

Paula Macedo de Oliveira

**VALIDAÇÃO DO MODELO DE ESTRESSE POR
INSTABILIDADE SOCIAL EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Odival Cezar Gasparotto.

Coorientadora: Profa. Dra. Sonia Gonçalves Carobrez

Florianópolis
2013

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

Oliveira, Paula Macedo de
Validação do Modelo de Estresse por Instabilidade Social
em Camundongos Suiços / Paula Macedo de Oliveira ;
orientador, Odival Cezar Gasparotto ; co-orientador,
Sonia Gonçalves Carobrez. - Florianópolis, SC, 2013.
62 p.

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

Inclui referências

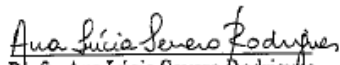
1. Neurociências. 2. Estresse social. 3. Instabilidade
social. 4. Corticosterona. 5. Eixo HPA. I. Gasparotto,
Odival Cezar . II. Carobrez, Sonia Gonçalves. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências. IV. Título.

PAULA MACEDO DE OLIVEIRA

**“VALIDAÇÃO DO MODELO DE ESTRESSE POR
INSTABILIDADE SOCIAL EM CAMUNDONGOS
SUÍÇOS”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau
de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

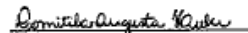
Florianópolis, 29 de agosto de 2013.



Prof. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Odival Cezar Gasparotto
Orientador – UFSC


Prof. Adair R. S. dos Santos
Membro – UFSC


Prof. Domitila A. Hauber
Membro da Banca Externo


Prof. Fernanda B.L. Christian
Membro – UFSC

Mãe, Pai e André, vocês foram a
minha força e determinação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus por me conceder fé em prosseguir nesta caminhada.

Aos meus irmãos Aline e Paulo, pela grande amizade e apoio.

À minha família querida pela compreensão nas ausências necessárias.

À amiga Letícia Rauen Delpizzo pelas longas conversas que me concederam força para superar os obstáculos encontrados durante esta caminhada.

Ao chefe e amigo, Gerson Appel pelo apoio.

Aos professores e orientadores Prof. Odival Cezar Gasparotto e Profa. Sonia Gonçalves, pela oportunidade e confiança em realizar este trabalho.

Ao Nivaldo, secretário do Programa de Pós Graduação em Neurociências, pela disponibilidade sempre que solicitado.

Ao Péricles, pela parceria e constante presença na realização dos experimentos laboratoriais.

Aos alunos e colegas do PGN/UFSC pelo convívio e aprendizado, em especial, ao companheiro de trabalho Lucas Kniess Debarba.

Muito obrigada, a todos que torceram por mais esta conquista!

RESUMO

O estresse é capaz de afetar vários processos fisiológicos e, portanto, é considerado como determinante no desenvolvimento de diversas patologias. A exposição a estímulos estressores é responsável por alterações na regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) que, por sua vez, são capazes de induzir uma elevação na secreção de glicocorticóides, hormônios esses reconhecidos como marcadores biológicos de grande importância na resposta ao estresse. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do modelo proposto de estresse por instabilidade social (IS) e validá-lo como modelo indutor de estresse. Para tanto, camundongos machos suíços presenciaram, a curta distância e sem contato físico direto, lutas entre animais mais velhos. Os episódios de luta foram promovidos por 30 minutos e aplicados por um ou quatro dias consecutivos. O nível de estresse, após a exposição ao modelo de instabilidade social, foi mensurado pelas análises da concentração plasmática dos hormônios, adrenocorticotrópico (ACTH) e corticosterona, da atividade da enzima glutatona redutase (GR) e a expressão do comportamento do tipo ansiedade. Os resultados mostraram que o modelo de estresse por IS gerou reações típicas de estresse com ativação do eixo HPA e alterações na atividade da enzima GR. Observou-se que as exposições repetidas (quatro) ao modelo de IS foram capazes de induzir um efeito cumulativo que se refletiu sobre os níveis elevados de ACTH e corticosterona, sobretudo quando comparados com os níveis desses hormônios em uma única exposição a IS. Em adição, verificou-se que a exposição a um estímulo heterotípico, após a aplicação do modelo de IS, foi responsável pela redução da atividade exacerbada do eixo HPA e da atividade da enzima GR, observada anteriormente pela exposição ao estresse de IS. Em conjunção, os dados do presente estudo indicam que o protocolo de instabilidade social proposto é um modelo válido e eficaz para a indução de estresse de natureza psicossocial.

Palavras-chave: estresse, estresse social, corticosterona, eixo HPA, estresse oxidativo, glutatona redutase.

ABSTRACT

Stress can affect various physiological processes and thus is considered a key factor in the development of several pathologies. The exposure to stressful stimuli is responsible for alterations in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) which, in turn, are capable of inducing an increase in the secretion of glucocorticoids, recognized as biological markers of great importance in response to stress. The aim of this study was to evaluate the effects of the proposed model of social instability stress (IS) and validate it as a model of stress inducer. Therefore, male Swiss mice witnessed fights between older animals in a short distance, without direct physical contact. The fighting episodes were promoted for 30 minutes and applied in one or four consecutive days. After exposure to the model of social instability, the stress level was measured by analysis of plasma concentrations of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone, Glutathion Reductase (GR) enzyme activity and expression of anxiety-like behavior. The results showed that the model of IS generated typical reactions to stress with HPA axis activation and changes in the activity of the enzyme GR. It was observed that repeated exposure (four) to IS model was able to induce a cumulative effect which was reflected on high levels of both hormones, especially when compared with the levels of these hormones in a single exposure to IS. In addition, the exposure to a stimulus heterotypic, after applying the model IS, was responsible for reducing the heightened activity of the HPA axis and GR enzyme activity, previously observed by exposure to stress IS. In conjunction, the data of this study indicate that the protocol of social instability stress is a valid and effective model for the induction of psychosocial stress.

Keywords: stress, social stress, social instability, corticosterone, HPA axis, oxidative stress, glutathione.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de estresse por instabilidade social.....	30
Figura 2: Labirinto em cruz elevado.	35
Figura 3: Níveis plasmáticos de ACTH.	36
Figura 4: Níveis plasmáticos de corticosterona.....	37
Figura 5: Atividade da enzima GR no córtex pré-frontal.....	38
Figura 6: Atividade da enzima GR no hipocampo.....	39
Figura 7: Porcentagem de tempo no braço aberto.....	40
Figura 8: Porcentagem de animais que permaneceram no braço fechado.....	40
Figura 9: Número de vezes que os animais cruzaram de um braço para o outro	41
Figura 10: Níveis plasmáticos de ACTH após teste no LCE	42
Figura 11: Níveis plasmáticos de corticosterona após LCE.....	42
Figura 12: Atividade da enzima GR no córtex pré-frontal após o teste no LCE.....	43
Figura 13: Atividade da enzima GR no hipocampo após o teste no LCE	44
Figura 14: Correlação dos níveis plasmáticos de ACTH com a atividade da enzima GR no córtex pré-frontal de animais do grupo CT	45
Figura 15: Correlação dos níveis plasmáticos de ACTH com a atividade da enzima GR no hipocampo.....	45
Figura 16: Correlação entre a atividade da GR com os níveis plasmáticos de ACTH de camundongos expostos a único protocolo de estresse por IS e testados no LCE.....	46
Figura 17: Correlação entre a atividade da GR com os níveis plasmáticos de corticosterona de camundongos controle testados no LCE.....	47
Figura 18: Efeitos da exposição ao teste no LCE nos níveis de ACTH	48
Figura 19: Efeitos da exposição ao teste no LCE nos níveis de corticosterona	49
Figura 20: Efeitos da exposição ao teste no LCE após protocolo de IS na atividade da enzima GR no córtex	49
Figura 21: Efeitos da exposição ao teste no LCE após protocolo de IS na atividade da GR no hipocampo.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Correlação (Coeficiente de Person) da atividade da enzima GR (mU/min) com os níveis plasmáticos de ACTH (pg/mL) ou corticosterona (pg/mL).....	51
Tabela 2: Atividade da enzima GR (mU/min) no córtex frontal em correlação com ACTH (pg/mL), corticosterona (pg/mL), ou ambulacão no teste LCE.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- % TAR – porcentagem de tempo em avaliação de risco
- %TBA – Porcentagem de tempo no braço aberto do labirinto em cruz elevado
- %NBF – porcentagem de animais que permaneceram no braço fechado
- ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico ou corticotropina
- AR – Avaliação de risco
- CRH – Hormônio liberador de corticotrofina
- CT – Controle
- Eixo HPA – Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- GCs – Glicocorticóides
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GR – Glutaciona redutase
- GSH – Glutaciona reduzida
- GSG – Glutaciona oxidada
- IS – Instabilidade social
- LCE – Labirinto em cruz elevado
- MR - Mineralocorticóides
- NO – Óxido nítrico
- NRISCO – Número de avaliação de risco no labirinto em cruz elevado
- VP - Vasopressina
- UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 NEUROBIOLOGIA DO ESTRESSE	21
1.2 MODELOS DE ESTRESSE	23
1.2.1 Estresse Psicossocial	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 ACASALAMENTO E CRIAÇÃO.....	28
3.2 ANIMAIS.....	28
3.3 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	29
3.4 PROTOCOLO DE INSTABILIDADE SOCIAL.....	29
3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS	30
3.6 DOSAGENS DE ACTH E CORTICOSTERONA	33
3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA GR NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO.....	33
3.8 ANÁLISE COMPORTAMENTAL	34
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ACTH E CORTICOSTERONA.....	36
4.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE.....	37
4.3 ANÁLISE COMPORTAMENTAL NO TESTE DO LCE	39
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEUROBIOLOGIA DO ESTRESSE

Estímulos estressores estão presentes na vida humana desde a antiguidade, tempos em que se lutava por comida e sobrevivência. As respostas comportamentais ou fisiológicas a estas situações são requeridas no dia-a-dia, permitindo que os seres humanos e outros animais sobrevivam, dentro de limites dinâmicos aos frequentes desafios do ambiente (MARGIS et al., 2003; SOREL & SAPOLSKY, 2007, SAPOLSKY, 2010).

O fisiologista canadense, Hans Selye, foi quem introduziu o conceito clássico de estresse no meio médico e científico. O principal trabalho para elaboração de sua teoria sobre o estresse foi publicado pela revista *Nature* em 1936, em que o termo estresse foi utilizado para descrever uma ameaça real ou potencial à homeostasia. Os estudos de Selye realizados em ratos mostraram uma série de alterações fisiológicas, como o aumento do tamanho da adrenal, ulceração gastrointestinal e involução do timo e tecidos linfoides, provocadas por uma variedade de fatores estressantes (SELYE, 1936). Para Selye, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) representa a chave efetora da resposta ao estresse, onde o córtex da glândula adrenal atua como órgão de integração entre os processos fisiológicos e patológicos (SELYE, 1951). Em 1976, Selye propôs que a maioria dos fatores estressantes induzem dois tipos de respostas em roedores: uma resposta de estresse geral que é comum a todos os estímulos estressores e envolve a liberação de Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona; e respostas individuais ao estresse, mediadas por ‘fatores condicionantes’ como a predisposição genética (SELYE, 1976).

Estímulos estressores são perturbadores do equilíbrio homeostático do organismo, e a resposta ao estresse é o conjunto de reações fisiológicas destinadas a restabelecer a homeostase (TSIGOS e CHROUSOS, 2002; SAPOLSKY, 2010). Os estressores comumente estudados são os estressores físicos ou químicos, como por exemplo, o calor, frio, radiação, substâncias tóxicas; estressores psicológicos responsáveis por alterações comportamentais e processos emocionais (ansiedade, medo); estressores sociais (brigas, disputas sociais, ambiente hostil) e estressores que afetam a homeostase vegetativa (hiperglicemia e exercícios físicos) (SAPOLSKY, 2000; BLANCHARD,

MCKITTIRICK, BLANCHARD, 2001; CIZZA, 2003; GONÇALVES, 2008; HAYASHIDA et al, 2010).

O estresse é um potente estímulo para o eixo HPA (CHROUSOS e GOLD, 1992; SOREL & SAPOLSKY, 2007, FOLEY e KIRSCHBAUM, 2010; ENGERT et al., 2012). Estudos mostram que diferentes estressores como o nado forçado (ARMARIO et al., 1991; RYGULA et al., 2005), estresse psicossocial (BLANCHARD, MCKITTIRICK, BLANCHARD, 2001; BARTOLOMUCCI, 2007), contenção física (CIZZA, 1993; LEE et al., 2006), nado em água fria, entre outros, são capazes de estimular a secreção do ACTH (JORGENSEN et al., 1998; KLENEROVA et al., 2003; FOLEY e KIRSCHBAUM, 2010).

A ativação do eixo HPA induz os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo a secretar o Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH). O CRH age na adeno-hipófise promovendo a liberação do hormônio ACTH. Como consequência, observa-se a liberação de corticosteróides a partir do córtex adrenal. Verifica-se um aumento desse hormônio na corrente sanguínea, minutos após o evento estressante (CHROUSOS e GOLD, 1992; SORRELS e SAPOLSKY, 2007; SAPOLSKY, 2010). Estudos corroboram e afirmam que a resposta aguda ao estímulo estressor é caracterizada pela liberação de mediadores do estresse, incluindo liberação de CRH, ACTH, glicocorticóides (GCs) e as catecolaminas, adrenalina e noradrenalina (MCCARTY, KVETNANSKY e KOPIN, 1981; TSIGOS e CHROUSOS, 2002; SOREL e SAPOLSKY, 2007, SAPOLSKY, 2010). Arginina-vasopressina também liberada a partir da ativação do eixo HPA atua sinergicamente ao CRH, estimulando a secreção de ACTH (TSIGOS e CHROUSOS, 2002).

Essa liberação de GCs é importante não só como hormônio do estresse, mas também na regulação do funcionamento de organismos não estressados (SAPOLSKY, ROMERO, MUNK, 2000). Em condições basais, os GCs têm efeito importante no balanço energético, metabolismo e manutenção dos níveis normais de CRH (DALLMAN, 2002; FOLEY e KIRSCHBAUM, 2010). As ações do cortisol liberado em resposta aos estressores recorrentes (exposição crônica) têm importantes efeitos fisiológicos em tecidos alvos e em todo o corpo, incluindo o Sistema Nervoso Central (SNC) e o sistema imunitário.

O estresse crônico está associado com a produção de estresse oxidativo e disfunções mitocondriais (MCINTOSH e SAPOLSKY, 1996; MANOLI et al., 2000). Evidências mostram a ação dos GCs sobre a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (LEE et al., 2006) e

sobre o sistema de proteção antioxidante no SNC (MADRIGAL et al., 2001) e níveis elevados de GCs podem gerar EROs e o estresse tem demonstrado ser efetivo em aumentar indicadores de peroxidação lipídica, gerar alteração na atividade enzimática antioxidante e nos níveis de glutathione (GONÇALVES et al., 2008).

As EROs são constantemente produzidas e os sistemas antioxidantes ajudam a defender o organismo contra as suas ações. As mitocôndrias têm papel vital na homeostase celular, mas são nelas que ocorrem os processos indutores do estresse oxidativo (MANOLI et al., 2007). A instalação do processo oxidativo decorre de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres. Evidências mostram que as EROs estão envolvidas com dano tecidual, como resultado de uma grande variedade de insultos (BAINS e SHAW, 1997; SORRELS e SAPOLSKY, 2007). A exposição de ratos ao estresse por imobilização crônica, por seis horas durante vinte e um dias consecutivos, mostrou que esse estressor leva a depleção da glutathione, aumento da peroxidação lipídica e a disfunção mitocondrial (MADRIGAL et al., 2001).

A glutathione é um tripeptídeo importante na proteção das células contra os danos provocados pelos radicais livres. A Glutathione Reduzida (GSH) desempenha várias funções no sistema nervoso incluindo captador de radicais livres, modulador da atividade redox do receptor ionotrópico e do neurotransmissor glutamato. A redução nos níveis de glutathione bem como aumento na taxa de Glutathione Oxidada (GSSG) / GSH têm sido proposta como um índice sensível de estresse oxidativo. A depleção de GSH pode aumentar o estresse oxidativo e os níveis de moléculas excitotóxicas; ambas as ações podem iniciar a morte celular em diferentes populações neuronais (BAINS e SHAW, 1997; SILVA, 2004).

Estudos ainda fortalecem e complementam as afirmativas sobre as consequências dos estímulos estressantes, sugerindo que o eixo HPA é um elo comum entre os transtornos depressivos e transtornos de ansiedade, apresentando-se alterado em ambas as condições (ANISMAN e ZACHARKO, 1982; ROTH et al., 2012) com implicações na etiologia da depressão e transtornos de ansiedade (BROWN et al., 1995; TURNER e LLOYD, 1999).

1.2 MODELOS DE ESTRESSE

A resposta ao estresse é modulada por vários fatores como: o tipo de agente estressor, o tempo, a previsibilidade e intensidade. Estressores

comumente usados em ratos e camundongos incluem estresse por contenção (DAL-ZOTTO, MARTÍ, ARMARIO, 2003; LEE et al., 2006), choques elétricos, nado forçado (DAL-ZOTTO, MARTÍ, ARMARIO, 2000) e exposição seqüencial a diferentes estressores (WILLNER, 1991; HAYASHIDA et al., 2010). Apesar de úteis e eficazes, alguns estímulos estressores são potencialmente dolorosos e oferece validade pouco comparável aos estressores psicológicos e sociais, isso porque estímulos físicos acionam mecanismos neurais, comportamentais, endócrinos e imunológicos que nem sempre são os mesmos provocados pelo estresse psicossocial.

Embora a dor e os traumatismos físicos possam provocar estresse, os estressores de natureza psicológica são os que melhor contribuem para o desenvolvimento e expressão de transtornos de humor, transtornos de ansiedade, traumas, fobias e crises de pânico (RUIS et al., 1999).

1.2.1 Estresse Psicossocial

Os estressores mais comuns vivenciados pelos seres humanos são de natureza psicológica ou social. A busca pela compreensão da complexa rede de alterações fisiológicas provocadas por esses estímulos tem sido um desafio para muitos pesquisadores.

Um modelo animal amplamente utilizado como um paradigma social para simular uma perda de controle social, é o modelo de derrota social, que também é conhecido como interação intruso-residente. O modelo de derrota social crônico tem sido proposto como um modelo de estresse social que produz um padrão comportamental associado à depressão, com sinais de anedonia e prejuízos na interação social (KOOHLAAS et al., 1997).

As alterações decorrentes da derrota social são consideradas como fatores importantes no desenvolvimento de patologias associadas ao estresse. Em roedores, o modelo de derrota social é considerado um estressor natural, responsável por mudanças fisiológicas e comportamentais que são, por vezes, de longa duração (BLANCHARD e BLANCHARD, 1990; KOOLHAAS et al., 1997; RUIS et al., 1999; RYGULA et al., 2005). Dentre as alterações, incluem-se o aumento do comportamento de submissão e ansiedade (RUIS et al., 1999), diminuição da atividade locomotora e exploratória (RYGULA et al., 2005). Esses efeitos são associados à diminuição do peso corporal e aumento do peso da glândula adrenal (SAPOLSKY, ROMERO, MUNCK, 2000; RYGULA et al., 2005).

Nos animais, os efeitos de longa duração provocados pela exposição ao estresse de derrota social são caracterizados por aumento no comportamento do tipo ansiedade, redução da mobilidade no teste de nado forçado, aumento da atividade de eixo HPA, alterações da frequência cardíaca e alterações na temperatura corporal (RUIS, et al., 1999). Fisologicamente, os animais derrotados socialmente apresentam aumento de ACTH e glicocorticóides e função imunológica reduzida (RYGULA et al., 2005).

RUIS et al. (1999) demonstraram que a duração e gravidade dos efeitos fisiológicos e comportamentais decorrentes de uma derrota social apresentaram relação com o tipo de acondicionamento dos animais após a aplicação do modelo de derrota social. Duas formas de alojamento foram avaliadas: o individual e em grupo. Os autores mostraram que animais alojados individualmente permaneceram um tempo significativamente menor no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), um tempo de imobilidade maior no teste do campo aberto e níveis significativamente maiores de ACTH e de corticosterona quando comparados aos animais alojados em grupo (RUIS et al., 1999).

Os modelos de superlotação são úteis para o estudo do estresse social. Esses modelos consistem no alojamento de animais em grupos em uma mesma caixa, ou em alojamentos alternados entre a superlotação e o isolamento. BROWN e GRUNBERG (1995) avaliaram os níveis plasmáticos de corticosterona em ratos machos e fêmeas quando expostos a diferentes condições de alojamento. A exposição a um ambiente de superlotação induziu um aumento nos níveis de corticosterona significativamente maior em machos do que em fêmeas. Por sua vez, a condição de isolamento resultou em fêmeas um aumento significativo nos níveis de corticosterona, em contraste com os machos. Esses dados levaram os autores concluir que as diferentes condições de alojamento afetaram diferentemente as respostas dos animais a esses estressores, sendo o fator gênero determinante nas diferenças fisiológicas observadas.

Modelos de estresse têm sido propostos para a compreensão das reações fisiológicas decorrentes da exposição a diferentes estímulos estressores. Os estudos que envolvem modelos animais, cujo contexto psicossocial é abordado, melhor contribuem para a compreensão das consequências da exposição a estressores observada na sociedade humana.

Por essa razão, a hipótese do presente estudo com modelo de estresse por instabilidade social (IS) é bastante válida. O nosso modelo de IS consiste na avaliação dos camundongos machos suíços que

presenciam lutas entre animais mais velhos a curta distância e sem contato físico direto. Os episódios de luta possuem duração de 30 minutos e são aplicados por um ou quatro dias consecutivos.

Dados não publicados realizados em nosso Laboratório de Neurobiologia do Estresse (UFSC) demonstraram que estressor por IS e biológicos (hemácias de carneiro e lipopolissacarídeo extraído de *Escherichia coli*) interferem no sistema de defesa antioxidante e no comportamento do tipo ansiedade.

Em outro estudo, também realizado em nosso laboratório, estressores de natureza psicossocial afetaram a atividade de enzimas antioxidantes no SNC que foram correlacionadas com alterações induzidas no comportamento do tipo ansiedade (GONÇALVES et al., 2008).

As relações entre saúde, estresse e instabilidade no ambiente social são de extrema importância, pois essas interferem no bem estar, na saúde e modulam importantes funções neuroendócrinas e comportamentais. Nas sociedades humanas as pressões sociais, econômicas e interpessoais relacionam-se fortemente com a incidência de disfunções cardiovasculares, câncer, infecções, artrite, fibromialgia e distúrbios mentais (SALVADOR & COSTA, 2009). Por essa razão, os conflitos sociais que constituem estressores relevantes entre membros de uma mesma espécie, mostram um potencial para reproduzir de forma eficiente a rotina estressante de nossa sociedade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar um novo modelo de estresse por instabilidade social em camundongos suíços machos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos do protocolo de estresse por instabilidade social na ação neuroendócrina, pela dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona e ACTH;
- Analisar os possíveis efeitos do protocolo de estresse por instabilidade social sobre o comportamento tipo ansiedade;
- Avaliar o comprometimento do córtex pré-frontal e hipocampo decorrente do estresse oxidativo nos animais expostos ao protocolo de instabilidade social.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ACASALAMENTO E CRIAÇÃO

Para o acasalamento foram utilizados oito casais de camundongos suíços fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais reprodutores apresentando, em média, sessenta e cinco dias de vida, foram recebidos pelo Laboratório de Neurobiologia do Estresse e mantidos em gaiolas individuais no Biotério de Manutenção do referido Laboratório em torno de quinze dias. Após a seleção aleatória dos casais para a reprodução, esses foram mantidos em gaiolas individualizadas permanecendo por dez dias.

Após o nascimento, os filhotes foram mantidos com suas mães até o desmame (vinte dias), quando foram separados (apenas os machos) em caixas individuais para ambientação nas salas designadas para cada grupo experimental. Com trinta dias de idade, esses animais foram desverminados com Ivermectina (Ivomec[®] 1%) por gavagem. A concentração de Ivermectina utilizada foi de 1mL/10kg de massa corporal.

Os grupos experimentais foram mantidos em salas diferentes, com dimensões e iluminação semelhantes e climatização comum.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados cinquenta e nove camundongos suíços machos, da espécie *mus musculus*, com idade de quarenta e cinco dias, provenientes do cruzamento de casais fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais experimentais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (19 cm de altura X 30 cm de comprimento X 13 cm de profundidade) com cobertura gradeada de aço. A forração das gaiolas foi feita com serragem de *Pinus* esterilizada.

Os animais permaneceram isolados individualmente durante todo o período de experimentação, sem contato visual direto com os outros animais, exceto durante a aplicação do modelo de estresse por instabilidade social. Nesta ocasião, os animais experimentais presenciaram as lutas entre dupla de camundongos, a curta distância, mas sem contato direto com os animais em interação.

3.3 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

As salas de manutenção dos animais foram mantidas com temperatura a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e iluminação controlada. O ciclo claro/escuro de 12:00 horas foi respeitado, sendo as luzes acesas às 6:00 horas.

A alimentação dos animais foi constituída de água e ração para roedores Biobase da marca Biotec oferecidos “ad libitum”. A troca de serragem era realizada uma vez por semana.

Os protocolos experimentais do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) (Nº PP00701) com aprovação encaminhada pelo Ofício número 21/CEUA/PRPE/2012 e estavam de acordo com as Diretrizes de Cuidados com Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América.

3.4 PROTOCOLO DE INSTABILIDADE SOCIAL

Ao completar quarenta e cinco dias de idade, os animais experimentais foram expostos ao estresse por instabilidade social (IS). Para a indução do estresse por instabilidade social, os animais experimentais ($n=5$) foram colocados em gaiolas com dimensões de (19 cm de altura X 15 cm de comprimento X 13 cm de profundidade). A face frontal das gaiolas era constituída de tela de arame e voltada para uma arena central de 25 cm de diâmetro (Figura 01). No centro da arena era colocada uma dupla de camundongos machos com idade de sessenta dias, no período pós-reprodutivo. As interações agonísticas ocorreram por um período de trinta minutos, em um único dia ou em quatro dias consecutivos. Durante as interações, observou-se luta pelo estabelecimento da hierarquia social. Os animais que participaram das interações agonísticas e que reagiram de forma muito violenta, gerando ferimentos nos conspécíficos, foram substituídos por animais que desferiram ataques moderados ao longo do período de pareamento.

O protocolo de instabilidade social foi aplicado na primeira metade do ciclo claro do dia. Finalizado o tempo de interação social, tanto os animais que presenciaram as lutas, como aqueles que interagiram agonisticamente, retornaram às suas respectivas gaiolas de manutenção.

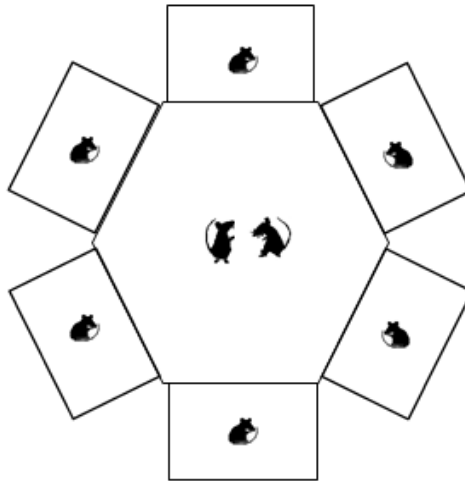


Figura 1: Modelo de estresse por instabilidade social

3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais experimentais foram expostos ao protocolo de instabilidade social único (exposição ao estressor por um dia) ou recorrente (exposição ao estressor por quatro dias consecutivos). Após os episódios de estresse por IS, coletaram-se em diferentes intervalos de tempo, amostras de plasma para dosagem de ACTH e corticosterona. Do mesmo modo, amostras de córtex e hipocampo foram retiradas para análise da atividade da enzima GR.

Esquema 01: Grupos experimentais

Identificação dos Grupos / n = número de animais	Protocolo Experimental
CT 1 / n=5	Animais submetidos ao mesmo ambiente na arena porém, não expostos ao estresse por IS. Análise de corticosterona, ACTH e atividade da GR. Amostras coletadas no dia 1.
IS 1/0, 25h: n=5	Animais expostos ao protocolo de estresse por IS. Análise de corticosterona, ACTH e atividade da GR. Amostras coletadas 15 minutos após a exposição ao estresse de IS.
IS 1/3h: n=5	Animais expostos ao protocolo de estresse por IS. Análise de corticosterona, ACTH e atividade da GR. Amostras coletadas na terceira hora após a exposição ao estresse de IS.
IS 1/24h: n=5	Animais expostos ao protocolo de estresse por IS. Análise de corticosterona, ACTH e atividade da GR. Amostras coletadas 24 horas após a exposição ao estresse de IS.
IS 4/0,25h: n=5	Animais expostos ao estresse por IS por quatro dias consecutivos. Análise de corticosterona, ACTH e atividade da GR. Amostras coletadas no quarto dia, 15 minutos após a exposição ao estresse de IS.
IS 4/3h: n=5	Animais expostos ao estresse por IS por quatro dias consecutivos Análise de corticosterona, ACTH e atividade da GR. Amostras coletadas no quarto dia, 3 horas após a exposição ao estresse de IS.
IS 4/24h: n=5	Animais expostos ao estresse por IS por quatro dias consecutivos. Análise de corticosterona, ACTH e atividade da GR. Amostras coletadas no quarto dia, 24 horas após a exposição ao estresse de IS.
CT/ LCE 1: n=8	Animais submetidos ao mesmo ambiente na arena porém, não expostos ao estresse de IS. Expostos ao LCE. Análise de corticosterona, ACTH e atividade da GR. Amostras coletadas logo após a finalização do teste no LCE.
IS1/LCE 24h: n=8	Animais expostos um episódio de estresse por IS. Expostos ao LCE 24h após a exposição ao estresse de IS. Análise de corticosterona, ACTH e atividade da GR. Amostras coletadas logo após a finalização do teste no LCE.
IS4/ LCE 24h: n=8	Animais expostos ao estresse por IS por quatro dias consecutivos. Expostos ao LCE 24h após a exposição ao estresse de IS. Análise de corticosterona, ACTH e atividade da GR. Amostras coletadas logo após a finalização do teste no LCE.

3.6 DOSAGENS DE ACTH E CORTICOSTERONA

As amostras de sangue dos animais experimentais foram coletadas por punção cardíaca, sob efeito de anestesia por inalação de isoflurano. Essas amostras coletadas com anticoagulante (heparina) foram depositadas em tubos Eppendorf e imediatamente submetidas à centrifugação a 4.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. O sobrenadante contendo o plasma foi coletado e armazenado em freezer a -20°C .

Para a análise do resultado de ACTH foi utilizado o método de quimioluminescência (IMMULITE[®] 2000 ACTH, Siemens Healthcare), Llanberis, United Kingdom com valor de referência inferior a 46 pg/mL, segundo dados do fornecedor.

Os níveis plasmáticos de corticosterona foi mensurado por quimioluminescência (Cortisol Immulite 2000 DPC, Los Angeles, CA, EUA) coeficiente de variação inter ensaio < 10 e limite de detecção de $5\mu\text{g/dL}$.

3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA GR NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO

O hipocampo e córtex frontal de cada animal foram coletados e homogeneizados em $300\mu\text{L}$ de tampão HEPES (20mM, pH 7,0). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 de força centrífuga relativa (rcf) a 4°C e o sobrenadante coletado para as dosagens da enzima glutationa redutase (GR).

A atividade da GR foi determinada pelo método descrito por CARLSBERG & MANNERVIK (1985) que mensura o consumo de NADPH em virtude da redução da glutationa oxidada (GSSH). A leitura foi realizada em um comprimento de onda de 340nm no espectrofotômetro Ageland[®].

O meio da reação foi composto por 10mL de tampão fosfato 0,25M, 9,94mL de água destilada e $53,3\mu\text{L}$ de NADPH (100mM). Para a determinação do valor padrão das amostras no espectrofotômetro adicionou-se a cubeta $400\mu\text{L}$ do meio de reação, $55\mu\text{L}$ de água destilada e $200\mu\text{L}$ da amostra. Uma vez determinado o valor basal mediante o uso de um comprimento de onda de 340nm, adicionou-se $25\mu\text{L}$ do substrato GSSG para possibilitar o consumo de NADPH na reação por cinco minutos. Do decaimento por minuto obtido foi descontado o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas

diluições. O valor foi expresso em unidades/mg de proteína. Uma unidade corresponde a $1\mu\text{mol/mL/min}$.

Para a análise da atividade da GR, o conteúdo de proteínas totais do córtex e hipocampo foi quantificado pelo método de BRADFORD (1976). A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm usando a Albumina de Soro Bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) como padrão. Esses ensaios bioquímicos foram conduzidos no Laboratório de Defesas Celulares, coordenado pelo Prof. Alcir Luiz Dafre, vinculado ao Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.8 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

O teste no LCE foi realizado em um labirinto adaptado para camundongos em sessão única de 5 minutos para cada animal experimental (LISTER, 1987).

O labirinto feito de PVC foi colocado a uma altura de 40 cm do chão. A estrutura do labirinto era composta por quatro braços, cada um medindo 15 cm de comprimento e 5 cm de largura. Dois desses braços eram abertos e os outros dois fechados, ou seja, protegidos por paredes laterais com 15 cm de altura (Figura 02).

Três dos grupos experimentais foram avaliados no LCE, o grupo controle (CT/LCE), o grupo de animais expostos a um único episódio de estresse por IS (IS1/LCE) e o grupo de animais expostos a quatro episódios consecutivos de estresse por IS (IS4/LCE). Os animais experimentais foram colocados no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados.

Os níveis do comportamento do tipo ansiedade foram determinados após avaliação da ambulação que é o somatório de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, da porcentagem de tempo de permanência no braço aberto (%TBA), número de animais que permaneceram no braço fechado (NBF) e porcentagem de tempo em avaliação de risco (%TAR).

Os animais experimentais foram submetidos ao LCE 24h após a exposição ao estresse de IS. Os testes ocorreram por um período de cinco minutos, na ausência de luz e foi usada uma videocâmera com iluminação de infravermelho para gravação do comportamento em uma câmara escura.

Os registros foram armazenados em VHS e analisados posteriormente por meio do software Etholog, disponível no endereço: <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/2727/ethohome.html>.



Figura 2: Labirinto em cruz elevado.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos a uma análise ANOVA de 1-via seguido por teste Pos Hoc Dunnett que permitiu a comparação entre os vários grupos experimentais com o grupo controle. Os dados foram representados com base na média e erro padrão da média.

A análise ANOVA de 2-vias seguido por teste de Tukey foi realizado na comparação dos grupos experimentais não submetidos ao LCE com os grupos experimentais submetidos ao LCE. Para análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos e/ou comportamentais foi utilizado o coeficiente de Pearson. O teste de Fischer foi utilizado na análise da proporção do tempo de permanência dos animais nos braços abertos no LCE. Significância superior a 1% ($p < 0,01$) foi representada por ‘***’ e maior do que 5% ($p < 0,05$) foram representadas por ‘**’.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ACTH E CORTICOSTERONA

O estresse por instabilidade social induziu um aumento nos níveis plasmáticos de ACTH ($F(6,26) = 88,614$, $p < 0.0001$) (Figura 03) e de corticosterona ($F(6,26) = 166,83$, $p < 0.001$) (Figura 04). Uma ativação do eixo HPA foi observada nos dois grupos experimentais, IS1 e IS4, após 3 e 24 horas da última exposição ao protocolo de IS. Um aumento significativamente maior foi notado nos níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona em animais expostos por quatro dias consecutivos ao estresse de instabilidade social ($p < 0,01$).

Com exceção do grupo IS1/0.25, os níveis de ACTH e corticosterona mostraram-se significativamente elevados nos grupos experimentais quando comparados com o grupo controle (grupo IS1/24 para corticosterona ($p < 0,05$); $p < 0,01$ em todas as outras comparações). O maior aumento nos níveis de ACTH e corticosterona foi observado na terceira hora após o episódio de estresse por IS (grupo IS4/3).

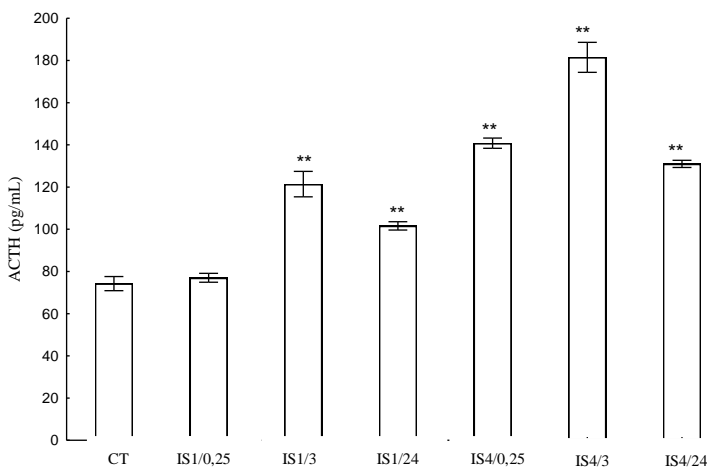


Figura 3: Níveis plasmáticos de ACTH. Efeito do estresse por instabilidade social de uma exposição (IS1) ou quatro exposições repetidas (IS4) nos níveis plasmáticos de ACTH nos diferentes grupos experimentais comparados com o grupo controle. CT = grupo controle; IS1 = animais estressados por um dia; IS4 = animais estressados em 4 dias consecutivos; /0,25 = coleta de sangue quinze minutos após o episódio de estresse; /3 = coleta de sangue três horas após o

episódio de estresse; /24 = coleta de sangue vinte e quatro horas após o episódio de estresse. Os valores representam a média +/- erro padrão da média. Os asteriscos sobre as barras indicam os níveis de significância estatística, onde ** = $p < 0,01$.

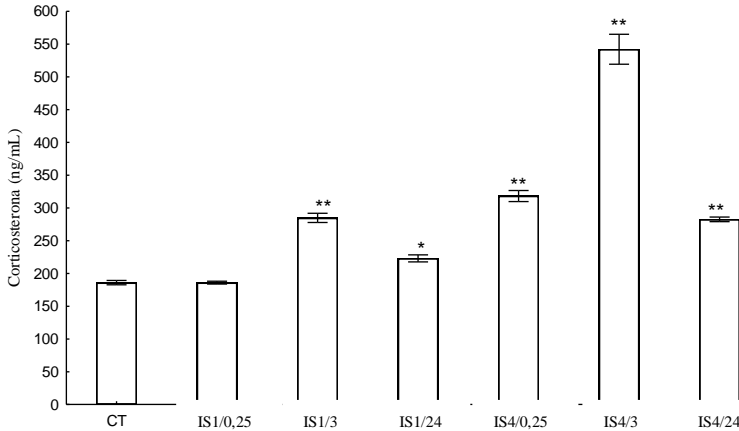


Figura 4: Níveis plasmáticos de corticosterona. Efeito do estresse por instabilidade social de uma exposição (IS1) ou quatro exposições repetidas (IS4) nos níveis plasmáticos de corticosterona nos diferentes grupos experimentais comparados com o grupo controle. CT = grupo controle; IS1 = animais estressados por um dia; IS4 = animais expostos a quatro exposições de IS por quatro dias consecutivos; /0,25 = coleta de sangue quinze minutos após o episódio de estresse; /3 = coleta de sangue três horas após o episódio de estresse; /24 = coleta de sangue vinte e quatro horas após o episódio de estresse. Os valores representam a média +/- erro padrão da média. Os asteriscos sobre as barras indicam os níveis de significância estatística, onde * = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,01$.

4.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE

Os dados da Figura 05 mostram os níveis de atividade da enzima GR no córtex pré-frontal, onde a sua elevação frente à exposição aos protocolos de IS foi significativa ($F(6,28) = 4.5232$, $p < 0.01$), embora na análise no Pos Hoc somente o grupo IS4/3 apresentou uma elevação marginalmente significativa em relação ao grupo controle, CT ($p < 0,056$).

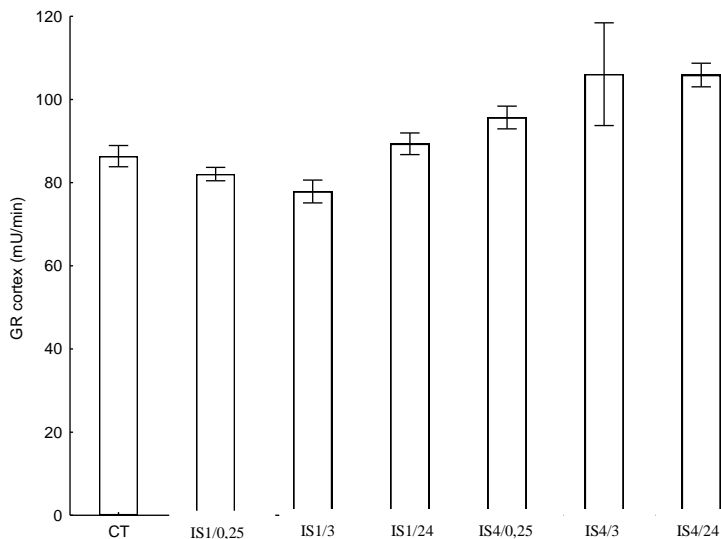


Figura 5: Atividade da enzima GR no córtex pré-frontal. CT = grupo controle, IS1 = animais expostos a uma única sessão no protocolo de estresse por instabilidade social, e IS4 = animais expostos a quatro exposições ao protocolo de IS por quatro dias consecutivos no protocolo de IS; /0,25 = coleta de sangue quinze minutos após o episódio de estresse; /3 = coleta de sangue três horas após o episódio de estresse; /24 = coleta de sangue vinte e quatro horas após o episódio de estresse. Os valores representam a média +/- erro padrão da média.

No hipocampo (Figura 06), a atividade da enzima GR foi similar entre os grupos e não se observou alterações significantes pela exposição ao protocolo de IS.

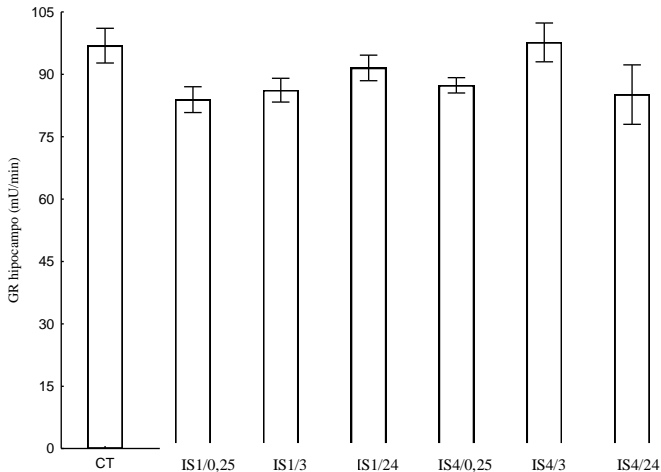


Figura 6: Atividade da enzima GR no hipocampo. CT = grupo controle, IS1 = animais expostos a uma única sessão no protocolo de estresse por instabilidade social, e IS4 = animais expostos a quatro dias consecutivos no protocolo de IS; /0,25 = coleta de sangue quinze minutos após o episódio de estresse; /3 = coleta de sangue três horas após o episódio de estresse; /24 = coleta de sangue vinte e quatro horas após o episódio de estresse. Os valores representam a média +/- erro padrão da média.

4.3 ANÁLISE COMPORTAMENTAL NO TESTE DO LCE

Os resultados obtidos pela análise do comportamento do tipo ansiedade no LCE mostraram uma redução da %TBA superior a 50% quando comparado ao grupo controle (Figura 07). Todavia, essa diferença observada na %TBA não foi estatisticamente significativa ($F(2,19) = 1,6815, p = 0,21263$).

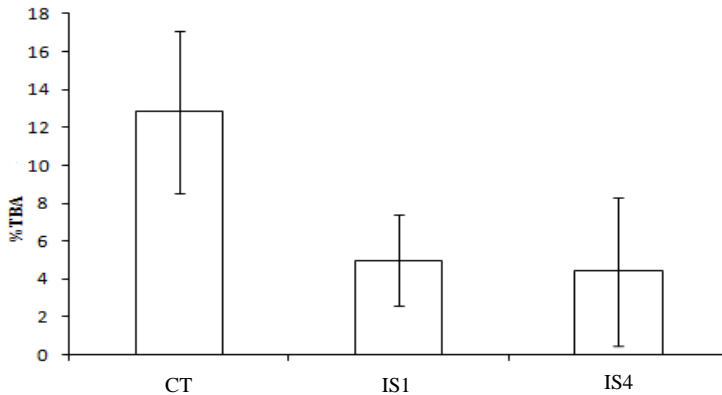


Figura 7: Porcentagem de tempo no braço aberto. CT = grupo controle; IS1 = grupo submetido a uma única sessão de instabilidade social; IS4 = grupo submetido a quatro sessões consecutivas de instabilidade social. Os valores representam a média +/- erro padrão da média.

A análise do percentual de animais que permaneceram no braço fechado (Figura 08) pelo Teste Fischer não mostrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo CT e os grupos estressados IS1 ou IS4 (CT X IS1, $p = 0,20$ e CT X IS4, $p = 0,09$).

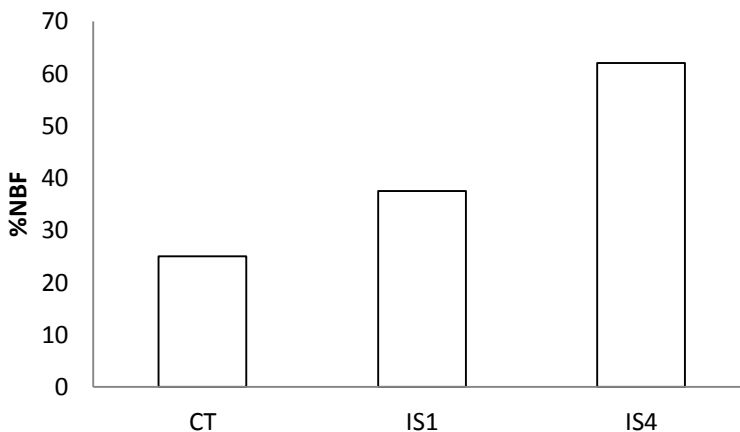


Figura 8: Porcentagem de animais que permaneceram no braço fechado. Uma grande porcentagem de animais permaneceu nos braços fechados dos LCE.

CT = grupo controle do LCE; IS1 = grupo submetido a uma única sessão de instabilidade social; IS4 = grupo submetido a quatro consecutivas sessões de instabilidade social.

Os resultados obtidos com a mensuração da ambulação no LCE (Figura 09) não mostraram significância estatística, tanto pela exposição ao protocolo de IS1 ou IS4 ($F(2,19) = 0.48503$, $p = 0.62309$).

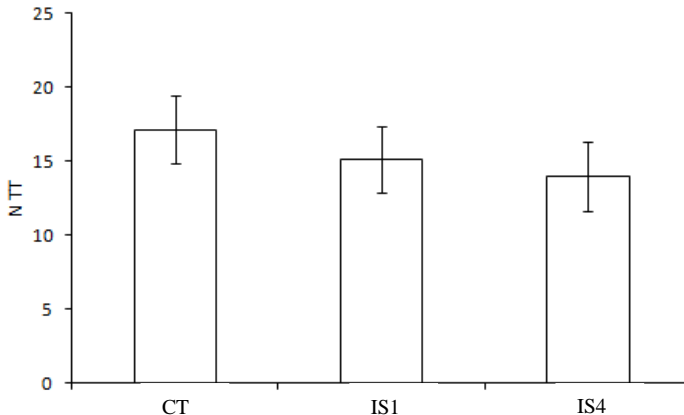


Figura 9: Número de vezes que os animais cruzaram de um braço para o outro. CT = grupo controle do LCE; IS1 = grupo submetido a uma única sessão de instabilidade social; IS4 = grupo submetido a quatro sessões consecutivas de instabilidade social. Os valores representam a média +/- erro padrão da média.

Nos animais submetidos ao teste no LCE, os protocolos de IS1 e IS4 interferiram de forma significativa nos níveis plasmáticos de ACTH ($F(2,19) = 30,075$, $p < 0,00001$) e corticosterona ($F(2,19) = 24,229$, $p = 0,0001$), Figuras 10 e 11 respectivamente. Cada grupo experimental diferiu significativamente do grupo CT na análise de Pos Hoc ($p < 0,01$ para todas as comparações).

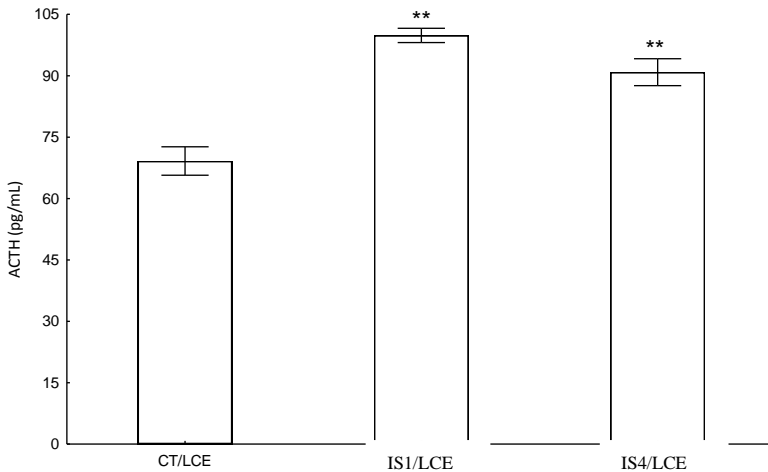


Figura 10: Níveis plasmáticos de ACTH após teste no LCE. Vinte e quatro horas após a exposição à última sessão dos protocolos IS1 ou IS4, os animais experimentais foram submetidos ao teste comportamental no LCE e o sangue foi coletado 5 minutos após a exposição ao mesmo. ** = $p < 0,01$, comparado ao grupo CT. Os valores representam a média +/- erro padrão da média.

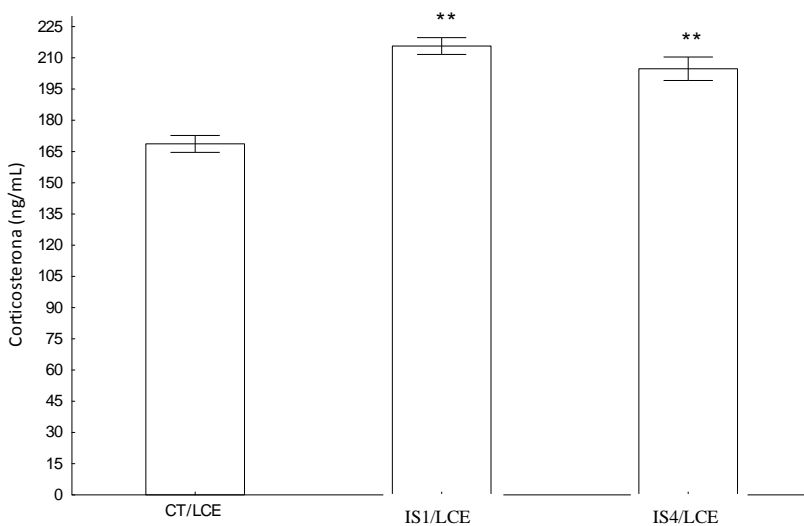


Figura 11: Níveis plasmáticos de corticosterona após LCE. Vinte e quatro horas após a exposição à última sessão dos protocolos IS1 ou IS4, os animais experimentais foram submetidos ao teste comportamental no LCE e o sangue

foi coletado 5 minutos após a exposição ao mesmo. ** = $p < 0,01$, comparado ao grupo CT. Os valores representam a média +/- erro padrão da média.

Nos animais submetidos ao teste no LCE, a atividade da enzima GR obtida nos grupos experimentais submetidos aos protocolos IS1 ou IS4 não sofreu alteração, no córtex ($F(2,20) = 1.0793$, $p = 0,35881$) (Figura 12) e no hipocampo ($F(2,20) = 0.38316$, $p = 0,68660$) (Figura 13).

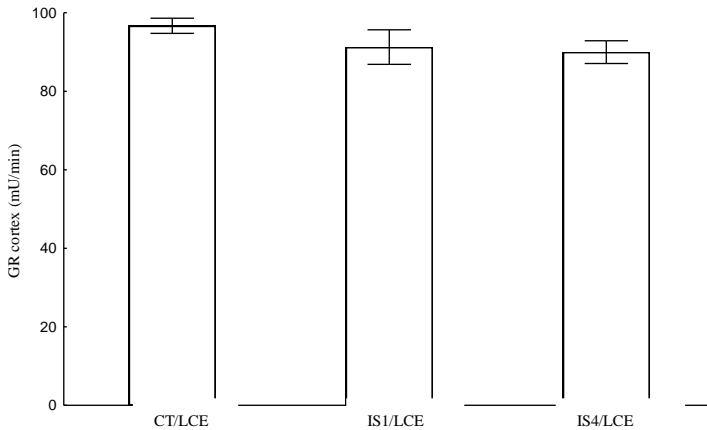


Figura 12: Atividade da enzima GR no córtex pré-frontal após o teste no LCE. Atividade da enzima GR obtida no córtex dos animais experimentais submetidos ao teste comportamental no LCE após a exposição aos protocolos IS1 e IS4. CT = grupo controle; IS1 = grupo submetido a uma única sessão de instabilidade social; IS4 = grupo submetido a quatro sessões consecutivas de instabilidade social. /LCE = teste comportamental no labirinto em cruz elevado 24 horas após a última sessão de IS. Os valores representam a média +/- erro padrão da média.

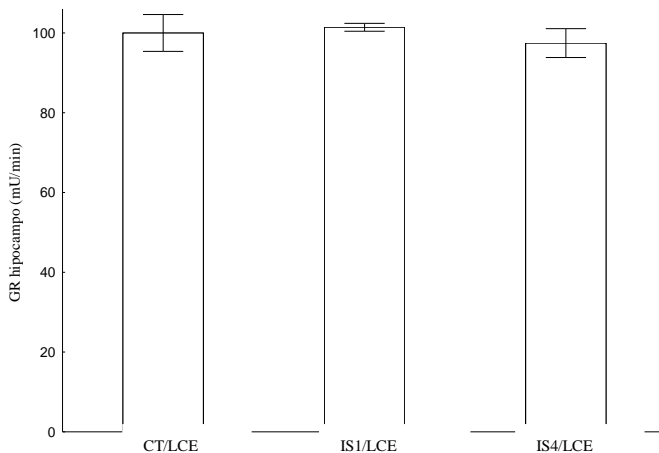


Figura 13: Atividade da enzima GR no hipocampo após o teste no LCE.

Atividade da enzima GR obtida no hipocampo dos animais experimentais submetidos ao teste comportamental no LCE após a exposição aos protocolos IS1 e IS4. CT = grupo controle; IS1 = grupo submetido a uma única sessão de instabilidade social; IS4 = grupo submetido a quatro sessões consecutivas de instabilidade social. /LCE = teste comportamental no labirinto em cruz elevado 24 horas após a última sessão de IS. Os valores representam a média +/- erro padrão da média.

Os dados da aplicação do teste de correlação encontram-se sumarizados na Tabela 01. A atividade da enzima GR apresentou correlações com os níveis plasmáticos de ACTH ou de corticosterona. As correlações foram constatadas nos grupos de animais IS1/24h e IS4/24h em situação de repouso, ou seja, 24 horas após o protocolo de estresse por IS. Observou-se uma correlação negativa nos grupos CT (GR no córtex X ACTH) (Figura 14) e IS1/24 (GR no hipocampo X ACTH) (Figura 15) ou corticosterona e IS 1/24 (GR no córtex X corticosterona) (tabela 01).

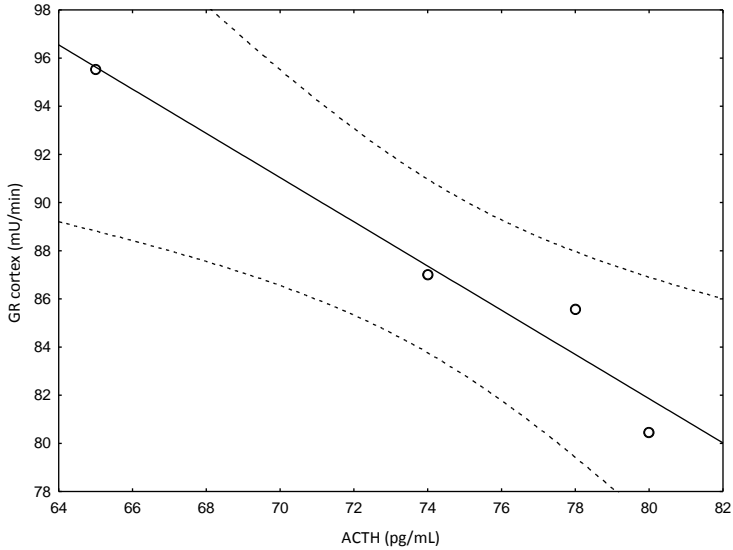


Figura 14: Correlação dos níveis plasmáticos de ACTH com a atividade da enzima GR no córtex pré-frontal de animais do grupo CT. O parênquima cortical e o sangue foram coletados cinco minutos após os animais serem testados no LCE.

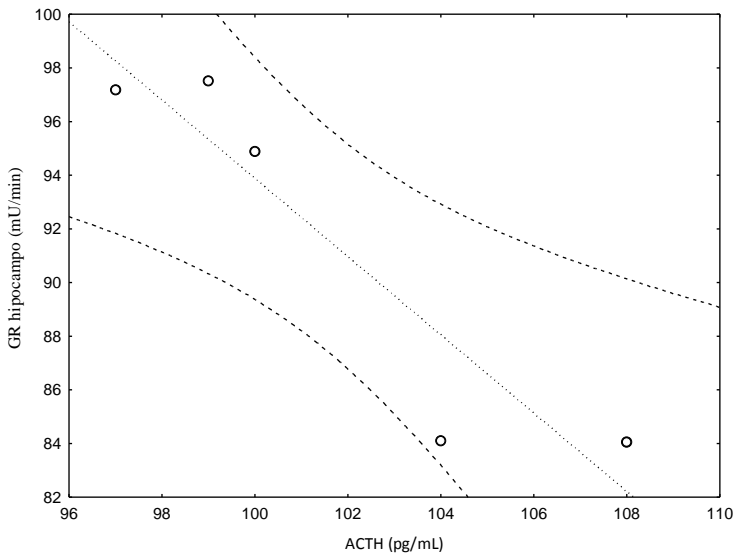


Figura 15: Correlação dos níveis plasmáticos de ACTH com a atividade da enzima GR no hipocampo. Parênquima cortical e sangue coletado de

camundongos expostos ao protocolo IS1 e testados no LCE. A coleta foi iniciada cinco minutos após o teste no LCE.

O único parâmetro comportamental que apresentou a correlação com um parâmetro fisiológico foi a ambulação. No grupo CT/LCE observou-se uma correlação positiva entre a ambulação e a atividade da GR no córtex (Coeficiente de Pearson) (Tabela 02). Uma correlação negativa entre a atividade da enzima GR no córtex pré-frontal e os níveis de ACTH plasmáticos foi observada no grupo IS1/LCE (Tabela 02, Figura 16). Em adição, os testes de correlação mostraram uma correlação positiva no grupo CT/LCE entre a atividade da enzima GR no córtex e os níveis de corticosterona plasmáticos (Figura 17).

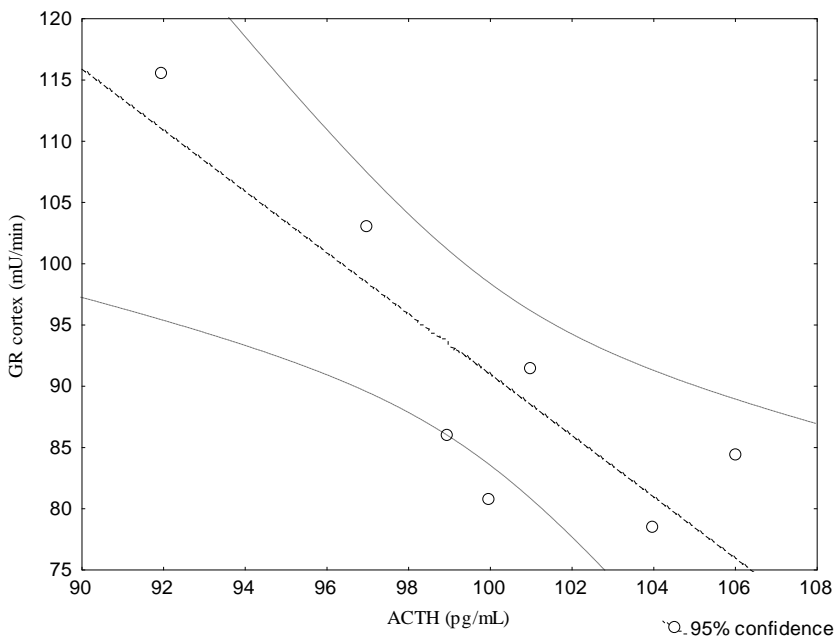


Figura 16: Correlação entre a atividade da GR com os níveis plasmáticos de ACTH de camundongos expostos a único protocolo de estresse por IS e testados no LCE. As amostras do córtex, hipocampo e o sangue foram coletados cinco minutos após o teste no LCE.

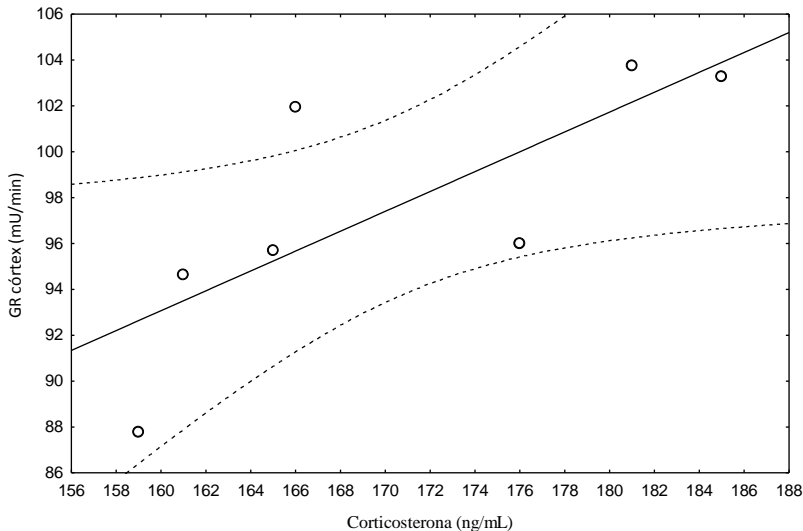


Figura 17: Correlação entre a atividade da GR com os níveis plasmáticos de corticosterona de camundongos controle testados no LCE. As amostras do córtex, hipocampo e o sangue foram coletados cinco minutos após o teste no LCE.

A comparação da atividade do eixo HPA e da enzima GR nos animais que foram testados ou não ao LCE (LCE e nLCE, respectivamente) foi realizada com a finalidade de avaliar os efeitos de um estímulo heterotípico. Os efeitos da aplicação dos protocolos de IS e da exposição ao LCE interagiram de forma significativa sobre a produção de ACTH ($F(2, 49) = 16,638$, $p < 0,00001$) e corticosterona ($F(2, 30) = 32,668$, $p = 0,00001$), Figuras 18 e 19, respectivamente. A elevação da produção de ACTH e corticosterona observada pela exposição ao protocolo IS1 não foi afetada pela exposição ao teste LCE; todavia, houve uma redução substancial da produção desses hormônios com a aplicação do estímulo heterotípico no grupo IS4 ($p < 0,01$ em todas as comparações).

A exposição ao estímulo heterotípico interagiu com a aplicação dos protocolos de IS na atividade da GR no córtex ($F(2, 33) = 8,8261$, $p < 0,001$) e no hipocampo ($F(1, 33) = 5,3505$, $p = 0,02709$). No córtex (Figura 20), a exposição ao LCE foi capaz de induzir uma redução da atividade da GR no grupo IS4 ($p < 0,01$). No hipocampo (Figura 21), a redução da atividade da GR induzida pelos protocolos de IS foi

aparentemente cancelada pela aplicação do teste no LCE sem, no entanto, gerar aumentos significativos nas comparações entre os grupos.

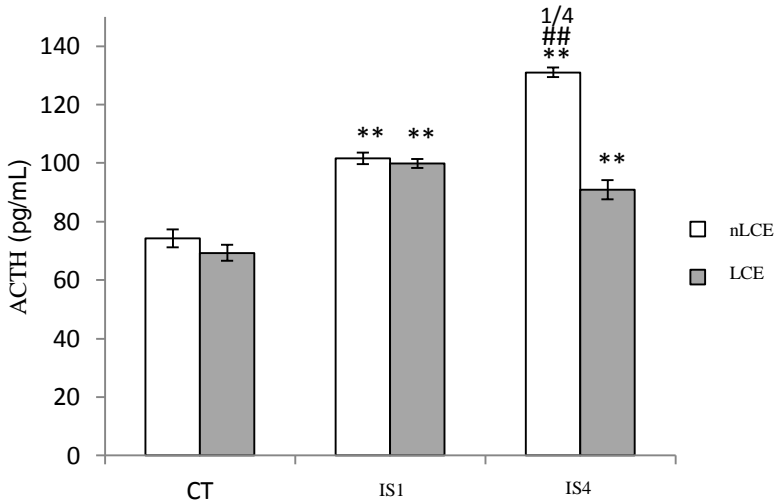


Figura 18: Efeitos da exposição ao teste no LCE nos níveis de ACTH. O teste no LCE foi aplicado 24h após a exposição ao protocolo de estresse por IS. nLCE = grupos não submetidos ao teste no LCE; LCE = grupo submetido ao teste no LCE. ** = $p < 0,01$ comparados ao grupo CT; ## = $p < 0,01$ comparados com camundongos do mesmo grupo submetidos ao teste no LCE; 1\4 = $p < 0,01$ comparados com camundongos expostos a uma única sessão do protocolo de IS.

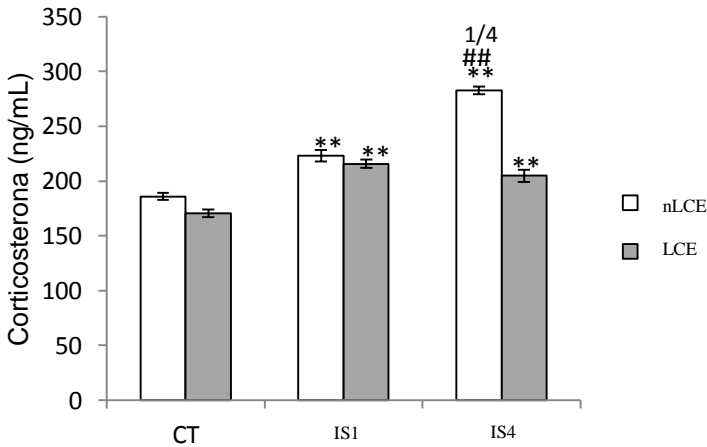


Figura 19: Efeitos da exposição ao teste no LCE nos níveis de corticosterona. O teste no LCE foi aplicado 24h após a exposição ao protocolo de estresse por IS. nLCE = grupo não submetido ao teste no LCE; LCE = grupo submetido ao teste no LCE. ** = $p < 0,01$ comparados ao grupo CT; ## = $p < 0,01$ comparados com camundongos do mesmo grupo submetidos ou não ao teste no LCE; 1\4 = $p < 0,01$ comparados com camundongos expostos a uma única sessão do protocolo de IS.

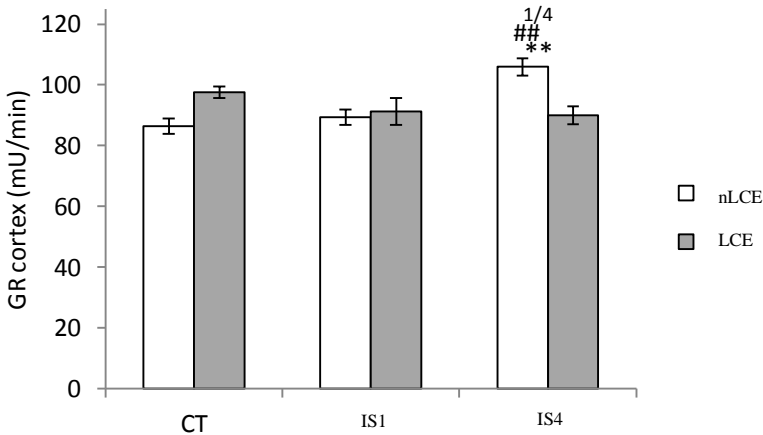


Figura 20: Efeitos da exposição ao teste no LCE após protocolo de IS na atividade da enzima GR no córtex. O teste no LCE foi aplicado 24h após a exposição ao protocolo de estresse por IS. nLCE = grupo não submetido ao teste no LCE; LCE = grupo submetido ao teste no LCE. ** = $p < 0,01$

comparados ao grupo CT; ## = $p < 0,01$ comparados com camundongos do mesmo grupo submetidos ou não ao teste no LCE; $1\sqrt{4} = p < 0,01$ comparados com camundongos expostos a uma única sessão do protocolo de IS.

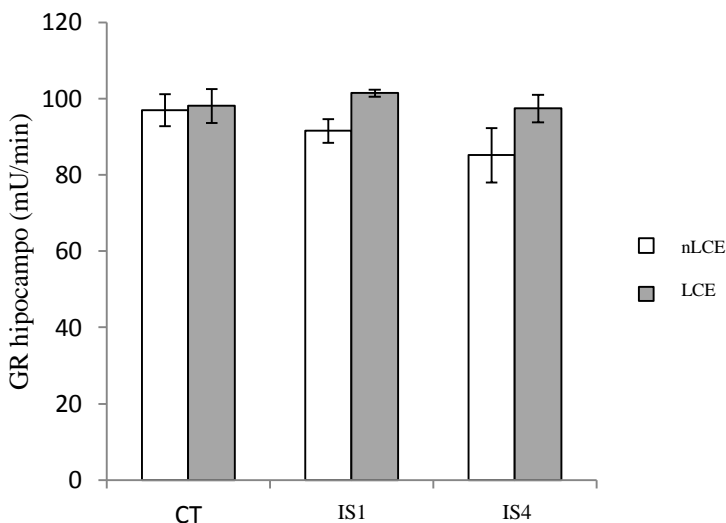


Figura 21: Efeitos da exposição ao teste no LCE após protocolo de IS na atividade da GR no hipocampo. O teste no LCE foi aplicado 24h após a exposição ao protocolo de estresse por IS. nLCE = grupo não submetido ao teste no LCE; LCE = grupo submetido ao teste no LCE. ** = $p < 0,01$ comparados ao grupo CT; ## = $p < 0,01$ comparados com camundongos do mesmo grupo submetidos ou não ao teste no LCE; $1\sqrt{4} = p < 0,01$ comparados com camundongos expostos a uma única sessão do protocolo de IS.

Tabela 1: Correlação (Coeficiente de Person) da atividade da enzima GR (mU/min) com os níveis plasmáticos de ACTH (pg/mL) ou corticosterona (pg/mL). Significância representada por * para $p < 0,05$ e marginalmente significante apresentados sem marcação.

Grupos	Parâmetro 1	Parâmetro 2	r(X,Y)	r ²	P	N	Significância
CT	GR córtex	ACTH	-0.975	0.952	0.024	4	*
IS1/24h	GR córtex	Corticosterona	-0.864	0.747	0.058	5	
IS1/24h	GR hipocampo	ACTH	-0.929	0.864	0.022	5	*
IS1/24h	GR hipocampo	Corticosterona	-0.895	0.801	0.040	5	*
IS4/24h	GR hipocampo	Corticosterona	0.914	0.836	0.029	5	*

Tabela 2: Atividade da enzima GR (mU/min) no córtex frontal em correlação com ACTH (pg/mL), corticosterona (pg/mL), ou ambulação no teste LCE. Significância representada por * para $p < 0,05$.

Grupos	Parâmetro 1	Parâmetro 2	r(X,Y)	r ²	P	N	Significância
CT/LCE	GR córtex	Corticosterona	0.764	0.583	0.045	7	*
IS1/LCE	GR córtex	ACTH	-0.854	0.730	0.014	7	*
CT/LCE	GR córtex	Ambulação	0.765	0.583	0.045	7	*

5 DISCUSSÃO

A proposição de um novo modelo de IS foi baseada no pressuposto de que um ambiente socialmente instável, gerado pela ocorrência de lutas possa deflagrar reações típicas ao estresse, mesmo que não haja envolvimento direto dos sujeitos nessas lutas.

O protocolo proposto de estresse por IS foi capaz de induzir ativação do eixo HPA, com aumento nos níveis plasmáticos de ACTH e de corticosterona. Uma potencialização da ativação do eixo HPA foi observada nos animais expostos às sucessivas exposições ao estresse de IS.

No presente estudo, o aumento na concentração de ACTH e corticosterona foi mais expressivo na terceira hora após a aplicação do protocolo de IS, e se manteve elevado na 24^a hora. Entre os marcadores típicos das reações ao estresse têm-se as alterações no eixo HPA (RODJERS e COLE, 1993; ver revisão KOOLHAAS, 1997; KEENEY, 2001; CARROBREZ, 2002), danos no sistema nervoso central, como por exemplo, falha no mecanismo antioxidante (BAINS e SHAW, 1997; MCINTOSH e SAPOLSKY, 1998; MADRIGAL et al, 2001; SORRELS e SAPOLSKY, 2007) e mudanças comportamentais (GEORGE, 1989; BLANCHARD, BLANCHARD e RODGERS, 1991; BARANYI, BAKOS e HALLER, 2005; SAAVEDRA-RODRIGUES e FEIG, 2013).

Experimentos realizados por KEENEY (2001) mostraram que camundongos machos submetidos à interação social crônica (quatro dias consecutivos) e que apresentaram um comportamento de derrota social, exibiram concentrações significativamente elevadas de corticosterona plasmática quando comparadas com animais submetidos à interação social aguda.

No cérebro, o excesso de GCs está envolvido com dano neuronal (MCINTOSH, HONG e SAPOLSKY, 1998; SAPOLSKY, 1999; KANARIK, et al, 2011), e redução na capacidade do sistema de defesa antioxidante do cérebro. Em estudos anteriores de nosso laboratório observou-se que os animais submetidos aos estressores de natureza psicossocial e biológica apresentaram diminuição na atividade da enzima GR no hipocampo, comprovando o efeito destes estímulos no sistema antioxidante deste tecido (GONÇALVES et al, 2008).

No presente estudo, a exposição ao protocolo de IS induziu alterações na atividade da GR apenas no córtex pré-frontal, embora na comparação com o grupo CT, apenas o grupo IS4/3 mostrou um aumento em um nível marginalmente significativo. Esse resultado, a

princípio, não era esperado, uma vez que o hipocampo tem alta densidade de receptores mineralocorticóides (MR) ou GCs (HAN, et al., 2005) e, portanto, é muito sensível ao estresse.

As correlações entre a atividade do eixo HPA e da GR merecem uma análise cautelosa e estudos adicionais, uma vez que, entre as combinações possíveis, apenas algumas correlações foram encontradas. No entanto, quando existentes, as correlações entre os grupos foram observadas em animais no repouso, ou seja, 24 horas após a última exposição ao protocolo de IS. As correlações observadas foram predominantes no grupo IS1, e também no grupo CT. Esse achado pode significar que a capacidade de resposta da atividade da enzima GR frente à ativação do eixo HPA nestes grupos está distante dos níveis de saturação da atividade da enzima, portanto as variações são observáveis. Ainda, e talvez, mais importante, nenhuma correlação foi encontrada nos animais expostos a instabilidade social recorrente (IS4) porque a resposta do eixo HPA pode estar próxima do seu nível de saturação.

O protocolo experimental que associa a IS e o teste no LCE podem ser avaliados de duas formas: 1) que analisa a influência do estresse por IS na expressão do comportamento tipo ansiedade; e 2) que considera a exposição ao LCE como um estressor heterotípico, portanto, com a possibilidade de induzir respostas típicas de estresse, assim como interferir nas respostas decorrentes da exposição ao protocolo por instabilidade social.

Na análise do comportamento do tipo ansiedade obteve-se uma redução maior do que 50% na %TBA nos grupos expostos ao protocolo de IS quando comparados ao grupo CT. Porém, a ausência de significância estatística pode estar relacionada ao fato de muitos animais experimentais permaneceram no braço fechado ou ainda, o número de animais experimentais ($n = 8$) talvez tenha sido baixo para esse tipo de análise. Se por um lado a análise da %TBA foi prejudicada pela permanência de animais no braço fechado, o número crescente de animais nessa condição no grupo IS4 reforça um efeito ansiogênico promovido pela exposição ao protocolo de IS. Dessa maneira, a possibilidade de um efeito da exposição do protocolo de IS sobre a expressão do comportamento tipo ansiedade no teste LCE deve ser investigada. Essa hipótese é reforçada por dados obtidos e não publicados pelo Laboratório de Neurobiologia do Estresse, coordenado pelo Professor Odival Cezar Gasparotto, em que a redução da %TBA induzida por exposição a IS4 mostrou-se estatisticamente significativa.

Como um fator heterotípico, o LCE reduziu a ativação do eixo HPA decorrente da exposição ao protocolo IS4. Esse resultado é reforçado por dados obtidos com a aplicação de estresse crônico seguido de exposição a um estressor heterotípico agudo, resultando na sensibilização do eixo HPA (BELDA et al., 2012; USCHOLD-SCHMIDT, 2012). A diminuição simultânea no ACTH e corticosterona, após uma exposição ao estressor heterotípico, pode representar uma diminuição ou uma mudança na liberação de secretagogos hipotalâmicos de corticotropina. A proporção de VP e CRH determina a sensibilidade da resposta do estresse sobre o do eixo HPA (AGUILERA, 1994). As exposições ao teste de LCE podem representar um novo estímulo que ativa uma via neuronal diferente, levando à diminuição da resposta. No entanto, é intrigante quão rápido o efeito inibitório da exposição ao LCE sobre a atividade do eixo HPA é estabelecida. Sabemos que diferentes paradigmas de estresse levam a diferentes respostas. A resposta de cada indivíduo a um estímulo estressor não é a mesma e pode ser de grande variabilidade. Um estímulo estressor pode provocar em um indivíduo grandes mudanças comportamentais e fisiológicas, e em outro indivíduo, pode causar uma resposta reduzida (LEONARD, 2005), o que pode justificar a variabilidade de resultados obtidos com protocolos diferentes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento desse modelo de instabilidade social induziu reações típicas de estresse, com ativação do eixo HPA e alterações na atividade da enzima GR. A elevada ativação do eixo HPA pôde ser observada em praticamente todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle, efeito esse característico e indicativo de estresse, o que torna o protocolo em questão como um modelo válido de estresse social. Em organismos estressados, a ativação do eixo HPA é o biomarcador mais importante de estresse psicossocial (FOLEY e KIRSCHBAUM, 2010; ENGERT et al., 2012).

A expressão do comportamento tipo ansiedade no teste LCE precisa ser investigada, pois mesmo com a análise do comportamento de tipo ansiedade prejudicada pela permanência de animais no braço fechado, o número crescente de animais nessa condição no grupo IS4 reforça um efeito ansiogênico promovido pela exposição ao modelo de IS.

Vantagens adicionais que o modelo de IS proposto apresenta incluem: mimetiza de forma bastante semelhante o estresse vivenciado pela sociedade humana, em que presenciar e observar situações de disputas são corriqueiras; permite a exposição de um número razoável de animais na mesma faixa de experimentação; o estímulo gerado é muito semelhante entre os animais que testemunham a luta e descarta as interferências de possíveis processos inflamatórios decorrentes de ferimentos contraídos durante as lutas entre os animais em interação social, assim como as respostas decorrentes da exposição a estímulos dolorosos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 15 (1994); p.321 – 350.

ANISMAN, H. And ZACHARKO, R.M. Depression: The predisposing influence of stress. *Behavioral Brain Research*, 5 (1982); p. 89-137.

ARMARIO, A. et al. Influence of Various Acute Stressors on the Activity of Adult Male Rats in a Holeboard and in the Forced Swim Test. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 39 (1991); p. 373-377.

BAINS, J. S. e SHAW, C. A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*, 25 (1997); p.335 – 358.

BARANYI, J., BAKOS, N. e HALLER, J. Social instability in females rats. The relationship between stress-related and anxiety-like consequences. *Physiology & Behavior*, 84 (2005), p.511 – 518.

BARTOLOMUCCI, A. *Social stress, immune functions and disease in rodents*. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 28 (2007); p. 28 – 49.

BLANCHARD D.C., BLANCHARD R.J. Behavioral correlates of chronic dominance–subordination relationships of male rats in a seminatural situation. *Neuroscience Biobehavior*, 14 (1990); p. 455-462.

BLANCHARD D.C., BLANCHARD, R.J. e RODGERS, R.J. Risk assessment and animal models of anxiety. *Animal Models in Psychopharmacology*, (1991); p. 17-134.

BLANCHARD, R. J.; MCKITTIRICK, C. R.; BLANCHARD, C. Animals models of social stress: Effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology and Behavior*, 73 (2001); p. 261 – 271.

BELDA, X.; DAVIU, N.; NADAL, R.; ARMARIO, A. Acute stress-induced sensitization of the pituitary–adrenal response to heterotypic stressors: Independence of glucocorticoid release and activation of CRH1 receptors. *Hormones e Behavior*, 62 (2012); p. 515 – 524.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, (1976); p.248 – 254.

BROWN, K. J. e GRUNBERG, N. E. Effects of housing on male and female rats: Crowding stress male but calms females. *Physiology & Behavior*, v. 58, Issue 6, (1995); p. 1085 – 1089.

CAROBREZ, S. G. et al. Long-term consequences of social stress on corticosterone and IL-1 β levels in endotoxin-challenged rats. *Physiology and Behavior*, 76 (2002); p. 99 – 105.

CARLSBERG, I. and MANNERVIK, B. Glutathion reductase. *Methods in Enzymology*, 113, (1985); p. 484 - 490.

CHROUSOS, G. P. & GOLD, P. W. The concepts of stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Stress and Stress disorders. JAMA*, 267, (1992); p.1244 – 1252.

DALLMAN, M. F. et. al. *Hormone Brain Behavior*, v. 1. Chapter 9: Corticotropin-Releasing Factor, Corticosteroids, Stress, and Sugar. Copyright (2002); p. 571 – 631.

DAL-ZOTTO, S.; MARTÍ, O.; ARMARIO, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behavioural Brains Research*, 114 (2000); p. 175 – 181.

DAL-ZOTTO, S.; MARTÍ, O.; ARMARIO, A. Glucocorticoids are involved in the long-term effects of a single immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*, 28, (2003); p.992 – 1009.

ENGERT, V. et.al. Differentiating anticipatory from reactive cortisol responses to psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* (2012). Article in press.

FOLEY, P. e KISCHBAUM, C. Human hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to acute psychosocial stress in laboratory settings. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35 (2010); p. 91 – 96.

GEORGE, L. K., et al. Social support and outcome of major depression. *The British Journal Psychiatry*, 154 (1989); p. 478-485.

GONÇALVES, L. et al. A temporal analysis of the relationships between social stress, humoral immune response and glutathione-related antioxidant defenses. *Behavioral brain*, 192, (2008); p. 226 – 231.

HAN, F. et al. Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neuroscience Research*, v. 51, Issue 4 (2005); p. 371 - 38.

HAYASHIDA, S. et al. Repeated social defeat stress induces chronic hyperthermia in rats. *Physiology and Behavior*, 101 (2010); p. 124 – 131.

JORGENSEN, H. et al. Serotonergic involvement in stress-induced ACTH release. *Brain Research*, 811 (1998); p.10 – 20.

KANARIK, M. et. al. Brain responses to chronic social defeat stress: Effects of regional oxidative metabolism as a function of a hedonic trait, and gene expression in susceptible and resilient rats. *European Neuropsychopharmacology*, 21 (2011); p. 92 – 107.

KEENEY, A. J.; HOGG, S.; MARSDEN, C. A. Alterations in core body temperature, locomotor activity and corticosterone following acute and repeated social defeat of male NMRI mice. *Physiology & Behavior*, 74 (2001); p.177 – 184.

KOOLHAAS, J. M. et. al. The dynamics of the stress response. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21 (1997); Issue 6, p. 775 – 782.

KOOLHAAS, J. M. et al. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35 (2011); p. 1291 – 1301.

KLENEROVA, V. et al. Combined restraint and cold stress in rats: effects on memory processing in passive avoidance task and on plasma levels of ACTH and corticosterone. *Behavioural and Brain Research*, 142 (2003); p. 143 – 149.

LEONARD, B. E. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. *European Psychiatry*, 20 (2005); p. 302-306.

LEE, Y. J. et.al. Immobilization stress induces cell death through production of reactive oxygen species in the mouse cerebral cortex. *Neuroscience Letters*, 392 (2006); p. 27 – 31.

LISTER, R. G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92 (1987); p. 180 – 185.

MADRIGAL, J.L. et. al. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction, are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 24, (2001); p. 420 – 429.

MANOLI L.P., GAMARO G.D., SILVEIRA P.P., DALMAZ C. Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. *Neurochemical Research*, (2000); 27:915-921.

MANOLI, I., et al. Mitochondria as key components of the stress response. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v.18, Issue 5, (2007); p. 190 – 198.

MARGIS, R., et al. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*, vol. 25. (2003); Porto Alegre.

MARTINEZ, M. et al. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: a review. *Aggressive Behavior*, 24 (1998); p. 241-256.

MCCARTY, R.; KVETNANSKY, R.; e KOPIN, I. J. Plasma catecholamines in rats: Daily variations in basal levels and increments in response to stress. *Physiology & Behavior*, v. 26, Issue 1, (1981); p. 27 – 31.

MCINTOSH L.J., SAPOLSKY R.M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-

induced toxicity in neuronal culture. *Experimental Neurology*, 141 (1996); p. 201-206.

MCINTOSH L.J., HONG, K.E.; SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Research*, 791 (1998); p. 209 – 214.

RODJERS, R. J. AND COLE, J. C. Anxiety Enhancement in the Murine Elevated Plus Maze by Immediate Prior Exposure to Social Stressors. *Physiology & Behavior*.53 (1993); p.383 – 388.

ROTH, M. et al. Effects of chronic plus acute prolonged stress on measures of coping style, anxiety, and evoked HPA-axis reactivity. *Neuropharmacology*, 63 (2012); p. 1118 – 1126.

RUIS, M. A. W. et al. Housing familiar male wild type rats together reduces the long-term adverse behavioural and physiological effects of social defeat. *Psychoneuroendocrinology*, 24 (1999); p. 285 – 300.

RYGULA, R., et al. Anhedonia and motivacional deficits in rats: Impact of chronic social stress. *Behavioural Brain Research*, 162 (2005); p. 127 – 134.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, L. e FEIG, L. A. Chronic social instability induces anxiety and defective social interactions across generations. *Biology Psychiatry*, 73 (2013); p. 44 – 53.

SALVADOR, A. e COSTA, R. Coping with competition: neuroendocrine responses and cognitive variables. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 33 (2009); p. 160 – 170.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids, stress and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Experimental Gerontology*. (1999); p. 721 – 732.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21 (2000); p. 55 – 89.

SAPOLSKY, R. M. Stress, Health and Social Behavior. *Encyclopedia of animal behavior*. (2010); p. 350 – 357.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agent. *Nature*, 32 (1936); p.138.

SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The American Journal of Medicine*, v.10, Issue 5, (1951); p.549 – 555.

SELYE, H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Canadian Medical Association Journal*,115 (1976); p. 53 – 56.

SILVA, R. H. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology*, 46 (2004); p. 895 – 903.

SOREL, S.F. & SAPOLSKY, R.M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, Behavioral and Immunity*, 27 (2007); p. 259 – 272.

TSIGOS, C. e CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53 (2002), p. 865 – 871.

TURNER, R.J. and LLOYD, D. A. The process of stress and social distribution of depression. *Journal of Health and Social Behavior*, 40 (1999); p. 4374-4404.

USCHOLD-SCHMIDT, N. et al. Chronic psychosocial stress results in sensitization of the HPA axis to acute heterotypic stressors despite a reduction of adrenal in vitro ACTH responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*, 37 (2012); p. 1676 – 1687.

WILLNER, P. As simulations of animal models of depression. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12 (1991); p. 131-136.