



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ALINE DANIELLE BONJORNO PREVEDELLO

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE DE NATUREZA PSICOSSOCIAL E BIOLÓGICA NA
INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO, DANOS CELULARES E ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS**

FLORIANÓPOLIS – SC

2009

ALINE DANIELLE BONJORNO PREVEDELLO

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE DE NATUREZA PSICOSSOCIAL E BIOLÓGICA NA
INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO, DANOS CELULARES E ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Odival César Gasparotto

Co-Orientador: Profa. Dra. Sônia Gonçalves

FLORIANÓPOLIS – SC

2009

Ofereço:

Ao meu amor, Felipe, alguém tão especial com quem tenho a felicidade de compartilhar a vida e um verdadeiro amor

Dedico:

Aos melhores pais que alguém poderia ter, Ivan e Dalva, que desde meu primeiro dia de vida deram todo amor, estímulo e o exemplo que será sempre o alicerce da minha vida

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo;

À minha família por todo apoio e por sempre acreditarem em mim. Aos meus pais, Ivan e Dalva, que me incentivaram pelo gosto ao estudo desde o primeiro dia do jardim de infância e por terem me feito chegar até aqui. Obrigado pelo amor que sempre me deram e me ensinaram a buscar. Ao meu irmão Iuri pelo incentivo e amizade. Pode ser que todos os irmãos se amem, mas nem todos têm o privilégio de ter uma grande amizade como a nossa!

Ao meu amor, Felipe. Você foi um grande companheiro nesta jornada. Obrigada por todo apoio e incentivo, pela compreensão e por segurar as pontas sempre. Mas principalmente por todo esse amor, que foi e será sempre minha maior força!

Aos meus orientadores, Prof. Odival César Gasparotto e Profa. Sônia Gonçalves, a quem passei a admirar como profissionais e como pessoas. Obrigada pela oportunidade e confiança, pela disponibilidade que sempre tiveram, pelos inúmeros ensinamentos e pela experiência que vou levar por toda a vida. Obrigada por tudo!

Ao Péricles, que foi um grande parceiro na realização do experimento deste estudo;

Aos animais que possibilitaram a realização deste estudo;

À Profa. Yara Maria Rauih Müller por disponibilizar seu laboratório e a todas as meninas do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal pela ajuda e por terem me recebido tão bem;

À Profa. Evelise Maria Nazari. Obrigada pela contribuição ao trabalho, pelos ensinamentos e por ter sido tão atenciosa;

Ao Prof. Alcir Luiz Dafre por disponibilizar seu laboratório e orientação a este trabalho;

Aos alunos Leidiane e Daniel por estarem sempre dispostos a ajudar;

Ao Nivaldo, que além de realizar seu trabalho com competência, está sempre disposto a ajudar a todos;

À Dona Vilma, obrigada pelo carinho, conversas e pelos lanchinhos. Ao seu Carlos pela dedicação e prestatividade;

Ao Prof. Carlos Roberto Zanetti pela disponibilidade e à aluna Camila pela ajuda e atenção;

Aos professores e colegas do PPG – Neurociências pelo convívio e aprendizado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO	IX
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Neurobiologia do Estresse	11
1.2. Estresse Psicossocial.....	13
1.3. Estresse e Memória	14
1.4. Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	15
1.5. Estresse Oxidativo	16
1.6. Estresse e Alterações Neurais	19
1.7. Estresse e Sistema Imune.....	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Animais.....	24
3.2. Estímulos Estressores e Grupos Experimentais.....	25
3.3. Protocolo Experimental	26
3.4. Análise Comportamental	28
3.5. Preparo da Solução de Hemácia de Carneiro e LPS	29
3.6. Coleta e Preparação de Material Biológico	29
3.7. Ensaio de Hemaglutinação Utilizado para Detecção de Anticorpos Anti-HC	29
3.8. Ensaio Imunoenzimático Utilizado para a Detecção de Anticorpos Anti-LPS	30
3.9. Estresse Oxidativo: Avaliação da Atividade da Enzima Glutathiona Redutase (GR).....	30
3.10. Procedimentos Histológicos	31

3.11. Imunohistoquímica	32
3.12. Marcação com TUNEL.....	33
3.13. Análise das Lâminas	34
3.14. Análise Estatística dos Dados	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Comportamento no Teste do LCE	35
4.2. Comportamento de Avaliação de Risco (AR) no LCE.....	39
4.3. Atividade da Enzima Glutathione Redutase (GR)	43
4.4. Produção de anticorpos anti-LPS.....	50
4.5. Análise Histológica.....	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ação da glutathiona no sistema antioxidante.....	17
Figura 2. Arena de interação agonística.	25
Figura 3. Protocolo geral de experimentação..	27
Figura 4. Comportamento nos braços abertos do LCE.....	36
Figura 5. Comportamento nos braços fechados do LCE.....	37
Figura 6. Comportamento na área central do LCE.....	39
Figura 7. Comportamento de acesso de risco no LCE.	41
Figura 8. Correlação entre o tempo de avaliação de risco e o tempo de permanência nos braços abertos no primeiro teste do LCE.....	42
Figura 9. Correlação entre a duração de episódios de avaliação de risco (T/N) e o tempo de permanência nos braços abertos no primeiro teste do LCE.....	42
Figura 10. Atividade da enzima Glutathiona Redutase (GR) no hipocampo e córtex frontal....	43
Figura 11. Correlação entre a atividade da GR no hipocampo e o tempo de comportamento de avaliação de risco.....	44
Figura 12. Correlação entre a atividade da GR e comportamentos de ansiedade nos animais estressados psicossocialmente.	45
Figura 13. Correlação entre a atividade da GR e o comportamento de acesso de risco no LCE nos animais injetados com HC.	47
Figura 14. Correlação entre a atividade da GR e o comportamento no LCE dos animais injetados com LPS.....	49
Figura 15. Produção de anticorpos anti-LPS	50
Figura 16. Correlação entre a produção de anticorpos anti-LPS e o número de acessos de risco no LCE no grupo injetado com a menor dose de LPS.....	51
Figura 17. Secções sagitais de cérebros de camundongos.....	52
Tabela 1. Análise estatística do comportamento no LCE.....	53
Tabela 2. Análise estatística do comportamento de avaliação de risco no LCE..	53

LISTA DE ABREVIATURAS

%TBA: Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos

%TBF: Porcentagem de tempo de permanência nos braços fechados

%TC: Porcentagem de tempo de permanência no centro

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico

APC: Células Apresentadoras de Antígenos

AR: Avaliação de Risco

BSA: Albumina de Soro Bovino, do inglês *bovine serum albumin*

CPF: Córtex Pré-Frontal

CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina

CV: Animais injetados com solução veículo

E: Animais expostos à instabilidade social

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

ERO: Espécie Reativa ao Oxigênio

GCs: Glicocorticóides

GPx: Glutathione Peroxidase

GR: Glutathione Redutase

GSH: Glutathione reduzida

GSSG: Glutathione oxidada

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HC: Hemácia de Carneiro

HPA: Hipotalâmico-Hipófise-Adrenal

IFN: Interferon

IL: Interleucina

IS: Instabilidade social

LCE: Labirinto em Cruz Elevado

LPS: Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

LTP: Potenciação de longa duração, do inglês *Long-term potentiation*

NA: Noradrenalina

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NBA: Número de entradas nos braços abertos

NBF: Número de entradas nos braços fechados

NC: Número de entradas no centro

NK: Células Natural Killer

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfatos

RGs: Receptores Glucocorticóides

RMs: Receptores Mineralocorticóides

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

SNC: Sistema Nervoso Central

T/N: Duração dos episódios de risco

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling*

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

RESUMO

As alterações fisiológicas e comportamentais decorrentes dos processos que envolvem a resposta ao estresse podem promover efeitos deletérios ao organismo. O estresse está relacionado a disfunções associadas ao sistema imune, oxidativo, processos de morte e proliferação celular, déficits cognitivos e mnemônicos, além da participação em diversas patologias. O estresse de natureza psicossocial ou biológica é responsável por alterações em marcadores de estresse oxidativo e na ativação do sistema de defesa antioxidante. Dados obtidos em nosso grupo de pesquisa demonstraram correlações entre a resposta imune humoral e a atividade de enzimas antioxidantes. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da exposição de camundongos suíços ao estresse de natureza psicossocial e biológica na ativação da resposta imune humoral, na indução de estresse oxidativo e nos processos de apoptose e neurogênese no hipocampo e córtex frontal. O comportamento tipo-ansioso e a memória emocional também foram analisados. Os animais experimentais foram injetados com Hemácias de Carneiro (HC), com Lipopolissacarídeo extraído de *Escherichia coli* (LPS) ou solução veículo (PBS). Outro grupo foi exposto ao estresse de instabilidade social por quatro dias consecutivos. No quinto dia os animais foram expostos ao teste do Labirinto em Cruz elevado (LCE) por dois dias consecutivos. Amostras de soro destes animais foram obtidas para as dosagens de produção de anticorpos anti-HC e anti-LPS. O parênquima cerebral foi retirado para análise da atividade da enzima Glutathione Redutase (GR) e as possíveis alterações nos tecidos foram avaliadas por métodos imunohistoquímicos: anti-fosfo histona H3 (marcador de células em divisão) e anti-Bcl2 (proteína presente na via apoptótica) assim como o método de marcação com TUNEL (marcação de fragmentação do DNA). A exposição aos estressores psicossociais e biológicos promoveu alterações no comportamento tipo-ansiedade. No hipocampo dos animais estressados foi observada uma redução na atividade da enzima GR. No córtex frontal a atividade foi mais estável, ocorrendo uma elevação apenas no grupo injetado com HC. Através dos estudos histológicos preliminares realizados neste trabalho não se observou a presença de alterações nos processos de proliferação ou apoptose nos tecidos avaliados. Desta forma, nossos resultados demonstraram que estressores psicossociais e biológicos interferem no sistema de defesa antioxidante e no comportamento tipo-ansioso, contudo, após um período de cinco dias de estresse não se observa indícios de agressão celular no hipocampo e no córtex frontal. Entretanto, estudos adicionais precisam ser conduzidos no sentido de elucidar os mecanismos associados às relações entre a resposta ao estresse e os sistemas imune, antioxidante e as consequências celulares e comportamentais associadas.

Palavras-chave: estresse psicossocial, estresse oxidativo, estresse biológico, sistema imune, ansiedade, memória.

ABSTRACT

The physiological and behavioral changes resulting from processes involving the stress response may promote deleterious effects to the organism. The stress is related to disorders associated with the immune system, oxidative stress, processes of cell proliferation and death, mnemonic and cognitive deficits, in addition to participation in various diseases. The stress of a psychosocial or biological nature is responsible for changes in markers of oxidative stress and activation of antioxidant defense system. Data obtained in our research group showed correlations between the humoral immune response and activity of antioxidant enzymes. The aim of this study was to evaluate the influence of exposure of Swiss mice to the stress of a psychosocial and biological activation of the humoral immune response, in the induction of oxidative stress and the processes of apoptosis and neurogenesis in the hippocampus and pre-frontal cortex. The emotional memory and anxiety-type behavior were also examined. The animals were injected with sheep red blood cells (SRBC), with bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) or vehicle solution (PBS). Another group was exposed to the stress of social instability for four consecutive days. On the fifth day the animals were exposed to the test of the elevated plus-maze for two consecutive days. Serum samples from these animals were obtained for the measurements of production of anti-SRBC titres and production of antibodies anti-LPS. The brain parenchyma was removed for analysis of the activity of the enzyme glutathione reductase (GR) and the possible changes in the tissues were evaluated by immunohistochemical methods: anti-phospho-Histone H3 (marker of cell division) and anti-Bcl2 (protein in the apoptotic pathway) and the method of marking with TUNEL (DNA fragmentation marking). Exposure to psychosocial and biological stressors promoted changes in anxiety-type behavior. In the hippocampus of the stressed animals was a reduction in activity of the GR enzyme. In the pre-frontal cortex, activity was more stable, with an increase only in the group injected with SRBC. Through histological studies in this preliminary work has not observed the presence of changes in the processes of proliferation or apoptosis in the tissues evaluated. Thus, our results demonstrated that biological and psychosocial stressors interfere with antioxidant defense system and anxiety-type behavior, however, after five days of stress there is no evidence of cellular injury in the hippocampus and pre-frontal cortex. However, additional studies must be conducted to elucidate the mechanisms associated with the relationship between the stress response and immune systems, and antioxidant and cell behavior associated consequences.

Keywords: psychosocial stress, oxidative stress, biological stress, immune system, anxiety, memory.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neurobiologia do Estresse

Os organismos buscam manter-se em um constante equilíbrio dinâmico denominado homeostasia. Segundo o conceito clássico de estresse (SELYE, 1956), estímulos físicos e/ou psicológicos, reais ou imaginários que interfiram neste equilíbrio constituem desafios que evocam respostas compensatórias envolvidas em processos adaptativos. Esses processos levam a uma série de alterações fisiológicas que constituem a “resposta ao estresse” (SORRELS & SAPOLSKY, 2007).

Em humanos e outros vertebrados, a resposta ao estresse envolve principalmente a ativação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) com a liberação de adrenalina e noradrenalina e do Sistema Hipotalâmico-Hipófise-Adrenal (HPA). Com a ativação do eixo HPA, o Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH) e a vasopressina produzidos pelo hipotálamo agem na glândula hipófise promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação. Este, por sua vez, irá atuar nas adrenais resultando na liberação de glicocorticóides (GCs) (SORRELS & SAPOLSKY, 2007).

Os GCs agem em seus receptores em múltiplos tecidos alvos, incluindo os que formam o eixo HPA, estruturas responsáveis pela inibição retroativa da secreção de ACTH e CRH. Dois tipos de receptores corticosteróides foram identificados no cérebro: os receptores mineralocorticóides (RMs) de alta afinidade, altamente expressos em áreas límbicas e no hipocampo e os receptores glucocorticóides (RGs), distribuídos de forma mais difusa e com uma afinidade dez vezes menor aos GCs (KLOET et al., 2005).

O hipocampo, estrutura chave nos processos emocionais, de aprendizado e memória, apresenta elevada concentração de receptores GCs e exerce efeitos inibitórios sobre o eixo HPA modulando a liberação de GC (FUCHS et al., 2001). Desta forma, constitui uma das estruturas mais importantes na mediação e integração da resposta ao estresse.

Por influenciar a transcrição gênica e alterar a atividade elétrica de células excitáveis, os GCs são potentes moduladores da fisiologia celular e do comportamento, capazes de alterar o metabolismo energético e promover estados de alerta no organismo (SAPOLSKY et al., 2000). No início do século XX, a descrição de Hans Selye e Walter Cannon sobre a resposta

ao estresse como uma reação de “luta ou fuga” destaca as ações das catecolaminas e corticóides no organismo. Estes hormônios são capazes de promover aumento da frequência cardiovascular e respiratória, mobilizar o oxigênio e glicose de células adiposas e hepáticas aos músculos, de modo a preparar o organismo para uma possível reação de luta ou fuga. Como consequência observa-se uma diminuição na digestão, crescimento, reprodução e na ativação imunológica (SORRELS & SAPOLSKY, 2007).

Enquanto as alterações fisiológicas em resposta a breves exposições a estressores promovem a restauração da homeostasia e, portanto, beneficiam a sobrevivência do organismo, a exposição repetida a eventos estressantes altera gradualmente características como a morfologia e a capacidade proliferativa das células, mesmo após a ausência do evento, tornando ainda as células vulneráveis a outras situações adversas (FUCHS et al., 2001).

O estresse está associado com a geração de estresse oxidativo, alteração dos processos de morte e proliferação celular e disfunções mitocondriais (MCINTOSH & SAPOLSKY, 1996; MANOLI et al., 2000; SAHIN & GÜMÜSLÜ, 2004). Estas alterações estão relacionadas a patologias cardíacas, gastrointestinais e imunológicas, desordens psiquiátricas como ansiedade e depressão, doenças neurodegenerativas, além de afetar processos cognitivos e mnemônicos (MADRIGAL et al., 2001).

Similarmente ao hipocampo, o córtex pré-frontal (CPF) desempenha importante papel na integração de informações cognitivas e emocionais. Estas estruturas formam uma interface entre estruturas límbicas e corticais, regulam a atividade do eixo HPA na vigência de estímulos estressores e estão associadas ao processamento da informação espacial (CERQUEIRA et al., 2005).

O grau de ativação do SNA e do eixo HPA durante a resposta ao estresse depende de vários fatores como o tipo, intensidade e duração do estressor. Além disso, sabe-se que diferenças individuais associadas à genética e à história de vida podem alterar a resposta individual ao estresse (JOËLS et al., 2006).

1.2. Estresse Psicossocial

A sociedade moderna marcada por pressões sociais, econômicas e interpessoais tem presenciado crescente incidência de disfunções associadas ao estresse. Doenças cardiovasculares, câncer, infecções, artrite, fibromialgia e desordens mentais são exemplos dessas disfunções (SALVADOR & COSTA, 2009).

O estresse social é comum em muitas espécies animais e geralmente resulta da competição por recursos como espaço, acesso a um parceiro reprodutivo, água ou alimento. Modelos animais têm sido desenvolvidos para simular a tendência natural de diferentes espécies em formar hierarquias sociais quando mantidas em grupo (ELY et al., 1978; TAMASHIRO et al., 2005). Estes modelos buscam esclarecer os mecanismos fisiológicos e comportamentais causados pela exposição ao estresse que resultam em distúrbios, assim como objetivam auxiliar o desenvolvimento adequado de terapias e tratamentos.

Modelos que utilizam estímulos físicos, como o modelo do estresse de restrição (EJCHEL-COHEN, 2006), resultam em respostas distintas daquelas obtidas com a exposição à estressores de natureza social ou psicológica (TAMASHIRO et al., 2005). Estes últimos, por sua vez, simulam de forma mais eficiente os desafios encontrados pelos animais em seu ambiente natural, fornecendo informações mais precisas dos mecanismos envolvidos nessas situações. Os modelos associados a conflitos sociais podem fornecer ferramentas importantes para o estudo de alterações decorrentes de desordens psiquiátricas como depressão maior, ansiedade, desordem de estresse pós-traumático, abuso de drogas e distúrbios de alimentação (HUHMAN, 2006).

O modelo de estresse social utilizando camundongos machos conspecíficos baseia-se na interação entre os animais, onde a necessidade de domínio territorial e a definição hierárquica geram conflitos e geralmente a definição de comportamento submisso ou dominante (BLANCHARD & BLANCHARD, 1990).

GASPAROTTO et al. (2002) demonstraram que a interação social exerce efeitos distintos sobre a atividade imunológica de animais que assumem posições hierárquicas sociais distintas. Neste estudo, camundongos suíços foram expostos à interação agonística por quatorze dias e posteriormente injetados com hemácias de carneiro (HC). O grupo de animais classificados como submissos apresentaram títulos de anticorpos anti-HC significativamente

mais baixos comparado aos outros grupos, indicando que o impacto do estresse de interação social sobre a resposta imune humoral foi maior nos animais que assumiram a postura de submissão.

1.3. Estresse e Memória

As memórias são formadas por modificações sinápticas em distintas vias que incluem o hipocampo e suas conexões. As alterações das redes que compõem cada memória determinam a resposta dos indivíduos aos diversos estímulos e sua interação com o meio.

A memória de trabalho, que mantém alguns segundos ou minutos a informação que está sendo processada, sem armazená-la é processada fundamentalmente pelo CPF em associação com outras áreas corticais e o hipocampo. A memória de trabalho, ao receber uma informação analisa se esta é nova e o contexto em que está inserida. Desta forma, determina a necessidade de armazená-la e, para tanto, tem acesso às memórias pré-existentes através de conexões com o hipocampo (IZQUIERDO, 2002).

O CPF recebe aferências axonais procedentes de regiões vinculadas à regulação de estados emocionais, níveis de consciência e ânimo, o que explica o fato de estados emocionais serem capazes de influenciar a memória de trabalho (IZQUIERDO, 2002).

As memórias podem ser classificadas em memórias de curta duração e de longa duração. A memória de curta duração se mantém por poucas horas. A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos no hipocampo e outras estruturas, e compreende diversas fases que requerem entre três e oito horas até sua consolidação (IZQUIERDO E MEDINA, 1997). Acredita-se que os mecanismos de consolidação envolvam o mecanismo celular de Potenciação de Longa Duração (LTP, do inglês: *Long-Term Potentiation*). Neste mecanismo, estimulações elétricas de alta frequência em axônios pré-sinápticos durante alguns segundos produzem aumento na magnitude da resposta pós-sináptica. Este processo envolve a transmissão glutamatérgica, sensibilização de receptores, síntese de proteínas e culmina com a formação de novas sinapses (IZQUIERDO, 2002).

O período de aquisição e consolidação de memória é suscetível à interferência por vários fatores como traumatismos, drogas, ocorrência de outras memórias e hormônios do estresse (MCGAUGH, 2000; IZQUIERDO, 1989).

Os hormônios do estresse exercem papel crucial na consolidação de memórias permanentes. Adrenalina e corticosterona, embora afetem funções cerebrais por diferentes mecanismos e vias convergem na regulação da consolidação da memória por influenciar mecanismos noradrenérgicos centrais (MCGAUGH & ROOZENDAAL, 2002).

Embora o estresse facilite e até seja indispensável ao aprendizado e à memória, a hiperatividade dos sistemas associados à resposta ao estresse pode prejudicar funções cognitivas como a retenção da memória e o aprendizado (JOELS et al., 2006). Um dos fatores associados a esses efeitos deletérios está relacionado aos danos hipocâmpais decorrentes da constante hiperatividade do eixo HPA e elevação crônica de GCs, que podem promover alterações estruturais e funcionais nesta estrutura e, conseqüentemente, comprometer os mecanismos regulatórios da resposta ao estresse (FUCHS et al., 2001).

Regiões como a amígdala que apresentam função reguladora dos estados de ânimo e emoções exercem papel modulador na formação e evocação das memórias. A amígdala recebe influência de corticóides e adrenalina liberados durante o estresse, estando portanto, associada ao efeito do estresse na formação das memórias e estados de humor (MCGAUGH & ROOZENDAAL, 2002). Os hormônios do estresse liberados durante a experiência emocional ativam a neurotransmissão noradrenérgica na amígdala, podendo resultar em facilitação da memória. Desta forma, em alguns casos, a memória emocional pode ser exacerbada em situações de estresse (MCGAUGH, 2000).

1.4. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é um teste comportamental amplamente aceito no estudo do comportamento de ansiedade em roedores (HANDLEY & MITHANI, 1984). Além da ampla utilização na avaliação do efeito de drogas ansiolíticas, atualmente este modelo tem sido útil ao entendimento das bases biológicas da emocionalidade como aprendizado e memória, dor e distúrbios de ansiedade. Adicionalmente, o LCE tem sido utilizado na definição de áreas cerebrais associadas ao medo e ansiedade (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

Incorporações ao modelo do LCE, como o paradigma da segunda exposição, possibilitaram a avaliação dos processos de aprendizado e memória (TREIT et al., 1993). O aumento da esquivas dos braços abertos durante a reexposição do animal ao LCE deve-se ao

aprendizado ocorrido na primeira exposição ao teste. As abordagens baseadas em aspectos da aprendizagem/memória e ansiedade constituem uma ferramenta experimental na investigação das relações entre emoção e cognição, que geralmente são integradas e contribuem juntas com o comportamento (STERN et al., 2008).

A análise do comportamento de avaliação de risco (AR) constitui uma medida comportamental relacionada à ansiedade e medo já que são observadas posturas associadas a estratégias comportamentais utilizadas em potenciais situações de perigo (BLANCHARD et al., 1991). Demonstrou-se que este padrão defensivo pode ser inclusive mais sensível à modulação de drogas ansiolíticas em comparação às medidas de esquiva, uma vez que roedores continuam a demonstrar aumento de comportamentos de AR, mesmo após cessar a esquiva em áreas desprotegidas (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Além da análise do tempo e do número de acessos de risco, a duração dos episódios de acesso de risco, caracterizada pela relação entre o tempo e o número de acesso de risco (T/N), fornece dados adicionais aos índices de ansiedade em que episódios de risco mais curtos indicam comportamento típico de ansiedade (BLANCHARD et al., 1991).

A eficiência da AR, como medida do comportamento ansiolítico, se confirma pelas correlações em que o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto é inversamente correlacionado ao tempo de AR. Desta forma, um indicativo de comportamento típico de ansiedade no animal caracteriza-se pela diminuição de tempo despendido nos braços abertos e concomitante aumento do comportamento de AR (GASPAROTTO et al., 2005).

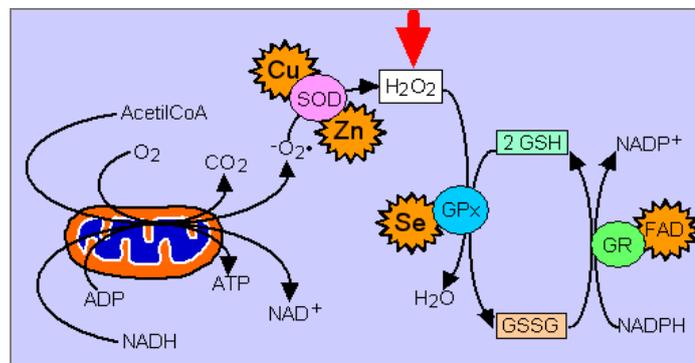
1.5. Estresse Oxidativo

O processo de oxidação, fundamental em processos metabólicos como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias gera espécies reativas ao oxigênio (ERO), moléculas com radicais de átomos de oxigênio contendo elétrons desemparelhados e capazes de reagir com outras moléculas. O excesso de EROs promove efeitos deletérios ao organismo como a peroxidação lipídica, agressão às proteínas e danos ao DNA e RNA. Dessa forma, encontra-se relacionado a doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e disfunções cognitivas, além de patologias como artrite, câncer e

AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro destas desordens (MANOLI et al., 2000; SCHULZ et al., 2000).

As células apresentam mecanismos de proteção à toxicidade causada pela reatividade do oxigênio. Entretanto, nos casos em que as defesas celulares são insuficientes em manter os níveis de EROs abaixo do limiar de toxicidade, instala-se a condição de estresse oxidativo. Isto pode ocorrer através de produção excessiva de EROs, perda de defesas antioxidantes ou o conjunto dessas duas situações (SCHULZ et al., 2000).

As proteções do organismo contra as EROs abrangem proteção enzimática e não-enzimática. As principais enzimas incluem CuZn superóxido dismutase (CuZn SOD), Mn superóxido dismutase (Mn SOD), glutaciona peroxidase e catalase (BARREIROS et al., 2006). A glutaciona (GSH) constitui uma defesa não-enzimática que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, operando em ciclos entre sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Nesse sistema, a GSH reduz o H_2O_2 a H_2O pela ação da enzima glutaciona peroxidase (GPx) e, em seguida, a GSH é regenerada através da enzima glutaciona redutase (GR) (Fig. 1).



(<http://www.unifesp.br/dneuro/nexp/riboflavina/d.htm>)

Figura 1. Ação da glutaciona no sistema antioxidante. A atividade da cadeia transportadora de elétrons leva à formação do ânion superóxido ($-O_2^\circ$) que sob a ação da enzima superóxido dismutase (SOD) origina o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é convertido em água pela ação da enzima glutaciona peroxidase (GPx). Esta reação consome duas moléculas de glutaciona que são oxidadas (GSSG). Em seguida, a GSH é regenerada através da enzima glutaciona redutase (GR) que reduz GSSG a GSH.

A glutaciona participa de importantes funções fisiológicas. No SNC, além de sua ação antioxidante está relacionada a processos como memória e aprendizado, desenvolvimento neuronal e doenças neurodegenerativas, pois pode interferir na neurotransmissão glutamatérgica. Adicionalmente, demonstrou-se que a depleção dos níveis de GSH no córtex

de camundongos após exposição a estresse foi revertida com uso de antidepressivos. Estes dados sugerem um papel fisiológico na modulação do humor desempenhado pela GSH (ROSA, 2005).

O cérebro que constitui apenas 2% do peso corporal e consome cerca de 20% do oxigênio utilizado pelo organismo gera altas concentrações de EROs. Tal condição requer mecanismos antioxidantes eficientes, onde o metabolismo da glutathiona desempenha papel relevante (DRINGEN, 2000). Além disso, o tecido cerebral apresenta alta sensibilidade às condições degenerativas induzidas pelo estresse oxidativo. Isto se deve a alguns fatores que o torna particularmente vulnerável: o SNC gera alta quantidade de EROs durante os processos de fosforilação oxidativa. Muitas áreas do cérebro possuem alta concentração de ferro que podem catalisar a geração de EROs. O cérebro é rico em ácidos graxos insaturados, que são alvos da peroxidação lipídica e apresenta baixa atividade das enzimas antioxidantes quando comparado a outros órgãos (DRINGEN, 2000; SAHIN & GÜMÜSLÜ, 2004).

Alterações em parâmetros pró e antioxidantes estão associadas à resposta ao estresse nas células do SNC. Insultos gerados pela ação de GCs, que incluem alteração no metabolismo energético celular, na homeostase do cálcio e ativação de cascatas de aminoácidos excitatórios têm sido associados ao aumento da geração de EROs no SNC (MCINTOSH & SAPOLSKY, 1996). Adicionalmente, a exposição ao estresse agudo e crônico pode promover peroxidação lipídica, redução na atividade enzimática antioxidante e nos níveis de glutathiona (SILVA et al., 2004).

A resposta antioxidante depende do tipo de estresse a que os animais são submetidos (SAHIN & GÜMÜSLÜ, 2004) bem como a duração da exposição aos estressores (MADRIGAL et al., 2001).

A resposta celular ao estresse envolve mudanças na concentração de GSH, que é consumida durante a remoção de compostos deletérios e posteriormente restaurada (GHIZONI et al, 2005). Foi demonstrado em camundongos que o estresse crônico de restrição é capaz de promover danos oxidativos em diversas regiões hipocâmpais, através da diminuição da expressão de glutathiona S-transferase, causando danos estruturais e funcionais nestas estruturas (EJCHEL-COHEN, 2006). Em alguns casos, embora os GCs por si não induzam morte celular, a exposição prévia a esses hormônios seguidos de estresse oxidativo é efetivo em causar morte neuronal (BEHL, 1998).

No Laboratório de Neurobiologia do Estresse (UFSC), estudos anteriores demonstraram que a atividade de enzimas antioxidantes no SNC foi afetada por estressores de natureza psicossocial e biológica, bem como evidências da correlação dessas alterações na indução de comportamento tipo-ansioso. Estas alterações são tempo-dependentes e resultam em correlações entre os tratamentos com o estímulo imunológico e a atividade das enzimas antioxidantes (GONÇALVES, 2007). A relação entre o estresse oxidativo e ansiedade foi abordada em estudos anteriores que demonstraram a participação dos genes glioxalase 1 e glutatona redutase 1, ambos associados ao metabolismo da glutatona, na gênese da ansiedade (HOVATTA, 2005; KROMER et al., 2005).

1.6. Estresse e Alterações Neurais

Uma das primeiras observações celulares após exposição crônica aos GCs foi a perda neuronal por apoptose em regiões hipocâmpais. Houve perda e alterações morfológicas em neurônios piramidais na área CA3 do hipocampo. Estas alterações neurais associaram-se ao aumento da ansiedade observado após o estresse crônico (JOËLS et al., 2007). Adicionalmente, estressores físicos e psicológicos podem inibir uma ou mais fases da neurogênese como proliferação, sobrevivência ou diferenciação celular principalmente no hipocampo (HEINE et al., 2004).

Além da supressão da neurogênese e perda celular, o estresse pode promover outras alterações celulares como a diminuição da arborização dendrítica neuronal. A remodelação dendrítica de neurônios hipocâmpais e corticais tem sido documentada após exposição a estresse crônico e administração de GCs. Essa remodelação pode levar à perda de sinapses nestas regiões e consequentes alterações funcionais (FUCHS et al., 2006).

Embora em menor concentração comparado ao hipocampo, o CPF apresenta alta densidade de receptores para GCs e consequentemente torna-se alvo aos efeitos do estresse, o que pode prejudicar funções cognitivas como a memória de trabalho (RADLEY & MORRISON, 2005). O estresse crônico altera a morfologia dendrítica no CPF medial, região que modula funções cognitivas e afetivas, e na amígdala, que possui papel na regulação de emoções como ansiedade e medo, e na formação de memórias emocionais (FUCHS et al., 2006).

A exposição a eventos estressores promove prejuízo da neurotransmissão serotoninérgica hipocampal e aumento na liberação de glutamato promovendo alterações em fatores associados à plasticidade neuronal. Estas alterações parecem estar envolvidas na mediação de consequências comportamentais do estresse como, por exemplo, a depressão (MCEWEN, 2005). Demonstrou-se que o estresse crônico e a exposição aos GCs são potentes inibidores da neurogênese adulta e proliferação celular no hipocampo (JOËLS et al., 2007; PHAM et al., 2003). A neurogênese hipocampal está associada ao aprendizado de novas tarefas e processamento de tarefas cognitivas. Situações de estresse poderiam, desta forma, prejudicar estes processos, assim como a aquisição e consolidação de respostas adaptativas que facilitariam o desempenho frente à estressores subsequentes (MCEWEN, 2005).

O sistema imune também pode influenciar a regulação da plasticidade neuronal. As células T, que podem ser transportadas passivamente ao SNC e participam de reparo e manutenção de lesões no SNC, dão suporte à neurogênese no SNC saudável (MOALEM et al., 1999). Demonstrou-se que a depleção aguda da imunidade em camundongos adultos prejudica significativamente o comportamento de aprendizagem nestes animais (BRYNSKIKH et al., 2008).

O remodelamento estrutural induzido por estresse envolvendo alterações dendríticas e supressão de neurogênese fornece base celular ao entendimento de fatores como o prejuízo da plasticidade neuronal no hipocampo humano observado em transtornos de humor (JOËLS et al., 2007).

1.7. Estresse e Sistema Imune

A modulação do sistema imune pelo SNC é mediada por uma complexa rede de sinais bidirecionais entre os sistemas nervoso, endócrino e imune. Hormônios associados com a resposta ao estresse induzem alterações quantitativas e qualitativas na função imune. Grande parte das células imunológicas apresenta receptores a esses hormônios. Essa modulação pode ocorrer por via direta, através de sua ligação com receptores, ou indireta, por exemplo, ao induzir a inibição de produção de citocinas produzidas em resposta a antígenos. Sabe-se que órgãos linfóides apresentam inervações noradrenérgicas. Além disso, células imunes apresentam receptores a neurotransmissores e neuropeptídeos (GLASER & GLASER, 2005).

O estresse exerce impacto na resposta imune e na saúde de roedores e humanos. Dependendo do tipo, intensidade e duração, um estímulo estressor pode suprimir ou elevar a resposta imune (FERNANDES, 2000). As ações dos GCs incluem a inibição da proliferação de linfócitos e da atividade de células natural killer (NK), indução de apoptose em neutrófilos e eosinófilos, redistribuição, apoptose e alterações fenotípicas em células T (SORRELS & SAPOLSKY, 2007).

Em contrapartida, células imunes ativadas podem interagir com determinadas regiões cerebrais. Citocinas e seus receptores estão presentes em neurônios. Neurônios sensoriais do nervo vago expressam receptores para IL-1 e podem ser estimulados por esta citocina. A informação das células imunes pode, portanto, ser passada da periferia a estruturas como o núcleo do trato solitário e elaboradas pelo hipotálamo e outras estruturas cerebrais. Esta ativação neuroendócrina gera consequências que refletem no humor e cognição demonstrando relevância clínica (KONSMAN et al., 2002). BESEDOVSKY (1977) demonstrou que a resposta do sistema imune ao lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) promove ativação do eixo HPA resultando na liberação de GCs. A injeção de hemácia de carneiro (HC) ou baixas doses de LPS em camundongos induzem alterações na atividade neuronal e no comportamento destes animais (GASPAROTTO et al., 2005).

O sistema imune possui dois sistemas de respostas relacionados, mas funcionalmente diferentes, a imunidade inata e a adquirida. A imunidade inata se refere à atividade de fagócitos e células NK que reconhecem e destroem células não identificadas como próprias, sem especificidade ao agente. A imunidade adquirida refere-se à resposta antígeno-específica a um patógeno e caracteriza-se pela resposta humoral e celular. A imunidade humoral é mediada através da produção de anticorpos pelos linfócitos B. As principais classes de anticorpos produzidos são IgM, IgG, IgE, IgD e IgA. A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T. Em particular, esta resposta é regulada por células apresentadoras de antígenos (APC) e pelas subclasses de linfócitos T helper (Th), Th1 e Th2. As células Th1 secretam interferon (IFN) e interleucina-2 (IL-2) que promovem imunidade celular, particularmente relevante na mediação de defesas contra patógenos intracelulares. Células Th2 secretam IL-4, IL-10 e IL-13 que promovem imunidade humoral, importante na defesa contra patógenos extracelulares. As APCs ativadas primariamente produzem citocinas e interferem com outras células organizando a defesa imune. Se a produção de IL-12 e de fator de necrose tumoral (TNF) prevalece, uma resposta Th1 local é produzida, se IL-10 prevalece ocorre uma resposta

Th2. Esses dois sistemas interagem em muitos passos e possuem ações inibitórias recíprocas. Estudos indicam que os GCs agem não apenas diminuindo a resposta imune no todo, mas regulando o balanço Th1/Th2. De fato, os GCs induzem a diminuição da imunidade mediada por Th1 e aumentam a imunidade mediada por Th2. Os GCs inibem a produção de IL-12 e a regulação de receptores IL-12 nas células T. Adicionalmente, inibem a produção de IL-2 e IL-1 e a atividade das células NK (BARTOLOMUCCI, 2007).

As respostas imunes são denominadas T-dependentes quando envolve a participação dos linfócitos T, o que não ocorre nas respostas T-independentes. Sabe-se que a administração de HC envolve uma resposta T-dependente, enquanto a administração de LPS envolve uma resposta T-independente. Consequentemente esses estímulos podem ativar vias fisiológicas diferenciadas.

A crescente evidência de que a atividade imune influencia as funções nervosas e promove a liberação de hormônios associados ao estresse suporta seu papel na regulação da cognição e comportamento (SIMMONS & BRODERICK, 2005). Desta forma, o sistema imune tem sido associado à etiologia de distúrbios como a depressão (BRYNSKIKH et al., 2008). Adicionalmente, foi demonstrado o aumento dos níveis de citocina cerebral após exposição ao estresse e a associação destas alterações com a plasticidade neuronal (FUCHS et al., 2006).

Considerando a relevância das alterações fisiológicas e comportamentais decorrentes dos processos que envolvem a resposta ao estresse e a inter-relação entre os sistemas nervoso e imune, além do papel do equilíbrio oxidativo na manutenção da homeostasia após a exposição à estressores, nos propomos a estudar os efeitos de estímulos estressores de natureza psicossocial e biológica nestes sistemas e suas inter-relações. Para tanto, abordamos as alterações morfológicas e oxidativas no SNC e indução de comportamentos associados a estes estímulos. Como os estímulos estressores afetam diferentemente as estruturas cerebrais optamos por avaliar a ação destes estímulos no hipocampo e no CPF dos animais do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da exposição de camundongos suíços ao estresse de natureza psicossocial e biológica na ativação da resposta imune, na indução de estresse oxidativo, nos processos de apoptose e neurogênese no hipocampo e CPF e no comportamento de ansiedade, nos processos cognitivos e mnemônicos nestes animais.

2.2. Objetivos Específicos

1 - avaliar a ativação de uma resposta imune humoral, ou seja, a produção de anticorpos anti-HC e anti-LPS nos animais injetados com HC e LPS, respectivamente;

2 - avaliar a indução de alterações na atividade da enzima glutathione redutase (GR) no hipocampo e CPF dos animais expostos aos estressores de natureza psicossocial e biológica;

3 - investigar a presença de alterações nos processos de apoptose e neurogênese no hipocampo e CPF dos animais avaliados;

4 – observar as possíveis alterações comportamentais associadas à ansiedade e aprendizado/memória após exposição aos estressores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos albinos suíços machos (n=55), com 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) foram transferidos para o Laboratório de Neurobiologia do Estresse. Com o objetivo de aclimação às condições do ambiente laboratorial, os animais foram mantidos inicialmente em grupos de irmãos, em gaiolas de polipropileno medindo 49x34x16 cm e fechadas com tampa de malha de aço. Todas as gaiolas eram forradas com serragem de madeira esterilizada.

As salas de manutenção dos animais dispuseram de iluminação artificial com ciclo claro-escuro de doze horas (12:12 horas), com início às 6:00 horas, e temperatura ambiente mantida entre $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A alimentação constituída de ração convencional para roedores foi fornecida pelo Biotério Central da UFSC. A ração e água clorada foram disponibilizadas aos animais *ad libitum*.

Decorridos sete dias de ambientação, os animais receberam o vermífugo Ivermectina (Ivomec 1%) por gavagem, obedecendo a concentração de 1mL/10 Kg de massa corporal, em solução contendo 0,05 mL/10 gramas. Após o procedimento de desinfecção parasitária, cada animal foi transferido para uma gaiola de polipropileno opaca medindo 13x19x30 cm. Transcorreu um período equivalente a quinze dias para a ambientação e a maturação destes animais. Os animais permaneceram isolados durante todo o período de experimentação, sem contato físico direto com outros animais, exceto nas sessões de interação social, quando presenciaram as lutas entre os animais mais velhos para o estabelecimento da hierarquia.

Os protocolos experimentais do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) (23080.019003/2008-35) e estavam de acordo com as Diretrizes de Cuidados com Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América.

3.2. Estímulos Estressores e Grupos Experimentais

Como estímulo estressor de natureza psicossocial utilizou-se o modelo de instabilidade social. Para tanto, os animais experimentais presenciaram diariamente, na segunda metade do ciclo claro, interações agonísticas entre camundongos machos no período pós-reprodutivo. Os animais experimentais foram transferidos para compartimentos plásticos (10,2 x 10,2 cm) posicionados ao redor de uma arena central de formato octogonal (figura 2). As paredes laterais da arena foram confeccionadas com tela de arame para possibilitar a separação dos animais experimentais daqueles que foram introduzidos em seu interior para interagirem agonisticamente.

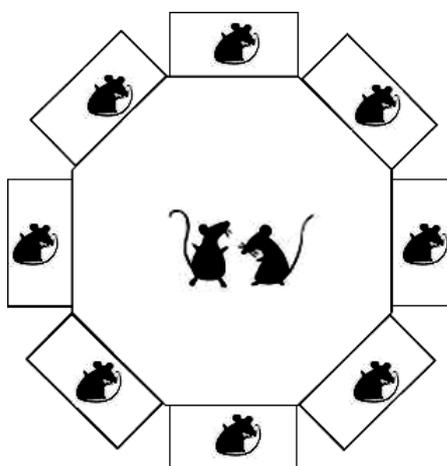


Figura 2. Arena de interação agonística.

O pareamento dos animais machos no período pós-reprodutivo foi conduzido e após a exibição de um comportamento de submissão por um dos animais pareados, iniciava-se a contagem do tempo até completar trinta minutos. Durante este período, o animal submisso permanecia sob a ameaça ou ao ataque do animal dominante. Caso a agressão fosse muito expressiva, com a possibilidade de gerar lesões, efetuava-se a separação dos machos por grade ou a troca do pares de machos. Os animais experimentais presenciavam as interações sociais e as agressões entre os machos e posteriormente retornavam às suas respectivas caixas de manutenção.

Os estímulos estressores biológicos utilizados foram a injeção de 0,1mL de uma solução contendo 10^9 Hemácias de carneiro (HC)/mL ou a injeção de 0,1mL de Lipopolissacarídeo

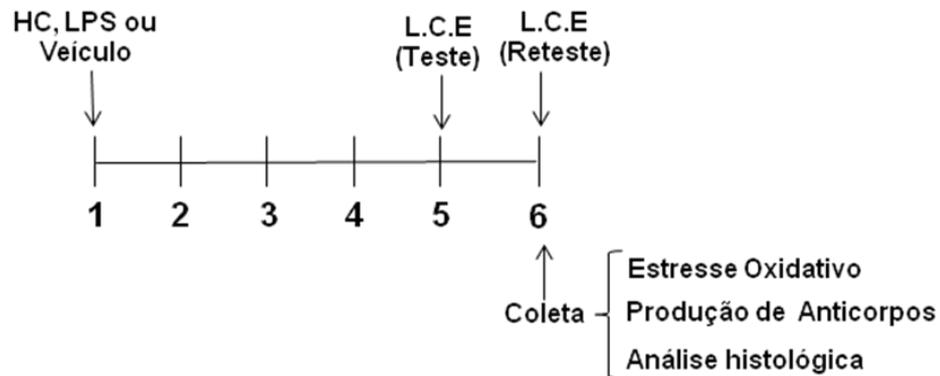
extraído de *Escherichia coli* (LPS – Sigma L2880). A solução de LPS foi injetada nas doses de 1mg/kg (dose considerada sub-letal) e de 0,33 mg/kg.

Para o estudo proposto foram analisados os seguintes grupos experimentais: animais expostos à instabilidade social (E), animais injetados com HC (HC), animais injetados com LPS em menor dose (LPS<), injetados com LPS em maior dose (LPS>) e animais controle injetados com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) (CV).

3.3. Protocolo Experimental

Os grupos experimentais receberam a injeção com HC, LPS ou PBS no primeiro dia de experimentação e permaneceram os dias seguintes isolados em suas gaiolas de manutenção. No quinto dia, os animais foram submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) durante cinco minutos. Uma re-exposição a este teste foi feita após vinte e quatro horas. Os animais estressados psicossocialmente foram expostos diariamente a quatro sessões semelhantes de instabilidade social e expostos ao teste do LCE, no quinto e sexto dia de experimentação. Na sequência, oito animais de cada grupo foram anestesiados com éter etílico vaporizado em uma máscara nasal e o sangue retirado por punção cardíaca até sobrevir à morte. Os cérebros foram retirados para coleta do hipocampo e córtex frontal. Estes tecidos foram armazenados em freezer a -80°C para posterior análise bioquímica. A enzima glutationa redutase (GR) participante do metabolismo antioxidante teve sua atividade mensurada. O sangue foi coletado e o soro posteriormente obtido foi utilizado para avaliação da produção de anticorpos anti-HC e anti-LPS. Os outros três animais de cada grupo foram anestesiados com uretana, de modo a possibilitar a perfusão com PBS (0,01M, pH 7,4) seguida de solução fixadora (Paraformaldeído 4%, pH 7,4). Os cérebros destes animais foram retirados para avaliação histológica de proliferação e morte celular. O protocolo experimental está sumarizado na figura 3.

A



B

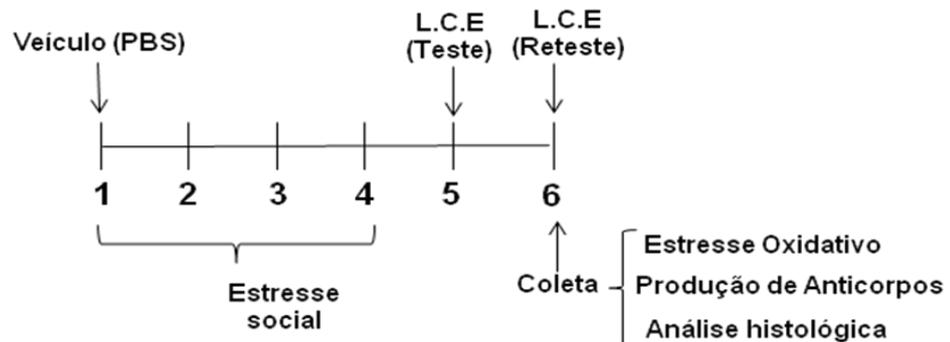


Figura 3. Protocolo geral de experimentação. A) No primeiro dia do experimento, os animais foram injetados com HC, LPS ou PBS e permaneceram os dias subsequentes isolados em suas gaiolas. No quinto dia, os animais foram expostos ao teste de labirinto em cruz elevado (LCE), sendo reexpostos ao teste após vinte e quatro horas. Amostras de sangue e o parênquima cerebral foram coletados, anteriormente ao sacrifício dos animais. B) Outro grupo foi exposto ao estresse de instabilidade social por quatro dias e a partir do quinto dia, o mesmo protocolo foi aplicado aos animais dos outros grupos experimentais.

3.4. Análise Comportamental

Decorridos quatro dias dos procedimentos de exposição aos estressores psicossociais e biológicos, os animais experimentais foram submetidos à avaliação no teste do LCE (HANDLEY & MITHANI, 1984) em duas sessões com duração de cinco minutos e um intervalo de vinte e quatro horas entre elas.

O LCE consiste de dois braços abertos opostos medindo 15 cm de comprimento por 5 cm de largura e dois braços opostos protegidos por paredes laterais com 15 cm de altura dispostos perpendicularmente. O labirinto apresenta uma área central na junção entre os braços e permanece elevado 40 cm do chão.

Durante a exposição ao labirinto observa-se no animal um conflito entre a motivação e o medo da exploração. Normalmente, os animais preferem explorar os braços fechados em detrimento aos abertos já que estes impedem o comportamento tigmotáxico dos animais (exploração do ambiente através das vibrissas).

Os testes ocorreram em ausência de luz e foram gravados por câmera de vídeo dotada de emissor de infravermelho. A análise foi feita com auxílio do programa Etholog (<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/2727/ethohome.html>). Os testes foram realizados na fase clara do ciclo iniciando-se às 08:00 horas. Ao iniciar os testes, os animais eram colocados no centro do labirinto e na ocorrência de queda do animal durante o teste, este era excluído do experimento. A fim de evitar qualquer interferência odorífera, após cada teste efetuava-se a limpeza do aparato com solução de álcool 20%/ detergente 0,5%.

As análises comportamentais avaliadas são representadas pela porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (%BA), nos braços fechados (%BF) e no centro (%C), número de entradas nos braços abertos (NA), nos braços fechados (NF) e no centro (NC) do labirinto (PELLOW et al., 1985). A entrada e saída foram consideradas apenas após a colocação das quatro patas do animal dentro e fora dos braços do labirinto. O comportamento de avaliação de risco foi avaliado através da análise do comportamento exploratório com a medida de movimentos realizados com a cabeça e ombros em direção às extremidades do labirinto e pelos movimentos em que o animal se estica e retorna a posição original sem se locomover (BLANCHARD et al., 1994).

3.5. Preparo da Solução de Hemácia de Carneiro e LPS

Para o preparo da suspensão, as hemácias de carneiro foram lavadas três vezes em PBS (0,01M, pH 7,2) durante um período equivalente a cinco minutos mediante centrifugação a 1500 rotações por minuto (rpm). Na última etapa de centrifugação, o sobrenadante foi eliminado e a papa de hemácias obtida foi ressuspensa em solução de PBS de modo a se obter 10^9 hemácias/mL. Este inóculo foi injetado por via intraperitoneal, em um volume de 0,1 mL (10^8 hemácias/animal). A solução de LPS foi diluída em PBS e injetada intraperitonealmente nas doses de 1mg/kg e de 0,33 mg/kg.

3.6. Coleta e Preparação de Material Biológico

As amostras de sangue foram retiradas por punção cardíaca, com os animais anestesiados com éter etílico vaporizado. Seguindo a morte dos animais por exsanguinação, realizou-se a retirada do córtex frontal e hipocampo bilateralmente para os ensaios bioquímicos de atividade enzimática antioxidante.

Terminadas as coletas, o tecido nervoso foi armazenado em freezer à temperatura de -80°C . O sangue foi depositado em tubos Eppendorf e centrifugado a 1500 rpm por um período equivalente a dez minutos. O soro obtido foi armazenado em freezer a -20°C para posterior avaliação da presença de anticorpos anti-HC e anti-LPS.

3.7. Ensaio de Hemaglutinação Utilizado para Detecção de Anticorpos Anti-HC

Para avaliar a produção de anticorpos anti-HC, amostras de 50 μL de soro inativado em banho-maria a 56°C puro ou diluído foram depositadas nos poços das placas de microhemaglutinação contendo 50 μL de solução PBS. Na sequência foi adicionado 50 μL de uma suspensão de HC, diluída a 2% em PBS, em cada poço da placa. As placas foram mantidas em repouso e incubadas por um período de vinte e quatro horas a uma temperatura de 4°C . A produção de anticorpos foi analisada mediante a observação de uma reação de aglutinação em microscópio estereoscópio (Olympus). O título de anticorpos anti-HC foi

determinado e expresso pela maior diluição do soro que apresentou o padrão característico de uma reação de aglutinação.

3.8. Ensaio Imunoenzimático Utilizado para a Detecção de Anticorpos Anti-LPS

A produção de anticorpos anti-LPS foi avaliada através da aplicação do método indireto de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Para tanto, realizou-se a sensibilização das microplacas adicionando-se o antígeno solúvel (200µL de LPS diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,005M). A placa foi incubada a 37°C, por três horas e em seguida colocada em geladeira a 4°C e mantida até o dia seguinte. Após a remoção da solução sensibilizadora, adicionou-se em cada poço 300µL de solução bloqueadora de peroxidases inespecíficas (Tris/NaCl/gelatina 0,5%). Transcorrido um período de incubação equivalente a uma hora a 37°C, realizou-se a lavagem das placas com solução PBS/Tween 0,05% (300µL por poço) por cinco vezes. Adicionou-se 100µL do soro dos camundongos imunizados com LPS, diluído em solução tampão (PBS/Tween 0,05%/Gelatina 0,5%). Após a incubação a 37°C por uma hora realizou-se a lavagem das placas por cinco vezes. Posteriormente, adicionou-se 100 µL do anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Anti-mouse polyvalent peroxidase – Sigma: A0412) diluído em tampão PBS/Tween 0,05%/BSA 1%. Após a incubação a 37°C por uma hora realizou-se a lavagem das placas por cinco vezes. A fim de promover a detecção da reação, adicionou-se 100µL da solução substrato/cromógeno. Após a incubação por dez minutos no escuro, adicionou-se 50µL da solução de parada da reação. A análise da reação foi realizada através da leitura em espectrofotômetro de microplacas em um comprimento de onda de 492 nm.

3.9. Estresse Oxidativo: Avaliação da Atividade da Enzima Glutationa Redutase (GR)

O hipocampo e córtex frontal de cada animal foi homogeneizado em 300µL de tampão HEPES (20mM, pH 7,0). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 força centrífuga relativa (rcf) a 4°C e o sobrenadante coletado para as dosagens da enzima GR.

A atividade da GR foi determinada pelo método descrito por CARLBERG & MANNERVIK (1981) que mensura o consumo de NADPH em virtude da redução da

glutationa oxidada (GSSG). A leitura foi realizada em um comprimento de onda de 340 nm no espectrofotômetro.

O meio de reação foi composto de 10 mL de tampão fosfato (KPi) 0,25M, 9,94 mL de água destilada e 53,3 μ L de NADPH (100 mM). Para a determinação do valor basal das amostras no espectrofotômetro adicionou-se na cubeta 400 μ L do meio de reação, 55 μ L de água destilada e 20 μ L da amostra. Uma vez determinado o valor basal através da utilização de um comprimento de onda de 340 nm, adicionou-se 25 μ 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 como Unidades/mg de proteína. Uma unidade corresponde a 1 μ 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 absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm usando a Albumina de Soro Bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) como padrão. Os ensaios bioquímicos foram conduzidos no Laboratório de Defesas Celulares, coordenado pelo Prof. Alcir Luiz Dafré (CFS-CCB-UFSC).

3.10. Procedimentos Histológicos

Para determinar a possível alteração na proliferação e morte celular no CPF e hipocampo induzida pela exposição ao estresse de instabilidade social e biológico (HC e LPS) repetiram-se os protocolos experimentais em três animais de cada grupo. No último dia de experimentação, os animais foram anestesiados com uretana (175mg/100grama de massa corporal) e perfundidos com PBS durante três a cinco minutos, seguido de solução fixadora (Paraformaldeído 4%) durante três a cinco minutos. Finalizada a perfusão, os cérebros permaneceram em solução fixadora por um período de vinte e quatro horas. Em seguida, foram transferidos para uma solução contendo álcool 70% por aproximadamente 48 horas até a inclusão das peças em parafina e a confecção das lâminas. As técnicas histológicas foram conduzidas no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, coordenado pela

Profa. Yara Maria Rauh Müller (BEG-CCB-UFSC). Os encéfalos foram preparados para a microscopia de luz de acordo com as seguintes etapas:

1. Desidratação: sob agitação branda as peças foram transferidas à solução de álcool 70% (duas vezes por 10 e uma vez por 20 minutos), álcool 70% e 80% (10 minutos cada) e álcool 100% por duas horas. Em seguida, adicionou-se xilol até obtenção de solução álcool-xilol 50% (5 minutos).

2. Diafanização: as peças foram imersas em xilol por um período de 10 a 40 minutos até apresentarem-se translúcidas.

3. Inclusão e emblocamento: realizou-se a imersão em parafina a 57°C por três vezes (durante uma hora cada). Após solidificação em temperatura ambiente, os blocos de parafina foram removidos dos moldes, aparados e acoplados ao micrótomo rotativo.

4. Montagem das Lâminas: os blocos foram seccionados sagitalmente em micrótomo (7µm), os cortes foram distendidos em banho-maria (37°C), colocados sobre as lâminas e mantidos em local apropriado para secagem.

5. Desparafinização: as lâminas foram imersas em xilol (duas vezes por 10 minutos), em álcool 100% (duas vezes por 10 minutos), 90%, 80% e 70% (por 10 minutos cada) e em seguida em água destilada por 10 minutos.

6. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE): foi empregada como controle histológico. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris (2 minutos), lavadas com água (10 minutos), água destilada (1 minuto), coradas com eosina (1 minuto) e lavadas novamente em água destilada (5 minutos).

7. Desidratação e Montagem das Lâminas: realizou-se a imersão das lâminas em álcool 70%, 80% e 90% (5 minutos), 100% (2 vezes por 10 minutos) e xilol (2 vezes por 10 minutos) e posteriormente foram montadas com Entelan.

3.11. Imunohistoquímica

A fim de avaliar a presença e localização de células em proliferação e apoptose no tecido estudado utilizaram-se os anticorpos anti-fosfohistona H3 (marcador de células em divisão

celular), e anti-Bcl-2 (proteína presente na via apoptótica). Após a desparafinização, as lâminas foram mergulhadas em solução de Peróxido de Hidrogênio e Metanol puro em proporção 1:2 (10 minutos) para bloqueio das peroxidases endógenas. Seguiu-se então a lavagem em PBS 0,1M (3 vezes por 10 minutos) em agitação branda. As lâminas foram lavadas com solução PBS/Triton 0,3% (10 minutos). Com o objetivo de inibir as ligações inespecíficas aos anticorpos utilizados, adicionou-se solução PBS/ Triton 0,1%/ BSA 5% por 50 minutos e em seguida o anticorpo primário nas seguintes diluições: anti-fosfo histona H3 (1:100, Upstate) desenvolvido em coelho e anti-Bcl2 (1:50, Chemicon) desenvolvido em camundongo. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário em câmara úmida na geladeira por dezesseis horas. Após lavados em PBS 0,1M (3 vezes por 5 minutos) e PBS/Triton 0,3% (2 vezes por 5 minutos), os cortes foram incubados com o anticorpo secundário anti-coelho e anti-camundongo conjugado a peroxidase IgG (Sigma) por três horas em temperatura ambiente. A fim de visualizar os sítios imunorreativos os cortes foram lavados em PBS/Triton 0,1% por 10 minutos e incubados em solução DAB 1%/ H₂O₂3%/ PBS por dois a cinco minutos até serem lavados com água destilada.

3.12. Marcação com TUNEL

A marcação com TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) foi utilizada para o reconhecimento de morte celular. O procedimento foi realizado utilizando o kit Fragel DNA Fragmentation Detection kit (Catalog # QIA 33, Calbiochem).

Os cortes foram desparafinizados, reidratados e lavados duas vezes em tampão Tris-salino (TBS) 20mM pH 7,4. Após, os cortes foram permeabilizados com proteinase K diluída em Tris 10 mM pH 8,0 (1:400), lavados em tampão TBS 20 mM e em seguida, lavados com metanol peróxido (9:1) para o bloqueio das peroxidases endógenas. Na sequencia destes procedimentos, os cortes foram preparados para a incubação com a enzima de marcação para TUNEL a 37 °C, tratados com DAB e contracorados com verde de metila. Finalmente, as lâminas foram montadas com Entelan® e observadas em microscópio de luz Olympus. Para os controles negativos foram seguidos os mesmos procedimentos, com omissão da enzima de marcação do TUNEL.

3.13. Análise das Lâminas

Os cortes sagitais do encéfalo nas diferentes técnicas foram analisados ao microscópio de luz (100X, 400X e 1000X) sob avaliação estereológica com gráticula ocular (Weibel nº 2, Tonbridge, England) em cinco campos visuais aleatórios (1000X).

3.14. Análise Estatística dos Dados

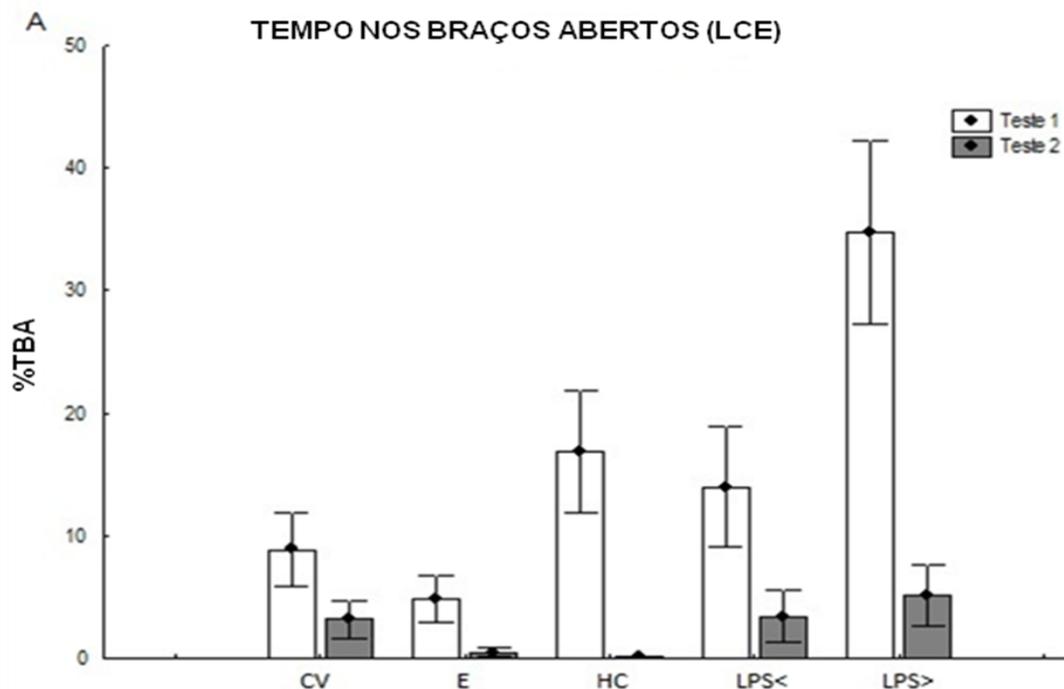
A produção de anticorpos anti-HC foi expressa com base na média geométrica e o intervalo de confiança, como sugerido em GASPAROTTO et. al. (2002). Estes dados foram submetidos a uma análise não-paramétrica ANOVA (teste de Kruskal-Wallis) seguido por teste Dunn para múltiplos pares da comparação de dados. Os testes comportamentais foram avaliados pela mesma técnica. Os dados relacionados à produção de anticorpos anti-LPS foram submetidos a análise ANOVA e pós teste Tukey. A enzima antioxidante foi expressa com base na média e desvio padrão e introduzida em análise de variância (3-vias ANOVA).

4. RESULTADOS

4.1. Comportamento no Teste do LCE

Os resultados da análise comportamental no teste do LCE (primeiro teste) demonstraram que a exposição ao estresse psicossocial ou biológico através da HC e LPS alterou o tempo de permanência nos braços abertos quando comparados ao grupo CV (Fig. 4A; Tabela1). Os camundongos do grupo submetido ao estresse de instabilidade social apresentaram menor tempo de permanência nos braços abertos comparado ao grupo controle, o que sugere a manifestação de um comportamento tipo-ansioso nestes animais ($p < .01$).

Os animais injetados com HC e LPS apresentaram um comportamento oposto, ou seja, permaneceram um tempo maior nos braços abertos quando comparados aos outros grupos. O mesmo padrão de resposta foi observado comparando-se o número de vezes em que os animais entraram nos braços abertos (Fig. 4B). De modo geral, o tempo de permanência nos braços abertos exibido pelos animais dos diferentes grupos experimentais foi menor no segundo teste comparado ao primeiro teste do LCE.



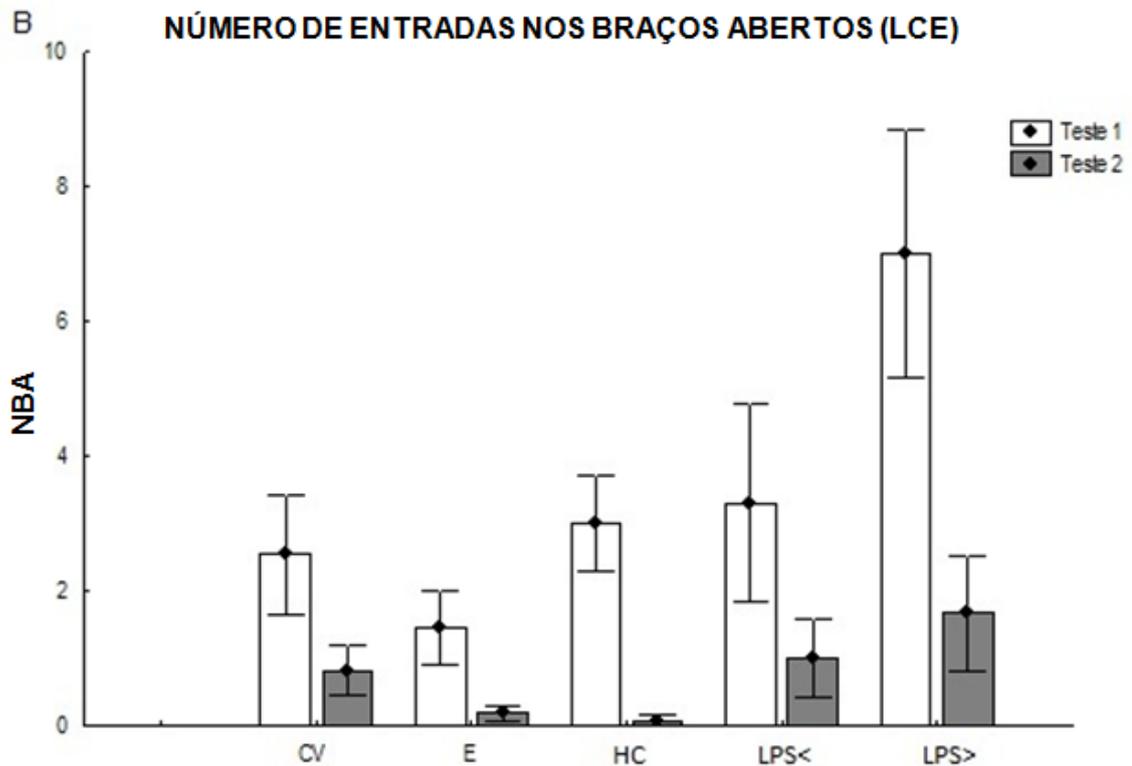


Figura 4. Comportamento nos braços abertos do LCE. A) Porcentagem do tempo nos braços abertos (%TBA). B) Número de entradas nos braços abertos (NBA). CV= grupo controle injetado com solução veículo; E= grupo estressado socialmente; HC= grupo injetado com Hemácia de Carneiro; LPS<= grupo injetado com a menor dose de LPS e LPS>= grupo de camundongos injetados com a maior dose de LPS. As barras brancas representam o primeiro teste no LCE e as barras cinzas representam o segundo teste no LCE, 24 horas após o primeiro teste.

Como esperado, o tempo de permanência nos braços fechados exibido pelos animais injetados com HC ou LPS foi inversamente proporcional ao tempo de permanência nos braços abertos. No primeiro teste do LCE, estes animais permaneceram um tempo menor nos braços fechados (Fig. 5, $p < .01$). O número de entradas nos braços fechados foi menor nos animais injetados com HC e LPS em relação aos animais dos grupos CV e E ($p < .01$).

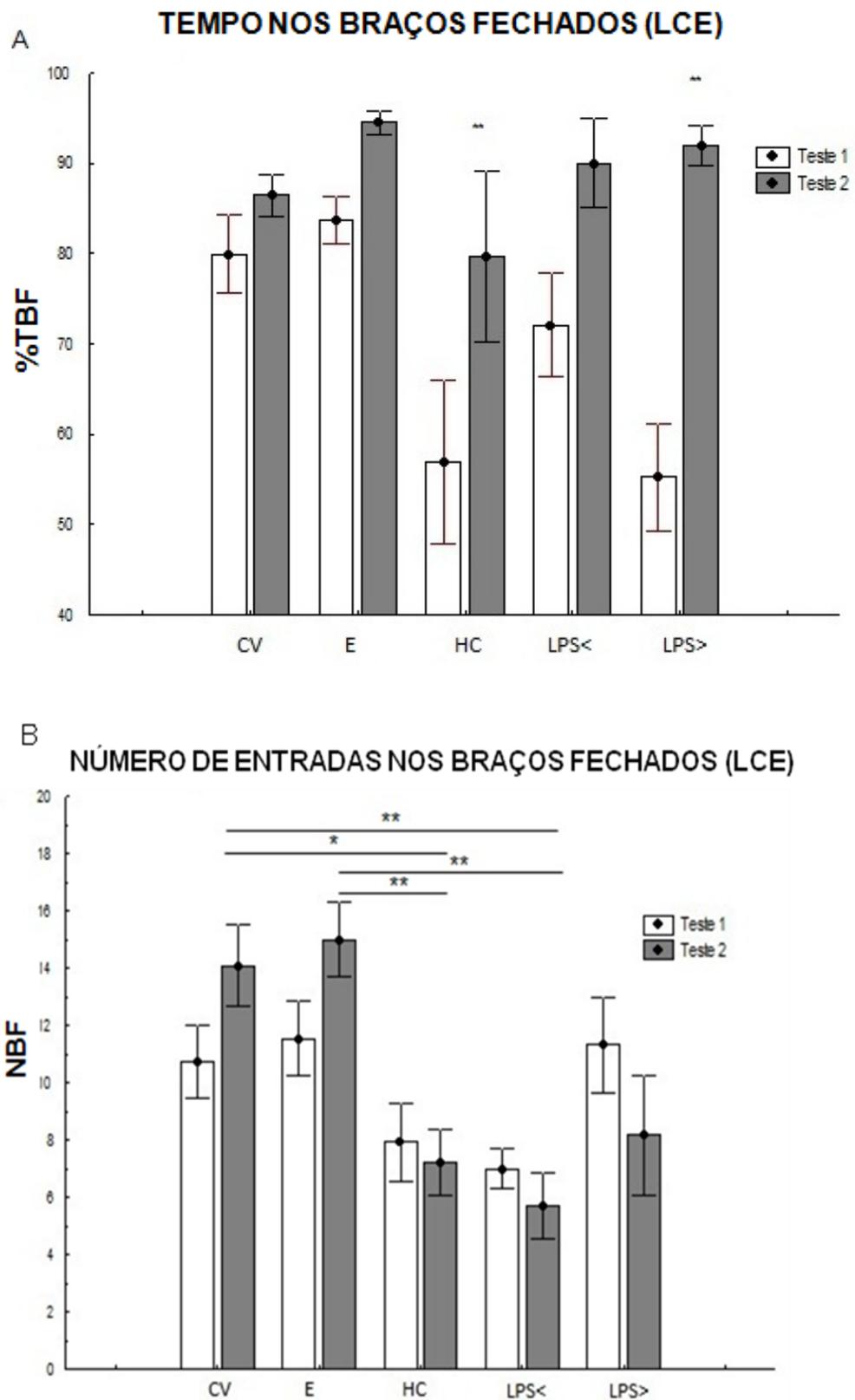
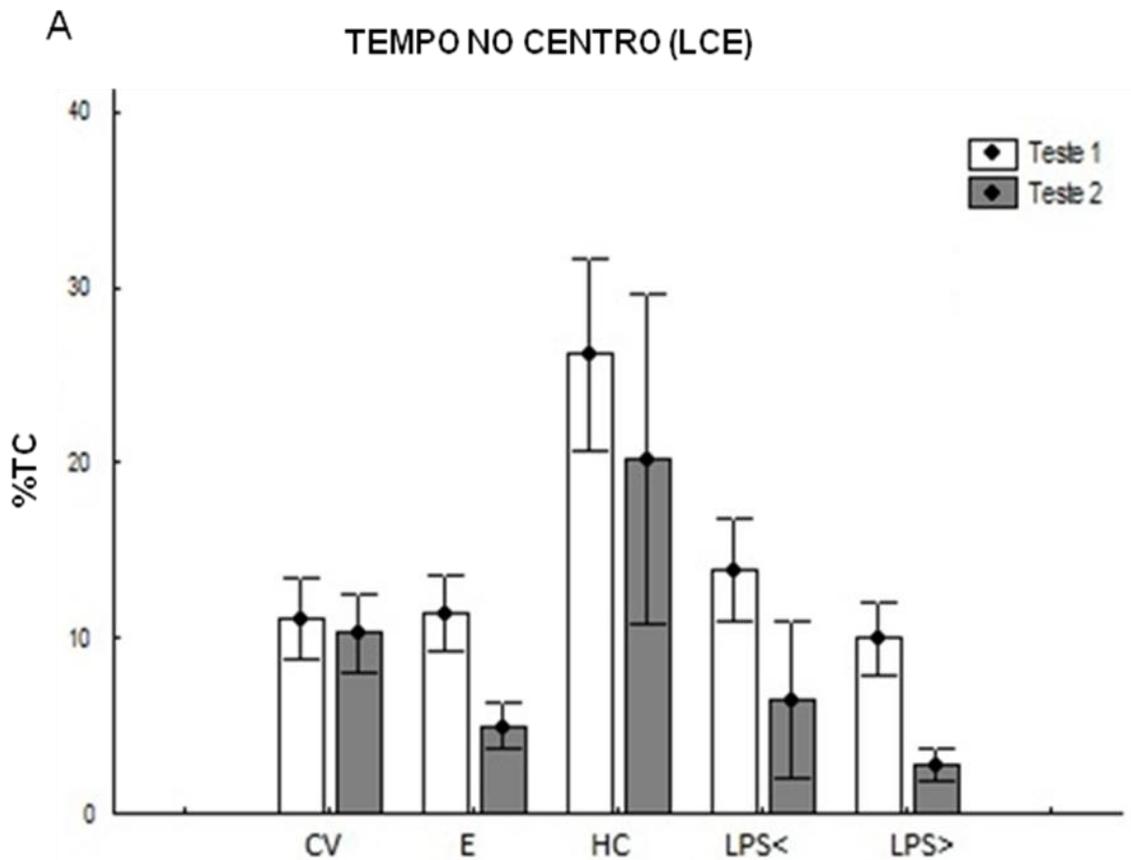


Figura 5. Comportamento nos braços fechados do LCE. A) Porcentagem do tempo nos braços fechados (%TBF). B) Número de entradas nos braços fechados (NBF). O * foi utilizado para comparar o primeiro e segundo teste em cada grupo. * indicam valores de $p < .05$ e ** indicam valores de p iguais ou maiores do que .01.

O tempo de permanência na área central do labirinto foi afetado na reexposição ao LCE (Fig. 6A) com significância estatística marginal ($p=.053$). No segundo teste do LCE foi possível verificar que todos os grupos experimentais, com exceção do grupo CV, apresentaram uma média de tempo menor de permanência no centro do labirinto. O mesmo ocorreu ao avaliarmos o número de entradas no centro, que foi menor no segundo teste (Fig. 6B, $p < .01$). Não foi considerado o tempo em que o animal atravessou o centro em direção aos braços do labirinto.



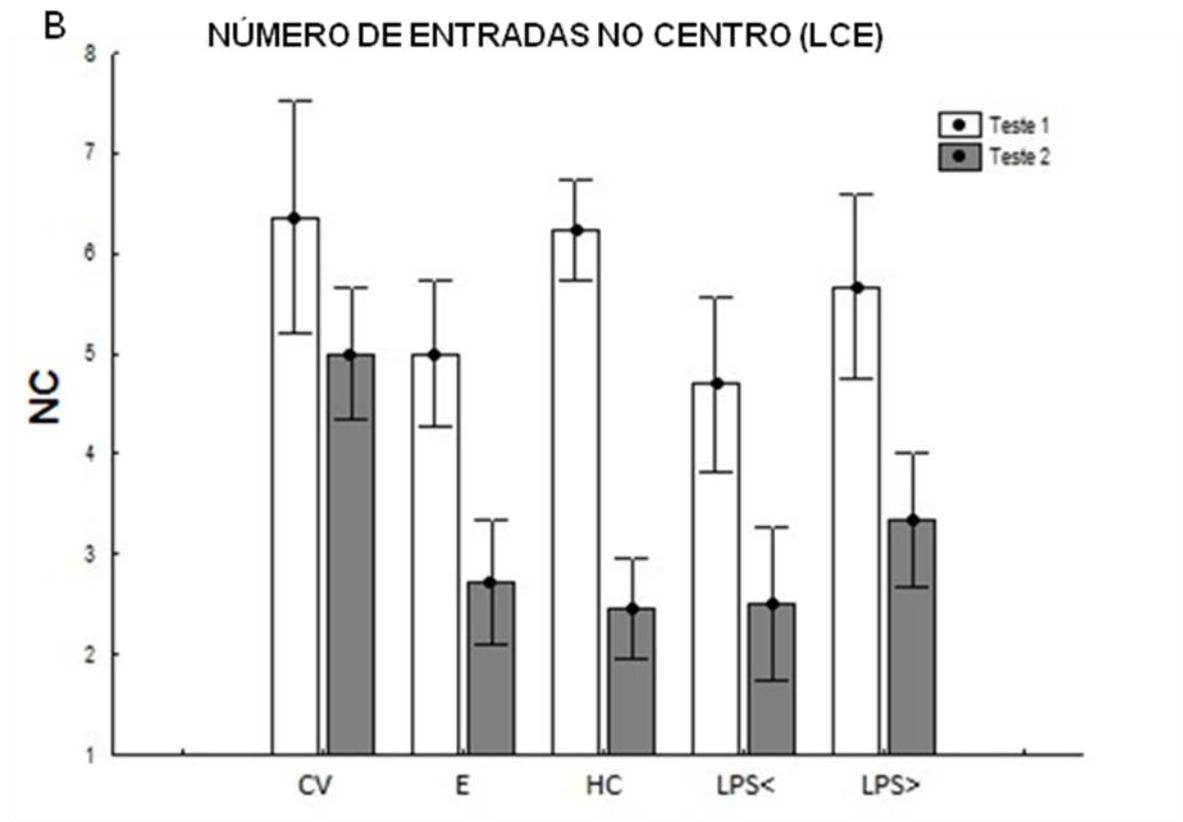
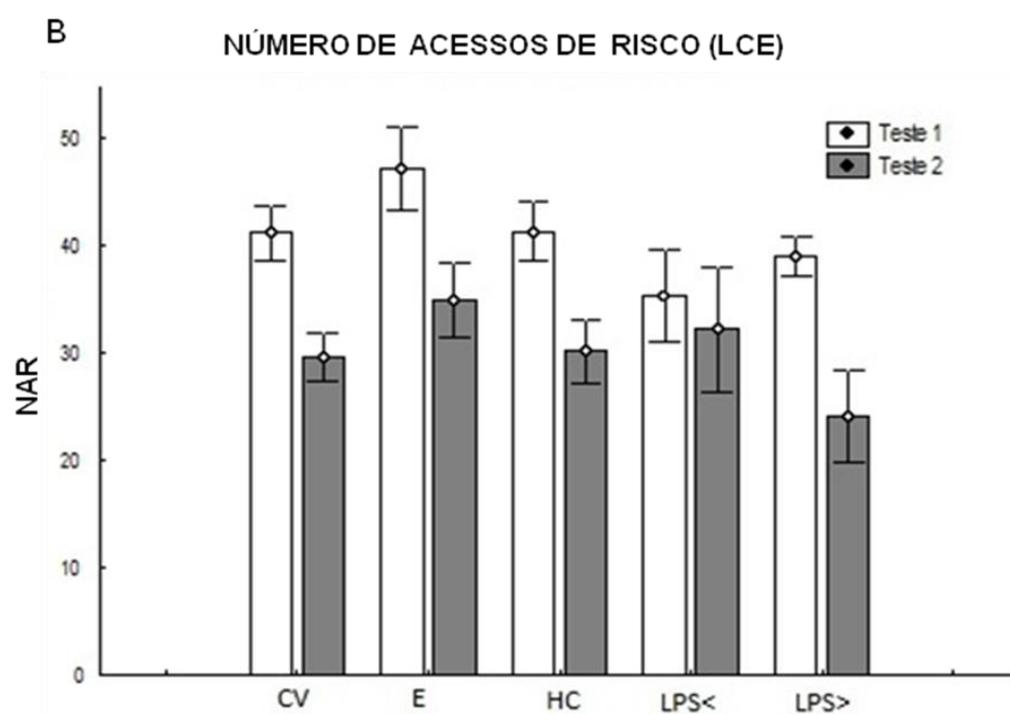
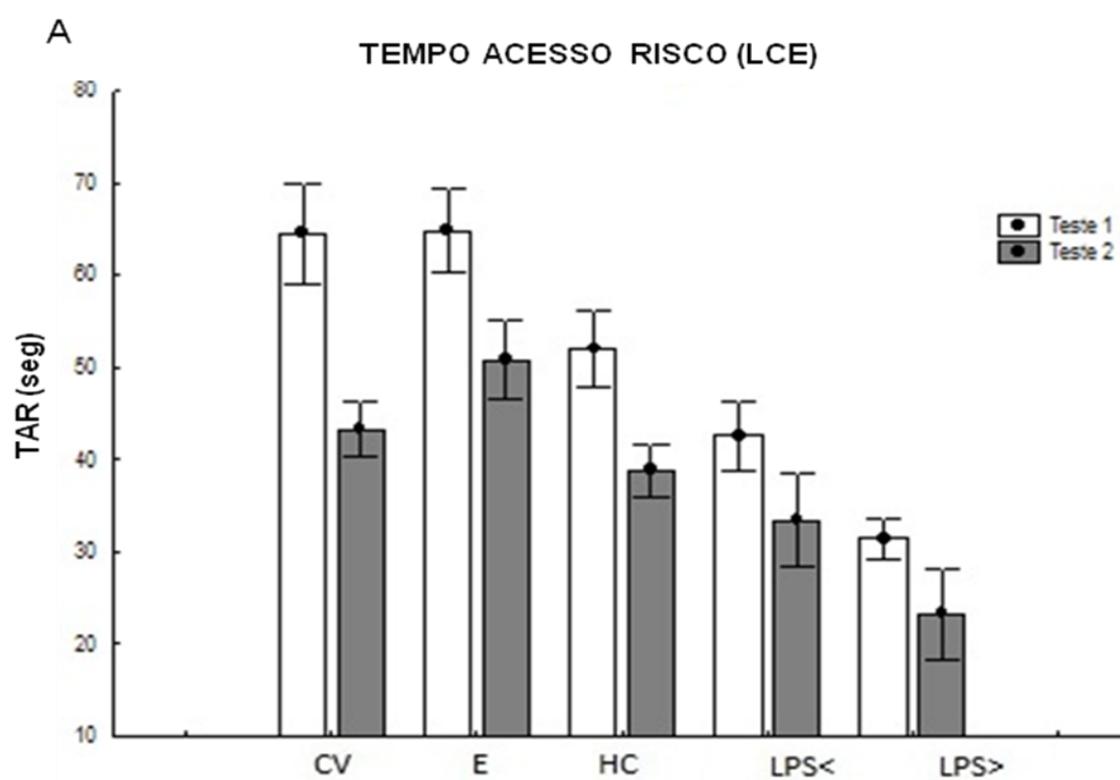


Figura 6. Comportamento na área central do LCE. A) Porcentagem de tempo na área central (%TC). B) Número de entradas na área central (NC).

4.2. Comportamento de Avaliação de Risco (AR) no LCE

Nos animais submetidos à injeção de HC e LPS foi observada uma redução na média do comportamento de AR em comparação aos animais controle e estressados psicossocialmente (Fig. 7, $p < .05$). Esta redução está presente tanto no primeiro quanto no segundo teste. Em todos os grupos observou-se diminuição da exibição do comportamento de AR no segundo teste ($p < .01$).

O número de acessos de risco exibido pelos animais apresentou diferença entre os testes ($p < .01$), porém não ocorreram alterações significativas entre os grupos ($p > .05$) (Fig. 7B). A relação entre o tempo e o número de acessos de risco (T/N), que identifica a duração dos episódios de risco exibidos pelos animais, indicou diferenças entre os tratamentos utilizados (Fig. 7C, $p < .01$). Os animais dos grupos submetidos à injeção de HC e LPS apresentaram episódios de avaliação de risco mais curtos comparado aos grupos controle e estressado psicossocialmente.



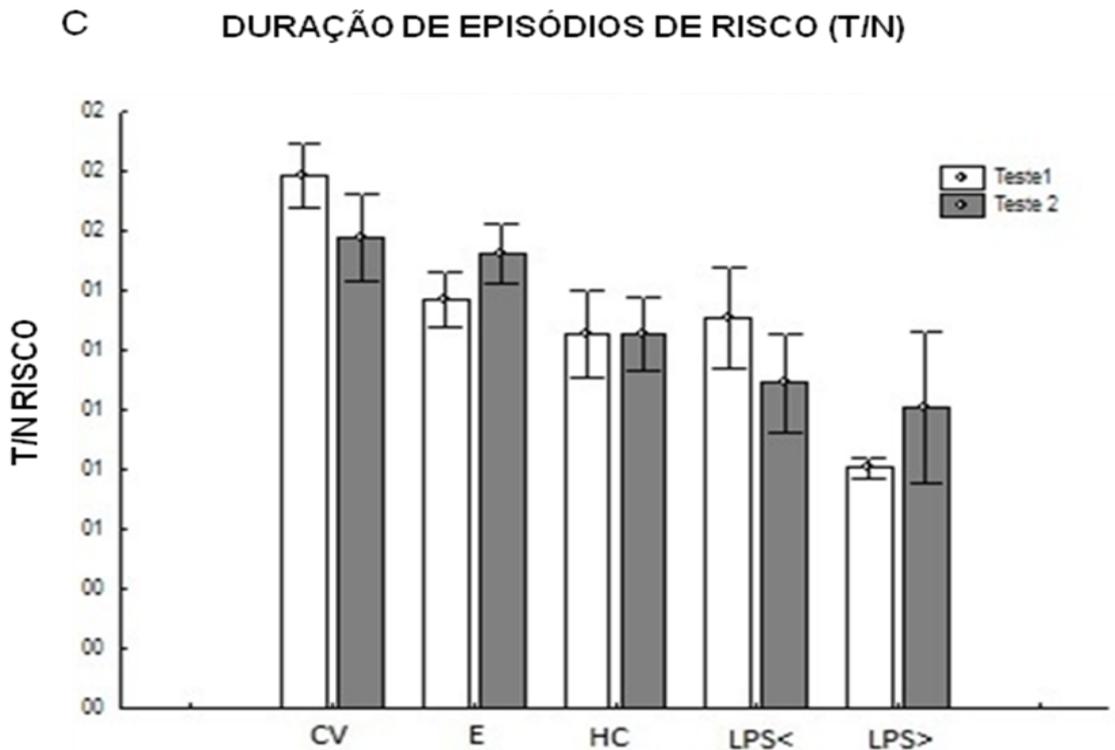


Figura 7. Comportamento de acesso de risco no LCE. A) Tempo de avaliação de risco exibido pelos animais no 1º e no 2º teste. B) Número de acessos de risco. C) Duração de episódios de acesso de risco obtidos com a relação entre o tempo e o número de acessos de risco (T/N).

Os comportamentos de AR no 1º teste e o tempo de permanência nos braços abertos no LCE são negativamente correlacionados. Os animais que apresentaram maior permanência nos braços abertos exibiram os menores índices do comportamento de avaliação de risco (Fig. 8). Esta relação confirma os dados obtidos com estes parâmetros, uma vez que comportamentos típicos de ansiedade se caracterizam por diminuição do tempo nos braços abertos e aumento de avaliação de risco.

A relação existente entre a duração dos episódios de risco e o tempo nos BA no primeiro teste também demonstrou dados contraditórios, uma vez que os animais que exibiram maior tempo de permanência nos braços abertos (indicativo de comportamento menos ansioso) exibiram episódios de avaliação de risco mais curtos (comportamento típico de ansiedade) (Fig. 9).

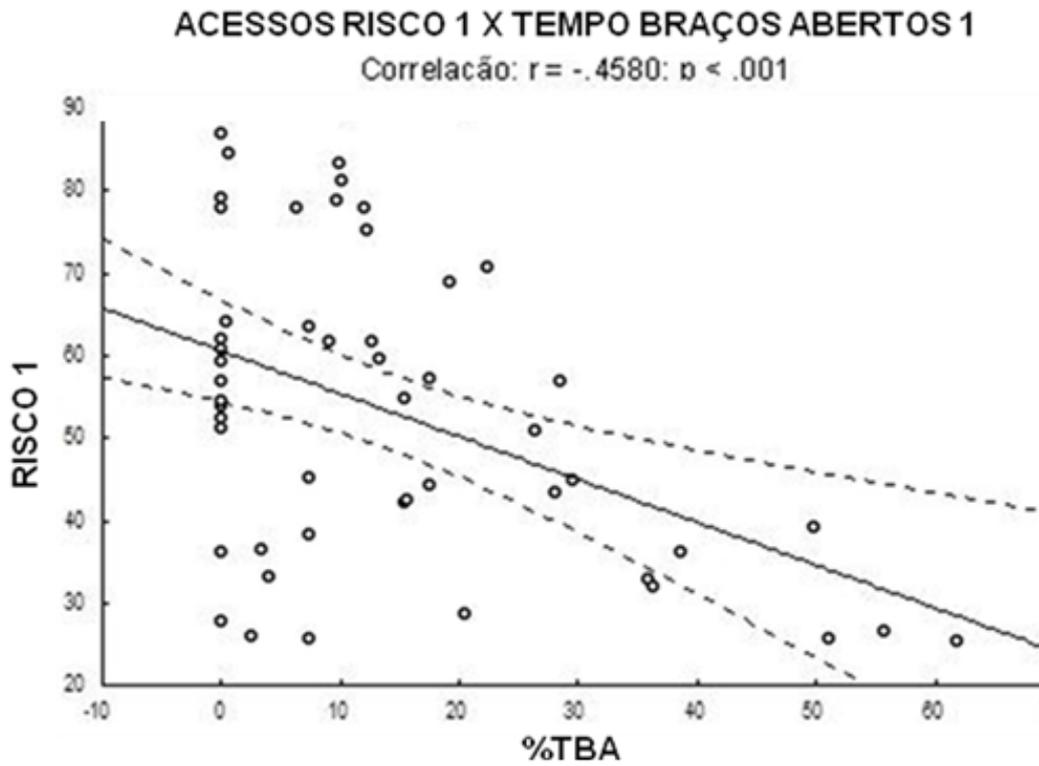


Figura 8. Correlação entre o tempo de avaliação de risco e o tempo de permanência nos braços abertos no primeiro teste do LCE.

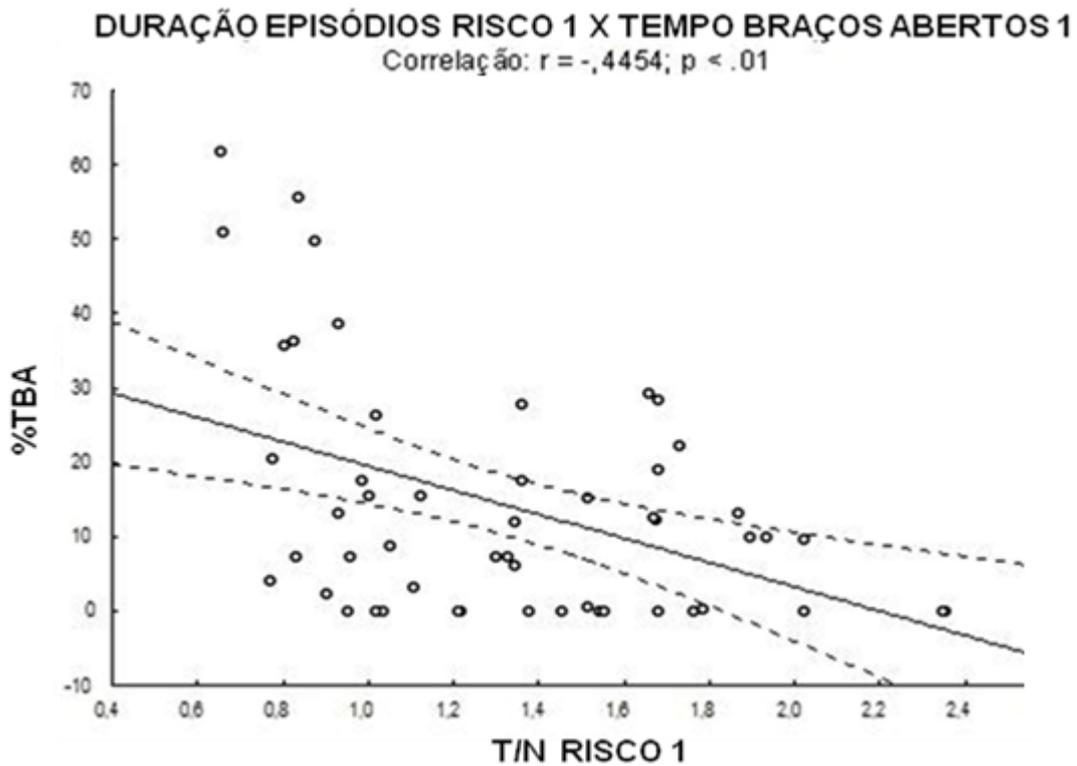


Figura 9. Correlação entre a duração de episódios de avaliação de risco (T/N) e o tempo de permanência nos braços abertos no primeiro teste do LCE (%TBA).

4.3. Atividade da Enzima Glutationa Redutase (GR)

A análise da atividade da GR demonstrou que no quinto dia após o início dos estressores todos os grupos apresentaram um decréscimo na atividade da GR no hipocampo (Fig. 10, $p < .01$).

Em todos os grupos, o córtex frontal apresentou menor atividade da GR em comparação à atividade observada no hipocampo. A atividade da GR no córtex frontal foi muito similar entre os grupos, com exceção do grupo injetado com HC em que a atividade da GR apresentou-se significativamente maior em relação aos outros grupos (Fig. 10, $p < .01$).

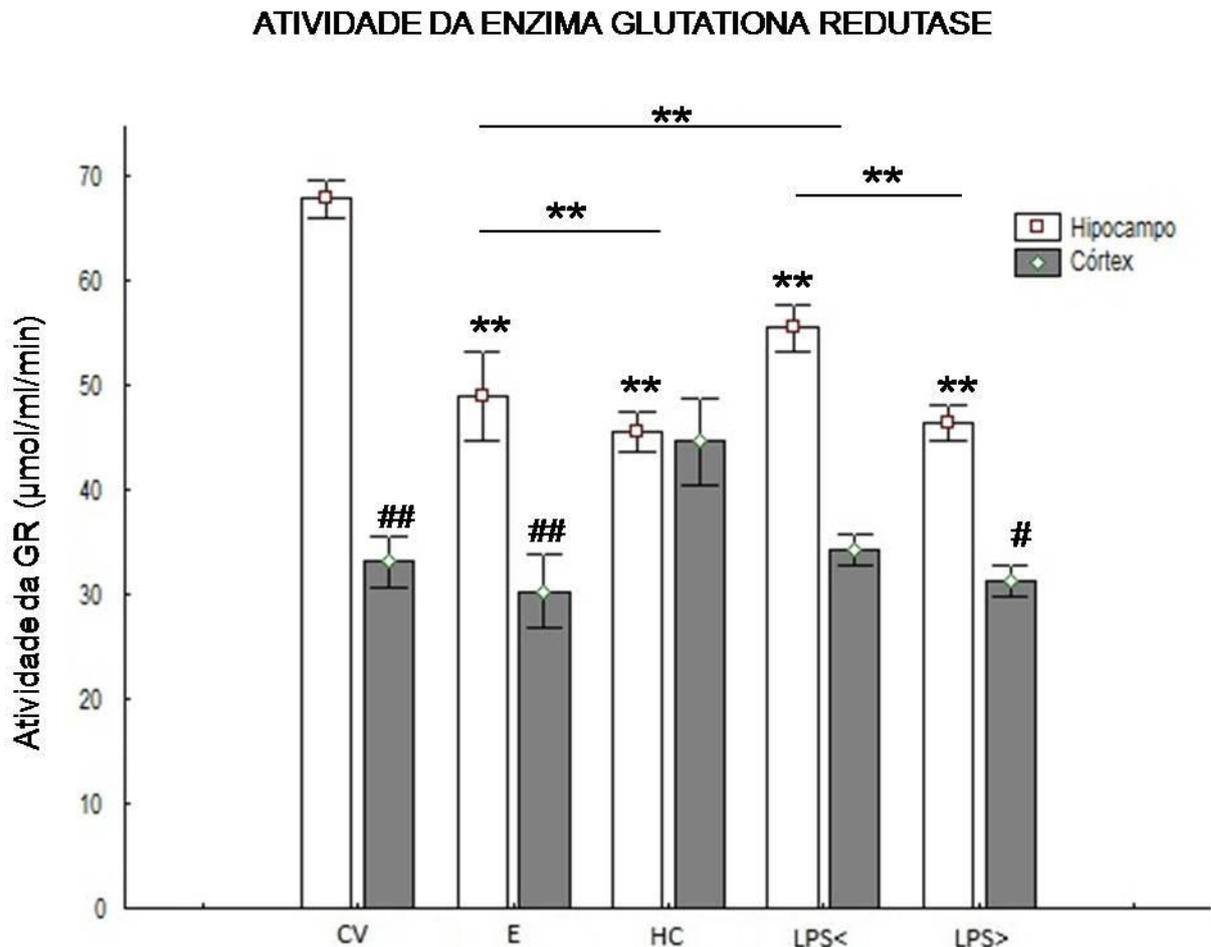


Figura 10. Atividade da enzima Glutationa Redutase (GR) no hipocampo e córtex frontal dos grupos avaliados. Os * sobre as barras que representam a atividade da GR no hipocampo (barras brancas) sinalizam diferenças estatísticas significantes com o grupo CV e os # sinalizam diferenças significantes entre a atividade da GR no hipocampo e córtex entre os grupos. A marcação única representa $p < .05$ e a dupla marcação $p < .01$.

A atividade da GR no hipocampo e o tempo de avaliação de risco na primeira exposição ao LCE apresentaram uma correlação positiva em que os animais com níveis elevados da atividade da GR apresentaram maiores índices de comportamento de avaliação de risco (Fig. 11).

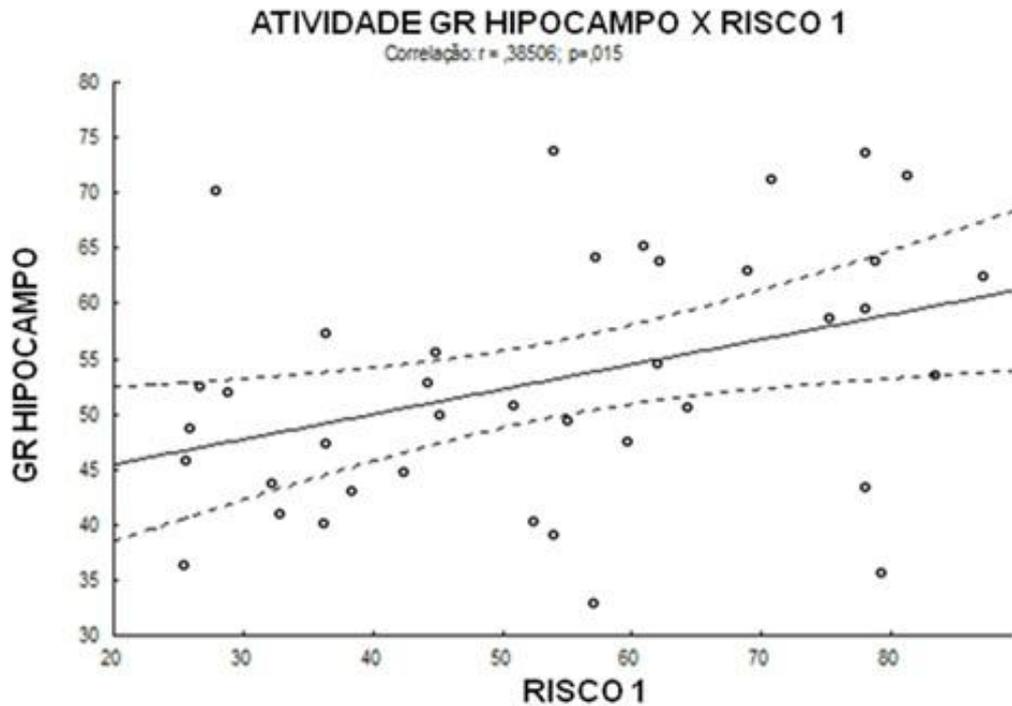


Figura 11. Correlação entre a atividade da GR no hipocampo e o tempo de comportamento de avaliação de risco no primeiro teste do LCE nos grupos avaliados.

Ao avaliarmos as correlações entre os níveis de atividade da GR e os comportamentos associados à ansiedade nos diferentes grupos observamos que no grupo CV a atividade da GR no hipocampo e córtex não se correlacionou com nenhum comportamento típico de ansiedade obtido no LCE.

No grupo estressado psicossocialmente, os animais que apresentaram maior permanência nos braços abertos, sugerindo menor ansiedade, apresentaram atividades elevadas da GR no hipocampo (Fig.12A). Esta correlação foi acompanhada pelo número de entradas nos braços abertos (Fig.12B). A atividade da GR no córtex frontal não se correlacionou com nenhum dado comportamental neste grupo.

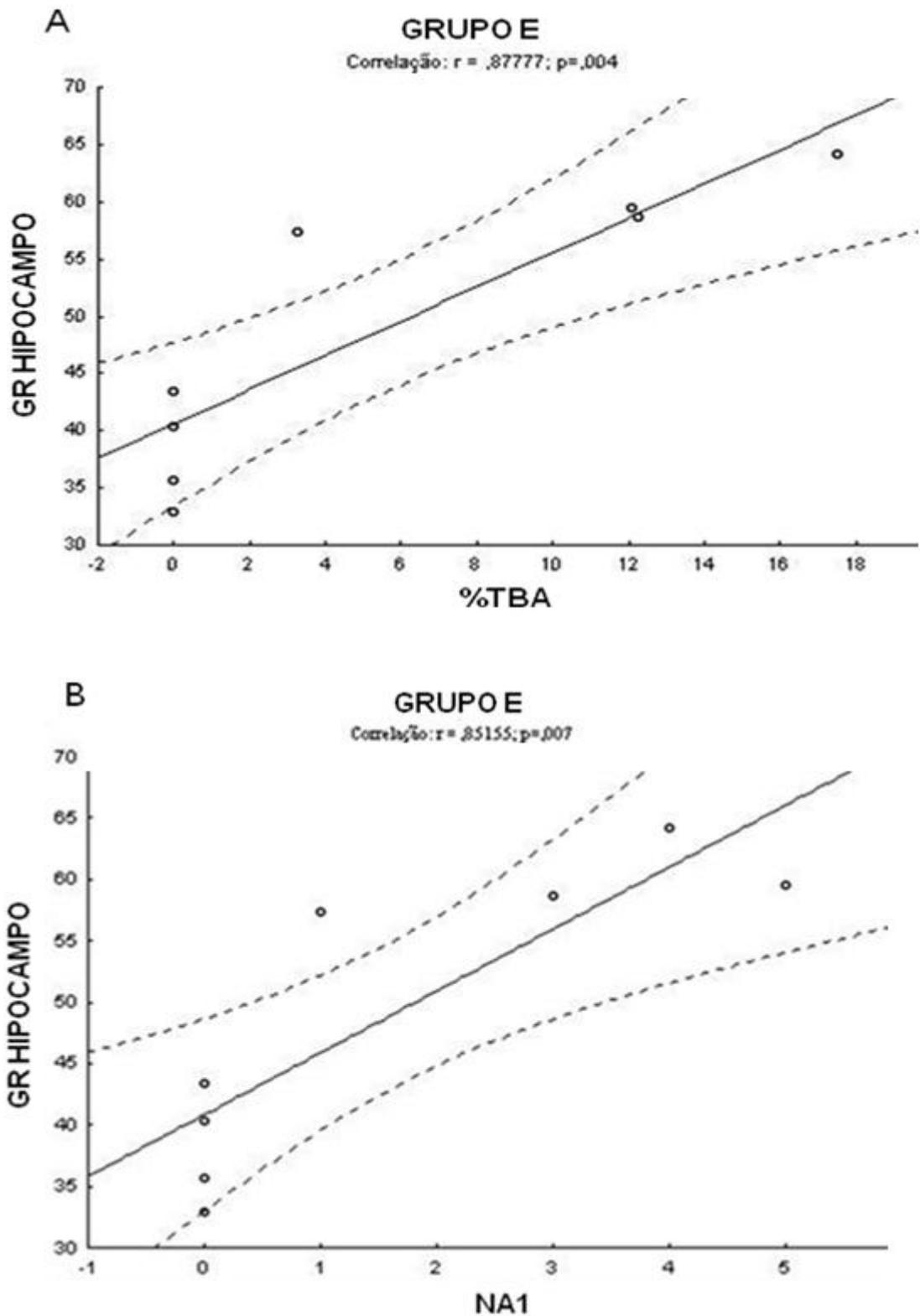
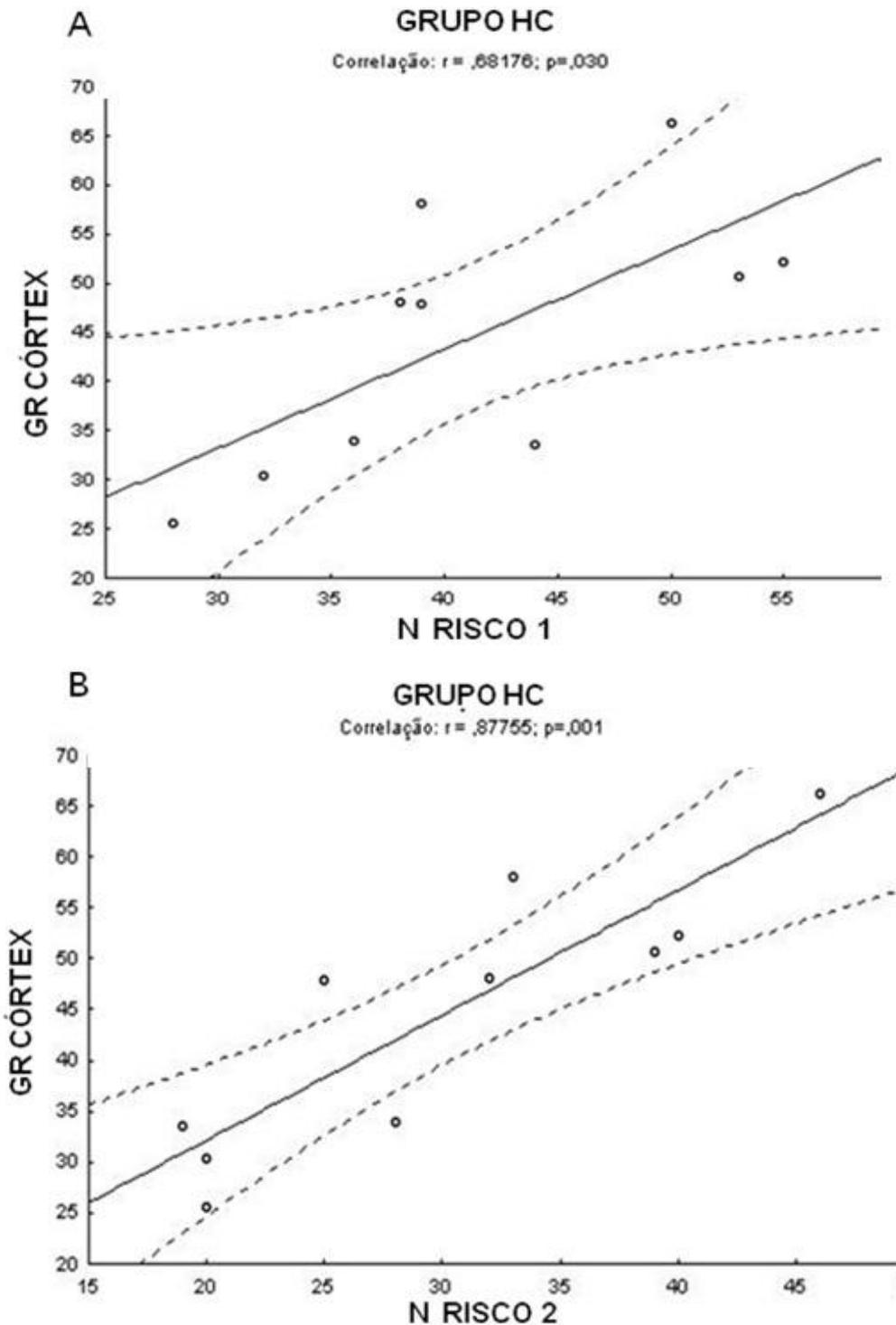


Figura 12. Correlação entre a atividade da GR e comportamentos de ansiedade nos animais estressados psicossocialmente. A) Correlação entre a atividade da GR no hipocampo e o tempo de permanência nos braços abertos (%TBA) no primeiro teste do LCE. B) Correlação entre a atividade da GR no hipocampo e o número de entradas nos braços abertos no primeiro teste do LCE (NA1).

Nos animais injetados com HC, entretanto, a atividade da GR encontrava-se elevada nos animais que apresentaram comportamento tipo-ansioso. Ao correlacionar a atividade da GR com o número de acessos de risco nos dois testes observa-se que os animais com a atividade da GR elevada apresentaram maior número de acessos de risco nos dois testes (Fig.13A e 13B). No hipocampo o mesmo quadro é observado quando a atividade da GR foi correlacionada com o tempo de acesso de risco (Fig.13C).



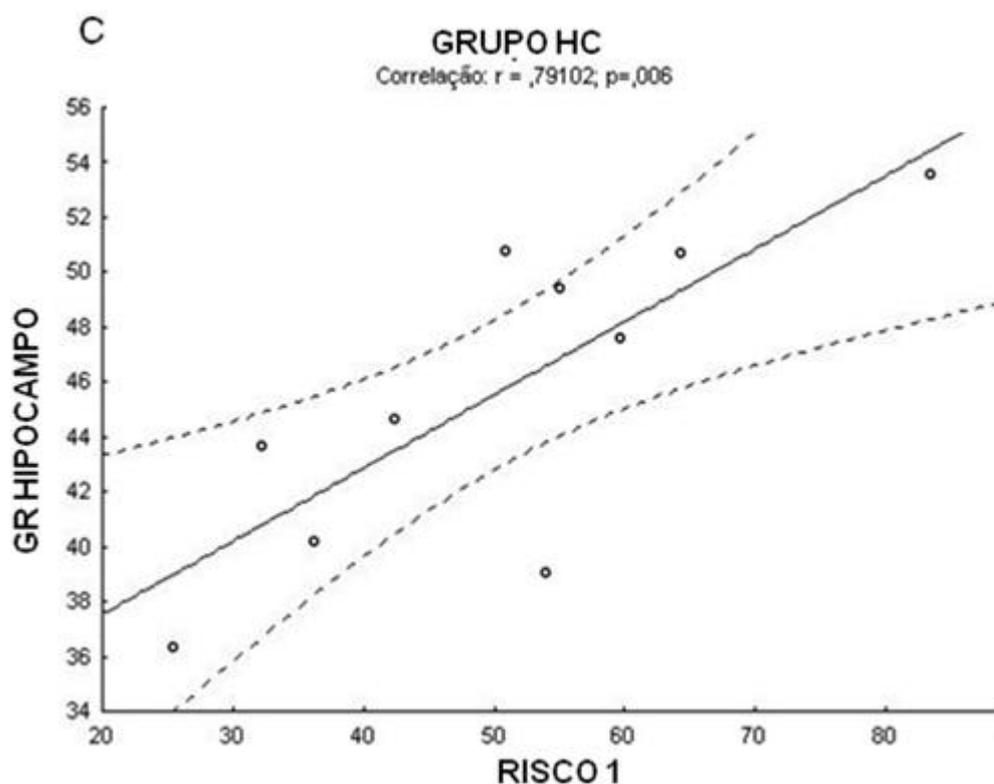
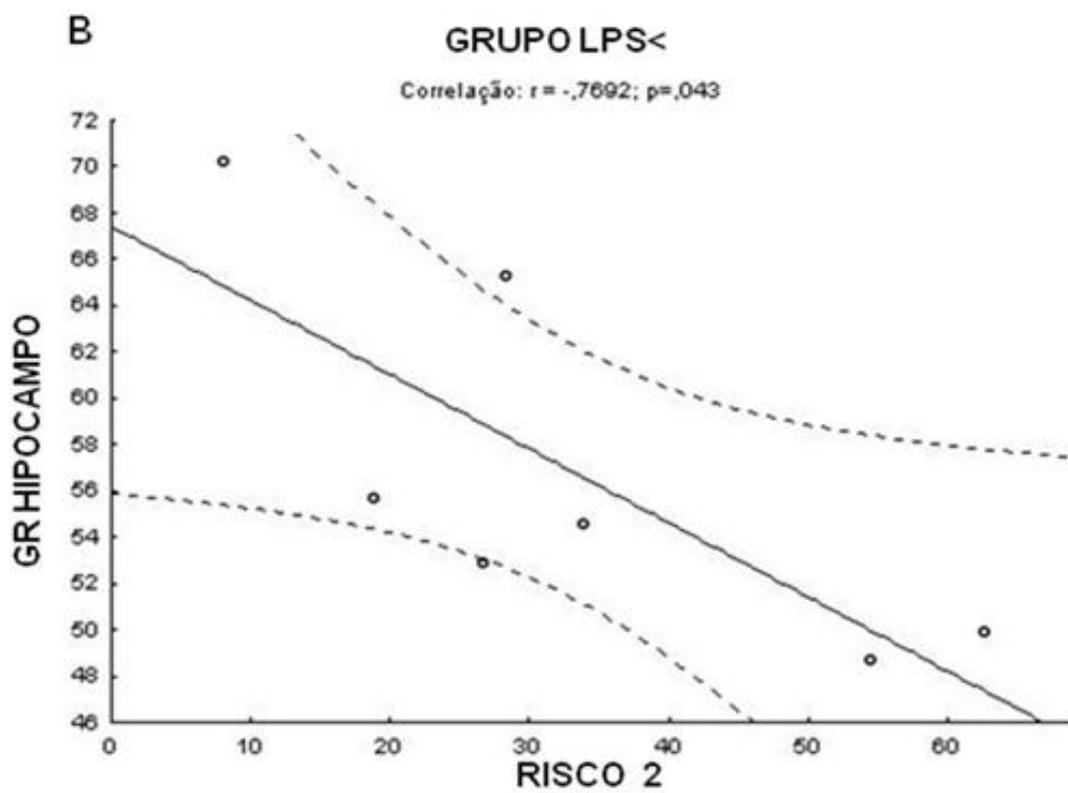
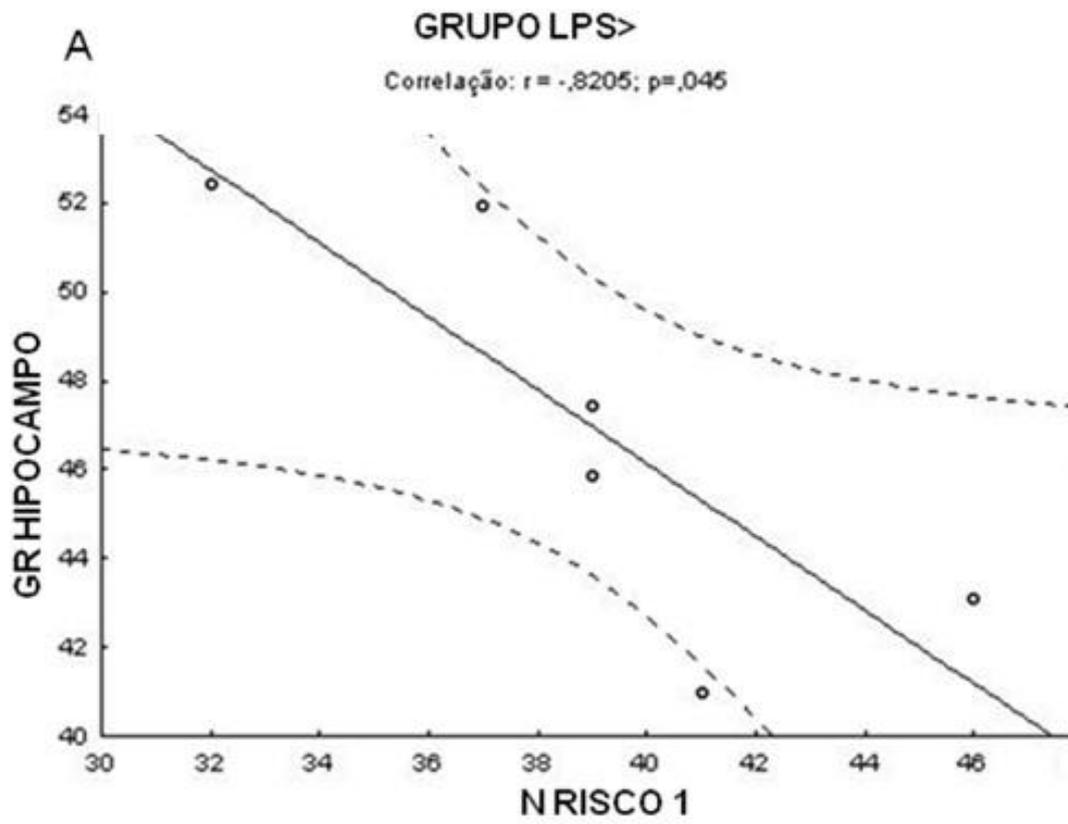


Figura 13. Correlação entre a atividade da GR e o comportamento de acesso de risco no LCE nos animais injetados com HC. (A) Atividade da GR no córtex e tempo de acesso de risco no primeiro teste do LCE. (B) Atividade da GR no córtex e tempo de acesso de risco no segundo teste. C) Atividade da GR no hipocampo e tempo de acesso de risco no primeiro teste.

Nos animais injetados com LPS, o acesso de risco correlacionou-se com a atividade da GR no hipocampo e no córtex sugerindo atividade elevada da GR nos animais menos ansiosos. No grupo injetado com a maior dose de LPS, os animais com a GR elevada apresentaram um número menor de acessos de risco no primeiro teste (Fig.14A). O grupo injetado com a menor dose de LPS apresentou o mesmo padrão no segundo teste, já que os animais com a GR elevada no hipocampo e no córtex apresentaram tempo menor de acesso de risco (Fig.14B e 14C). Entretanto, neste grupo a correlação da GR com o tempo nos braços abertos (%TBA) apontou em direção oposta com a atividade da GR elevada nos animais que exibiram menor tempo de permanência nos braços abertos (comportamento tipo-ansioso) (Fig.14D).

Desta forma, nos animais estressados psicossocialmente e injetados com LPS, a atividade elevada da GR correlacionou-se com os comportamentos menos ansiosos. Entretanto, nos animais injetados com HC a atividade da GR encontrou-se elevada nos animais que apresentaram comportamento tipo-ansioso.



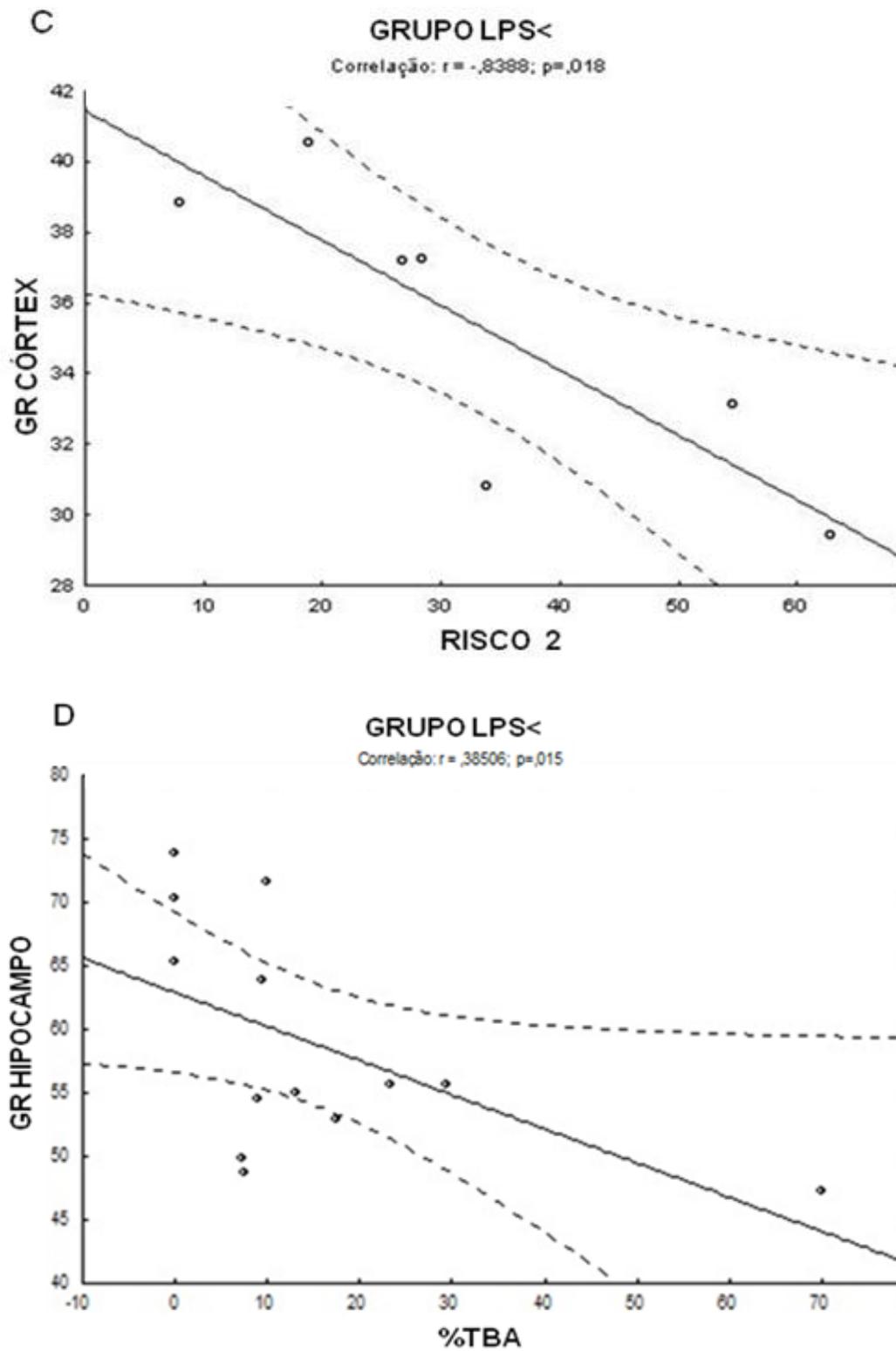


Figura 14. Correlação entre a atividade da GR e o comportamento no LCE dos animais injetados com LPS. (A) Atividade da GR no hipocampo e número de acessos de risco dos animais injetados com a maior dose de LPS no primeiro teste do LCE. (B) Atividade da GR no hipocampo e tempo de acesso de risco no grupo LPS< no segundo teste. (C) Atividade da GR no córtex e tempo de acesso de risco no grupo LPS< no segundo teste. (D) Atividade da GR no hipocampo e o tempo nos braços abertos no grupo LPS< no primeiro teste.

4.4. Produção de anticorpos anti-LPS

O ensaio utilizado para a detecção dos anticorpos dos animais injetados com LPS em maior e menor dose demonstrou que no quinto dia após a injeção, os animais do grupo injetado com a menor dose de LPS apresentaram níveis de anticorpos superiores ao grupo de animais controle e ao grupo de animais injetados com a maior dose de LPS (Fig. 15, $p < .01$).

No grupo injetado com a menor dose de LPS a produção de anticorpos apresentou uma correlação negativa com o número de acessos de risco exibido pelos animais deste grupo já que os animais com produção superior de anticorpos apresentaram menor número de acessos de risco (Fig. 16)

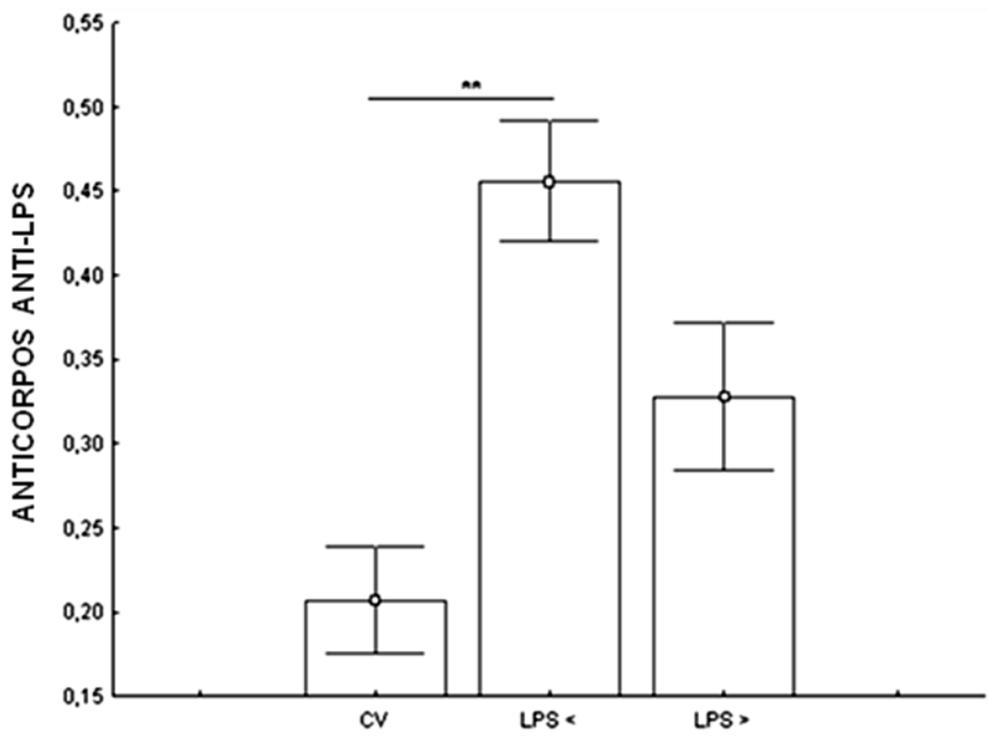


Figura 15. Produção de anticorpos anti-LPS mensurada por ELISA nos animais controle injetados com solução veículo (CV), injetados com a dose menor de LPS (LPS<) e injetados com a dose maior de LPS (LPS>).

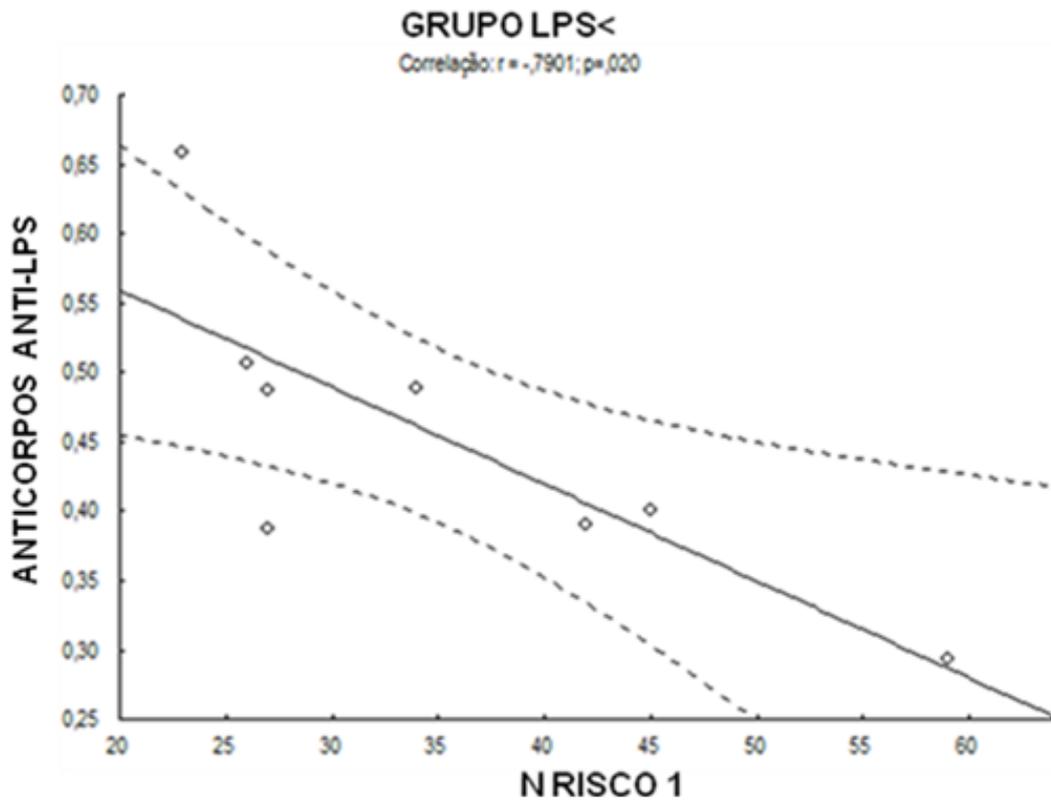


Figura 16. Correlação entre a produção de anticorpos anti-LPS e o número de acessos de risco no LCE no grupo injetado com a menor dose de LPS.

4.5. Análise Histológica

A análise histológica realizada nos grupos avaliados não indicou a presença de marcação positiva após avaliação da técnica imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-fosfohistona H3 (marcador de células em divisão celular) e anti-Bcl2 (proteína presente na via apoptótica), bem como pela técnica de TUNEL (marcador de fragmentação de DNA) como evidenciado na figura 17. Desta forma, não houve indícios de alterações nos processos apoptóticos e neurogênicos no hipocampo e no córtex frontal quando avaliado o sexto dia após a submissão dos animais aos estressores utilizados.

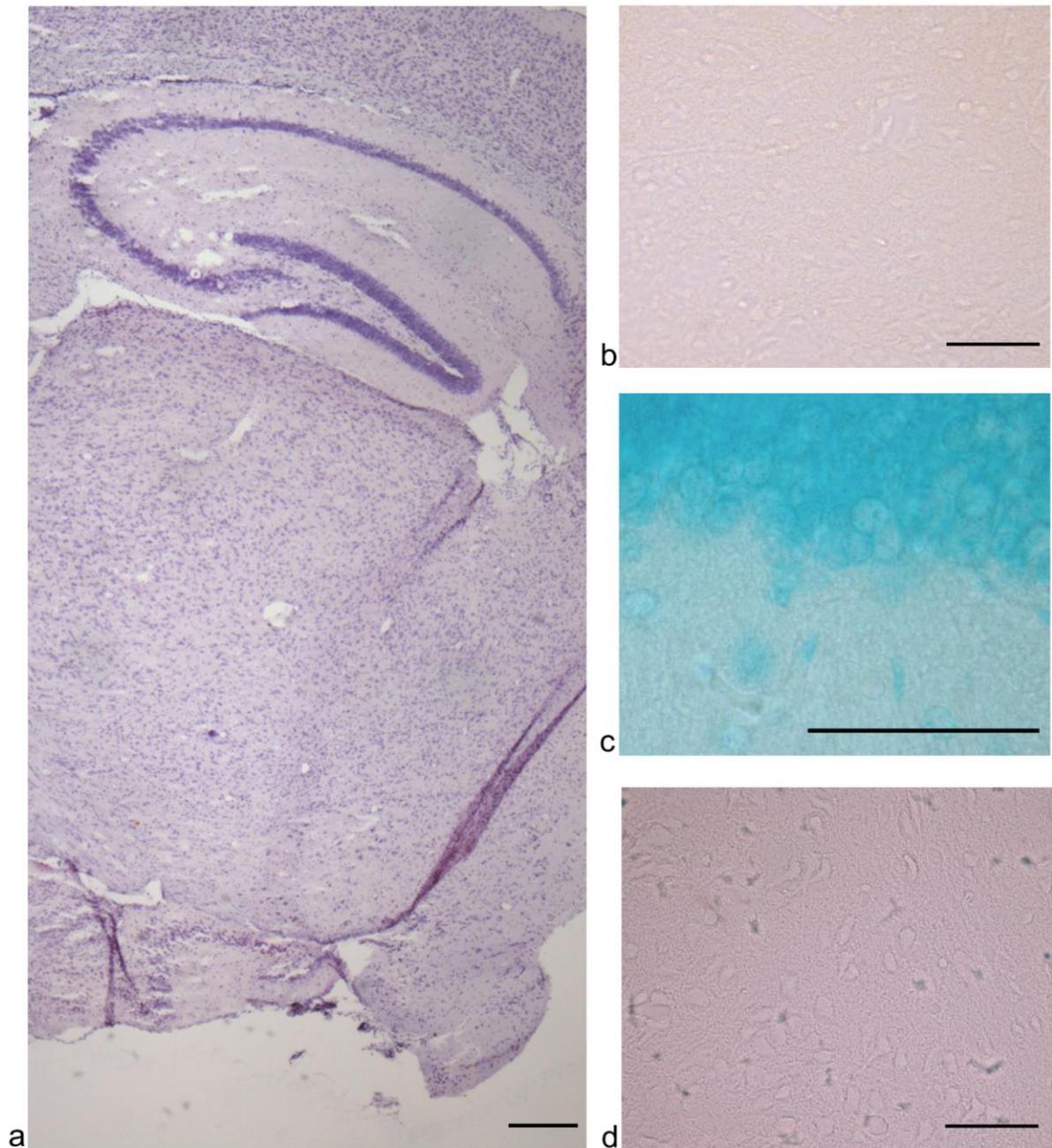


Figura 17. Secções sagitais de cérebros de camundongos. A) coloração Hematoxilina-Eosina, grupo controle. B) imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-fosfohistona H3, grupo injetado com HC. C) marcação de TUNEL, grupo injetado com HC. D) imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-Bcl-2, grupo estressado psicossocialmente. Escala: a= 200 μ m; b, c, e d= 50 μ m.

Tabela 1. Análise estatística do comportamento no LCE. MS= Marginalmente significativa. ÍNDICE p = Nível p aceito como significativo (* e **) ou NS= Não significativa, Tto=Tratamento.

FATOR	EFEITO	ANOVA	ÍNDICE p
%TBA	Tto	F(4,46)=5,44; p < .01	**
	Teste	F(1,46)=41,25; p < .01	**
	Tto X Teste	F(4,46)=3,95; p > .05	NS
NA	Tto	F(4,46)=3,90; p < .01	**
	Teste	F(1,46)=31,01; p < .01	**
	Tto X Teste	F(4,46)=1,64; p > .05	NS
%TBF	Tto	F(4,45)=2,36; p > .05	NS
	Teste	F(1,46)=52,00; p < .01	**
	Tto X Teste	F(4,46)=3,36; p < .05	*
NF	Tto	F(4,46)=8,10; p < .01	**
	Teste	F(1,46)=0,21; p > .5	NS
	Tto X Teste	F(4,46)=3,29; p < .05	*
%TC	Tto	F(4,46)=2,38; p > .05	NS
	Teste	F(1,46)=8,56; p =.53	MS
	Tto X Teste	F(4,46)=44,16; p > .5	NS
NC	Tto	F(4,46)=1,80; p > .05	NS
	Teste	F(1,46)=33,91; p < .01	**
	Tto X Teste	F(4,46)=1,14; p > .05	NS

Tabela 2. Análise estatística do comportamento de avaliação de risco no LCE. MS= Marginalmente significativa. ÍNDICE p = Nível p aceito como significativo (* e **) ou NS= Não significativa, Tto=Tratamento.

FATOR	EFEITO	ANOVA	ÍNDICE p
Risco (T)	Tto	F(4,46)=3,043; p < .05	*
	Teste	F(1,46)=39,17; p < .01	**
	Tto X Teste	F(4,46)= 2,12; p > .05	NS
Risco (N)	Tto	F(4,35)=1,82; p > .05	NS
	Teste	F(1,35)=41,01; p < .01	**
	Tto X Teste	F(4,35)=1,37; p > .05	NS
T/N Risco	Tto	F(4,35)=5,15; p < .01	**
	Teste	F(1,35)=0,39; p > .05	NS
	Tto X Teste	F(4,35)= 1,50; p > .05	NS

5. DISCUSSÃO

A aprendizagem no LCE envolve a memória espacial com a distinção entre os braços abertos e fechados do labirinto e a memória emocional, uma vez que as áreas que potencialmente oferecem perigo, especialmente nos braços abertos, geram medo no animal (DAL-CÓL et al., 2003). Desta forma, a avaliação da aquisição de esquiva dos braços abertos possibilita a análise da memória emocional adquirida durante o teste (FILE, 1993).

No presente estudo, o perfil comportamental exibido pelos animais do grupo controle no segundo teste está de acordo com os dados da literatura que demonstram que a experiência prévia ao LCE promove uma redução gradual da atividade exploratória nos braços abertos, caracterizando a aquisição da resposta de esquiva (PELLOW et al., 1985; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000).

A exposição ao estresse psicossocial e a injeção com HC e LPS alteraram o tempo de permanência dos animais nos braços abertos na primeira exposição ao LCE em relação ao grupo controle. Os animais estressados psicossocialmente apresentaram menor tempo de permanência nos braços abertos em relação ao grupo controle, sugerindo um comportamento tipo-ansioso. Estes dados estão de acordo com a literatura, que demonstram a ação da resposta ao estresse de origem psicossocial na indução de comportamento típico de ansiedade (GASPAROTTO et al., 2005). Em contrapartida, os animais injetados com HC e LPS apresentaram maior permanência nos braços abertos em comparação aos animais dos grupos CV e estressados psicossocialmente.

Neste estudo, os animais injetados com HC e LPS apresentaram uma redução no comportamento de AR comparado aos outros grupos. O tempo de permanência nos braços abertos e o comportamento de avaliação de risco no LCE sugerem que os animais injetados com HC e LPS estavam menos ansiosos em relação aos animais controle e estressados psicossocialmente. Contudo, estudo anterior demonstrou que a injeção de HC associou-se à indução de ansiedade (GASPAROTTO et al., 2005). Adicionalmente, sabe-se que o LPS induz alterações referidas como “comportamento doentio” que incluem letargia, depressão do comportamento social e exploratório assim como a indução de comportamentos típicos de ansiedade avaliados no teste do LCE (LACOSTA et al., 1999). Entretanto, no presente estudo as avaliações comportamentais foram realizadas no quinto dia após a injeção de LPS ou HC e

pode haver a possibilidade de que as manifestações comportamentais associadas à ansiedade demandem um período maior de tempo para se manifestarem.

Durante a resposta imune primária níveis de IL-1 podem estimular estruturas cerebrais como o locus cerúleo e núcleo central da amígdala e a ação destas estruturas pode promover respostas de estados de alerta (BERKENBOSCH et al, 1991) que em altos níveis podem levar à ansiedade (REDMOND & HUANG, 1979). Neste processo, após um estímulo imunogênico, o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona eleva o nível do CRH que age sobre o locus cerúleo e amígdala (BUTLER et al., 1990).

No quadro geral dos grupos, os animais que exibiram maior permanência nos braços abertos apresentaram menor expressão de comportamento de AR. Esses dados confirmam a relação entre os parâmetros comportamentais observados neste estudo, uma vez que um comportamento tipo-ansioso caracteriza-se pela diminuição do tempo nos braços abertos e aumento do comportamento de AR.

Em todos os grupos houve um decréscimo do comportamento de AR na segunda exposição comparado à primeira exposição ao LCE. De fato, vias cognitivas relacionadas ao aprendizado ocorrido no primeiro teste interferem no segundo teste e o animal, que apresenta diminuição na motivação em explorar os braços abertos do labirinto, apresenta diminuição no comportamento de avaliação de risco (BLANCHARD et al., 1991).

A relação entre a duração de episódios de risco (T/N) e o tempo de permanência nos braços abertos apresentou dados contraditórios uma vez que os animais que permaneceram mais tempo nos braços abertos (sugerindo comportamento menos ansioso) exibiram episódios de AR mais curtos (sugerindo comportamento típico de ansiedade). Este padrão permanece nas correlações realizadas nos diferentes grupos. Embora a avaliação da duração de episódios de risco (T/N) seja utilizada como parâmetro de comportamentos típicos de ansiedade no LCE (BLANCHARD et al., 1991), em nosso estudo os animais com menores índices de comportamento tipo-ansioso nos outros parâmetros obtidos no LCE, como o tempo nos braços abertos e o tempo de avaliação de risco, apresentaram episódios de risco mais curtos. Desta forma, podemos questionar a validade da utilização deste parâmetro na avaliação de comportamentos associados à ansiedade no LCE através dos protocolos utilizados neste trabalho.

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 glutatona (GHIZONI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2008; SAHIN & GÜMÜSLÜ, 2004). Além disso, os GCs são efetivos em aumentar a vulnerabilidade a insultos metabólicos em diferentes regiões cerebrais, particularmente no hipocampo, possivelmente por diminuir a capacidade de defesa neuronal. O prejuízo das defesas enzimáticas no hipocampo, córtex e cerebelo tem sido reportado como possíveis componentes dos danos neurais mediados por GCs (MCINTOSH et al., 1998).

Sabe-se que o sistema imune e antioxidante são inter-relacionados. As citocinas podem estimular a produção de EROs e, em contrapartida, sua participação em vias celulares é modulada por seu estado redox, e este pode ser influenciado por EROs e seus agentes tióis associados. As citocinas podem afetar a reciclagem e transporte da glutatona e antioxidantes e precursores da glutatona têm demonstrado regular a síntese e ativação de citocinas (HADDAD & HARB, 2005). A crescente evidência de que a atividade imune influencia as funções nervosas suporta seu papel na regulação da cognição, afecção e comportamento e, desta forma, o sistema imune tem sido associado à etiologia de desordens afetivas e de humor como a depressão (SIMMONS & BRODERICK, 2005).

Nos processos de detoxificação de EROs, a glutatona é oxidada (GSSG) e a enzima GR catalisa a sua redução à GSH restaurando seus níveis no tecido. Desta forma, a avaliação da atividade enzimática da GR constitui um indicativo indireto da resposta antioxidante a um determinado insulto. BARKER et al. (1996) demonstrou que a depleção da glutatona leva à redução da atividade da GR. Adicionalmente, o aumento do estresse oxidativo, que pode inibir esta enzima e conseqüentemente aumentar a suscetibilidade ao estresse oxidativo, leva a um ciclo de eventos oxidativos que podem se tornar deletérios.

No presente estudo observou-se que os animais submetidos aos estressores de natureza psicossocial e biológica (HC e LPS) apresentaram diminuição na atividade da enzima GR no hipocampo, demonstrando o efeito destes estímulos no sistema antioxidante deste tecido. A diminuição na atividade da GR ocorre possivelmente por estar sendo consumida no processo de regeneração da glutatona. Além disso, a atividade da GR pode decair em decorrência de sua inibição em processos de estresse oxidativo (BARKER et al., 1996)

No córtex a atividade da GR apresentou-se mais baixa em relação ao hipocampo em todos os grupos. Os animais injetados com HC foram os únicos a apresentarem alteração da

atividade da GR no córtex e ao contrário do que ocorreu no hipocampo, a atividade da GR estava elevada em relação aos outros grupos. A elevação na atividade da GR neste tecido sugere que o tratamento com HC induziu uma resposta do sistema antioxidante e o aumento da demanda da produção desta enzima.

Estudos têm demonstrado que a vulnerabilidade ao estresse oxidativo no cérebro é regionalmente específica (BAEK et al., 1999). MANOLI et al. (2000) avaliou a presença de estresse oxidativo induzido por vários modelos de estresse crônico em distintas regiões do cérebro de ratos e evidenciou que o aumento da lipoperoxidação ocorreu de forma diferenciada no córtex, hipotálamo e hipocampo. Esta regionalidade pode ser atribuída a diferenças na atividade de enzimas antioxidantes nessas áreas (ARNAIZ et al., 1998). Entretanto, observou-se que a formação de estresse oxidativo após distintos insultos e a vulnerabilidade regional não segue um padrão (MANOLI et al., 2000). Outro fator que explica a maior suscetibilidade do hipocampo aos efeitos do estresse é o fato deste possuir maior densidade de receptores GCs comparado a outros tecidos (FUCHS et al., 2001).

Ao correlacionarmos à atividade da GR no hipocampo e o tempo de AR observamos uma tendência dos animais com a atividade elevada da GR apresentarem maiores índices de comportamento de avaliação de risco.

Ao avaliarmos a correlação entre os níveis de ansiedade e a atividade da GR observamos diferenças entre os grupos. Nos animais estressados psicossocialmente e injetados com LPS as correlações foram semelhantes com a atividade elevada da GR associada aos animais que apresentaram menores índices de comportamento ansioso. Nos animais injetados com HC foi possível observar uma correlação positiva entre os níveis elevados da atividade da GR e comportamento tipo-ansiedade.

A indução de estresse através da injeção de HC e LPS promove a ativação de diferentes respostas, dado que a HC envolve a ativação de uma resposta imune T-dependente e o LPS induz uma resposta do tipo T-independente. Estas respostas produzem diferentes citocinas e conseqüentemente diferentes vias neurais são ativadas.

A administração periférica de LPS estimula a produção de TNF- α , IL-1 e IL-6. Sabe-se que estas citocinas podem evocar respostas do eixo HPA como a transcrição de CRH no núcleo paraventricular e a liberação de CRH e ACTH na circulação. O LPS pode ativar regiões cerebrais como o hipotálamo, hipocampo, CPF e o núcleo central da amígdala

(AKASAKAA et al., 2006). Adicionalmente, demonstrou-se que a injeção de HC afeta estruturas como o hipocampo, núcleo paraventricular, hipotálamo e CPF (GARDIER et al., 2004; DELRUE et al., 2004).

Os animais do grupo injetado com a menor dose de LPS apresentaram níveis de produção de anticorpos superiores ao grupo de animais injetados com a maior dose de LPS. As diferentes doses de LPS injetadas evocam respostas diferentes do organismo. O LPS em menor dose promove principalmente a ativação de linfócitos B e estes secretam anticorpos. O LPS em maior dose constitui um insulto mais agressivo que evoca respostas que incluem a atividade macrofágica. Nesta situação, o organismo reage de modo a alertar rapidamente o SNC. Desta forma, durante a resposta a uma dose alta de LPS a produção de anticorpos apresenta-se como uma estratégia secundária ao organismo. A administração de LPS em altas doses tem sido utilizada em modelos de sepse, uma vez que induz uma resposta inflamatória sistêmica exagerada e deletéria caracterizada por lesão tecidual, ativação da cascata de coagulação, formação de trombos na microcirculação, hipóxia e acidose teciduais, depressão miocárdica, culminando com disfunção orgânica múltipla e choque endotóxico (AKASAKAA et al., 2006).

As regiões cerebrais relacionadas à regulação das respostas associadas ao estresse através do eixo HPA podem tornar-se suscetíveis a seus efeitos deletérios e a habilidade em regular a resposta a subsequentes estressores pode ser comprometida (RADLEY & MORRISON, 2005). Demonstrou-se que a exposição a estressores induz alterações celulares e morfológicas no tecido nervoso. Uma das primeiras observações de alteração celular após exposição crônica a GCs é a perda de neurônios piramidais na região CA3 do hipocampo (RADLEY & MORRISON, 2005).

Ao avaliar as possíveis alterações nos processos de neurogênese e apoptose no hipocampo e córtex frontal nos camundongos submetidos aos estressores psicossociais e biológicos, nossos resultados não indicaram indícios de alterações aparentes nos processos de neurogênese e apoptose após a análise histológica dos tecidos avaliados. Esses dados estão de acordo com a avaliação comportamental destes animais, como descrito a seguir.

No teste do LCE, a experiência aversiva nos braços abertos do labirinto no primeiro teste gerou a aquisição de memória que promoveu o aumento da esquivas a esses braços no segundo teste. No segundo teste do LCE observamos que o decréscimo do tempo de permanência nos braços abertos ocorreu em todos os grupos experimentais. O mesmo resultado foi observado,

quando comparou-se o número de vezes em que os animais entraram nestes braços, indicando que nenhum dos tratamentos prejudicou a memória emocional adquirida pelos animais durante a exposição ao primeiro teste. Desta forma, estes resultados sugerem que não houve danos celulares severos a ponto de causar tal prejuízo.

Todavia, principalmente nos animais injetados com a maior dose de LPS esperava-se algum comprometimento celular devido à severidade do estímulo que culminou inclusive com a morte de alguns animais neste grupo. Como a avaliação histológica foi feita no sexto dia após a imunização pode-se avaliar a possibilidade de que neste período de avaliação não tenha sido possível identificar a presença de danos celulares induzidos pelos tratamentos utilizados neste protocolo. Podemos avaliar a possibilidade de que a manifestação das alterações nos processos apoptóticos e neurogênicos demande um período maior de tempo para se manifestar. Adicionalmente, questionamos se um possível dano celular ocorrido poderia já ter sido reparado pelos mecanismos celulares associados. Desta forma, estudos cinéticos adicionais são necessários para elucidar estas questões.

Além da perda celular observada em animais submetidos a severos estressores e tratamentos prolongados com GCs, estressores menos severos produzem outras alterações morfológicas referidas como atrofia dendrítica neuronal caracterizada por padrões de arborização menos complexos e decréscimo na extensão apical dendrítica (CONRAD et al., 1999). As alterações sinápticas decorrentes de retrações dendríticas podem ocorrer em compensação à toxicidade causada por glutamato e cálcio induzida nestes neurônios durante os períodos prolongados de estresse (RADLEY & MORRISON, 2005).

RADLEY & MORRISON (2005) demonstraram que a administração crônica de altos níveis de GCs induz retração apical e diminuição na arborização dendrítica em neurônios piramidais de CA3 em ratos, sendo que a maior duração deste tratamento resulta em danos hipocâmpais mais substanciais como morte celular neuronal. Adicionalmente, três semanas de estresse de restrição ou de administração diária de GCs produzem retração apical e redução de espinhos dendríticos em neurônios piramidais corticais. CERQUEIRA et al. (2005) observou que estas alterações na complexidade dendrítica podem correlacionar-se com alterações comportamentais.

As implicações funcionais das alterações dendríticas no hipocampo, amígdala e córtex têm sido avaliadas. A diminuição nas ramificações neurais pode promover prejuízo na transmissão sináptica. Adicionalmente, células com menor extensão dendrítica são

eletricamente mais compactas e conseqüentemente a transferência de informação de outros dendritos ao soma torna-se mais eficiente, exacerbando determinadas respostas (JOËLS et al., 2007).

CONRAD et al., (1999) demonstrou que a remodelação dendrítica no hipocampo de ratos submetidos ao estresse crônico correlaciona-se com prejuízos da memória espacial. Estudo posterior sugere que as alterações estruturais neuronais induzidas pelo estresse podem ter um papel modulatório na amígdala e conseqüentemente aos processos de memória e aprendizado associados a ela (HUFF & RUDY, 2004).

KOLE (2004) demonstrou que uma breve exposição ao estresse social em ratos foi suficiente para induzir adaptações na arquitetura dendrítica e sinapses excitatórias de neurônios em CA3 de forma similar aos animais submetidos a estressores por um período maior. Outro estudo observou que ratos submetidos a apenas dez minutos de estresse durante dez dias ou simplesmente uma injeção diária de veículo durante dez semanas foram eficazes em promover marcante redução na complexidade dendrítica no CPF (JOËLS et al., 2007). Estes resultados demonstram que longos períodos de estresse não são necessários para induzir alterações morfológicas que podem promover sensibilização a determinados comportamentos e respostas neuroendócrinas.

Desta forma, apesar de não termos verificado alterações como morte por apoptose, a não realização da análise de outros parâmetros morfológicos neste trabalho não descarta a possibilidade da ocorrência de alterações morfológicas e funcionais como remodelação dendrítica e alterações sinápticas em decorrência dos estímulos estressores utilizados.

Evidências indicam que a severidade dos danos causados pelo estresse depende do tipo, duração e intensidade do estímulo estressor. Enquanto um mês de estresse psicossocial não foi suficiente para induzir perda neuronal, longos períodos causaram perda celular na região do giro denteado e danos neuronais na formação hipocampal em musaranhos (LUCASSEN et al., 2001). Adicionalmente, a submissão ao estresse de restrição afetou a neurogênese após seis, mas não em três semanas (PHAM et al., 2003). Estes autores concluíram que o estresse aplicado deve ter afetado outros parâmetros estruturais como arborização dendrítica, interneurônios, neurogênese ou glia nos animais avaliados (LUCASSEN et al., 2001).

ZELENA et al. (1999) avaliaram as conseqüências endócrinas e comportamentais do estresse social sob variação da intensidade e tipo de interação agonística. Ratos foram

submetidos à interação agonística durante quatro dias e os confrontos variaram de trinta minutos a quatro horas diárias. Embora alterações no peso e nos níveis de corticosterona foram encontradas apenas nos animais submetidos a quatro horas diárias de encontro agonístico, os animais submetidos a trinta minutos sofreram alterações comportamentais sutis, mas capazes de alterar os efeitos relacionados à ansiedade quando expostos a estressores agudos adicionais. Estes dados indicam que alterações sutis podem afetar a reatividade comportamental a novos estressores. De qualquer modo, parece que a simultânea organização sináptica e/ou alteração da função celular contribuem às mudanças na rede funcional e comportamento após o estresse crônico.

Desta forma, podemos sugerir que, embora não tenhamos observado morte por apoptose decorrente do tempo e intensidade de exposição ao estresse em nosso protocolo experimental, protocolos com duração maior de exposição à estressores desta natureza poderiam promover alterações desta magnitude.

Todavia, alterações específicas como a apoptose não são necessárias para que haja alterações comportamentais e fisiológicas como ansiedade e estresse oxidativo como foi observado em nosso estudo.

Ao sobrecarregar a capacidade adaptativa do organismo estímulos estressores podem gerar danos acentuados e até irreversíveis. Entretanto, há fases em que as alterações são reversíveis e o organismo consegue se adaptar se não houver a continuidade do estímulo. Embora dados que documentem os efeitos do estresse no SNC sejam interpretados como efeitos deletérios é possível que pelo menos uma parte destas alterações reflita respostas adaptativas e rearranjo nos sistemas de redes e suas conexões em ordem de reagir às alterações requeridas pelo ambiente interno e externo (FUCHS et al., 2006).

A habilidade do cérebro em promover adaptações funcionais após estímulos é geralmente referida como plasticidade neuronal. Estes processos dinâmicos são baseados na capacidade de componentes neurais em se adaptar e alterar sua estrutura ou repertório funcional em resposta a alterações ambientais. Entretanto, alterações estruturais e funcionais cerebrais em pacientes com desordens de humor deixam claro que as alterações na plasticidade neuronal nem sempre são benéficas. Estudos tratando do impacto do estresse prolongado na habilidade dos indivíduos envelhecerem com sucesso concluíram que os danos neuronais induzidos por estresse e acumulados através da vida promovem desvantagem ao indivíduo em lidar com a

diminuição da função e viabilidade neuronal associado ao envelhecimento (SAPOLSKY et al., 1985; MCEWEN, 2000).

O entendimento a respeito de como a extensão, o tipo e a severidade do estressor e suas interações determinam os efeitos do estresse na fisiologia e no comportamento necessita de maiores esclarecimentos. Desta forma, torna-se fundamental a realização de novos estudos que visem a elucidação destas questões e o desenvolvimento de novas terapias que assegurem a melhoria da qualidade de vida.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados demonstraram que os estressores psicossociais e biológicos utilizados promoveram alterações no sistema de defesa antioxidante e no comportamento tipo-ansioso dos animais avaliados. Contudo, no sexto dia após a submissão aos estressores não foi possível observar indícios de alterações nos processos de apoptose e neurogênese no hipocampo e no córtex frontal sugerindo que este período de exposição aos estressores não foi suficiente para causar a exaustão na capacidade adaptativa do organismo. Entretanto, podemos avaliar a possibilidade de que o período avaliado não foi eficaz em detectar os efeitos deletérios analisados. Desta forma, estudos adicionais precisam ser conduzidos no sentido de elucidar a presente questão e os mecanismos associados às relações entre a resposta ao estresse e os sistemas imune, antioxidante e consequências celulares e comportamentais associadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASAKAA S., NOMURAA M., NISHIIA H., FUJIMOTOA N., UETAB Y. The hypothalamo-pituitary axis responses to lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Brain Research** 2006; 1089:1-9.

ARNAIZ S.L., TRAVACIO M., LLESUY S., ARNAIZ R.L.G. Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. **Neurochemistry Research** 1998; 23:1477-1483.

BAEK B.S., KWON H.J., LEE K.H., YOO M.A., KIM K.W., IKENO, Y., YU B.P., CHUNG H.Y. Regional difference of ROS generation, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activity in rat brain and their dietary modulation. **Arch. Pharm. Res.** 1999; 22:361-366.

BARKER J.E., HEALES S.J.R., CASSIDY A., BOLAIOS J.P., LAND J.P., CLARK J.B. Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity; an enzyme susceptible to oxidative damage. **Brain Research** 1996; 716:118-122.

BARREIROS A.L.B.S., DAVID J.M., DAVID J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova** 2006; 29:113-123.

BARTOLOMUCCI A. Social stress, immune functions and disease in rodents. **Frontiers in Neuroendocrinology** 2007; 28:28-49.

BEHL A. Effects of glucocorticoids on oxidative stress-induced hippocampal cell death: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology** 1998; 33:689-96.

BERKENBOSCH F., WOLVERS D.A.W., DERIJK R. Neuroendocrine and immunological mechanisms in stress-induced immunomodulation. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** 1991; 40:639-47.

BERTOGLIO L.J., CAROBREZ A.P. Previous maze experience required to increase open arm avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Review** 2000; 108:197-203.

BESEDOVSKY H., SORKIN F., FELIX D., HAAS H. Hypothalamic changes during the immune response. **Eur J Immunol** 1977; 7:323-5.

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

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

BLANCHARD R.J., RODGERS R.J., BLANCHARD D.C. Ethological approaches to the preclinical psychopharmacology of anxiety. **Strategies for studying CNS compounds** 1994; 145-161.

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** 1976; 72:248-254.

BRYNSKIKH A., WARREN T., ZHU J., KIPNIS J. Adaptive immunity affects learning behavior in mice. **Brain, Behavior, and Immunity** 2008; 22:861-869.

BUTLER P.D., WEISS J.M., STOUT J.C., NEMEROFF C.R. Corticotropin-releasing factor produces fear-enhancing and behavioral activating effects following infusion into the locus coeruleus. **J Neuroscience** 1990; 10:176-83.

CARLBERG I., MANNERVIK B. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2', 5'-ADP-Sepharose 4B. **Analytical Biochemistry** 1981; 116:531-536.

CAROBREZ A.P., BERTOGLIO L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Behavioral Reviews** 2005; 29:1193-1205.

CERQUEIRA J.J., PEGO J.M., TAIPA R., BESSA J.M., ALMEIDA O.F., SOUSA N. Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. **Journal of Neuroscience** 2005; 25:7792-7800.

CONRAD C.D., LEDOUX J.E., MAGARIFIOS A.M., MCEWEN B.S. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CAS dendritic atrophy. **Behavioral Neuroscience** 1999; 113:902-913.

DAL-CÓL M.L.C., ORLANDI-PEREIRA L., ROSA V.P., CALIXTO A.V., CAROBREZ A.P., FARIA M.S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 2003; 74:395-400.

DELRUE C., DELEPLANQUE B., ROUGE-PONT F., VITIELLO S., NEVEU PJ. Brain monoaminergic, neuroendocrine, and immune responses to an immune challenge in relation to brain and behavioural lateralization. **Brain Behav Immun** 1994; 8:137-52.

DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology** 2000; 62:649-671.

EJCHEL-COHEN T.F., WOOD G.E., WANG J., BARLOW K., NOBREGA J.N., MCEWEN B.S., YOUNG T.L. Chronic restraint stress decreases the expression of glutathione S-transferase pi2 in the mouse hippocampus. **Brain Research** 2006; 1090:56-162.

ELY D.L., HENRY J.P. Neuroendocrine response patterns in dominant and subordinate mice. **Horm. Behav.** 1978; 10:156-169.

FERNANDES G.A. Immunological stress in rats induces bodily alterations in saline-treated conspecifics. **Physiology & behavior** 2000; 69:221-230.

FILE S.E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research** 1993; 58:199-202

FUCHS E., FLÜGGE G., CZECH B. Remodeling of neuronal networks by stress. **Frontiers in Bioscience** 2006; 11:2746-2758.

FUCHS E., FLÜGGE G., OHL F., LUCASSEN P., VOLLMANN-HONSDORF G.K., MICHAELIS T. Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus. **Physiology and Behavior** 2001; 73:285-291.

GARDIER A.M., KACHANER S., SHAGHAGHI E.K., BLOT C., BOHUON C., JACQUOT C. Effects of a primary immune response to T-cell dependent antigen on serotonin metabolism in frontal cortex: in vivo microdialysis study in freely moving Fischer 344 rat. **Brain Research** 1994; 645:150-6.

GASPAROTTO O.C., IGNÁCIO Z.M., LINA K., GONÇALVES S. The effect of different psychological profiles and timings of stress exposure on humoral immune response. **Physiology & Behavior** 2002; 76:321-326.

GASPAROTTO O.C., LOPES D.M., CAROBREZ S.G. Pair housing affects anxiety-like behaviors induced by a social but not by a physiological stressor in male Swiss mice. **Physiology & Behavior** 2005; 85:603-612.

GHIZONI D.M., PAVANATI K.C.A., ARENT A.M., MACHADO C., FARIA M.S., PINTO C.M.H., GASPAROTTO O.C., GONÇALVES S., DAFRE A.L. Alterations in glutathione levels of brain structures caused by acute restraint stress and by nitric oxide synthase inhibition but not by intraspecific agonistic interaction. **Behavioural Brain Research** 2005; 166:71-77.

GLASER R., GLASER J.K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nature Reviews Immunology** 2005; 5:243-251.

GONÇALVES L., Consequências do estresse psicossocial na cinética da resposta imune humoral e na defesa antioxidante de camundongos suíços. 2007. 66f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GONÇALVES L., DAFRE A.L., CAROBREZ S.G., GASPAROTTO O.C. A temporal analysis of the relationships between social stress, humoral immune response and glutathione-related antioxidant defenses. **Behavioural Brain Research** 2008; 192:226-231.

HADDAD J.J., HARB H.L. L-γ-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and SH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? **Molecular Immunology** 2005; 42:987-1014.

HANDLEY S.L., MITHANI S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **N. S. Arch. Pharmacol** 1984; 327:1-5.

HEINE V.M., MASLAM S., ZARENO J., JOËLS M., LUCASSEN P.J. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. **European Journal of Neuroscience** 2004; 19:131-44.

HOVATTA I., TENNANT R.S., HELTON R., MARR R.A., SINGER O., REDWINE J.M., ELLISON J.A., SCHADT E.E., VERMA I.M., LOCKHART D.J., BARLOW C. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. **Nature** 2005; 438:1.

HUFF N.C., RUDY J.W. The amygdala modulates hippocampus-dependent context memory formation and stores cue-shock associations. **Behavior Neuroscience** 2004; 118:53-62.

HUHMANN K.L. Social Conflict Models: can they inform us about human psychopathology? **Hormones and Behavior** 2006; 50:640-646.

IZQUIERDO I. Different forms of post-training memory processing. **Behavioral and Neural Biology** 1989; 51:171-202.

IZQUIERDO I., MEDINA J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory** 1997; 68:285-316.

IZQUIERDO, IVÁN. Memória. Porto Alegre: Artmed, 2002. 95p.

JOËLS M., KARST H., KRUGERS H.J., LUCASSEN P.J. Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. **Frontiers in Neuroendocrinology** 2007; 28:72-96.

JOËLS M., PU Z., WIEGERT O., MELLY O.S., KRUGERS H.J. Learning under stress: how does it work? **Trends in Cognitive Sciences** 2006; 10:152-158.

KLOET E.R., JOËLS M., HOLSBOER F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience** 2005; 6:463.

KOLE M.H.P., COSTOLI T., KOOLHAAS J.M., FUCHS E. Bidirectional shift in the cornu ammonis 3 pyramidal dendritic organization following brief stress. **Neuroscience** 2004; 125: 337-347.

KONSMAN J.P., PARNET P., DANTZER R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in Neurosciences** 2002; 25: 157-159.

KROMER S.A., KESSLER M.S., MILFAY D., BIRG I.N., BUNCK M., CZIBERE L., PANHUYSSEN M., PUTZ B., DEUSSING J.M., HOLSBOER F., LANDGRAF R., TURCK C.W. Identification of glyoxalase-i as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. **The Journal of Neuroscience** 2005; 25:4375-4384.

LACOSTA S., MERALI Z., ANISMAN H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. **Brain Research** 1999; 818:291-303.

LUCASSEN P.J., VOLLMANN-HONSDORF G.K., GLEISBERG M., BOLDIZSÁR E., RON D.K., FUCHS E. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. **European Journal of Neuroscience** 2001; 14:161-166.

MADRIGAL J.L, OLIVENZA R., MORO M.A., LIZASOAIN I., LORENZO P., RODRIGO J. Ghuthatione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. **Neuropsychopharmacology** 2001; 24:420-9.

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.

MCGAUGH J.L. Memory – A century of consolidation. **Science** 2000; 287:248-251.

MCGAUGH J.L., ROOZENDAAL B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. **Current Opinion in Neurobiology** 2002; 12:205-210.

MCINTOSH L.J., CORTOPASSI K.M., SAPOLSKY R.M. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. **Brain Research** 1998; 791:215-222.

MCINTOSH L.J., SAPOLSKY R.M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. **Experimental Neurology** 1996; 141:201-206.

MCEWEN B.S. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. **Metabolism Clinical and Experimental** 2005; 54:20-23.

MCEWEN B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research** 2000; 886:172-189.

MOALEM G., LEIBOWITZ-AMIT R., YOLES E., MOR F., COHEN I.R., SCHWARTZ M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. **Nature Medicine** 1999; 5:49-55.

PELLOW S., CHOPIN P., FILE S., BRILEY M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods** 1985; 14:149-167.

PHAM K., NACHER J., HOF P.R., MCEWEN B.S. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience** 2003; 17:879-886.

RADLEY J.J., MORRISON J.H. Repeated stress and structural plasticity in the brain. **Ageing Research Reviews** 2005; 4:271-287.

REDMOND D.E.J., HUANG Y.H. Current concept 2. New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. **Life Science** 1979; 25:2149-62.

ROSA J.M. Estudo do mecanismo de ação antidepressiva da glutatona em camundongos. 2005. 108f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SAHIN E., GÜMÜSLÜ S. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. **Behavioural Brain Research** 2004; 155:241-8.

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

SAPOLSKY R.M., KREY L.C., MCEWEN B.S., Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. **J. Neuroscience** 1985; 5:1222-1227.

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

SCHULZ J.B., LINDENAU J., SEYFRIED J., DICHGANS J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. **European Journal of Biochemistry** 2000; 267:4904-4911.

SELYE H. The stress of life. New York: McGraw-Hill, 1956.

SILVA R.H. ABÍLIO V.C., TAKATSU A.L., KAMEDA S.R., GRASSL C., CHEHIN A.B., MEDRANO W.A., CALZAVARA M.B., REGISTRO S., ANDERSEN M.L., MACHADO R.B., CARVALHO R.C., RIBEIRO R.A., TUFIK S., FRUSSA-FILHO R. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. **Neuropharmacology** 2004; 46:895-903.

SIMMONS D.A., BRODERICK P.A. Cytokines, stressors, and clinical depression: Augmented adaptation responses underlie depression pathogenesis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** 2005; 29:793-807.

SORRELLS S.F., SAPOLSKY R.M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. **Brain, Behavior, and Immunity** 2007; 21:259-272.

STERN C.A.J., CAROBREZ A.P., BERTOGLIO L.J. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus maze. **Pharmacology Biochemistry Behavior** 2008; 90:545-50.

TAMASHIRO L.K., NGUYEN M.M.N., SAKAI R.R. Social stress: from rodents to primates. **Frontiers in Neuroendocrinology** 2005; 26:27-40.

TREIT D., MENARD J., ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 1993, 44:463-469.

ZELENA D., HALLER J., HALÁSZ J., MAKARA G.B. Social stress of variable intensity: physiological and behavioral consequences. **Brain Res Bull** 1999; 48:297-302.