicam as áreas de maior permanência, enquanto que as cores frias indicam as áreas de menor permanência. Assim, observa-se que os padrões de exploração dos animais representados pela Figura 11, corroboram os dados de tempo de exploração da área da barreira apresentados nas Figuras 10.A e 10.B. Sendo que na Figura 11.A, observa-se um padrão de exploração da zona da barreira semelhante entre animais do grupo controle e derrotado assim como foi observado na Figura 10.A. Já na Figura 11.B observa-se que houve uma maior ocupação da zona da barreira pelos animais do grupo derrotado quando comparados aos animais do controle, do mesmo modo que observou-se na Figura 10.B.

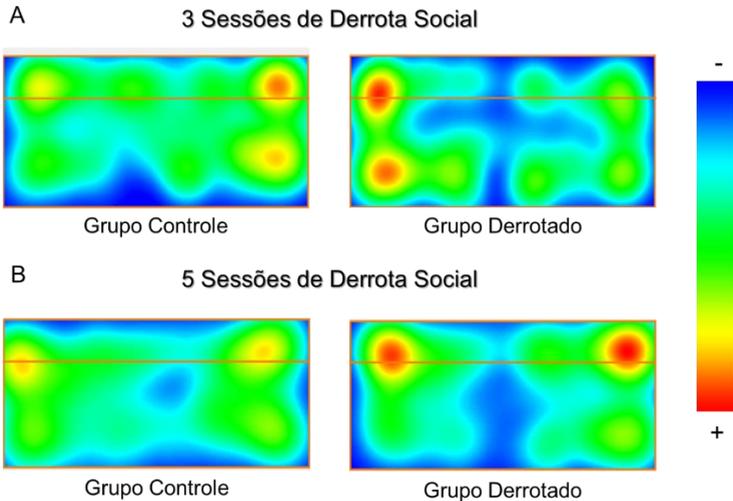


Figura 11. Mapa de ocupação média dos camundongos submetidos ao protocolo de derrota social (DS) de 3 ou 5 sessões no teste de partição (TP). Camundongos C57BL/6 machos foram submetidos a 3 ou a 5 sessões de DS e avaliados no TP 24h após a última sessão. A escala de cores denota a intensidade da ocupação: cores frias indicam menor ocupação, enquanto que as cores quentes indicam maior ocupação.

Entretanto, observou-se diferenças significativas no tempo de exploração da zona da barreira entre os minutos do teste [3 sessões: $F(4,$

28)= 5,455, $p= 0,002$; 5 sessões: $F(4, 48)= 12,850$, $p= 0,000$], ou seja, observou-se que animais tanto do grupo controle, quanto do grupo derrotado expostos aos protocolos de 3 ou 5 sessões de DS apresentaram um aumento da exploração da zona da barreira com o passar do tempo de teste (Figuras 10.A e 10.B).

4.2. AVALIAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS COMPORTAMENTAIS DOS CAMUNDONGOS INTRUSOS FRENTE AO ATAQUE DURANTE AS SESSÕES DE DERROTA SOCIAL

A Figura 12 representa a prevalência de estratégias comportamentais adotadas pelos camundongos intrusos durante a fase de ataque físico do protocolo de DS composto por 3 sessões (A) ou 5 sessões (B). Observa-se que, em ambos protocolos experimentais, as estratégias classificadas como ativas foram predominantes, principalmente a combinação da postura de submissão e tentativa de fuga, 40% e 57,5% dos animais expostos a 3 e 5 dias de DS, respectivamente. Além disso, apenas um animal expressou o comportamento de imobilidade frente ao ataque em uma das sessões do protocolo de 5 dias. No protocolo de 3 sessões de DS não houve ataque em apenas uma sessão com um único animal. Já no protocolo de 5 sessões de DS ocorreram dois episódios em que não houve ataque com animais intrusos diferentes.

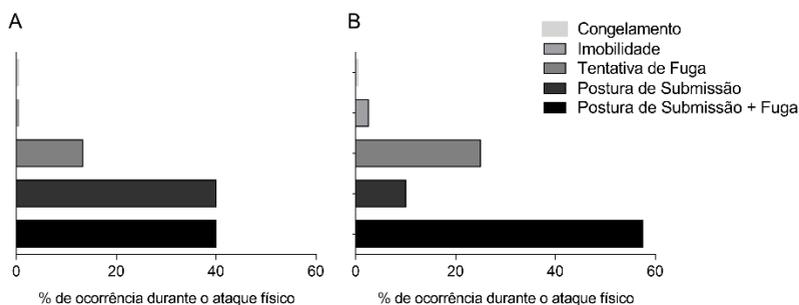


Figura 12. Prevalência de estratégias comportamentais adotadas frente ao ataque físico pelos camundongos submetidos ao protocolo de derrota social (DS). (A) Estratégias adotadas durante o protocolo composto por 3 sessões. (B) Estratégias adotadas durante o protocolo composto por 5 sessões. Valores expressos como porcentagem em relação ao número total de episódios de ataque físico.

4.3. AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DEFENSIVAS DOS CAMUNDONGOS INTRUSOS APÓS O PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL DE 3 SESSÕES NO TESTE E RETESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL E INVESTIGAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES RESILIENTES E VULNERÁVEIS

Os camundongos intrusos foram submetidos ao protocolo de DS composto por 3 sessões, conforme descrito anteriormente. No dia seguinte, após a última sessão de estresse, foi realizado o TIS, que foi repetido após 10 dias. A partir dos dados de tempo gasto explorando a ZIS, na presença ou ausência do alvo social, foi determinado o índice de interação social (IS) para cada animal no teste e no reteste.

Observou-se que ocorreram variações no valor do índice de IS de um mesmo animal derrotado de um teste para outro, de modo que:

- 60% dos animais derrotados, que obtiveram índice de IS < 1 no teste de 24 h, mantiveram índices menores que 1 no reteste;
- 60% dos animais derrotados, que obtiveram índice de IS > 2 no teste de 24 h, apresentam índices maiores que 2 no reteste;
- dos 54,5% de animais derrotados, que apresentaram índice de IS maior que 1 e menor que 2 no teste de 24 h, 45,45% obtiveram índice de IS < 1 e o restante (54,54%) obtiveram índice > 2 no reteste.

Baseando-se nessas observações foi determinado que o intervalo entre 1 e 2 representava uma “*grey zone*” (do inglês, zona cinzenta), isto é, um intervalo no qual não se pode afirmar com certeza se os animais se enquadram no perfil de vulnerável ou resiliente ao estresse. Portanto, foi estabelecido um critério de exclusão em que todos os animais presentes neste intervalo foram retirados das análises posteriores. Enquanto os animais que obtiveram índice menor que 1 e maior que 2 no teste de 24 h foram classificados como vulneráveis e resilientes, respectivamente (Figura 13).

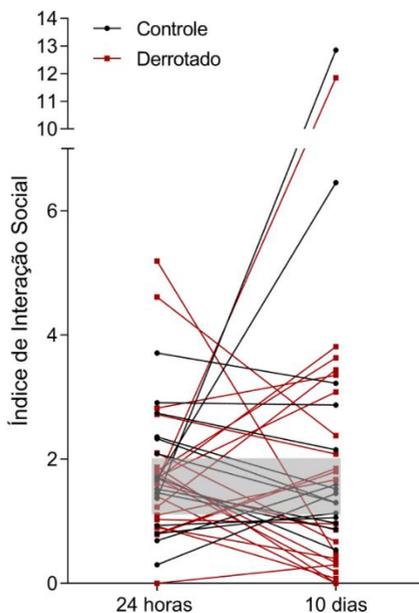


Figura 13. Índice de interação social obtido pelos animais do grupo controle e derrotado no teste interação social (TIS) realizado 24h e no reteste 10 dias após a última sessão de derrota social (DS). Os animais contidos na zona sombreada em cinza (*grey zone*) foram excluídos das análises posteriores. Os animais que apresentaram índice de IS menor que 1 e maior que 2 foram classificados como, vulneráveis e resilientes, respectivamente (n= 15/controle e n= 22/derrotado).

Após a determinação das subpopulações de animais derrotados, foram analisados os parâmetros comportamentais dos animais selecionados no TIS.

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou um efeito significativo da repetição do TIS no tempo de exploração da ZIS [F(, 44)= 4,797, $p= 0,034$; reteste > teste] (Figura 14.A) e nos parâmetros locomotores [entradas na ZIS: F(1, 44)= 13,985, $p=0,001$; distância total percorrida: F(1, 44)= 34,218, $p= 0,000$; teste > reteste] (Figura 14.C e D). Também houve uma diferença significativa na distância percorrida entre os grupos experimentais [F(2, 44)= 5,021, $p= 0,011$; controle > resiliente > vulnerável] e número de entradas na ZIS quanto à presença ou ausência de alvo [F(1, 44)= 4,568, $p= 0,038$; ausência > presença] (Figura 14.C e D). Não foram observadas diferenças estatísticas no tempo de exploração da zona dos cantos [grupo: F(2, 44)= 0,194, $p= 0,824$] (Figura 14.B).

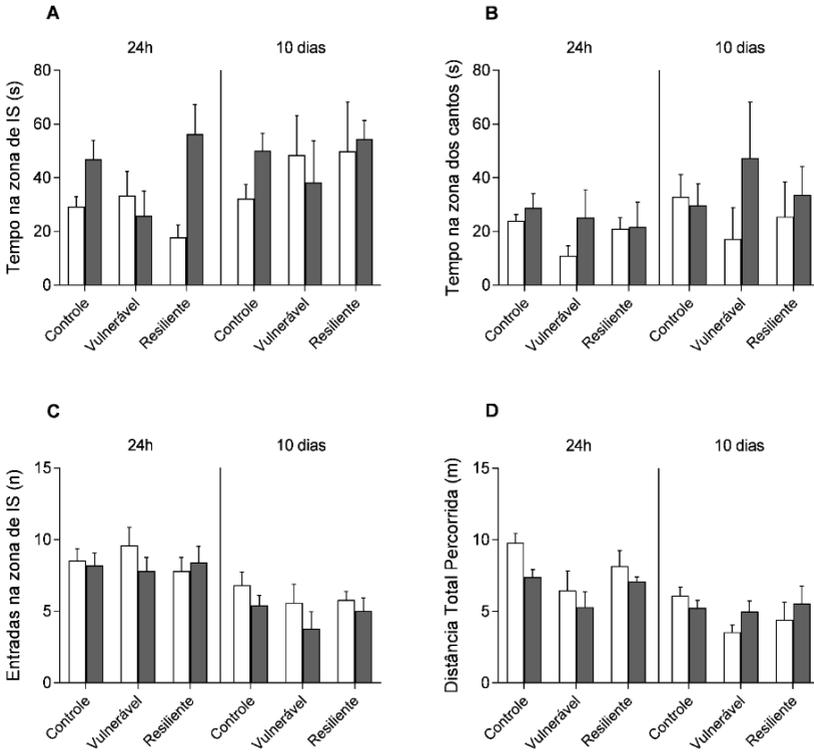


Figura 14. Avaliação de parâmetros comportamentais de camundongos expostos ao protocolo de derrota social no teste e reteste de interação social realizados 24h e 10 dias após a última sessão de derrota. Camundongos C57BL/6 machos foram submetidos a 3 dias de derrota social e testados no interação social (TIS) após 24h e 10 dias. (A) Tempo de exploração da zona de interação social (ZIS). (B) Tempo de exploração da zona dos cantos. (C) Número de entradas na ZIS. (D) Distância total percorrida. As barras vazias representam os resultados obtidos na fase sem alvo e barras cheias os resultados na fase com alvo do TIS. Dados expressos como média + E.P.M foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas e complementados com o teste de *post hoc* de Bonferroni ($n = 5/\text{vulnerável}$ e resiliente ; $n = 15/\text{grupo controle}$).

4.4. AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DEFENSIVAS DOS CAMUNDONGOS INTRUSOS APÓS O PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL DE 5 SESSÕES EM UMA BATERIA DE TESTES

Um dia após o término do protocolo de DS composto por 5 sessões, os camundongos C57BL/6 foram submetidos ao TIS, no qual, a ANOVA de duas vias apontou um efeito significativo do grupo [$F(1, 28) = 4,538$, $p = 0,0421$; controle > derrotado] e da presença ou ausência do animal alvo [$F(1, 28) = 11,305$, $p = 0,002$; com alvo > sem alvo] sobre o tempo de exploração da ZIS (Figura 15.A).

Embora o teste estatístico não tenha apontado diferenças significativas entre os grupos [$F(1, 28) = 3,125$, $p = 0,088$] ou quanto a presença e ausência de alvo [$F(1, 28) = 0,965$, $p = 0,334$] no tempo de permanência na zona dos cantos, observa-se que os animais derrotados apresentaram uma tendência a permanecer mais tempo que os controles nessas zonas do aparato em ambas situações (Figura 15.B).

Não foram identificadas diferenças estatísticas no número de entradas na ZIS [grupo: $F(1, 28) = 2,386$, $p = 0,134$] e na distância total percorrida [grupo: $F(1, 28) = 1,657$, $p = 0,208$] (Figura 15.C e D).

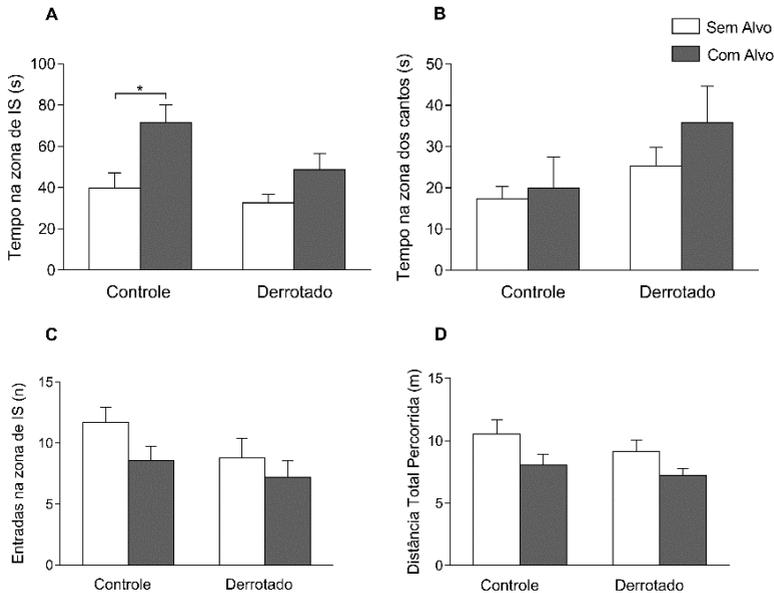


Figura 15. Avaliação das respostas comportamentais dos camundongos intrusos no interação social (TIS) após o protocolo de derrota social (DS) de 5 sessões. Camundongos C57BL/6 machos foram submetidos a 5 dias de derrota social e avaliados no TIS após 24h. (A) Tempo de exploração da zona de interação social (ZIS). (B) Tempo de exploração da zona dos cantos. (C) Número de entradas na ZIS. (D) distância total percorrida. Dados apresentados como média + EPM foram comparados por ANOVA de duas vias, seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ ($n = 7-9$ /grupo).

Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas no tempo de exploração dos braços abertos [$t(12) = 0,896$, $p = 0,388$] (Figura 16.A) e o no comportamento de avaliação de risco [$t(12) = 0,441$, $p = 0,667$] (Figura 16.B) no LCE. Também não houve diferenças no número de entradas nos braços fechados do LCE [$t(12) = 1,321$, $p = 0,211$] (Figura 16.C) que é considerado um parâmetro de atividade locomotora (RODGERS, 1997). O tempo de imobilidade no TSC também não foi alterado pela exposição ao protocolo de DS [$t(14) = 1,013$, $p = 0,328$] (Figura 16.D).

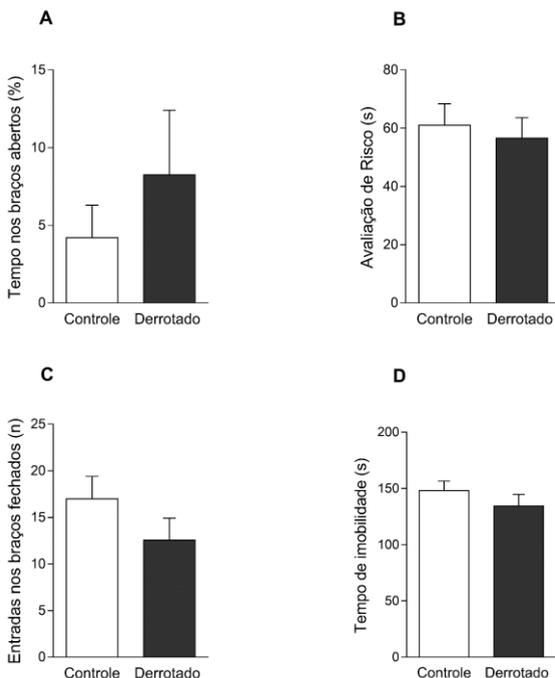


Figura 16. Avaliação do comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo após o protocolo de derrota social (DS) de 5 sessões. Camundongos C57BL/6 machos foram submetidos a 5 dias de derrota social e foram testados subsequentemente no TIS, LCE e TSC, com 24h de intervalo entre cada teste. (A) Tempo de exploração dos braços abertos (%), (B) número de entradas nos braços fechados, (C) comportamento de avaliação de risco (s) no teste do labirinto em cruz elevado, (D) tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda. Dados apresentados como média + E.P.M. foram comparados pelo teste *t* de *Student* não pareado, $p > 0,05$ ($n = 7-9$ /grupo).

5. DISCUSSÃO

O TEPT é um transtorno psiquiátrico causado pela exposição a eventos traumáticos, frequentemente associado a comorbidades, como o TDM. O diagnóstico de TEPT é feito exclusivamente por meio de questionários, sendo que não existe nenhum teste laboratorial capaz de detectar marcadores que confirmem o desenvolvimento do transtorno. Além disso, apenas dois medicamentos, ambos ISRS, são indicados pelo FDA para o tratamento de TEPT (YEHUDA *et al.*, 2015)

Adicionalmente, o TEPT está associado à incapacitação social, profissional e física do indivíduo, caracterizada pelo empobrecimento das relações sociais e um menor sucesso acadêmico e profissional (APA, 2013). Deste modo, é evidente a necessidade de se desenvolver modelos animais que permitam estudar os aspectos neurobiológicos do TEPT que ainda não foram esclarecidos, bem como novos alvos farmacológicos e métodos de diagnóstico. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer um modelo de conflito social em camundongos para o estudo do TEPT.

Embora trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório tenham demonstrado que o modelo de DS composto por três sessões de 3h promoveu alterações proeminentes e duradoras nas respostas defensivas dos animais, evidenciadas pela diminuição da exploração da zona da barreira e pelo aumento do comportamento de avaliação de risco no TP (SANTOS, 2015; MARCHETTE, 2017), essas alterações não foram observadas no presente trabalho.

Hammamieh e colaboradores (2012) também observaram alterações comportamentais pronunciadas no TP, como redução do tempo de duração das visitas e da locomoção na zona da barreira, aumento do comportamento de congelamento e ausência do comportamento de *tail rattling* (i.e. “bater de cauda”) em animais expostos a um modelo de derrota social composto por 5 sessões de 6 h de duração. Com base nesses achados, nós nos propusemos a testar se aumentando o número de sessões de DS de três para cinco com duração de 3 h seria possível observar alterações no comportamento dos animais derrotados quando comparados aos controles. Entretanto, novamente não observamos diferenças estatísticas nos parâmetros avaliados no TP entre o grupo derrotado e controle.

Em humanos, a exposição a um episódio traumático é um critério crucial para efetuar o diagnóstico de TEPT (APA, 2013), contudo sabe-se que existe uma ampla variabilidade individual na resposta ao trauma, de modo que a maior parte dos indivíduos que passam por situações

traumáticas apresentam respostas adaptativas que culminam em sua recuperação. Ou seja, apenas uma pequena parcela dos indivíduos desenvolve o TEPT (Figura 2), indicando que existem outros fatores, além da exposição ao trauma, envolvidos na etiologia do transtorno (YEHUDA *et al.*, 2011; DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMOND, 2013). O mesmo é observado em animais, pois alguns modelos de estresse são capazes de induzir alterações comportamentais e fisiológicas em apenas uma subpopulação de animais, de modo que estes são considerados vulneráveis ao estresse, enquanto os que não apresentam essas alterações são considerados resilientes (KRISHNAN *et al.*, 2007).

Entre os fatores que influenciam o desenvolvimento do TEPT, a genética parece desempenhar um papel importante. Em humanos, estudos realizados em gêmeos monozigóticos e dizigóticos sugerem que existe um componente hereditário envolvido na etiologia do transtorno (AFIFI *et al.*, 2010). Adicionalmente, estudos conduzidos em animais geneticamente modificados suportam a ideia de que existem alterações genéticas que são fatores de risco para o aparecimento dos sintomas de TEPT (ADAMEC *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2009; VERMA *et al.*, 2012).

Entretanto, também deve-se considerar que em humanos, os fatores epigenéticos podem sofrer influência de diversos fatores ambientais, como traumas e abusos sofridos na infância (DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMOND, 2013).

Além disso, já foi demonstrado que roedores de linhagens consanguíneas também apresentam variabilidade interindividual quando expostos a protocolos de estresse. De modo que estes dados reforçam a ideia de que existem outros fatores que não são relacionados aos fatores genéticos, envolvidos na resposta ao estresse (EBNER & SINGEWALD, 2017).

Neste contexto, sugerimos que a ausência de alterações das respostas defensivas dos animais derrotados observadas no TP pode ter sido causada por seleção accidental de animais que apresentavam majoritariamente o fenótipo de resiliência ao estresse.

Além disso, observamos que os animais expostos a ambos os tipos de protocolos testados (3 ou 5 sessões), adotaram predominantemente o comportamento de tentativa de fuga e postura de submissão frente ao ataque, sendo que apenas um animal adotou o comportamento de imobilidade. Esses resultados se assemelham com os resultados obtidos por Bartolomucci e colaboradores (2004), que evidenciaram uma predominância destes comportamentos em animais subordinados após um protocolo de derrota social em um estudo que comparou as respostas defensivas de animais subordinados e dominantes. Adicionalmente,

estratégias comportamentais passivas, como a imobilidade durante o ataque físico, são correlacionadas com uma maior ativação do eixo HPA e a um perfil de vulnerabilidade ao estresse (WALKER *et al.*, 2009; WOOD *et al.*, 2010).

Diante disso, o próximo passo foi investigar se a nossa população de animais era realmente composta predominantemente por camundongos resilientes ao estresse. Para isso foram avaliadas as respostas defensivas dos animais após a exposição ao mesmo protocolo de DS composto por 3 sessões de 3 h no TIS.

O TIS é comumente utilizado em estudos de subpopulações, pois além de permitir a investigação do comportamento de esquiva social, também é capaz de gerar o índice de IS, que classifica os animais como resilientes ou vulneráveis ao estresse (BERTON *et al.*, 2006; KRISHNAN *et al.*, 2007; GOLDEN *et al.*, 2011).

Em um experimento conduzido por Krishnan e colaboradores (2007), no qual os animais foram expostos a um protocolo de dez sessões consecutivas de derrota social, os pesquisadores observaram que quando testados no TIS 24 h após a última sessão, cerca de 50% dos animais derrotados apresentavam índice de interação similar aos dos controles não derrotados, ou seja, acima de 1. Baseando-se nesse achado, optamos por expor os animais ao TIS 24 h após a última sessão de estresse e repeti-lo após 10 dias, visando investigar possíveis mudanças no índice de IS de um mesmo animal de um teste para outro.

Conforme observado em nossos resultados, enquanto os animais do grupo controle mantiveram predominantemente uma linearidade nos valores do índice de IS no teste e no reteste, o grupo derrotado apresentou oscilações principalmente dos animais que obtiveram índice no intervalo entre 1 e 2 no primeiro teste. A partir dessa observação, determinamos um critério de exclusão para investigar diferenças nas respostas defensivas de animais que nitidamente apresentavam um fenótipo vulnerável ou resiliente ao estresse, de acordo com o índice obtido a partir do TIS.

Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, tanto no tempo de exploração da ZIS, quanto no tempo gasto na zona dos cantos, resultados que contrastam com o estudo de Krishnan e colaboradores (2007), que mostrou que camundongos expostos à derrota social classificados como vulneráveis apresentaram uma redução do tempo de exploração da ZIS e um aumento no tempo de permanência na zona dos cantos. Adicionalmente, outro estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa utilizou o tempo de exploração da área da barreira no TP como critério para classificar camundongos

submetidos a 3 sessões de derrota social, como vulneráveis (menor tempo de exploração da área da barreira) ou resilientes (tempo de exploração da área da barreira maior ou igual ao do grupo controle). Em resumo, foi observado uma diminuição nos parâmetros de exploração da área da barreira e um aumento na frequência de execução de comportamento de avaliação de risco dos camundongos classificados como vulneráveis (MARCHETTE, 2017), similarmente ao estudo de Krishnan e colaboradores (2007).

Contudo, observa-se que, embora em nosso trabalho o teste estatístico não tenha apontado diferenças significativas entre os grupos, os animais vulneráveis apresentaram uma tendência a explorar menos a ZIS no teste e no reteste e somente no reteste apresentaram uma tendência a permanecer por mais tempo na zona dos cantos.

Quando investigado se houve diferença entre os parâmetros avaliados entre o teste de 24 h e o reteste de 10 dias, observou-se uma redução dos parâmetros locomotores (distância total percorrida e número de entradas na ZIS) e um aumento da exploração da ZIS no reteste quando comparado ao teste.

Segundo a teoria do mapa cognitivo de O'Keefe e Nadel (1978), quando um organismo explora um ambiente desconhecido, ele constrói uma representação do ambiente no hipocampo e a exploração daquele ambiente será reduzida conforme a representação vai se tornando mais completa. Este processo é chamado de habituação e pode ocorrer em uma mesma sessão de exposição ou entre sessões de exposição diferentes a um mesmo ambiente (BOLIVAR *et al.*, 2009). Baseando-se nessa teoria, os nossos resultados sugerem que ocorreu habituação ao aparato entre as sessões de teste. Este dado representa um achado importante, considerando que este protocolo de teste e reteste de interação social pode ser utilizado para avaliar o efeito de fármacos em subpopulações resilientes e vulneráveis, de modo que o efeito da habituação pode gerar falsos resultados.

Outro ponto que chama atenção neste bloco de resultados refere-se à porcentagem de camundongos que apresentaram fenótipo vulnerável ou resiliente. Segundo Golden e colaboradores (2011), a porcentagem de animais da linhagem C57BL/6J que apresentam fenótipo resiliente após o protocolo de DS é 30 - 40%. Considerando o número total de camundongos derrotados avaliados em nosso estudo (22 animais), foi observado que 77% apresentaram fenótipo resiliente seguindo-se o critério do índice de IS. Logo, esta observação sugere que nossos camundongos apresentam um perfil de resposta ao estresse majoritariamente resiliente.

Por fim, nós também avaliamos os animais expostos ao protocolo de 5 sessões de DS em uma bateria de testes comportamentais composta pelo TIS, LCE e TSC. Porém, devido ao número reduzido de animais estudados neste experimento (7 controles e 9 derrotados) optamos por não os classificar em subpopulações resilientes e vulneráveis ao estresse.

Foi observado que não houve diferença entre os grupos no tempo de exploração da ZIS na ausência do alvo social, de modo que se pode inferir que os animais do grupo controle não expostos à DS e os animais expostos à DS exploram de modo similar o aparato na ausência do camundongo *Swiss*, dados similares aos observados por Golden e colaboradores (2011). Porém, na presença do alvo, os camundongos derrotados apresentaram uma tendência a explorar a ZIS por menos tempo, quando comparados aos controles, sugerindo um comportamento de esquiva social frente a um estímulo aversivo. Além disso, nota-se que os animais derrotados também apresentaram uma tendência a permanecer por mais tempo na zona dos cantos na presença do alvo em comparação aos animais controle. Estes resultados se assemelham os resultados de um estudo recém-publicado por Mouri e colaboradores (2018), no qual os pesquisadores observaram que camundongos da linhagem C57BL/6, submetidos a 5 sessões de 10 min de duração de derrota social, apresentaram uma redução do tempo gasto investigando a ZIS e um aumento do tempo de permanência na zona dos cantos quando comparados ao controle.

Adicionalmente, os animais expostos a 5 sessões de DS não apresentaram alterações do tempo de imobilidade no TSC, resultado que também foi observado em outros estudos, nos quais os camundongos foram submetidos a 3, 5 ou 10 sessões de DS (SANTOS, 2015; ALBRECHET-SOUZA *et al.*, 2017; MOURI *et al.*, 2018). Também não se observou alterações relacionadas ao comportamento tipo-ansioso no teste do LCE, resultado que contrasta com o resultado obtido por SANTOS (2015), em que foi observado uma redução no tempo de exploração dos braços abertos do labirinto de camundongos expostos a 3 sessões de DS.

Como citado anteriormente, uma das principais dificuldades em se desenvolver um modelo de estudo de TEPT em animais é utilizar um estressor que seja intenso o suficiente para mimetizar os sintomas do TEPT, sem induzir alterações comportamentais características de outros transtornos psiquiátricos, como o TDM (YEHUDA & ANTELMAN, 1993; SCHÖNER *et al.*, 2016). Portanto, a ausência de alterações no comportamento de imobilidade no TSC representa um

achado importante para atestar a validade do nosso modelo como um modelo para estudo do TEPT.

6. RESUMO DE RESULTADOS

- Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais expostos ao protocolo de derrota social de 3 e 5 sessões no teste de partição;
- Houve um predomínio de estratégias defensivas ativas frente ao ataque físico durante as sessões de derrota social;
- 77% dos camundongos expostos ao protocolo de derrota social de 3 sessões, quando avaliados no teste de interação social 24 h após a última sessão apresentaram o fenótipo de resiliência ao estresse;
- Não foram observadas diferenças estatísticas entre os animais expostos ao protocolo de derrota social de 3 sessões, que foram classificados como vulneráveis ou resilientes, quando avaliados no teste de interação social. Porém, observou-se que os animais vulneráveis apresentaram uma tendência a explorar por menos tempo a zona de interação social, e o por mais tempo a zona dos cantos;
- Quando os animais foram expostos ao protocolo de derrota social de 5 sessões e avaliados no teste de interação social, os camundongos derrotados apresentaram uma tendência em explorar por menos tempo a zona de interação social do aparato;
- Não houve diferenças estatísticas significativas entre os animais expostos a 5 sessões de derrota social quando comparados aos controles nos parâmetros avaliados no labirinto em cruz e no teste de suspensão pela causa, ou seja, não foi observado comportamento tipo ansioso e tipo depressivo.

7. CONCLUSÕES

O conjunto de dados obtidos neste trabalho sugere que não foi possível observar respostas defensivas características do comportamento de esquiva social no teste de partição devido provavelmente a uma alteração no perfil de resposta ao estresse dos animais estudados.

Deste modo, sugerimos que neste trabalho foi estudada uma população de animais composta majoritariamente por animais resilientes, uma vez que foi observado um predomínio de animais com este fenótipo no teste de interação social após o protocolo de derrota social de três sessões e que o protocolo composto por cinco sessões de derrota social, ou seja, com uma maior intensidade do estímulo estressante foi capaz de induzir alterações mais robustas nas respostas defensivas dos animais no teste de interação social.

Assim, trabalhos futuros devem investigar possíveis fatores que possam ter contribuído para o predomínio do fenótipo resiliente apresentado pelos nossos animais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R.; BURTON, P.; BLUNDELL, J.; MURPHY, D. L.; HOLMES, A. Vulnerability to mild predator stress in serotonin transporter knockout mice. **Behavioural Brain Research**, v. 170, p. 126-140, 2006.

AFIFI, T. O.; ASMUNDSON, G. J.; TAYLOR, S.; JANG, K. L. The role of genes and environment on trauma exposure and posttraumatic stress disorder symptoms: a review of twin studies. **Clinical Psychology Review**, v. 3, n. 1, p. 101-12, 2010.

ALBRECHET-SOUZA, L.; W. VIOLA, T. W.; GRASSI-OLIVEIRA, R.; MICZEK, K. A.; ALMEIDA R. M. M. Corticotropin releasing factor in the bed nucleus of the *stria terminalis* in socially defeated and non-stressed mice with a history of chronic alcohol intake. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 762, 2017.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, (DSM-V). Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.

AVGUSTINOVICH, D. F.; KOVALENKO, I. L.; KUDRYAVTSEVA, N. N. A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology. **Neuroscience Behavioral Physiology**, v. 35, n. 9, p. 917-24, 2005.

BARTOLOMUCCI A.; PEDERZANI, T.; SACERDOTE, P.; PANERAI, A. E.; PARMIGIANI, S.; PALANZA P. Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 7, p. 899-910, 2004.

BEERY, A. K.; KAUFER, D. Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 116-127, 2015.

BERGER, W.; PORTELLA, C. M.; FONTENELLE, L. F.; KINRYS, G.; MENDLOWICZ, M. V. Antipsicóticos, anticonvulsivantes, antiadrenérgicos e outras drogas: o que fazer quando o transtorno do estresse pós-traumático não responde aos inibidores seletivos da recaptação da serotonina? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, p. 61-65, 2007.

BERTON, O.; MCCLUNG, C. A.; DILEONE, R. J.; KRISHNAN, V.; RENTHAL, W.; RUSSO, S. J.; GRAHAM, D.; TSANKOVA, N. M.; BOLANOS, C. A.; RIOS, M.; MONTEGGIA, L. M.; SELF, D. W.; NESTLER, E.J. Essential role of bdnf in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 864-8, 2006.

BOLIVAR, V. J. Intrasession and intersession habituation in mice: from inbred strain variability to linkage analysis. **Neurobiology of learning and memory**, v. 92, n. 2, p. 206-14, 2009.

BREMNER, J. D., RANDALL, P.; SCOTT, T. M.; BRONEN, R. A.; SEIBYL, J. P.; SOUTHWICK, S. M; DELANEY, R. C.; MCCARTHY, G.; CHARNEY, D. S.; INNIS, R. B. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 152, p. 973–981, 1995.

CAMARA FILHO, J. W. S.; SOUGEY, E. B. Transtorno de estresse pós-traumático: formulação diagnóstica e questões sobre comorbidade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 221-228, 2001.

COHEN, H.; MATAR, M. A.; RICHTER- LEVIN, G.; ZOHAR, J. The contribution of an animal model toward uncovering biological risk factors for PTSD. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 1071, p. 335–350, 2006.

COHEN, H.; MATAR, M. A.; ZOHAR, J. Maintaining the clinical relevance of animal models in translational studies of post-traumatic stress disorder. **Institute for Laboratory Animal Research**, v. 55, n. 2, p. 233-45, 2014.

DASKALAKIS, N. P.; YEHUDA, R.; DIAMOND, D. M. Animal models in translational studies of PTSD. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1-17, 2013.

DESLAURIERS J.; POWELL S.; RISBROUGH V. B. Immune signaling mechanisms of PTSD risk and symptom development: insights from animal models. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 14, p. 123-132, 2017.

DUQUE, A.; VINADER-CAEROLS, C.; MONLEÓN, S. Effects of social stress and clomipramine on emotional memory in mice. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 76, p. 225-233, 2016.

ETKIN, A. & WAGER, T. D. Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, p. 1476–1488, 2007.

FLESHNER, M.; MAIER, S. F.; LYONS, D. M.; RASKIND, M. A. The neurobiology of the stress-resistant brain. **Stress**, v. 14, n. 5, p. 498–502, 2011.

GOLDEN, S. A.; COVINGTON, H. E.; BERTON, O.; RUSSO, S. J. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, n. 8, p. 1183-92, 2011.

GOSWAMI, S.; RODRÍGUEZ-SIERRA, O.; MICHELE CASCARDI, M.; PARÉ, D. Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity. **Frontiers in neuroscience**, v. 7, p. 1-14, 2013.

GURVITS, T.V.; SHENTON, M. E.; HOKAMA, H.; OHTA, H.; LASKO, N.B.; GILBERTSON, M. W.; ORR, S. P.; KIKINIS, R.; JOLESZ, F. A.; MCCARLEY, R. W.; PITMAN, R. K. Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder. **Biology Psychiatry**, v. 40, p. 1091–1099, 1996.

HAMMAMIEH, R.; CHAKRABORTYA, N.; DE LIMA, T. C. M.; MEYERHOFFA, J.; GAUTAMA, A.; MUHIEA, S.; D'ARPA, P.; LUMLEY, L.; CARROLL, E.; JETTA, M. 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.

HAMMELS, C.; PISHVA, E.; DE VRY, J.; VAN DEN HOVE, D. L.; PRICKAERTS, J.; VAN WINKEL, R.; SELTEN, J. P.; LESCH, K. P.; DASKALAKIS, N. P.; STEINBUSCH, H. W.; VAN OS, J.; KENIS, G.; RUTTEN, B. P. Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 59, p. 111–140, 2015.

HANEY, M.; MACCARI, S.; LE MOAL, M.; SIMON, H.; PIAZZA, P. V. Social stress increases the acquisition of cocaine self-administration in male and female rats. **Brain Research**, v. 698, p. 46-52, 1995.

HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers Behavioural Neuroscience**, v. 7, n. 61, p. 1-12, 2013.

HOLLY, E. N.; SHIMAMOTO, A.; DEBOLD, J. F.; MICZEK, K.A. Sex differences in behavioral and neural cross-sensitization and escalated cocaine taking as a result of episodic social defeat stress in rats. **Psychopharmacology**, v. 224, n. 1, p. 179-188, 2012.

KASAI, K.; YAMASUE, H.; GILBERTSON, M. W.; SHENTON, M. E.; RAUCH, S. L.; PITMAN, R. K. Evidence for acquired pregenual anterior cingulate gray matter loss from a twin study of combat-related posttraumatic stress disorder. **Biological Psychiatry**, v. 63, p. 550–556, 2008.

KESSLER, R. C.; SONNEGA, A.; BROMET, E.; HUGHES, M.; NELSON, C. B. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, p. 1048-1060, 1995.

KILPATRICK, D. G.; RESNICK, H. S.; MILANAK, M. E.; MILLER, M. W.; KEYES, K. M.; FRIEDMAN, M. J. National estimates of exposure to traumatic events and PTSD prevalence using DSM-IV and DSM-5 criteria. **Journal of Trauma Stress**, v. 26, n. 5, p. 537-547, 2013.

KITAYAMA, N., QUINN, S. & BREMNER, J. D. Smaller volume of anterior cingulate cortex in abuse-related posttraumatic stress disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 90, p. 171–174, 2006.

KRISHNAN, V.; HAN, M. H.; GRAHAM, D. L.; BERTON, O.; RENTHAL, W.; RUSSO, S. J.; LAPLANT, Q.; GRAHAM, A.; LUTTER, M.; LAGACE, D. C.; GHOSE, S.; REISTER, R.; TANNOUS, P.; GREEN, T. A.; NEVE, R. L.; CHAKRAVARTY, S.; KUMAR, A.; EISCH, A. J.; SELF, D. W.; LEE, F. S.; TAMMINGA, C. A.; COOPER, D. C.; GERSHENFELD, H. K.; NESTLER, E. J. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, v. 131, p. 391–404, 2007.

KRUGERS, H. J.; HOOGENRAAD, C. C.; GROG, L. Stress hormones and AMPA receptor trafficking in synaptic plasticity and memory. **Nature Reviews – Neuroscience**, v. 11, p. 675-81, 2010.

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. Use of the "Partition" Test in behavioral and pharmacological experiments. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 33, n. 5, p. 461-471, 2013.

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.

LIBERZON, I.; ABELSON, J. L. Context processing and the neurobiology of post-traumatic stress disorder. **Neuron**, v. 92, n. 1, p. 14-30, 2016.

LIU, Y. Y.; ZHOU, X. Y.; YANG, L. N.; WANG, H. Y.; ZHANG, Y. Q.; PU, J. C.; LIU, L. X.; GUI, S. W.; ZENG, L.; CHEN, J. J.; ZHOU, C. J.; XIE, P. Social defeat stress causes depression-like behavior with metabolite changes in the prefrontal cortex of rats. **PLoS One**, v. 12, n. 4, 2017.

LUZ, M. P.; COUTINHO, E. S.; BERGER, W.; MENDLOWICZ, M. V.; VILETE, L. M.; MELLO, M. F.; QUINTANA, M. I.; BRESSAN, R. A.; ANDREOLI, S. B.; MARI, J. J.; FIGUEIRA, I. Conditional risk for posttraumatic stress disorder in an epidemiological study of a Brazilian urban population. **Journal of Psychiatric Research**, v. 72, p. 51-7, 2016.

MARCHETTE, R. C. N. Resiliência e vulnerabilidade ao estresse social e suas implicações neurobiológicas. Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis, 2017.

MARCHETTE, R. C. N.; SANTOS, 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.

MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A.; PICO-ALFONSO, M. A. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory area of psychobiology rodents: a review. **Aggressive Behavior**, v. 24, p. 241–256, 1998.

MCEWEN, B. S. The neurobiology and neuroendocrinology of stress: Implications for post-traumatic stress disorder from a basic science perspective. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 25, p. 469–494, 2002.

MOURI, A.; UKAI, M.; UCHIDA, M.; HASEGAWA, S.; TANIGUCHI, M.; ITO, T.; HIDA, H., YOSHIMI, A.; YAMADA, K.; KUNIMOTO, S.; OZAKI, N.; NABESHIMA, T.; NODA, Y. Juvenile social defeat stress exposure persistently impairs social behaviors and neurogenesis. **Neuropharmacology**, v. 133, p. 23- 37, 2018.

O'BRIEN, J.T. The 'glucocorticoid cascade' hypothesis in man. **British Journal of Psychiatry**, v. 170, p. 199–201, 1997.

O'KEEFE J. & NADEL L. The hippocampus as a cognitive map. **Oxford University Press**, 1978.

PHILLIPS, L. J.; MCGORRY, P. D.; GARNER, B.; THOMPSON, K. N.; PANTELIS, C.; WOOD, S. J.; BERGER, G. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. **The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 40, n. 9, p.725-41, 2006.

PICO-ALFONSO M. A. Psychological intimate partner violence: the major predictor of posttraumatic stress disorder in abused women. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 1, p. 181-93, 2005.

PITMAN, R. K.; RASMUSSEN, A. M.; KOENEN, K. C.; SHIN, L. M.; ORR, S. P.; GILBERTSON, M. W.; MILAD, M.R.; LIBERZON, I. Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nature Review Neuroscience**, v. 13, n.11, p. 769-87, 2012.

RIBBLE, D. O.; SALVIONI, M. Social organization and nest co-occupancy in *Peromyscus californius*, a monogamous rodent. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 26, p. 9-15, 1990.

RODGERS R. J. Animal models of ‘anxiety’: where next? **Behavioural Pharmacology**, v. 8, p. 477-96, 1997.

ROLLINS, C.; GLASS, N. E.; PERRIN, N. A.; BILLHARDT, K. A.; CLOUGH, A.; BARNES, J.; HANSON, G. C.; BLOOM, T. L. Housing instability is as strong a predictor of poor health outcomes as level of danger in an abusive relationship: findings from the SHARE Study. **Journal of Interpersonal Violence**, v. 27, n. 4, p. 623-43, 2012.

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.; UNO, H.; REBERT, C. S.; FINCH, C. E. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. **Journal of Neuroscience**, v. 10, p. 2897–2902, 1990.

SCHÖNER, J.; HEINZ, A.; ENDRES, M.; GERTZ, K.; KRONENBERG, G. Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 10, p. 2248-2256, 2017.

SHIN, L. M.; LIBERZON. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology reviews**, v. 35, p. 169-191, 2010.

SOUTHWICK, S. M.; PAIGE, S.; MORGAN, C. A.; BREMNER, J. D.; KRYSTAL, J. H.; CHARNEY, D.S. Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin. **Seminars in Clinical Neuropsychiatry**, v. 4, n. 4, p. 242-8, 1999.

STAAAY, F. J. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. **Brain Research Reviews**, v. 52, p. 131-159, 2006.

STEIN, M. B., KOVEROLA, C., HANNA, C., TORCHIA, M. G.; MCCLARTY, B. Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse. **Psychological Medicine**, v. 27, p. 951-959, 1997.

TRAINOR, B. C.; PRIDE, M. C.; LANDEROS, R. V.; KNOBLAUCH, N. W.; TAKAHASHI, E. Y.; SILVA, A. L.; CREAN, K. K. Sex differences in social interaction behavior following social defeat stress in the monogamous California Mouse (*Peromyscus californicus*). **Plos One**, v. 6, p. 1-11, 2011.

VAN DE KAR, L. D.; BLAIR, M.L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, n. 1, p. 1-48, 1999.

VAN KAMPEN, M.; KRAMER, M.; HIEMKE, C.; FLUGGE, G.; FUCHS, E. The chronic psychosocial stress paradigm in male tree shrews: evaluation of a novel animal model for depressive disorders. **Stress**, v. 5, p. 37-46, 2002.

VERMA, D.; TASAN, R. O.; HERZOG, H.; SPERK, G. NPY controls fear conditioning and fear extinction by combined action on Y (1) and Y (2) receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, p. 1461-1473, 2012.

WALKER F.R.; MASTERS, L. M.; DIELENBERG, R. A.; DAY, T. A. Coping with defeat: acute glucocorticoid and forebrain responses to social defeat vary with defeat episode behaviour. **Neuroscience**, v. 162, p. 244-253, 2009.

WANG, Z.; NEYLAN, T.C.; MUELLER, S. G.; LENOCI, M.; TRURAN, D.; MARMAR, C. R.; WEINER, M. W.; SCHUFF, N. Magnetic resonance imaging of hippocampal subfields in posttraumatic stress disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, p. 296-303, 2010.

WHITAKER, A. M.; GILPIN, N. W.; EDWARDS, S. Animal models of post-traumatic stress disorder and recent neurobiological insights. **Behavioural Pharmacology**, v. 25, p. 398-409, 2014.

WILLNER, P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 10, n. 6, p. 677-90, 1986.

WOOD, S. K.; WALKER, H. E.; VALENTINO, R. J.; BHATNAGAR, S. 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.

WU, G.; FEDER, A.; COHEN, H.; KIM, J. J.; CALDERON, S.; CHARNEY, D. S.; MATHÉ, A. A. Understanding resilience. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 6-20, 2013.

YEHUDA, R. Disease Markers: Molecular Biology of PTSD. **Disease Markers**, v. 30, p. 61–65, 2011.

YEHUDA, R.; ANTELMAN, S. M. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. **Biological Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 479-86, 1993.

YEHUDA, R.; HOGE, C. W.; ALEXANDER C. MCFARLANE, A. C.; VERMETTEN, E.; LANIUS, R. A.; NIEVERGELT, C. M.; HOBFOLL, S. E.; KOENEN, K. C.; NEYLAN, T. C.; HYMAN, S. E. Post-traumatic stress disorder. **Nature Reviews – Disease Primers**, v. 1, p. 1-22, 2015.

YEHUDA, R.; SOUTHWICK, S. M.; NUSSBAUM, G.; Wahby, V.; Giller, E. L. J.; Mason, J. W. Low urinary cortisol excretion in patients with posttraumatic stress disorder. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 178, n. 6, p. 366-9, 1990.

YEHUDA, R.; TEICHER, M. H.; TRESTMAN, R.L.; LEVENGOOD, R. A.; SIEVER, L. J. Cortisol regulation in posttraumatic stress disorder and major depression: a chronobiological analysis. **Biological Psychiatry**, v. 40, n. 2, p. 79-88, 1996.

YU, H.; WANG, Y.; PATTWELL, S.; JING, D.; LIU, T.; ZHANG, Y.; BATH, K. G.; LEE, F. S.; CHEN, Z. Y. Variant BDNF Val66Met polymorphism affects extinction of conditioned aversive memory. **Journal Neuroscience**, v. 29, p. 4056-4064, 2009.

ZATZICK, D.; DONOVAN, D.; DUNN, C.; RUSSO, J.; WANG, J.; JURKOVICH, G.; GENTILELLO, L. Substance use and posttraumatic stress disorder symptoms in trauma center patients receiving mandated

alcohol screening and brief intervention. **Journal of Substance Abuse Treatment**, v. 43, n. 4, p. 410–417, 2012.

ZOHAR, J.; AMITAL, D.; MIODOWNNIK, C.; KOTLER, M.; BLEICH, A.; LANE, RM.; AUSTIN, C. Double-blind placebo-controlled pilot study of sertraline in military veterans with posttraumatic stress disorder. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 190-5, 2002.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do papel dos receptores de neurocinina-1 (NK1) em um modelo de estresse social", protocolada sob o CEUA nº 6798200617, sob a responsabilidade de **Therese Christina Monteiro de Lima** e equipe: **Bruna Caroline Pierone** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/09/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of the role of neurokinin-1 (NK1) receptors in a social stress model", utilizing 300 Isogenics mice (300 males), 240 Heterogenics mice (240 males), protocol number CEUA 6798200617, under the responsibility of **Therese Christina Monteiro de Lima** and team; **Bruna Caroline Pierone** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 09/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 08/2017 a 08/2019

Área: **Farmacologia**

Origem: **CCB - Lafex- Laboratório de Farmacologia Experimental**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 5 meses**

N: **300**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **20 a 35 g**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 6 meses**

N: **240**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **30 a 50 g**

Resumo: Estima-se que o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) acomete cerca de 7,8% da população geral, sendo que este transtorno é desencadeado a partir da exposição a um evento traumático que pode ter sido experimentado, testemunhado ou confrontado pelo indivíduo. Alguns exemplos de eventos traumáticos que podem causar TEPT são: situações de violência urbana, doméstica ou sexual; acidentes automobilísticos ou de trabalho; e desastres naturais. Os sintomas são agrupados em três categorias sendo que estas contemplam os sintomas relacionados à reexperiência do trauma, ao comportamento de esquiva e isolamento social e por fim a hiperexcitabilidade psíquica e psicomotora. Além disso, pacientes portadores de TEPT frequentemente sofrem de condições comórbidas, como depressão, ansiedade e dependência de drogas. O tratamento do TEPT é comumente feito pela associação entre a psicoterapia e farmacoterapia, sendo que os fármacos de primeira escolha são os antidepressivos, particularmente os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). Entretanto, estudos relatam que menos de um terço dos pacientes respondem adequadamente ao tratamento farmacológico, que também é de difícil adesão devido aos muitos efeitos adversos causados. Atualmente, tem-se estudado o papel dos neuropeptídeos na fisiopatologia de distúrbios psiquiátricos como o TEPT e como estes poderiam ser manipulados a fim de constituir novas estratégias terapêuticas. Um desses neuropeptídeos é a substância P (SP) que é amplamente distribuída pelo sistema nervoso central e parece estar envolvida com a regulação de diversos mecanismos fisiológicos, como por exemplo, na modulação da resposta ao estresse e de comportamentos afetivos e relacionados à ansiedade. A SP atua por meio da interação com os receptores de neurocinina ou NK1, 2 e 3, ligando-se preferencialmente aos receptores NK1. Existem evidências de que a ativação do receptor NK1 pela substância P está relacionada com a expressão de comportamentos de medo e ansiedade e que o bloqueio deste mecanismo causa um efeito tipo-ansiolítico em modelos animais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é estudar o efeito do bloqueio dos receptores NK1 promovido pelo Aprepitanto (EMEND®, Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda) como possível nova estratégia terapêutica para pacientes com TEPT. Para isso será realizado um tratamento crônico com doses crescentes de aprepitanto em camundongos submetidos ao protocolo de derrota social (DS), um modelo translacional para o estudo de TEPT. Além disso, também propõe-se o estudo de um possível efeito aditivo da associação entre o tratamento com o aprepitanto e o enriquecimento ambiental que visa mimetizar a psicoterapia utilizada como tratamento de TEPT em humanos.

Local do experimento: Laboratório de Neurofarmacologia, Sala 307, Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC (etapas comportamentais); Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), CCB, UFSC (análises moleculares).



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



Florianópolis, 04 de fevereiro de 2018

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina