

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**ESTRESSE CRÔNICO POR IMOBILIZAÇÃO: EFEITOS
SOBRE NOCICEPÇÃO, COMPORTAMENTO ALIMENTAR,
MEMÓRIA ESPACIAL E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.**

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

ORIENTADORA

Prof^a. Dra. Carla Dalmaz

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, com ênfase em Bioquímica, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Bioquímica

Porto Alegre
1998

Dedico esta dissertação as minhas filhas Ariela e Cristina.

AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu marido Ronaldo e as minhas filhas Ariela e Cristina, pelo seu amor e compreensão, por estarem sempre do meu lado e serem a razão de minha existência.
- ◆ A meu pai, exemplo de persistência e força, que é meu companheiro e confidente.
- ◆ A minha mãe, por seu carinho, presença constante e estímulo ao meu crescimento.
- ◆ A minha orientadora Carla Dalmaz, por ter confiado na minha capacidade, por ser esta pessoa maravilhosa, solidária e competente.
- ◆ À querida Marta S. Freitas, um agradecimento muito especial, por ser minha grande amiga e por me mostrar que eu podia.
- ◆ À Ana Paula, pela valiosa ajuda, além do carinho e amizade constante
- ◆ Ao Grupo de Estresse, em especial: Giovana Gamaro, pela ajuda em Montevideo e nas dosagens de corticosterona; Simone, pela ajuda inicial e nas tarefas comportamentais; Luciana, pelo carinho, amizade, e ajuda na fase final.
- ◆ À Professora Maria Beatriz pela amizade, e carinho que sempre me dispensou.
- ◆ À amiga Fernanda Fontela por ela ser como é.
- ◆ Ao professor Carlos Alexandre, a Nice e a Ionara do grupo de Hipóxia e Isquemia, pela amizade e disposição a ouvir e ajudar sempre.
- ◆ Aos amigos da Biologia Celular do Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, de Montevideo, pela hospitalidade e atenção com que me trataram durante minha estada em seu país. Em especial ao Professor Rodolfo Silveira, Cecília e Miguel.
- ◆ Ao professor Adriano, pela ajuda nas contagens de corticosterona.
- ◆ Ao CNPq, pela bolsa concedida.
- ◆ Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e do Curso de Pós-Graduação.

SUMÁRIO

Índice de figuras	vii
Abreviaturas	x
Divulgações	xii
Resumo.....	xiv
INTRODUÇÃO	01
Estresse e alterações de comportamento alimentar.....	06
Estresse, catecolaminas e indolaminas.....	07
Estresse e nocicepção.....	09
Estresse e memória.....	11
OBJETIVOS	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
1. Animais Experimentais	17
2. Modelo de Estresse	17
2.1 Tratamento crônico	17
2.2 Tratamento agudo	20
3. Procedimentos comportamentais	20
3.1. Medida de reflexo de retirada da cauda	20
3.1.1. Exposição à novidade	22
3.1.2. Efeito da morfina sobre nocicepção	23
3.1.3. Efeito da suspensão do tratamento de estresse crônico.....	23
3.2. Consumo de alimento palatável, não doce.....	24

3.3. Labirinto aquático.....	27
3.3.1. Memória espacial.....	27
3.3.2. Memória de trabalho.....	28
4. Dosagens bioquímicas.....	31
4.1. Dosagem de corticosterona no plasma.....	31
4.2. Medidas dos níveis de catecolaminas, indolaminas e seus metabólitos.....	31
5. Análise estatística.....	35
RESULTADOS.....	34
1. Efeito do estresse crônico por imobilização sobre a nocicepção de ratos Wistar	34
1.1. Efeito da exposição à novidade sobre a nocicepção em ratos estressados cronicamente por imobilização	34
1.2. Efeito da morfina em diferentes doses sobre a nocicep- ção em ratos stressados cronicamente por imobilização avaliados em 30 e 60 min após a injeção	41
1.3. Efeito da suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização durante 14 e 28 dias sobre a nocicepção em ra- tos Wistar	46
1.4. Suspensão do tratamento de estresse crônico por imobili- zação durante 14 e 28 dias: efeito de uma nova sessão de estresse sobre a nocicepção	49
2. Efeito do estresse crônico por imobilização sobre o comportamento alimentar	52

3. Efeito do estresse crônico por imobilização sobre a memória	
espacial	56
3.1. Memória de referência	57
3.2. Memória de trabalho	63
4. Alterações dos níveis de corticosterona plasmática	66
5. Estudo dos níveis de catecolaminas, indolaminas e seus	
metabólitos em diferentes estruturas cerebrais	70
DISCUSSÃO.....	80
Medida de resposta nociceptiva	82
Comportamento alimentar	94
Memória espacial	96
Medida de corticosterona	97
Medida de catecolaminas, indolaminas e seus metabólitos.....	100
CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Eixo LHPA	3
Figura 2 – Modelo de tratamento crônico.....	19
Figura 3 – Desenho esquemático do aparelho de <i>Tail-Flick</i>	21
Figura 4 - Desenho esquemático da caixa onde se realizou a tarefa de comportamento alimentar.....	26
Figura 5a - Desenho esquemático do labirinto aquático- memória espacial.....	30
Figura 5 b - Desenho esquemático do labirinto aquático - divisão em quadrantes...30	
Figura 6 – Determinação de catecolaminas em estruturas cerebrais.....	34
Figura 7 a – Efeito da novidade na latência do <i>Tail-Flick</i> no grupo controle.....	38
Figura 7 b – Efeito da novidade na latência do <i>Tail-Flick</i> no grupo manipulado.....	39
Figura 7c – Efeito da novidade na latência do <i>Tail-Flick</i> no grupo estressado	40
Figura 8 a - Efeito da administração de morfina sobre a resposta nociceptiva em animais controles.....	43
Figura 8 b - Efeito da administração de morfina sobre a resposta nociceptiva em animais manipulados.....	44
Figura 8 c - Efeito da administração de morfina sobre a resposta nociceptiva em animais estressados cronicamente por imobilização.....	45
Figura 9 a - Efeito da suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização por 14 dias sobre a resposta nociceptiva dos animais controles e estressados.....	47
Figura 9 b - Efeito da suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização por 28 dias sobre a resposta nociceptiva dos animais controles e estressados.....	48
Figura 10 a- Efeito de uma nova exposição a um agente estressor, após suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização por 14 dias, sobre resposta nociceptiva de animais controles e estressados.....	51
Figura 10 b- Efeito de uma nova exposição a um agente estressor, após suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização por 28 dias, sobre resposta nociceptiva de animais controles e estressados.....	52

Figura 11 – Efeito do estresse crônico por imobilização sobre o comportamento alimentar (consumo de alimento não-doce) ao longo dos dias de habituação.....	53
Figura 12 - Efeito do estresse crônico por imobilização sobre o consumo de alimento não-doce (amendoim) em duas situações: alimentado e jejum.....	55
Figura 13 - Latência para atingir à plataforma nos 10 <i>trials</i> na tarefa de memória de espacial de referência do labirinto aquático	58
Figura 14 - Latência para atingir a plataforma no primeiro <i>trial</i> da diferentes sessões na tarefa de memória de espacial referência no labirinto aquático.....	59
Figura 15 – Tempo gasto nos quadrantes alvo e oposto do labirinto aquático na tarefa de memória de espacial referência.....	61
Figura 16 – Efeito do estresse crônico por imobilização sobre o número de cruzamentos no labirinto aquático.....	62
Figura 17 - Latência para atingir a plataforma do longo dos 8 <i>trials</i> na tarefa de memória espacial de trabalho do labirinto aquático.....	64
Figura 18 - Latência para atingir a plataforma na tarefa de memória espacial de trabalho no labirinto aquático.....	65
Figura 19 - Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis plasmáticos de corticosterona medidos 24 h após a última exposição ao estressor.....	67
Figura 20 - Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis plasmáticos de corticosterona medidos imediatamente após a última exposição ao estresse.....	68
Figura 21 - Efeito do estresse agudo por imobilização sobre os níveis plasmáticos de corticosterona imediatamente após a última exposição ao estresse.....	69
Figura 22 - Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de norepinefrina 24 h após a última exposição ao estresse.....	72
Figura 23 - Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de	

dopamina 24 h após a última exposição ao estresse.....	73
Figura 24 - Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de DOPAC 24 h após a última exposição ao estresse.....	74
Figura 25- Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de DOPAC/DA 24 h após a última exposição ao estresse.....	75
Figura 26 - Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de serotonina 24 h após a última exposição ao estresse.....	77
Figura 27- Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de 5-HIAA 24 h após a última exposição ao estresse.....	78
Figura 28 - Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de 5-HIAA/ 5-HT 24 h após a última exposição ao estresse.....	79

ABREVIATURAS

ACTH:	Hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina
AMPA:	α -amino-3-hidroxi-5metilisoaxasol-4-propionato
ANOVA:	Análise de variância
AVP:	Arginina-vasopressina
CA:	Catecolaminas
CRH:	Hormônio liberador de corticotrofina ou ACTH
°C:	Graus Célsius
cm :	Centímetros
DOPAC:	Ácido di-hidroxifenilacético
EP:	Erro padrão da média
GABA:	Ácido gama-aminobutírico
g :	Gramas
GCS:	Glicocorticóides
Hz:	Hertz
h:	Hora
LHPA:	Eixo límbico-hipotalamo-pituitário-adrenal
LTP:	Potenciação de longa duração (<i>Long term potentiation</i>)
mL:	Mililitros
mA	Miliampére
min:	Minutos
ng:	Nanogramas
nA:	Nanoampére
NA:	Norepinefrina
NMDA:	N-metil-D-aspartato
OT:	Ocitocina
PVN:	Núcleo paraventricular hipotalâmico
POMC:	Pró-opiomelanocortina
PCA:	Ácido perclórico
pH:	Potencial hidrogeniônico da solução

rpm:	Rotações por minuto
SCA:	Sistema catecolaminérgico
s:	Segundos
SOS:	Octil sulfato de sódio
THF:	Tetra-hidrofurano
TFL:	Latência de retirada da cauda (<i>tail-flick latency</i>)
μL:	Microlitro
μm:	Micrômetro
V:	Volts
W:	Watts
5-HT	Serotonina
5-HIAA	Ácido 5-hidróxi-indolacético

DIVULGAÇÕES

Os resultados contidos nesta dissertação foram parcialmente divulgados em:

APRESENTAÇÃO EM CONGRESSOS

Efeito do estresse crônico por imobilização sobre a resposta nociceptiva induzida pela novidade. Evento: XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Período: 27 a 30 de agosto de 1997. Local: Caxambu - MG

Efeito do estresse crônico por imobilização sobre o comportamento alimentar em ratos. Evento: XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. Período: 27 a 30 de agosto de 1997. Local: Caxambu – MG.

Efeito do estresse crônico por imobilização sobre a memória de ratos submetidos ao labirinto aquático. Evento: XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. Período: 26 a 29 de agosto de 1998. Local: Caxambu – MG.

Efeito da suspensão do tratamento de estresse crônico em ratos sobre a hiperalgesia induzida pelo mesmo. Evento: XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. Período: 26 a 29 de agosto de 1998. Local: Caxambu – MG.

Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de catecolaminas em diferentes regiões cerebrais. Evento: XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. Período: 26 a 29 de agosto de 1998. Local: Caxambu – MG.

COMUNICAÇÕES ORAIS:

Chronic stress, nociception and memory. Evento: XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. Período: 26 a 29 de agosto de 1998. Local: Caxambu – MG.

Effects of chronic stress on novelty-induced antinociception. *Symposium on Molecular Mechanisms of Neural Plasticity*. Período: 13 e 14 de novembro de 1997. Local: Porto Alegre, RS.

PUBLICAÇÕES:

Effect of chronic stress on novelty-induced antinociception. Torres, ILS; Cucco, SNS, Vasconcellos, AP; Dalmaz, C. *Physiol. Behav.* Submetido.

Effect of different models of chronic stress on the levels of biogenic amines in different brain structures. Torres, ILS; Gamaro, G; Manoli, L; Vasconcellos, AP; Silveira, R; Dalmaz, C. Em preparação.

INTRODUÇÃO

O termo estresse geralmente refere-se a alterações físicas ou psicológicas que alteram o equilíbrio ou a homeostasia do organismo. Estressores psicológicos são indicados como elementos-chave nas doenças psiquiátricas, ainda que estressores físicos (infecções virais e doenças auto-imunes) estejam sendo reconhecidos como indutores potenciais das mesmas (Akil e Morano, 1995).

A resposta ao estresse físico ou psicológico é coordenada pelo sistema nervoso central e resulta em modificações comportamentais, viscerais e endócrinas que permitem ao organismo adaptar-se ao estresse (Tizabi e Aguilera, 1992).

Em 1936, o cientista e médico austríaco Hans Selye (Henry, 1993) apresentou pela primeira vez em biologia o conceito de estresse. Conceituou estresse como uma síndrome geral de adaptação, ou seja, um conjunto de reações sistêmicas e não-específicas que surgem quando ocorre uma exposição do organismo a potenciais agentes agressores, chamados estressores (Bonamin, 1984). O estresse pode influenciar a recuperação de doenças, reduzir a resistência a doenças ou produzir doenças diretamente (Ursin e Olf, 1993).

O organismo reage ao estresse pela ativação de um complexo repertório de respostas comportamentais e fisiológicas, o paradigma de “luta ou fuga” descrito por Cannon no início do século (conforme citado por Carrol *et al.*, 1976).

Todos os organismos, da bactéria ao ser humano, desencadeiam mecanismos para reagir a mudanças que sejam estressoras no seu ambiente externo ou interno. Nos mamíferos, esta função é executada, em parte, pelo eixo límbico-hipotálamo-pituitário-adrenal (LHPA) (Akil e Morano, 1995). A ativação do eixo LHPA resulta no aumento da secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior ou adeno-hipófise e de corticosteróides pelo córtex da adrenal (Sutanto e de Kloet, 1993). A liberação de ACTH é controlada por vários secretagogos sintetizados pelos neurônios do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) e liberados pela eminência média hipotalâmica dentro da circulação porta-hipofisária. Os mais importantes destes secretagogos parecem ser o CRH, a arginina-vasopressina (AVP) e a ocitocina (OT) (Romero *et al.*, 1995; Cullinan *et al.*, 1995). Estes agem na hipófise levando à síntese e a liberação de ACTH pela hipófise anterior e de outros peptídeos derivados de um precursor comum, a pró-opiomelanocortina (POMC) em que estão incluídos os opióides endógenos. O ACTH, por sua vez, ativa a conversão do colesterol em pregnenolona, aumentando a produção e a liberação de glicocorticóides (GCS) pelo córtex da adrenal (Fig.1). Estes últimos hormônios atuam em todo organismo para mediar modificações nos processos (por ex: metabólico, imune, inflamatório) requeridos para adaptação e preparação do organismo para lidar com uma situação estressante, incluindo mudanças na forma de obtenção de energia e no metabolismo (Cullinan *et al.*, 1995; Akil e Morano, 1995; Mello Aires, 1985). Os glicocorticóides inibem a liberação e a síntese

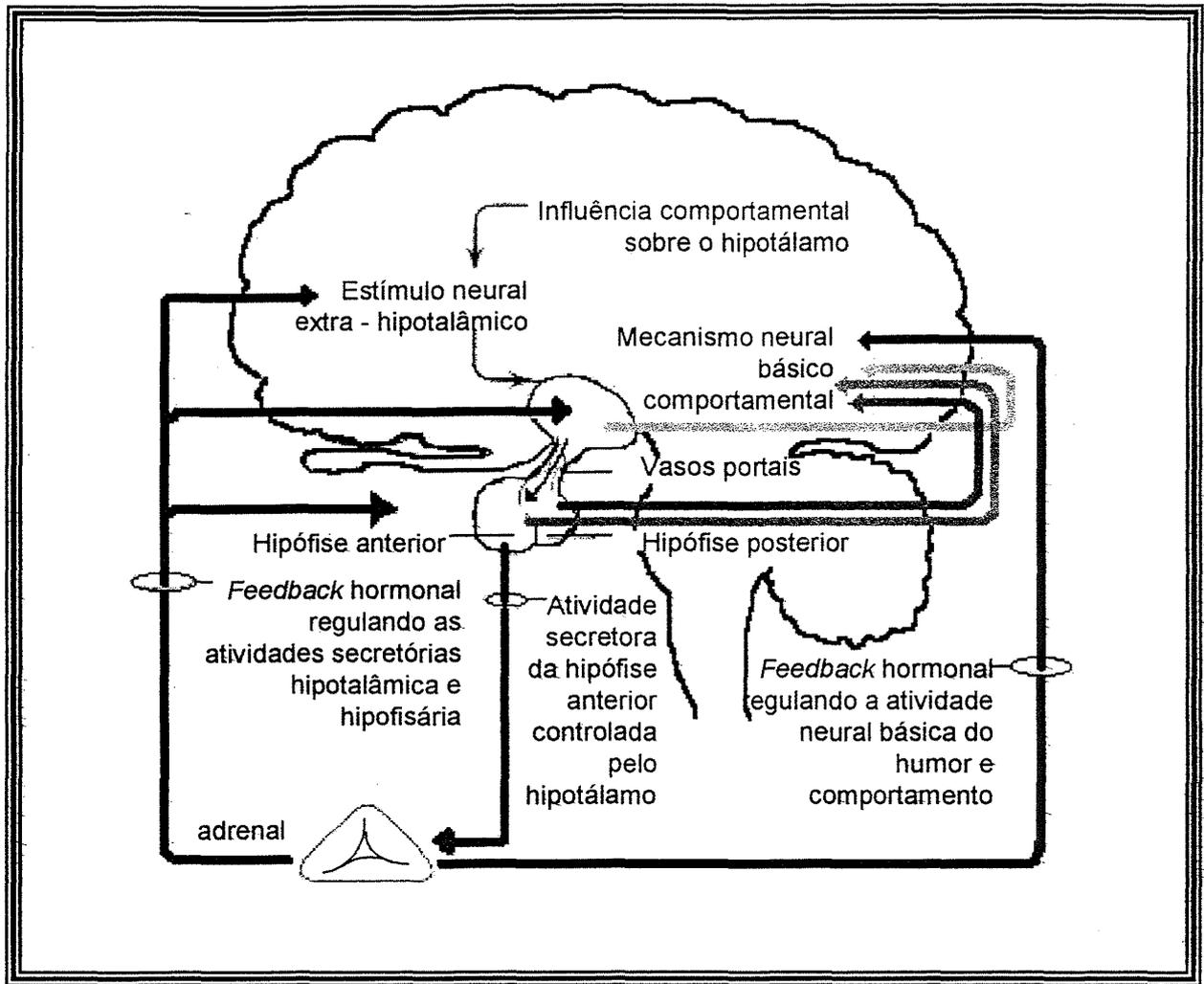


Figura 1: Eixo límbico-hipotálamo-hipófise-adrenal (LHPA).

de ACTH por atuarem no hipocampo, bem como em hipotálamo e hipófise (Duman,1995), exercendo então um efeito de *feedback* negativo sobre a liberação de ACTH (Reisini *et al.*, 1986).

Os GCS produzem mudanças fisiológicas requeridas para preparar o organismo em situações de emergência. Os GCS influenciam os sistemas renal, cardiovascular e nervoso (Liddle, 1981; Tyrrel & Forsham, 1983). O cortisol é o principal hormônio glicocorticóide secretado pelo córtex da adrenal humana, enquanto que a corticosterona é o principal corticóide secretado nos ratos (Bhatnagar *et al.*,1997). Embora esses hormônios sejam catabólicos, prolongada exposição aos mesmos pode ser deletéria, resultando em condições patológicas em animais cronicamente estressados (Martignoni *et al.*, 1992).

O hipocampo é o principal alvo no cérebro para esteróides adrenocorticais devido à grande concentração de receptores para GCS nesta estrutura (Sapolsky *et al.*, 1984; McEwen *et al.*, 1975.). Em seres humanos, o hipocampo sofre atrofia após estresse traumático, depressão recorrente, síndrome de Cushing e em indivíduos idosos (Magariños *et al.*, 1997). Em ratos, tem-se mostrado que a exposição a estresse agudo ou crônico como causa de perda de células neuronais hipocampais e atrofia de dendritos apicais nos neurônios da região de CA3 do hipocampo (Moghaddam *et al.*, 1994).

No hipocampo, os GCS regulam a via que resulta na inibição da síntese e secreção do CRH pelos neurônios do hipotálamo. O CRH é um neuropeptídeo sintetizado na parte parvocelular do PVN e está distribuído em

áreas cerebrais extra-hipotalâmicas, tais como hipocampo, amígdala, estriado ventral e córtex frontal (Swanson *et al.*, 1983). O CRH tem crucial importância nas respostas comportamental, neuroendócrina e neuroimune ao estresse (Swanson *et al.*, 1983).

Uma elevação prolongada de GCS resulta em efeitos neurotóxicos e morte celular, que pode contribuir para prejuízo no controle de *feedback* negativo do eixo LHPA (Duman, 1995). Além dessa ação sobre a liberação de CRH, os glicocorticóides têm múltiplos efeitos no hipocampo, incluindo alterações na síntese protéica (Nestler *et al.*, 1981), na recaptação de GABA (Miller *et al.*, 1978) e na atividade serotoninérgica (Biegon *et al.*, 1985).

Selye, em seus estudos iniciais (*apud* Sapolsky, 1992), observou que uma variedade de estressores crônicos pode causar úlcera péptica, hipertrofia da adrenal e colapso autoimune. Selye descobriu a extraordinária importância do estresse como causador de doenças. Atualmente, conhece-se um grande número de doenças que são causadas ou exacerbadas pelo estresse crônico (miopatia, hipertensão, diabetes induzida por esteróides, alterações na reprodução, nanismo psicogênico). O estresse crônico não é patogênico porque as defesas do organismo falham, e sim, porque, no estresse crônico e intenso, os mecanismos envolvidos neste processo tornam-se, eles mesmos, agressivos ao organismo (Sapolsky, 1992).

Demandas repetidas ou de longo prazo podem levar a modificações no eixo LHPA, resultando em respostas alteradas ao estresse (Konarska *et al.*, 1989; Tizabi & Aguilera, 1992). Além disso, o envelhecimento pode diminuir a capacidade de resposta apropriada ao estressor (Sapolsky,

1992). Por outro lado, o estresse crônico pode acelerar os aspectos degenerativos do envelhecimento (Bhatnagar *et al*, 1997). Entre as alterações resultantes da exposição crônica ao estresse, estariam defeitos no mecanismo de *feedback* ou no ritmo circadiano (Holmes *et al.*,1995). Isto assume grande importância quando se considera que há numerosas indicações de alterações do eixo LHPA em várias síndromes psiquiátricas, incluindo desordens alimentares, ansiedade e doença do pânico (Akil e Morano, 1995).

Estresse e alterações de comportamento alimentar

O comportamento alimentar reflete uma interação entre o estado fisiológico do organismo e as condições ambientais (Halmi, 1995). As condições ambientais incluem características do alimento, tais como paladar, textura, novidade, acessibilidade e composição nutricional, e condições externas ao alimento, tais como temperatura, presença de pessoas ou exposição a algum tipo de estresse (Blundell e Hill, 1986). Centros hipotalâmicos da fome fazem parte de um complexo de interações neuro-regulatórias que incluem o sistema periférico de saciedade (hormônios gastrintestinais e pancreáticos) e uma grande rede neural no cérebro (Blundell e Hill, 1986).

Diferentes sistemas de neurotransmissores centrais têm sido envolvidos no comportamento e na patologia alimentar. Por exemplo, sabe-se que a ingestão de sacarose aumenta o metabolismo da dopamina no hipotálamo, e parece provável que os mecanismos centrais da dopamina

sejam necessários à resposta normal de alimentação ao estímulo do sabor doce (Blundell, 1991). Peptídeos opióides também têm sido implicados nas respostas de prazer a alimentos, especialmente de sabor doce (Blundell, 1991). A norepinefrina estimula o apetite, principalmente de alimentos ricos em carboidratos, por meio de receptores α_2 no NPV. Paralelamente, a serotonina interage com mecanismos noradrenérgicos e facilita a saciedade (Blundell & Hill, 1993; Halmi, 1995)

Os efeitos do estresse na ingestão têm sido bem estudados em animais com técnicas de compressão na cauda, imobilização ou exposição a um ambiente novo (Halmi, 1995).

Em nosso laboratório foi estudado o comportamento alimentar de ratos estressados cronicamente em dois modelos de estresse: por imobilização e estresse variável (luz piscante, natação, privação de água, privação de comida, isolamento, imobilização isolada ou associada ao frio) para consumo de alimento doce. Observou-se que os animais estressados cronicamente por imobilização consumiam mais alimento doce que os animais controle e este efeito foi revertido pela administração de diazepam (Ely et al., 1997). Por outro lado os animais submetidos a estresse crônico variável apresentaram uma diminuição significativa no consumo de alimento doce (Gamero, 1998). Em ambos os modelos de estresse não houve variação no consumo de ração-padrão.

Estresse, catecolaminas e indolaminas.

Estudos de vários autores mostraram que a imobilização e outros

tipos de estresse induzem a ativação do eixo LHPA e que esta ativação ocorre subseqüentemente à ativação dos neurônios catecolaminérgicos do tronco cerebral (Lachuer *et al.*, 1994).

Durante o estresse a glândula adrenal secreta GCS e catecolaminas (CA) (Natelson *et al.*, 1987). Estressores de vários tipos ativam a liberação e o *turnover* de epinefrina pela glândula adrenal e de CA pelo sistema nervoso autônomo (Tsuda *et al.*, 1989; McEwen & Sapolsky, 1995).

A exposição crônica a estímulos estressantes induz a mecanismos compensatórios que atenuam os efeitos deletérios do estresse repetido, em um sistema defensivo que mantém o estado homeostático (Mansi e Drolet, 1997). Esta habilidade para adaptar-se ao estresse repetido ou prolongado envolve aparentemente os eixos LHPA e simpático-adrenal (AS), os dois maiores envolvidos na resposta ao estresse (Mansi e Drolet, 1997).

Os sistemas catecolaminérgicos (SCA) do tronco cerebral estão envolvidos na ativação do eixo LHPA (Plotsky *et al.*, 1989). O PVN é densamente inervado por terminais catecolaminérgicos (Swanson *et al.*, 1983). Esta inervação se origina de grupos de células noradrenérgicas localizadas no tronco cerebral (chamadas grupo A₁ na medula ventral e grupo A₂ na medula dorso medial) e nos setores superiores da medula bem como em menor extensão do *locus coeruleus* na ponte dorsal (Sawchenko & Swanson, 1982).

Investigações fisiológicas têm demonstrado que a integridade da inervação SCA no PVN é necessária para a ativação do eixo LHPA por

certos estressores tais como estresse por exposição a vapores de éter (Lachuer *et al.*, 1994) ou por imobilização (Gibson *et al.*, 1986).

Exposição ao estresse também causa ativação do *turnover* da serotonina (5-HT) (Van Loon *et al.*, 1981). Isto levou alguns autores a sugerir que o estresse estaria envolvido com fenômenos relacionados à ansiedade (Graeff, 1993). Deve-se lembrar que a 5-HT tem importante função no aprendizado e retenção do medo (Archer *et al.*, 1982; Archer, 1993). Anormalidades na função serotoninérgica têm sido ligadas a muitos sintomas de depressão, como por exemplo, mudanças de apetite, humor, função sexual, sono e função cognitiva (Blundell, 1984). Estudos sugerem que a liberação de renina e prolactina, mas não a secreção de corticosterona, seja modulada pelos neurônios serotoninérgicos do mesencéfalo e suas projeções para a região mediobasal do hipotálamo (Van de Kar *et al.*, 1982).

Além disso, sabe-se que uma das conseqüências do estresse repetido é o aumento da atividade da tirosina-hidroxilase (TH), uma enzima limitante para a formação de norepinefrina e epinefrina no *locus coeruleus* e medula da adrenal (Lachuer *et al.*, 1994). O estresse induz a ativação da biossíntese de CA e também aumenta a eficiência catalítica da TH (Nisenbaum *et al.*, 1991).

Estresse e nocicepção

Existem evidências de que o estresse está associado com alterações no sistema opióide endógeno. Em 1985, Van der Kolk e associados (Friedman & Southwick, 1995) propuseram que a doença de

estresse pós-traumático estaria associada à depleção crônica de peptídeos opióides endógenos. O estresse leva à liberação de opióides endógenos, diminuindo a sensibilidade à dor (Southwick *et al.*, 1995). A analgesia provocada pelo estresse pode ser bloqueada pela administração de um antagonista opióide (naltrexona, naloxona) (Siegfried *et al.*, 1987; Rodgers & Hendrie, 1983), demonstrando que há uma relação daquela com sistemas opióides endógenos. Os tipos de estresse que levam a este fenômeno incluem choque nas patas, injeção de salina hipertônica, natação em água fria, estímulos nocivos na pele e imobilização (Amir & Amit, 1978; Bodnar, 1986; Hayes *et al.*, 1978). Em nosso laboratório, temos observado que ratos estressados agudamente (machos e fêmeas) apresentam alta latência para retirada da cauda a um estímulo térmico nocivo (*tail-flick*) quando comparados com ratos controles. Por outro lado, ratos estressados cronicamente por imobilização mostraram uma adaptação a este efeito, que varia conforme o sexo (Gamaro *et al.*, 1998 b). Fêmeas cronicamente estressadas não apresentam o efeito analgésico característico em resposta à sessão de estresse, quando comparadas com controles. Ratos machos cronicamente estressados mostraram uma diminuição na latência do *tail-flick*, caracterizando uma resposta hiperalgésica, tanto no estado basal quanto após exposição a sessão de estresse (Gamaro *et al.*, 1998 b).

A nocicepção também tem sido relacionada com exposição à novidade (Netto *et al.*, 1987; Siegfried *et al.*, 1987; Dalmaz *et al.*, 1991). Sabe-se que há liberação de β -endorfina em situações de novidade não dolorosas (Carrasco *et al.*, 1982; Izquierdo e Netto, 1985a, 1985b). Tem sido sugerido

que a antinocicepção presente após exposição à novidade ocorre devido à liberação de β -endorfina hipotalâmica (Siegfried *et al.*, 1987).

Estresse e memória

Denomina-se aprendizado a aquisição de informação por meio da experiência e memória o armazenamento e a evocação da informação ou de conseqüências destas informações. Não existe memória sem aprendizado, e não há aprendizado sem experiências (Carrasco *et al.*, 1982; Izquierdo, 1989a e 1989b; Izquierdo e Medina, 1991).

Várias regiões do cérebro têm sido implicadas nos processos de memória: a amígdala, o hipocampo, o núcleo caudado, o hipotálamo e o tálamo (localizados no centro do cérebro), o córtex cerebral (Izquierdo & Medina, 1997). Este conjunto de estruturas integra um sistema modulador que influencia a decisão, por parte do sistema nervoso, diante de cada experiência, do que deve ser gravado e do que deve e pode ser evocado (Izquierdo, 1989a). Dados recentes indicam que o córtex entorrinal e, minutos mais tarde, o córtex parietal posterior participam nos processos de formação ou consolidação da memória nas horas que seguem a seu processamento inicial por hipocampo e amígdala (Izquierdo & Medina, 1997).

A cadeia de fenômenos da memória é constituída por esta seqüência de eventos: 1) experiência nova, 2) aquisição de comportamento ou informação, 3) armazenamento, 4) consolidação, 5) evocação (Izquierdo e Netto, 1985 b). A memória pode ser modificada por tratamentos farmacológicos e/ou comportamentais que atuam sobre os processos de

aquisição, consolidação e/ou evocação (Gold & McGaugh, 1975; Izquierdo *et al.*, 1984).

Estudos dos laboratórios de Izquierdo (Izquierdo e Dias, 1983 a e b ; Izquierdo, 1984), de Wied (de Wied, 1977 a e b; Bohus & de Wied; 1981; de Wied, 1984) e McGaugh (McGaugh, 1983; McGaugh *et al.* 1988; Kim & McGaugh, 1990; Liang *et al.*, 1990; McGaugh, 1990), juntamente com outros pesquisadores, têm demonstrado que mecanismos hormonais estão envolvidos com o aprendizado e a memória. Em particular, os hormônios secretados pelo sistema hipófise-adrenal parecem estar envolvidos. Tanto o aprendizado aversivo quanto o apetite podem ser influenciados pelos hormônios da hipófise-adrenal (ACTH e GCS) (Izquierdo e Dias, 1983 a e 1983b; Gray & Garud, 1977; Levine *et al.*, 1977; Roozendaal e McGaugh, 1996). Situações estressantes podem facilitar ou deprimir a memória, dependendo do nível de estresse envolvido (Gold e Van Buskirk, 1978 a).

Há também evidências de que o estresse pode melhorar ou prejudicar o aprendizado e, como foi citado acima, muitos hormônios secretados durante o estresse (ACTH, glicocorticóides, opióides, epinefrina, norepinefrina e vasopressina) têm sido descritos como afetando os processos de aprendizado e memória (Izquierdo e Dias, 1981, 1983a e 1983b; Izquierdo *et al.*, 1982; Roozendaal *et al.*, 1993, Roozendaal e McGaugh, 1996).

Entre os vários sistemas moduladores envolvidos na adaptação ao estresse que apresentam efeito sobre a memória estão os sistemas mediados por catecolaminas (Izquierdo & Dias, 1983a; Armário *et al.*, 1990) ou por neuropeptídeos, como a β -endorfina, o ACTH e a vasopressina (Izquierdo *et*

al., 1982; Izquierdo & Dias, 1983 b, Almeida & Izquierdo, 1984). Além destes, a memória sofre influência de outros sistemas, tais como aminoácidos excitatórios, como o ácido glutâmico (Brioni & Izquierdo, 1988, Brioni & McGaugh, 1989; McGaugh *et al* 1988) ou inibitórios como o GABA (ácido gama-aminobutírico) (Brioni & McGaugh, 1989; McGaugh, 1989a e 1989b). A epinefrina administrada após o treino produz como resultado uma curva em “U” invertido, isto é, a retenção é aumentada por pequenas doses do hormônio e é diminuída por doses altas (Gold e Van Buskirk, 1978b, Gamaro *et al.*, 1997). Estímulos estressantes, incluindo os utilizados em testes de memória em animais, provocam liberação de epinefrina pela medula da supra-renal (Gold e Van Buskirk, 1978b). Dependendo da intensidade do estresse aplicado ao animal, a epinefrina poderá ser facilitadora (estresse leve) ou amnésica (estresse mais intenso). Neste último caso, a diminuição da retenção é causada pelo alto nível plasmático de epinefrina (Gold e McCarty, 1981; Gold *et al.*, 1982) e correspondente alterações de catecolaminas centrais (Gold & Van Burkisk, 1978b).

O hipocampo tem importante função nos fenômenos de aprendizado e cognição. É uma estrutura muito importante nos processos de aprendizado e memória nos mamíferos (Berger e Thompsom, 1982; Olton *et al*, 1980). Os GCS liberados durante o estresse interferem na função hipocampal influenciando, portanto, os processos de aprendizado e memória (Bohus *et al.*, 1982). Há relatos de que o estresse diminui a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long term potentiation*) hipocampal (Foy *et al.*, 1987). Existe uma correlação negativa entre corticosterona plasmática e LTP,

indicando uma relação inversa entre a magnitude da resposta ao estresse e a extensão da manutenção da LTP (Foy *et al.*, 1987). Sabe-se que os glicocorticóides promovem a extinção da resposta de esquiva (Bohus *et al.*, 1970, Tyrrel & Forsham, 1983; Van Wimersma Griedanus, 1970). Muitas alterações comportamentais causadas por glicocorticóides são resultado da ação destes hormônios sobre a função hipocampal (Bohus *et al.*, 1982). Recentes estudos de Lupien e McEwen indicam que glicocorticóides têm múltiplos e freqüentemente conflitantes efeitos sobre a memória (Lupien & McEwen, 1997). Doses extremamente baixas ou altas podem prejudicar a consolidação (Luine *et al.*, 1996), mas doses intermediária melhoram a memória (Rooszendaal & McGaugh, 1996; Lupien & McEwen, 1997), e a ativação de receptores de glicocorticóides parece ser pré-requisito para armazenamento de longa duração da informação.

Também a glicose é citada como uma substância moduladora da memória, podendo facilitar a função colinérgica e o aprendizado de novas tarefas (Gold, 1986; Gold, 1991; Stone *et al.*, 1995; Ragozzino *et al.*, 1996). A glicose leva a um aumento da atividade hipocampal. Certas doses de glicose podem ajudar a sustentar essa atividade pelo aumento da síntese de acetilcolina, devido a uma maior disponibilidade de acetil-CoA, um dos precursores da acetilcolina (Tusek, 1983; Messier *et al.*, 1990; Ragozzino *et al.*, 1996). Existem também relatos de que a glicose poderia reverter o efeito inibitório exercido por opióides sobre o *turnover* da acetilcolina no hipocampo (Ragozzino *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1991).

Em nosso laboratório temos estudado estresse crônico e memória.

Utilizamos para isto dois modelos de estresse crônico: estresse por imobilização e estresse variável (luz piscante, imobilização, imobilização + frio, natação, privação de água ou comida, isolamento). No modelo de estresse por imobilização os animais estressados mostraram alterações tarefa-específicas em relação a animais controles, isto é, não foram observadas alterações de desempenho nas tarefas de esquiva ativa de duas vias, esquiva inibitória e labirinto de oito braços (Gamaro *et al.*, 1998 a, Cucco, 1998). Por outro lado, os animais estressados cronicamente por imobilização apresentaram perda de memória na tarefa de exposição ao campo aberto (Gamaro, *et al.*, 1998 a; Xavier, 1995). Com relação ao estresse crônico variável, os animais estressados não diferiram dos controles na tarefa de campo aberto, esquiva inibitória e esquiva ativa de duas vias (Gamaro, 1998).

Os animais parecem ser capazes de formar mapas cognitivos do ambiente que os rodeia, por meio do comportamento exploratório, e utilizar-se destes mapas para orientar-se e deslocar-se de forma flexível neste ambiente (Xavier, 1989). Muller e colaboradores (1996) atribuem importância capital ao comportamento exploratório para a formação e a atualização desses mapas cognitivos, que estariam sendo processados no hipocampo. Segundo eles, a detecção de diferenças entre a representação neural do ambiente e a estimulação presente dar-se-ia por meio de unidades (células nervosas) localizadas no hipocampo, que disparariam quando o ambiente, ou parte dele, fosse modificado.

Para testar memória espacial de trabalho ou de referência utilizam-se comumente labirintos (de oito braços, em cruz ou aquático). Sugere-se que

a aprendizagem do labirinto envolva aprendizagem espacial, de seqüências de respostas ou ambas. A importância de cada uma deve variar com a disponibilidade de pistas e com o estágio de treinamento dos animais (Kendler e Gasser, 1948).

Xavier (1985) estudou a relação entre hipocampo, o comportamento exploratório e o aprendizado espacial, por meio da observação da reação de ratos lesados no hipocampo dorsal, concluindo que os animais com lesões no hipocampo dorsal não perdem a habilidade para responder a novos estímulos. A deficiência destes animais parece relacionar-se com o contexto espacial da apresentação dos estímulos. O hipocampo parece constituir uma parte importante do substrato neural relacionado à orientação espacial.

Assim sendo e considerando que o estresse crônico pode levar, segundo a literatura, a alterações em células nervosas hipocampais (bibliografia citada acima), é de interesse o estudo dos efeitos do estresse crônico sobre a memória em tarefas espaciais.

OBJETIVOS

O objetivo da presente dissertação de Mestrado é estudar o efeito do estresse crônico por imobilização sobre diferentes parâmetros comportamentais e bioquímicos apresentados a seguir:

- 1) Avaliar efeitos do estresse crônico por imobilização sobre a nocicepção, por meio dos seguintes parâmetros:
 - 1.1 a antinocicepção induzida por novidade;
 - 1.2 o efeito antinociceptivo da morfina;
 - 1.3 o efeito da interrupção do estresse crônico por 14 ou 28 dias;
 - 1.4 o efeito de uma nova exposição a uma sessão de estresse após 14 ou 28 dias de interrupção;
- 2) Avaliar os efeitos do estresse crônico por imobilização sobre a ingestão de alimento palatável, não-doce;
- 3) Avaliar o efeito do estresse crônico por imobilização sobre a memória espacial, utilizando diferentes versões da tarefa de labirinto aquático;
- 4) Avaliar as alterações de corticosterona plasmática após estresse crônico por imobilização, comparando-as com as induzidas por estresse agudo;
- 5) Determinar os níveis de aminas biogênicas em diferentes estruturas cerebrais (hipocampo, córtex frontal, hipotálamo e amígdala).

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos machos (60 dias). Os animais, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram mantidos em caixas-moradia, confeccionadas em *plexiglas*, medindo 41x34x16 cm, com assoalho recoberto de serragem. Os animais foram submetidos a um ciclo normal claro/escuro de 12 horas, com ração padronizada e água *ad libitum*.

2. MODELO DE ESTRESSE

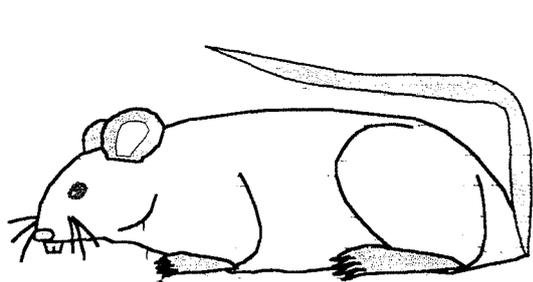
2.1. TRATAMENTO CRÔNICO

Os animais foram divididos em 3 grupos: controle, manipulado e estressado (Fig. 2).

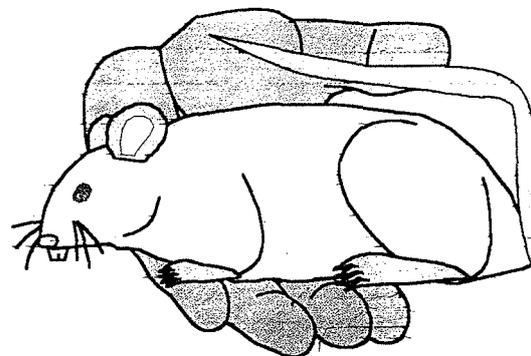
Os animais do grupo denominado estressado foram imobilizados em um tubo plástico de diâmetro regulável, durante uma hora por dia, 5 dias por semana, por 40 dias, sempre entre 09:00 e 12:00h.

Os animais do grupo manipulado foram submetidos à manipulação diária, porém sem imobilização.

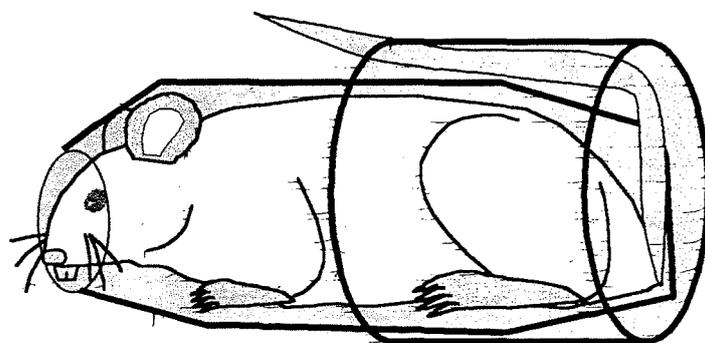
Os animais do grupo controle foram mantidos em suas caixas moradias durante todo o tratamento.



A. CONTROLE



B. MANIPULADO



C. ESTRESSADO

Figura 2: Modelo de tratamento crônico.

2.2. TRATAMENTO AGUDO

Os animais submetidos ao estresse foram imobilizados uma única vez, por 1 hora, em tubos de plástico de diâmetro regulável. O grupo controle foi mantido em suas caixas moradia até do sacrifício.

3. PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

Foram sempre realizados à tarde, entre 14 e 18 horas.

3.1. MEDIDA DE REFLEXO DE RETIRADA DA CAUDA

Foi realizado num aparelho *Tail Flick*, descrito por D'Amour e Smith (1941) (Fig. 3).

Os ratos foram contidos, utilizando-se uma toalha de pano, e colocados no aparelho com a cauda imobilizada sobre uma fenda, delimitada por duas chapas de metal. Uma fonte luminosa fixa estava colocada 2 a 3 cm rostral à ponta da cauda do animal. O acionamento da fonte luminosa disparava automaticamente um cronômetro digital, e a deflexão da cauda, motivada pelo calor irradiado pela lâmpada, desobstruía o feixe de luz que ativava uma fotocélula, o que, por sua vez, encerrava a medida (travava o cronômetro). A intensidade de luz foi ajustada em 0,35 mA, para se obter uma latência controle de retirada da cauda (*Tail Flick* ou TFL) de 3 a 6 s. Um limite superior de 10 s foi imposto às medidas para evitar danos teciduais aos animais. O teste baseia-se no

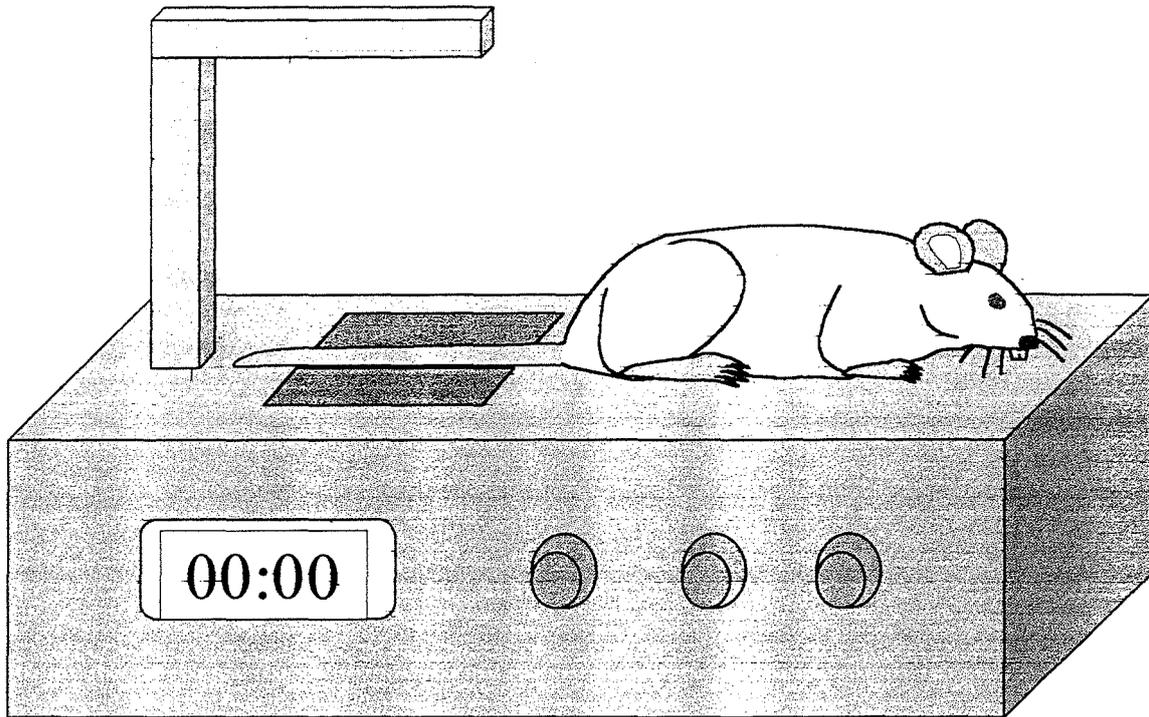


Figura 3: Desenho esquemático do aparelho de *Tail- Flick*.

princípio de que o calor intenso produzido pela focalização da luz na cauda provoca uma resposta nociceptiva (D'Amour e Smith, 1941; Siegfried *et al.*, 1987; Netto *et al.*, 1987).

Foi realizada uma primeira medida com a finalidade de habituar o animal ao aparelho, 24 horas antes da medida efetiva da latência de retirada da cauda.

3.1.1 Exposição à novidade

Neste experimento cada grupo (controle, manipulado e estressado) foi sub-dividido em outros dois sub-grupos: com e sem exposição à novidade.

O procedimento geral constou das etapas descritas a seguir. No primeiro dia, os animais foram familiarizados com o procedimento. A latência de base foi obtida para cada animal (esses dados não foram utilizados). A seguir, os animais foram colocados numa caixa de espera por 2 minutos e, então, relocalados nas caixas-moradia. No segundo dia, os animais foram submetidos à medida de TFL duas vezes: antes e dois minutos após exposição ao campo aberto durante 2 min (situação de novidade). Entre a exposição à novidade e a segunda medida de TFL, os animais foram deixados em uma caixa de espera. Os animais dos sub-grupos não expostos à novidade foram colocados por 4 min na caixa de espera, entre as duas medidas de TFL, sem exposição a qualquer situação experimental, conforme mostrado abaixo.

medidas basais, os animais de ambos os grupos (controle e estressado crônico) foram submetidos a um estímulo estressante (3h de imobilização) e a nocicepção foi então novamente avaliada. Uma vez que o grupo manipulado não apresentava diferença em relação ao controle para este parâmetro, esse grupo foi sacrificado e apenas os grupos controle e estressado foram mantidos para as medidas após a suspensão do tratamento.

Dados de animais que apresentaram medidas acima de 9 s, quando foi feita a medida de pré-exposição foram eliminados. Três animais foram eliminados e todos faziam parte do grupo controle.

3.2 CONSUMO DE ALIMENTO PALATÁVEL, NÃO - DOCE

Foi realizado conforme descrito por Ely e colaboradores (1994), com modificações.

Após 40 dias de estresse, os animais foram deixados em jejum durante a noite. No dia seguinte foram colocados, um a um, na extremidade de um compartimento fechado de 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, com teto de vidro (Fig. 4). Na outra extremidade deste compartimento havia uma pequena placa de Petri, onde foram colocados 10 grãos de amendoim (de peso conhecido). Os animais dispunham de 3 minutos para permanecer neste ambiente e a quantidade de amendoim ingerida foi medida em gramas. Após, os animais voltaram às suas caixas-moradia e lhes foi oferecida ração por pelo menos duas horas. Após, a ração foi novamente retirada e o proce-

dimento foi repetido por 5 a 6 dias (período de habituação).

Se algum animal não ingerisse qualquer amendoim durante a habituação, seria descartado. Foram eliminados 16 animais do grupo controle, 16 animais do grupo manipulado e 12 animais do grupo estressado.

Ao final da habituação, a ingestão foi medida durante um período de três min, por dois dias consecutivos , com os animais submetidos a duas situações: alimentados (dia 1) ou em jejum (dia 2).

A ingestão foi expressa em mg de alimento.

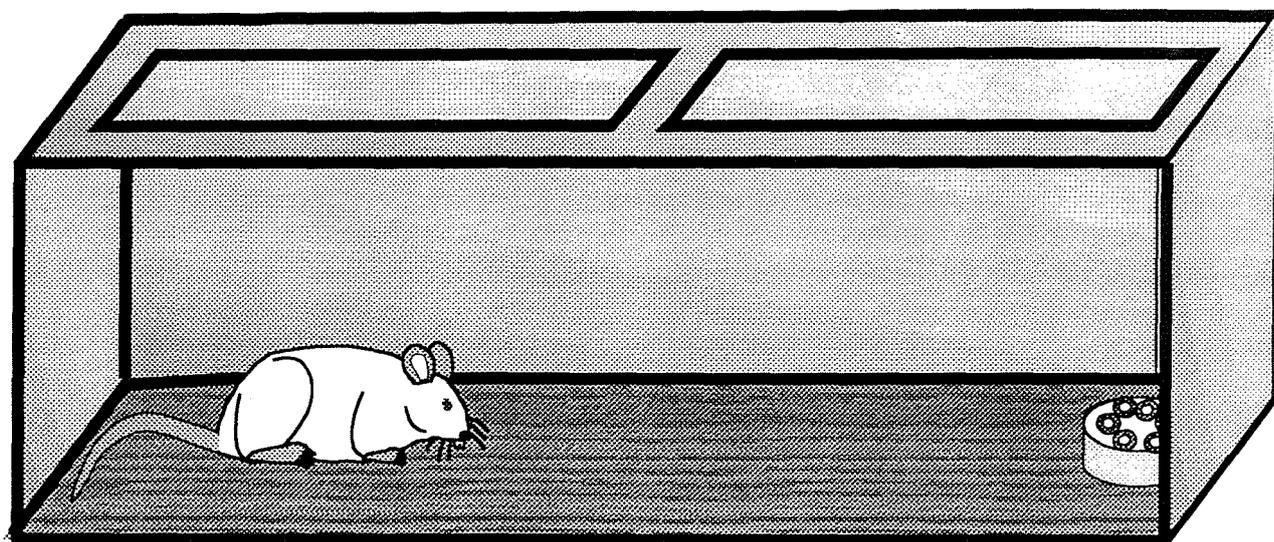


FIGURA 4: Desenho esquemática da caixa onde se realizou a tarefa de comportamento alimentar

3.3 LABIRINTO AQUÁTICO - Memória Espacial

3.3.1. Memória de Referência

Foi realizado conforme descrito por Brioni e colaboradores, (1990), com modificações (Morris, 1981; Brandeis *et al.*, 1989; Fenton *et al.*, 1994) Utilizou-se um tanque circular (112 cm de diâmetro e 55 cm de altura), com 25 cm de água a 22-25 °C (Fig 5 a). Diversas dicas extra-labirinto foram espalhadas pelas paredes da sala onde se localizava o tanque, na forma de cartazes com padrões geométricos diferentes, visíveis ao animal de dentro do tanque. Quatro posições iniciais foram utilizadas, as quais dividiram o tanque em quatro quadrantes iguais (Fig 5b). Utilizou-se, no centro do terceiro quadrante, não visível ao animal (1 cm abaixo do nível da água), uma plataforma de acrílico transparente e circular, com 5 cm de diâmetro, representando a única posição relativamente “seca” do tanque.

O treino consistia em duas sessões em dois dias consecutivos, de cinco tentativas ou *trials* em que o animal poderia nadar livremente até encontrar a plataforma e nela subir com as quatro patas, sendo estas tentativas separadas por um intervalo de 30 s. Se o animal não encontrasse a plataforma em até 60 s, era então conduzido gentilmente até esta, onde permanecia por 20 segundos, retornando, após, à sua caixa-moradia. Em cada *trial* o animal foi largado de uma posição diferente pré-estabelecida. No dia do teste, o animal foi largado de uma posição determinada, uma única vez, sem a presença da plataforma. Mediram-se o tempo até que o animal atingisse o local em que a pla-

taforma estava localizada durante os treinos, o tempo médio de permanência em cada quadrante e o número de cruzamentos. Para a medida de permanência em cada quadrante foi utilizado a divisão do labirinto mostrado na figura 5 b. O tempo de permanência no quadrante alvo em relação ao oposto e a diferença na latência para encontrar a plataforma entre o primeiro *trial* e o teste foram tomados como medida de memória. Utilizou-se como medida de aprendizado a diminuição nos tempos dos primeiros *trials* das sessões de teste em relação à sessão de treino.

3.3.2. Memória de Trabalho

Este experimento foi realizado no mesmo tanque da tarefa anteriormente descrita. Utilizou-se uma plataforma branca, visível ao animal (1,5 cm acima do nível da água).

O treino consistiu de uma única sessão, com 8 tentativas ou *trials*, separadas por intervalos de 30 s. Durante estas tentativas, o animal podia nadar livremente até encontrar a plataforma e subir com as quatro patas sobre ela. Se o animal não encontrasse a plataforma em até 60 s, era conduzido gentilmente até ela onde permanecia por 20 s, retornando então a sua caixa-moradia, onde permanecia por 30 s até a próxima tentativa. Utilizaram-se 8 posições diferentes de largada pré-estabelecidas, sempre o animal estando virado para a parede do tanque, variando também a posição da plataforma.

No dia do teste foram feitas duas tentativas com a plataforma em duas

posições diferentes. Mediu-se a latência para o animal chegar à plataforma.

A diferença na latência em encontrar a plataforma entre o primeiro *trial* do treino (dia 1) e o teste (dia 2) foi tomada como medida de memória de trabalho.

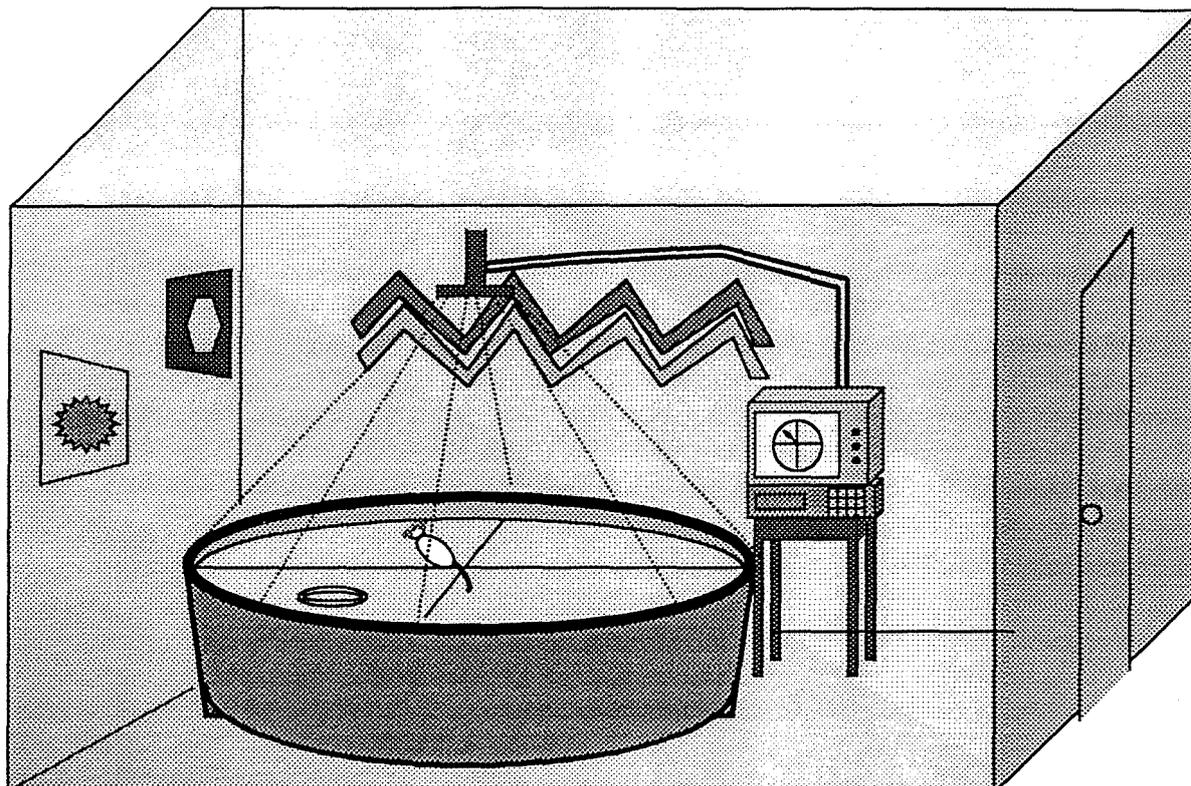


FIGURA 5 a: Desenho esquemático do Labirinto Aquático

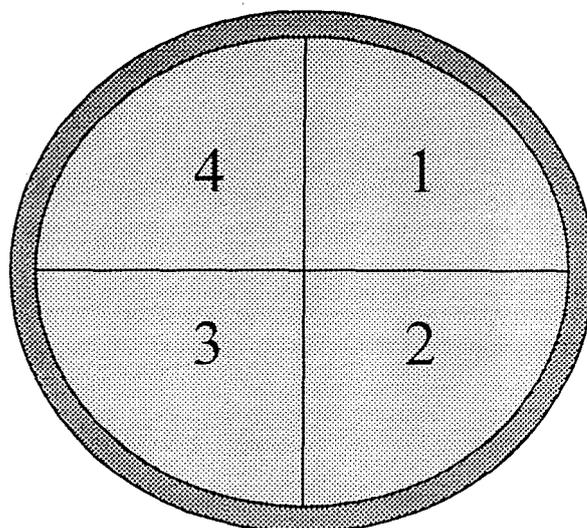


FIGURA 5 b: Desenho esquemático dos 4 quadrantes do Labirinto Aquático. 1. Quad. adjacente 1; 2. Quad. Alvo; 3. Quad. adjacente 2; 4. Quad. oposto

4. DOSAGENS BIOQUÍMICAS

4.1 Dosagem de Corticosterona no Plasma

O sangue do tronco foi coletado em tubo contendo heparina e centrifugado. O plasma foi então separado e congelado a -20°C .

A dosagem de corticosterona foi realizada através da técnica de Radioimunoensaio, utilizando-se um *kit* de dosagem BIOTRAK - RAT [125] *assay system* (Amersham LIFE SCIENCE). As medidas foram realizadas nos modelos de estresse crônico 24h e imediatamente após imobilização e de estresse agudo imediatamente após imobilização.

Os resultados obtidos através de leitura em contador de radiação gama- COBRA Auto-Gamma PACKARD foram calculados seguindo as instruções de cálculo do *kit*, comparando-se com a curva padrão. E os resultados foram expressos em ng de corticosterona/mL de plasma.

4.2. Medida dos níveis de catecolaminas, indolaminas e seus metabólitos

As dosagens de catecolaminas, indolaminas e seus metabólicos foram executadas por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC - ED) com detecção eletroquímica (Jonsson *et al.*, 1980; Hallmam *et al.*, 1984). Os animais foram sacrificados 24 horas após a última sessão de estresse, o cérebro

rapidamente removido e a dissecação regional (hipotálamo, hipocampo, amígdala, córtex frontal). As estruturas foram pesadas e congeladas envoltas em papel alumínio e guardadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização da análise (Hallman *et al.*, 1984).

Para a dosagem de aminas biogênicas e seus metabólitos, as estruturas foram colocadas em *Eppendorfs*, de 1,5 mL, suspensas em ácido perclórico 0,1 M, em volumes variáveis, de acordo com a estrutura (0,8 mL para hipocampo, córtex, 0,7 mL para hipotálamo e amígdala). e homogeneizadas em um sonicador, executando-se 8 pulsos para cada amostra. As amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm, por 15 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram retirados $50\text{ }\mu\text{L}$ do sobrenadante que foram injetados na coluna (Fig 6).

A quantificação de norepinefrina (NE), dopamina (DA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), serotonina (5-HT), ácido 5 hidróxi-indolacético (5-HIAA), foi feita por comparação com picos obtidos através da injeção de uma solução padrão.

As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna de fase reversa C18 (ODS 220 x 4,6 mm, partículas de $5\text{ }\mu\text{m}$, BAS, USA), um detector amperométrico (BAS LC – 3A) equipado com um eletrodo de trabalho de carbono vítreo e um registrador gráfico TYT (BAS).

A fase móvel continha ácido cítrico 0,15 M, octil sulfato de sódio 15 mg%, acetonitrila 3,2 % (v:v), tetra-hidrofurano 1,2 % (v:v). Utilizou-se água bidestilada, e antes da adição dos solventes orgânicos a fase móvel foi filtra-

da (microfiltro de 0,29 μm) e desgaseificada, com pH final ajustado em 3,0.

Utilizou-se fluxo de 1 mL por min para a fase móvel. O detector, foi ajustado para um potencial de oxidação + 850 mV e sensibilidade em 20 nA para os padrões e 10 nA para as amostras.

Os valores das catecolaminas, indolaminas e seus metabólitos foram expressos em ng/g de tecido.

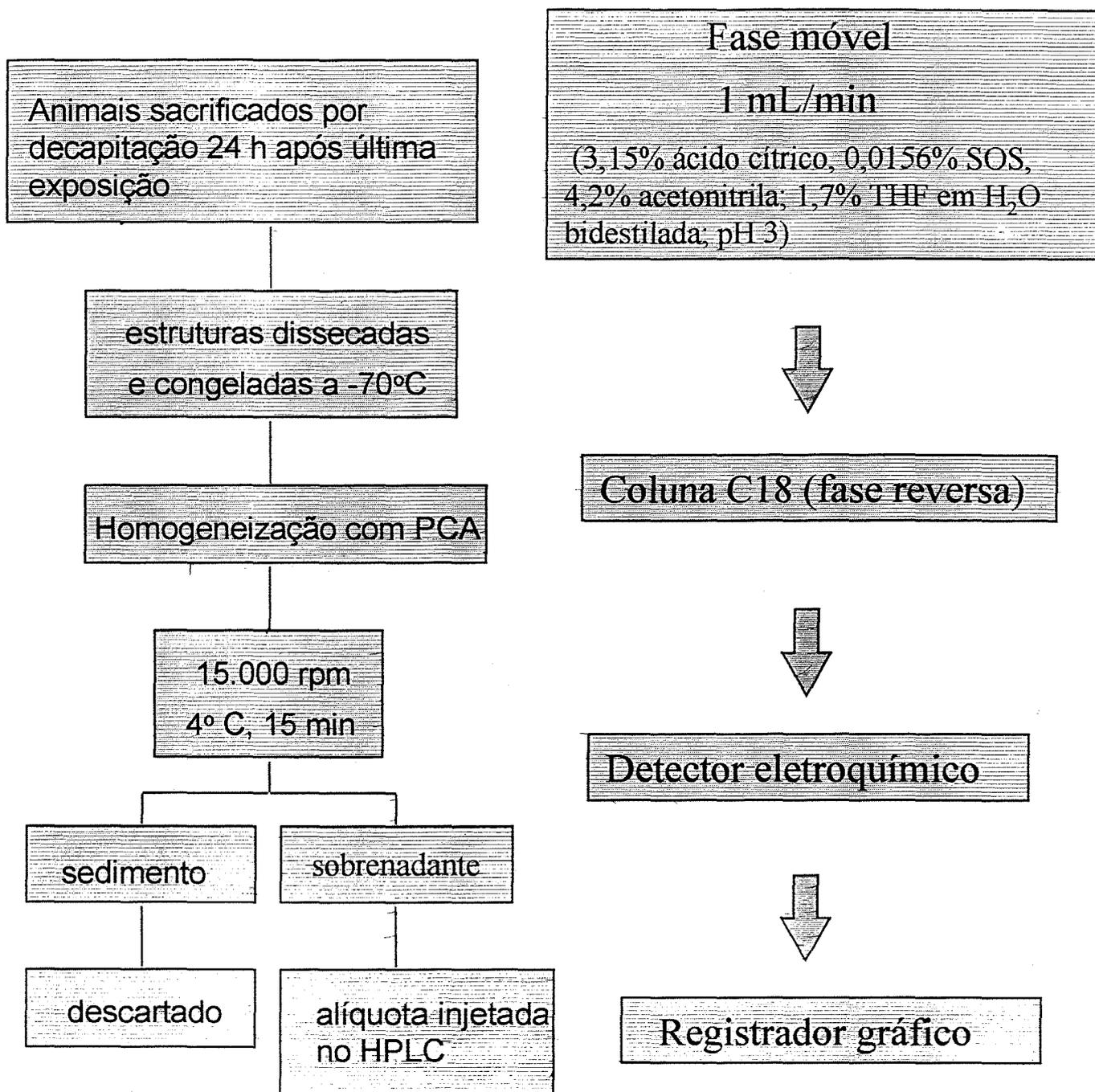


Figura 6: Determinação de catecolaminas em hipocampo, hipotálamo, amígdala e córtex frontal.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos (consumo de alimento palatável; níveis de corticosterona e catecolaminas; tempo no quadrante e no quadrante oposto à plataforma no teste de labirinto aquático) foram expressos como média \pm erro padrão. Utilizou-se ANOVA de medida repetida ou de uma via, seguida, quando necessário, pelo teste de Student-Newman-Keuls ou teste t de Student, segundo desenho experimental.

Os dados não-paramétricos (latência para retirada da cauda no *tail-flick*, latência para atingir a plataforma no labirinto aquático) foram expressos como mediana e intervalos interquartis e comparados pela análise de variância de Kruskal-Wallis, pelo teste U de Mann-Whitney ou pelo teste de Wilcoxon, dependendo do desenho experimental.

RESULTADOS

1. Efeito do estresse crônico por imobilização sobre a nocicepção de ratos Wistar.

1.1. Efeito da exposição à novidade (campo aberto) sobre a nocicepção em ratos estressados cronicamente por imobilização.

Conforme citado anteriormente, existem relatos de que a exposição a uma situação de novidade provoca antinocicepção, a qual, sugere-se, seja devida à liberação de β -endorfina hipotalâmica (Netto *et al.*, 1987; Siegfried *et al.*, 1987). Neste experimento, determinou-se o efeito da novidade sobre a nocicepção, medida por meio de um aparelho de *tail-flick*, antes e após exposição pela primeira vez ao campo aberto, em animais controle, manipulados e estressados.

No primeiro dia, todos os animais foram familiarizados com o aparelho de *tail-flick* e, no dia seguinte, verificou-se o efeito da exposição à novidade nestes animais, conforme descrito em Material e Métodos. Observar que, para tal, os animais dos três grupos foram subdivididos em dois outros grupos: expostos ou não à novidade.

Como se pode observar na Figura 7 a. os animais do grupo controle apresentaram um aumento na latência de retirada da cauda após exposição à

novidade (Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$), confirmando os dados da literatura. Por outro lado, os animais dos grupos manipulado e estressado cronicamente por imobilização não são significativamente diferentes em suas latências antes e após exposição à novidade (exposição ao campo aberto) (Figura 7 b e 7 c, Teste de Wilcoxon, $p > 0,05$), ou seja, não houve efeito antinociceptivo.

RESPOSTA NOCICEPTIVA *controle*

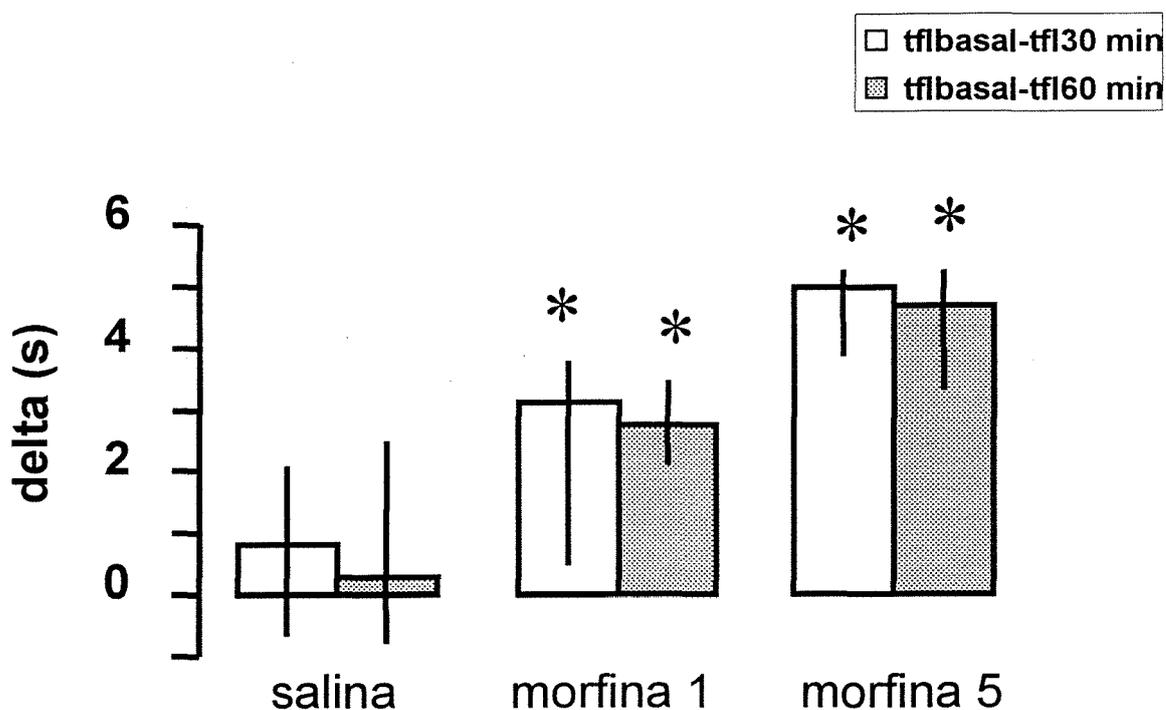


Figura 8 a: Efeito da administração de morfina sobre a resposta nociceptiva em animais controles. Medidas expressas como mediana (intervalos interquartis).

* Diferença significativa em relação às medidas anteriores pelo teste de Wilcoxon, $p < 0,05$. Salina $N = 18$; morfina 1 $N = 10$; morfina 5 $N = 8$.

RESPOSTA NOCICEPTIVA *estressado*

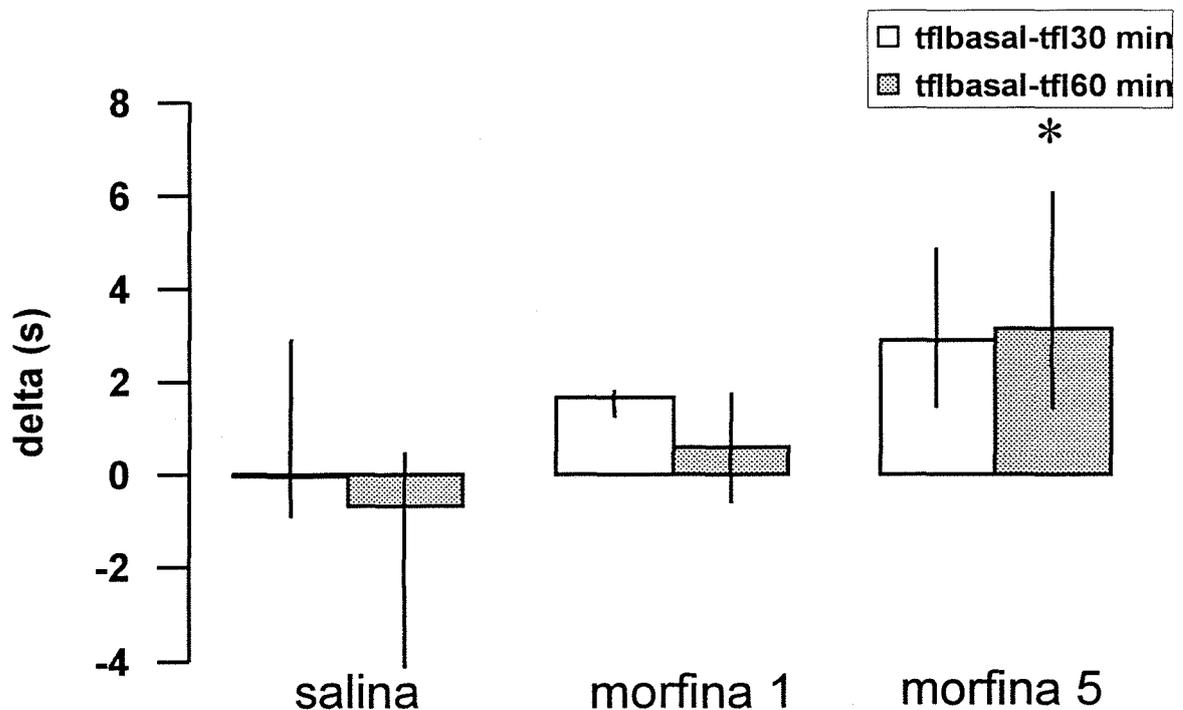


Figura 8 c: Efeito da administração de morfina sobre a resposta nociceptiva em animais estressados cronicamente por imobilização. Dados expressos como mediana (intervalo interquartis).

* Diferença significativa em relação às medidas anteriores. Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$.

Grupo salina: N = 11. Morfina 1: N = 13. Morfina 5: N = 8.

RESPOSTA NOCICEPTIVA

Manipulado

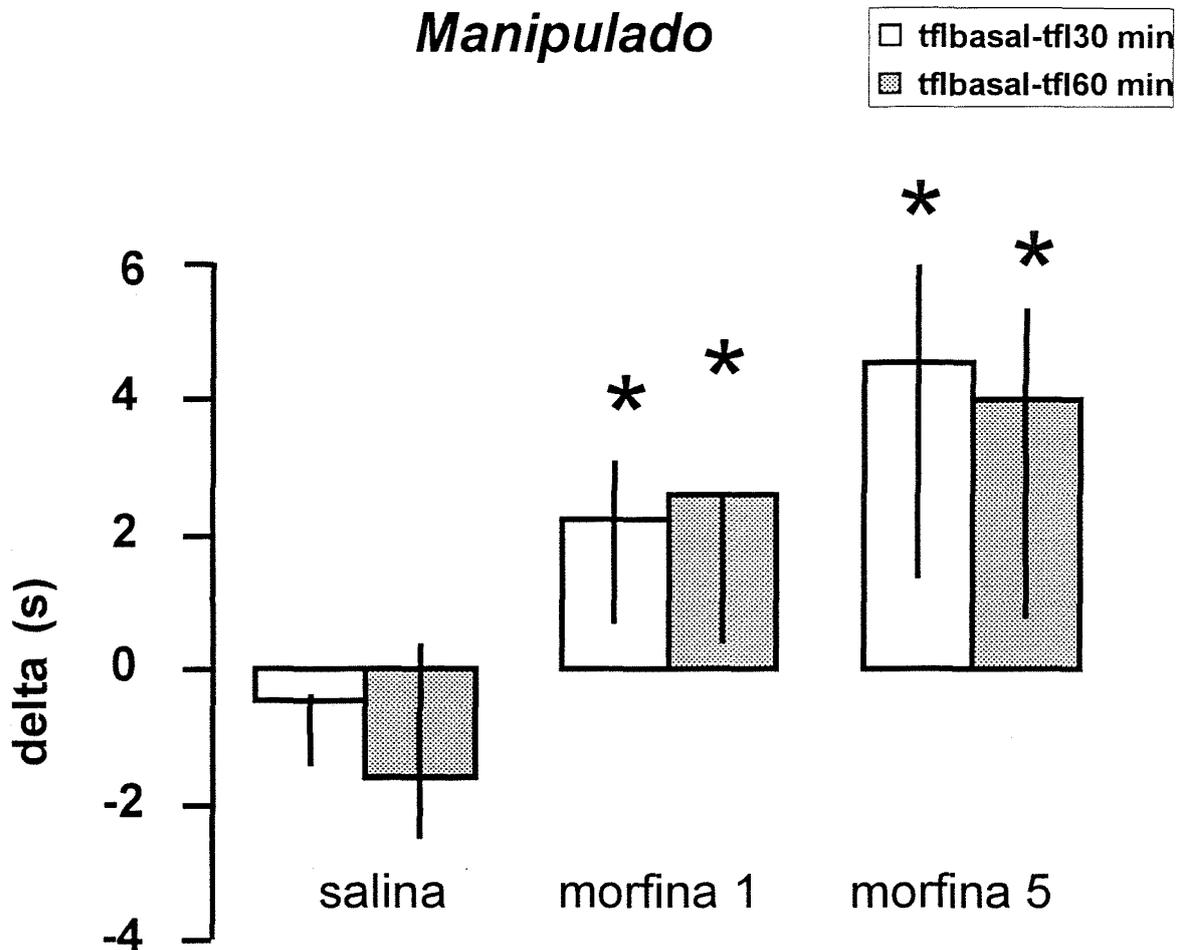


Figura 8 b: Efeito da administração de morfina sobre a resposta nociceptiva em animais manipulados. Dados expressos como mediana (intervalo interquartis).

* Diferença significativa em relação às medidas anteriores. Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$. Salina $N = 9$; morfina 1 $N = 13$; morfina 5 $N = 10$.

1.2. *Efeito da morfina em diferentes doses (1,0 e 5,0 mg/Kg) sobre a nocicepção em ratos estressados cronicamente por imobilização, avaliados em 30 e 60 min após a injeção*

Os animais foram submetidos ao estresse crônico, como descrito em Material e Métodos. Após 40 dias, os três grupos (controle, manipulado e estressado) foram expostos ao aparelho de *tail-flick* para habituação ao procedimento. No dia seguinte, a latência para retirada da cauda foi novamente medida, após o quê cada grupo foi subdividido em três sub-grupos, conforme a dose de morfina administrada intraperitonealmente: salina, morfina 1 mg/kg e morfina 5 mg/kg. A latência para retirada da cauda foi novamente medida 30 e 60 min após a injeção. Os dados foram analisados, utilizando a diferença entre as latências de retirada da cauda entre o basal e 30/60 minutos (30 min - basal e 60 min - basal).

Inicialmente foram comparadas as latências dos sub-grupos (S, M1, M5) em cada tratamento comportamental (estresse, manipulado e controle). Para o grupo controle, as latências basais foram de 6,36 (5,25 / 7,91), 5,31 (3,66 / 6,54) e 5,05 (4,79 / 5,45), respectivamente para os sub-grupos salina, morfina 1 mg/Kg e morfina 5 mg/Kg, não se mostraram estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). Para o grupo manipulado as latências basais foram de 6,12 (4,92 / 7,28), 6,55 (3,96 / 6,81), 5,25 (4,02 / 6,25), respectivamente para os sub grupos S, M1, M5, não se mostraram estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). Para o grupo estressado as latências basais foram de 4,00 (3,35 / 7,06), 5,30 (4,09 / 7,95),

5,04 (3,93 / 6,89), respectivamente para os sub grupos S, M1, M5, não se mostraram estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Analisando-se a diferença basal- 30 (delta1) no grupo controle, observa-se que os ratos responderam às doses de morfina de 1 e de 5 mg/kg, com aumento de TFL (Figura 8a, teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, seguido pelo teste de Wilcoxon, $p < 0,05$). Quanto à diferença basal - 60 (delta2), também observa-se aumento de TFL com ambas as doses de morfina em relação à salina (Figura 8a, teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, seguido pelo teste de Wilcoxon, $p < 0,05$). Ao se comparar as diferenças de latência aos 30 e aos 60 min, observa-se que as respostas aos 30 são similares às obtidas aos 60 min pós-injeção (teste de Wilcoxon, $p > 0,05$).

No grupo manipulado, os animais apresentaram efeito antinociceptivo para ambas as doses de morfina, tanto aos 30 quanto aos 60 min (Figura 8b, teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, seguido pelo teste de Wilcoxon, $p < 0,05$). Ao se comparar as diferenças de latência aos 30 e aos 60 min, observa-se que as respostas aos 30 são similares às obtidas aos 60 min pós-injeção (teste de Wilcoxon, $p > 0,05$).

No grupo estressado, os animais apresentaram efeito antinociceptivo aos 60 min para a dose de 5 mg/kg de morfina (Figura 8c, teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, seguido pelo teste de Wilcoxon, $p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos aos 30 min (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

RESPOSTA NOCICEPTIVA *controle*

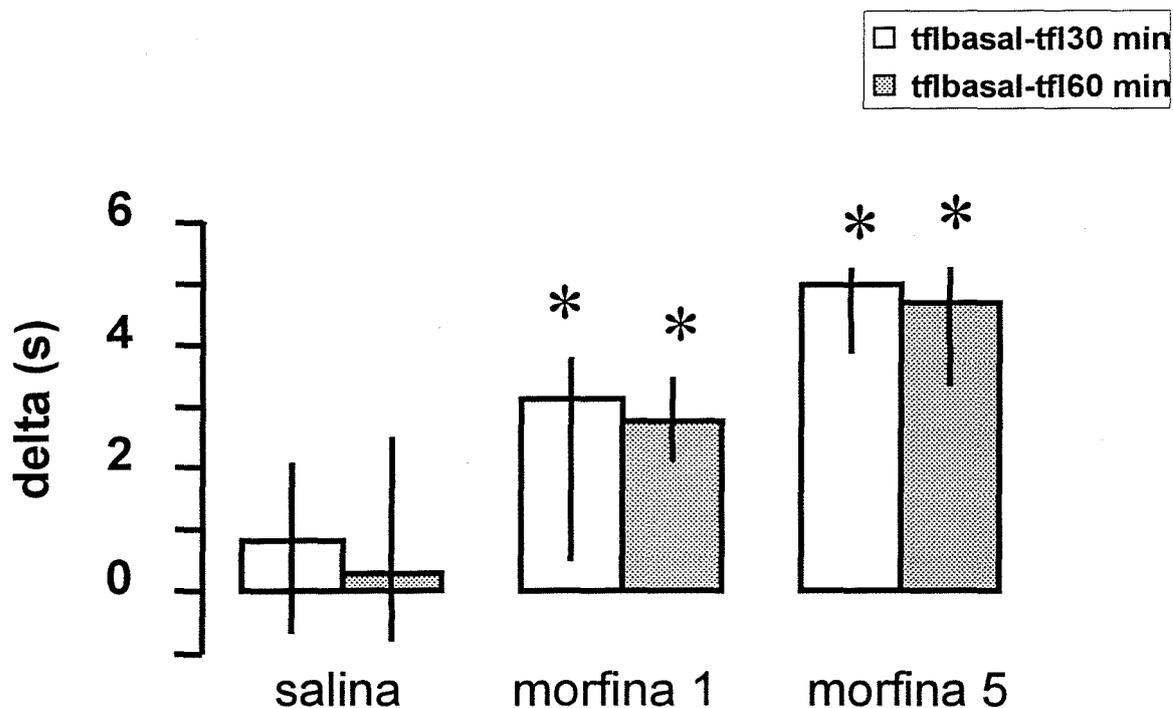


Figura 8 a: Efeito da administração de morfina sobre a resposta nociceptiva em animais controles. Medidas expressas como mediana (intervalos interquartis).

* Diferença significativa em relação às medidas anteriores pelo teste de Wilcoxon, $p < 0,05$. Salina $N = 18$; morfina 1 $N = 10$; morfina 5 $N = 8$.

RESPOSTA NOCICEPTIVA

Manipulado

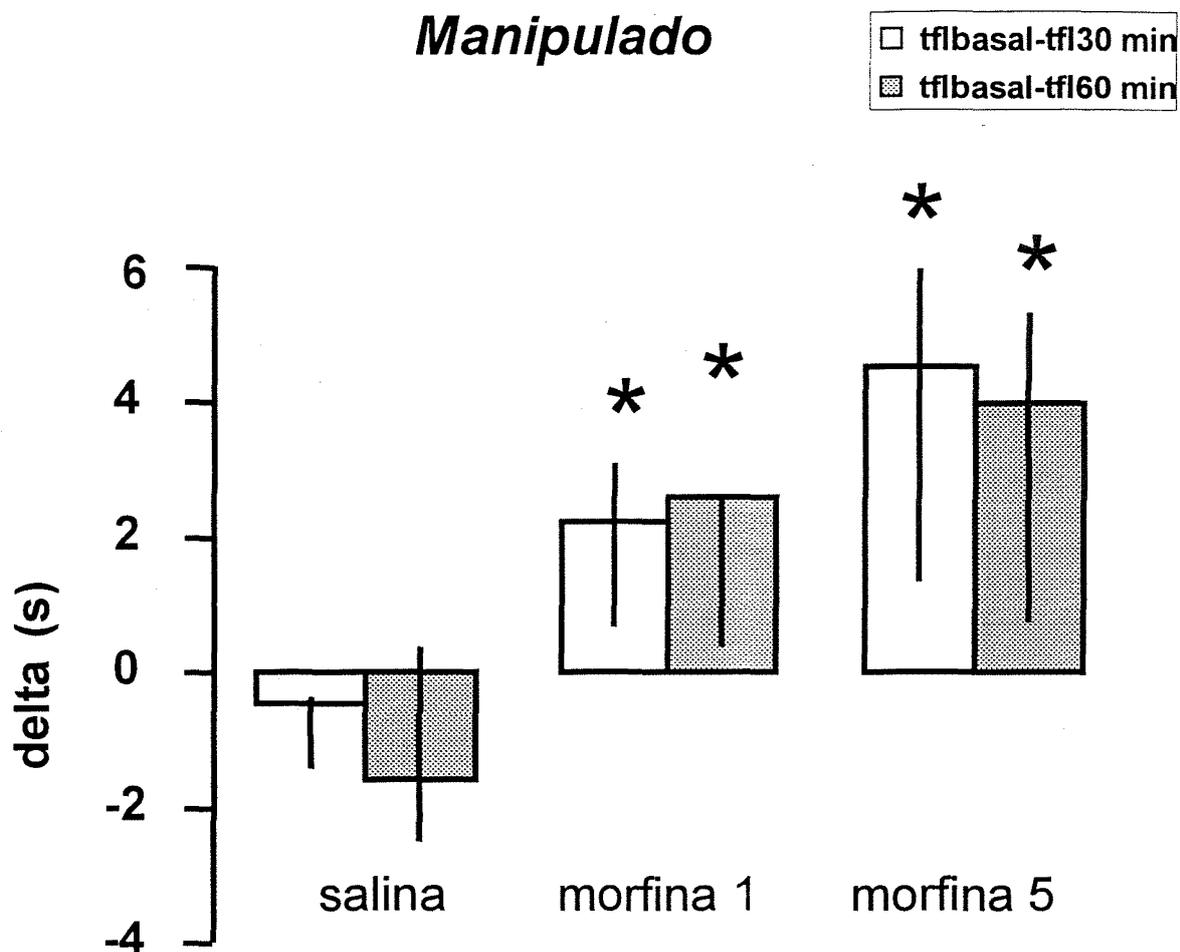


Figura 8 b: Efeito da administração de morfina sobre a resposta nociceptiva em animais manipulados. Dados expressos como mediana (intervalo interquartis).

* Diferença significativa em relação às medidas anteriores. Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$. Salina $N = 9$; morfina 1 $N = 13$; morfina 5 $N = 10$.

RESPOSTA NOCICEPTIVA *estressado*

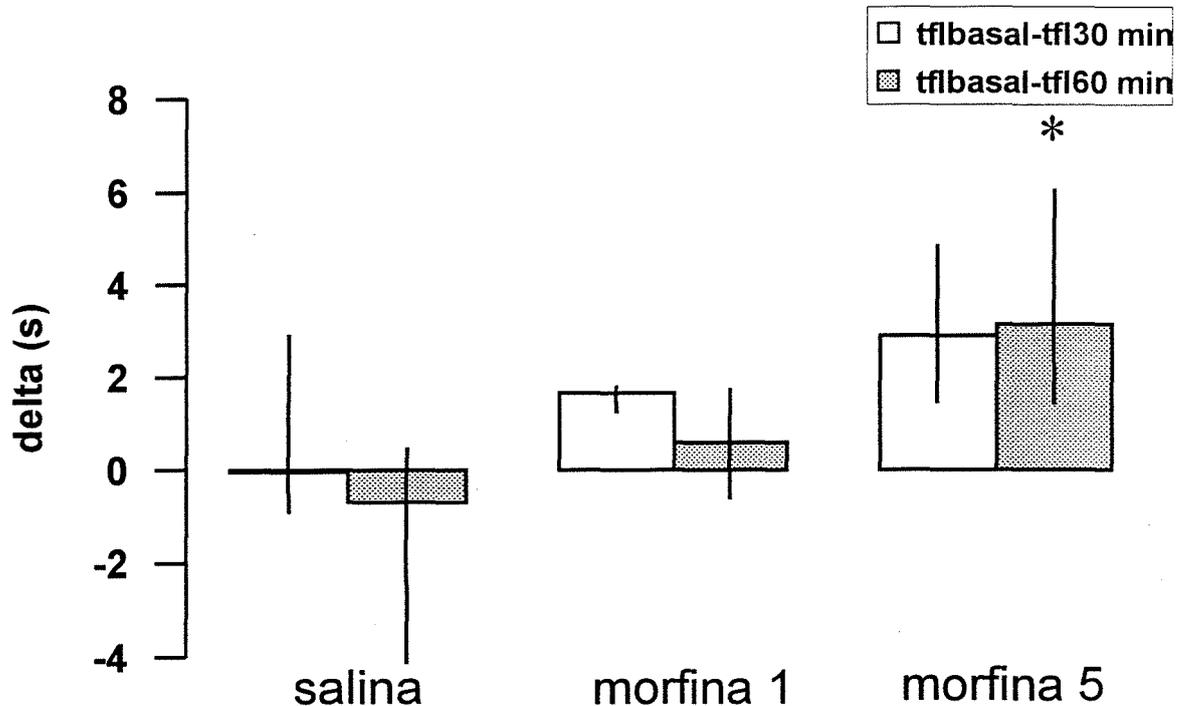


Figura 8 c: Efeito da administração de morfina sobre a resposta nociceptiva em animais estressados cronicamente por imobilização. Dados expressos como mediana (intervalo interquartis).

* Diferença significativa em relação às medidas anteriores. Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$.

Grupo salina: $N = 11$. Morfina 1: $N = 13$. Morfina 5: $N = 8$.

1.3. *Efeito da suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização durante 14 e 28 dias sobre a nocicepção em ratos Wistar.*

Resultados anteriores de nosso laboratório indicam que, após a exposição a este modelo de estresse crônico, os animais apresentam diminuição na latência de retirada da cauda, caracterizando um efeito hiperalgésico (Gamaro *et al.*, 1998 a) sendo este resultado comprovado nesta dissertação. Neste experimento, tivemos por objetivo verificar se este efeito hiperalgésico desapareceria após a interrupção do estresse.

Pelo fato do grupo manipulado não apresentar o efeito hiperalgésico, observado no grupo estressado cronicamente, esse grupo não foi utilizado nesse experimento.

Após 40 dias de tratamento comportamental, este foi suspenso e o TFL basal foi medido, observou-se que os animais estressados apresentavam diminuição na latência de retirada da cauda (hiperalgesia). Os animais permaneceram então em suas caixas-moradia sem serem manuseados durante 14 e 28 dias. Após este período, os animais foram submetidos à determinação da latência de retirada da cauda conforme M & M. Os resultados obtidos (Figuras 9a e 9b) indicam que, tanto 14 quanto 28 dias após a suspensão do estresse, os animais do grupo estressado cronicamente continuam hiperalgésicos em relação aos controles. (Teste U de Mann-Whitney, $p < 0,02$ em ambos os casos).

14 DIAS SEM ESTRESSE

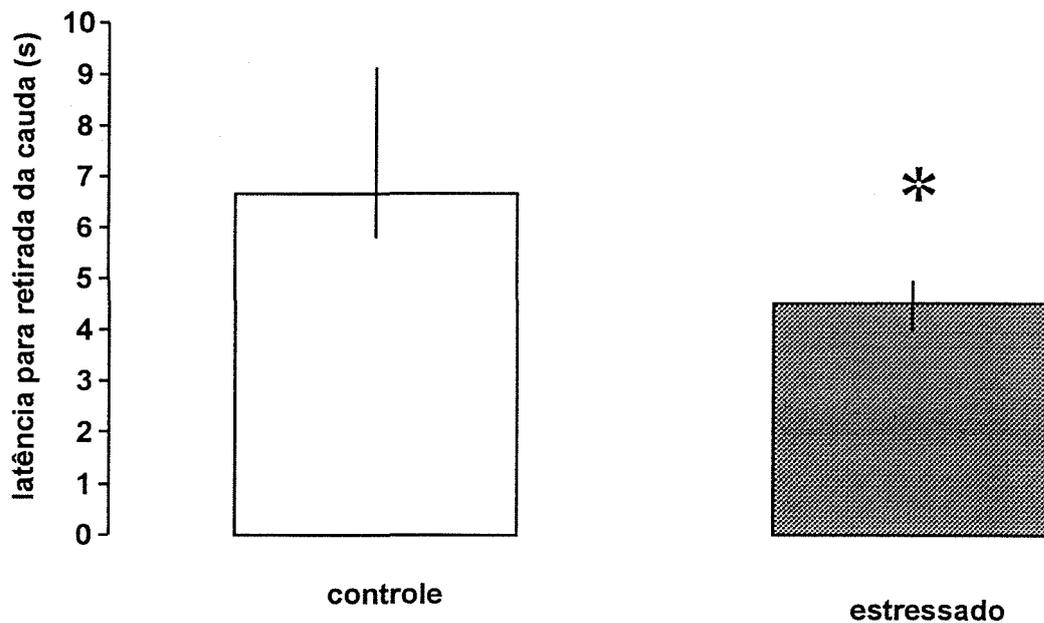


Figura 9 a: Efeito da suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização por 14 dias sobre a resposta nociceptiva de animais controles e estressados. Dados expressos em mediana e intervalos interquartis.

* Diferença significativa pelo teste U de Mann-Whitney, $p < 0,02$. Controle $N = 8$; estressado $N = 7$.

28 DIAS SEM ESTRESSE

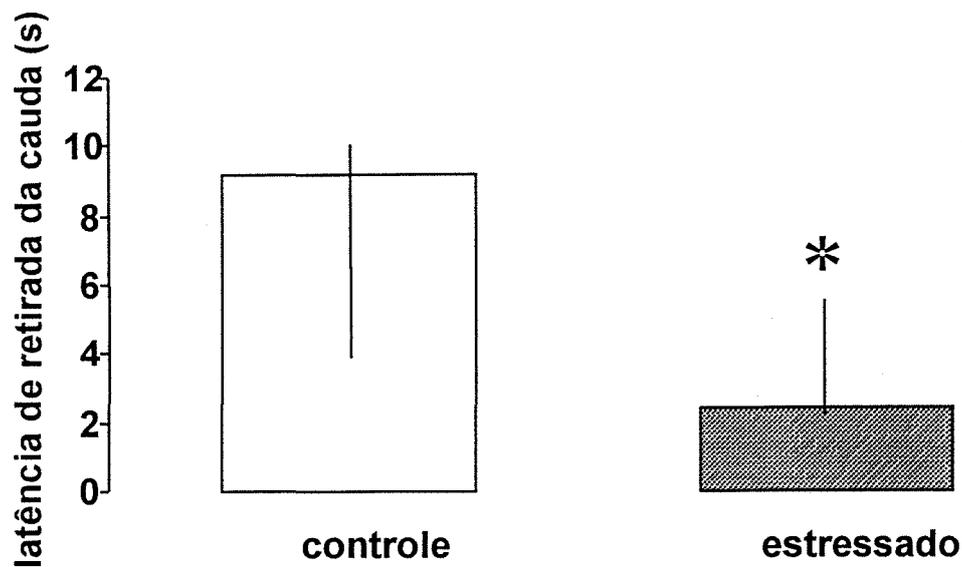


Figura 9 b: Efeito da suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização por 28 dias sobre a resposta nociceptiva dos animais controles e estressados. Dados expressos em mediana e intervalos interquartis.

* Diferença significativa pelo teste U de Mann-Whitney, $p < 0,02$. Controle $N = 8$; estressado $N = 7$.

1.4. Efeito da *suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização durante 14 e 28 dias: efeito de uma nova sessão de estresse sobre a nocicepção em ratos Wistar.*

Após 40 dias de estresse crônico, este tratamento foi suspenso. Os animais permaneceram então em suas caixas-moradia sem serem manuseados durante 14 e 28 dias. Após este período, os animais tanto do grupo controle quanto do grupo estressado foram imobilizados durante três horas, sendo a determinação da latência de retirada da cauda realizada antes e após esta sessão de estresse.

Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras 10 a e 10b. Indicam que, 14 dias após a suspensão do estresse, os animais do grupo estressado cronicamente não apresentam o efeito analgésico característico da exposição ao estresse agudo (teste de Wilcoxon, $p > 0,05$), ao contrário do que ocorre com o grupo controle (teste de Wilcoxon, $p < 0,03$). Na medida pré-exposição, o grupo estressado difere significativamente do grupo controle ($p < 0,05$, teste U Mann-Whitney). Por outro lado, 28 dias após a interrupção do tratamento de estresse crônico, os animais do grupo estressado, embora ainda apresentem hiperalgesia em relação aos controles, passam a apresentar o efeito analgésico após exposição a uma sessão de estresse agudo, semelhante aos animais controle (teste de Wilcoxon, $p < 0,03$, para o grupo estressado, e $p < 0,05$, para o grupo controle).

14 DIAS SEM ESTRESSE

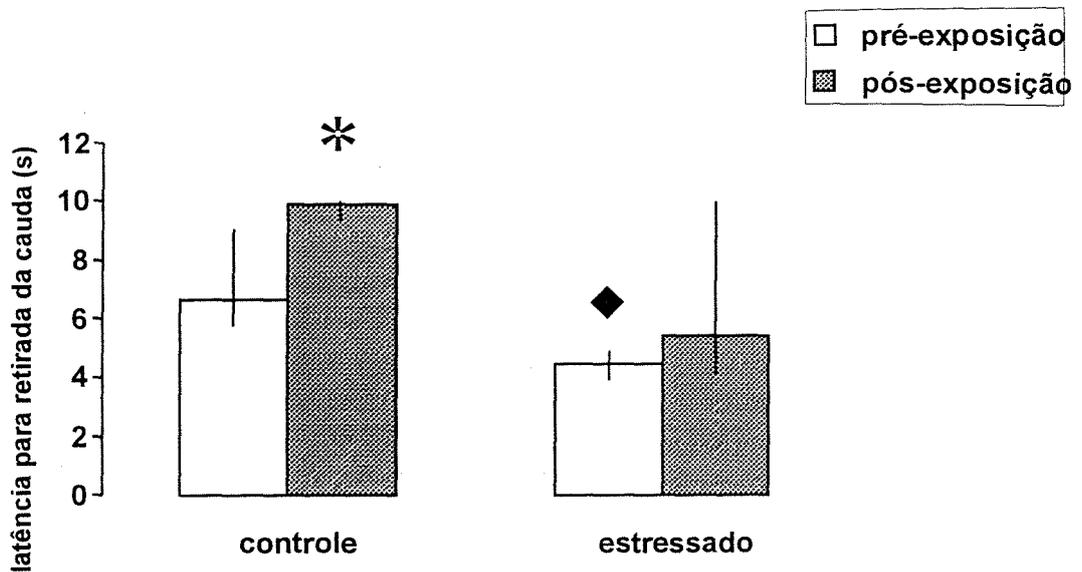


Figura 10 a: Efeito de uma nova exposição a um agente estressor, após a suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização por 14 dias, sobre a resposta nociceptiva de animais controles e estressados. Dados foram expressos como mediana e intervalos interquartis

◆ Diferença não significativa em relação ao controle na pré-exposição pelo teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$.

* Diferença significativa em relação à medida de pré-exposição pelo teste de Wilcoxon, $p < 0,03$. Controle $N = 8$; estressado $N = 7$.

28 DIAS SEM ESTRESSE

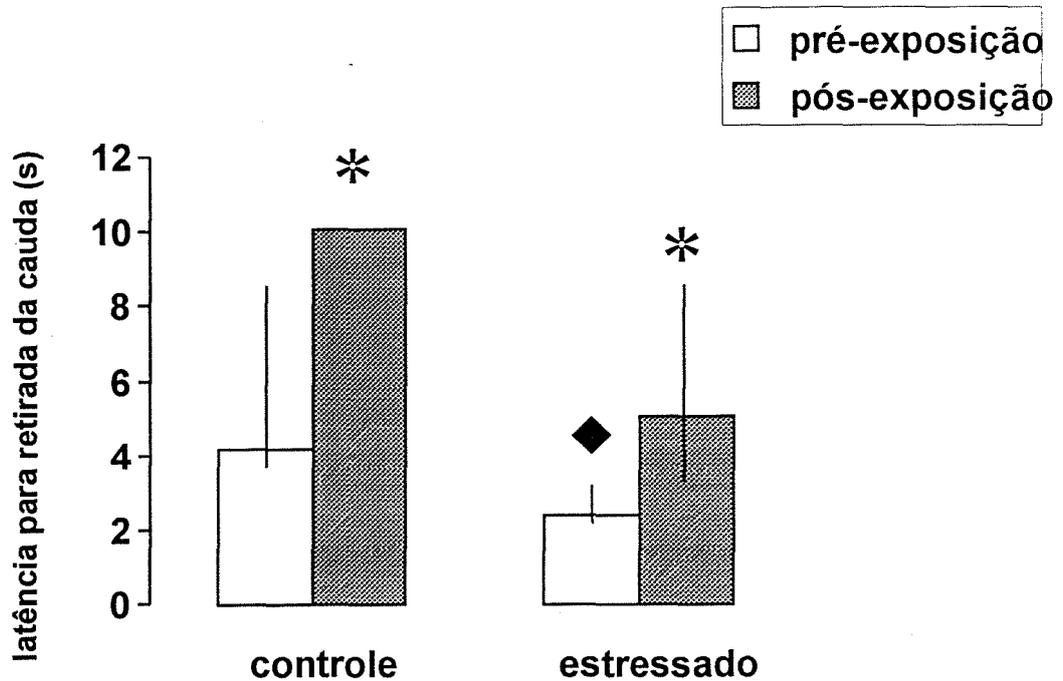


Figura 10 b: Efeito de uma nova exposição a um agente estressor, após a suspensão do tratamento de estresse crônico por imobilização por 28 dias, sobre a resposta nociceptiva de animais controles e estressados. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil.

◆ Diferença significativa em relação ao controle pelo teste U de Mann - Whitney, $p < 0,01$.

* Diferença significativa em relação a medida de pré-exposição pelo teste de Wilcoxon, $p < 0,05$. Controle $N = 8$; estressado $N = 7$.

2. Efeito do estresse crônico por imobilização sobre o comportamento alimentar.

Conforme descrito na Introdução, experimentos anteriores mostraram que este tipo de estresse crônico leva a alterações no comportamento alimentar, especificamente no que se refere à ingestão de alimento doce, sem interferir com a ingestão de ração padrão (Ely et al., 1997). Havia a seguinte questão: seria este aumento de ingestão exclusivo para alimento doce, ou ocorreria para alimentos do agrado dos animais, independentemente do sabor doce?

Os animais, após o tratamento crônico, foram expostos ao alimento (amendoim) durante 7 dias, a fim de familiarizarem-se com o mesmo, e só então foram testados. Durante este período, sofreram restrição alimentar. Foram realizados dois testes, em dois dias consecutivos: no primeiro dia, os animais foram testados em jejum e, no dia seguinte, o teste foi realizado com os animais alimentados.

Os resultados mostraram que, durante o período de habituação, houve um aumento no consumo do alimento ao longo do tempo para os três grupos, mostrando habituação em relação ao novo alimento (Figura 11). Não houve diferença entre os grupos e também não houve interação entre grupos e tempo (ANOVA de medida repetida, tendo dias como fator dependente e grupos como fator independente; $F = 0,20$ para grupos, $p > 0,05$; $F = 15,46$ para dias,

COMPORTAMENTO ALIMENTAR

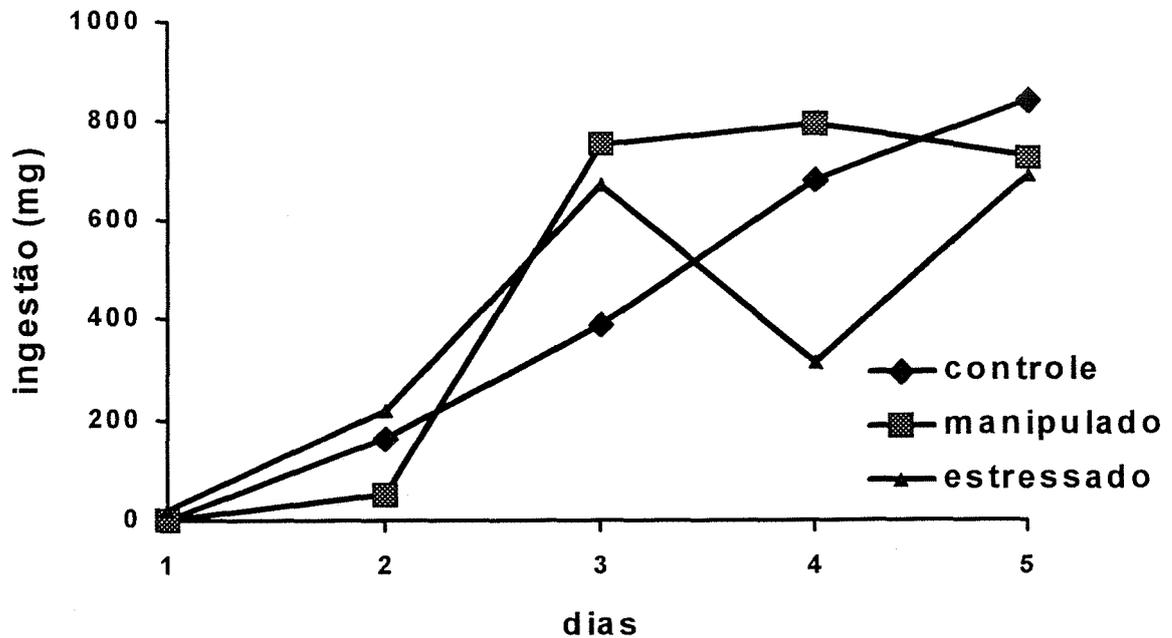


Figura 11: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre o comportamento alimentar (consumo de alimento não-doce) ao longo dos dias de habituação. Dados expressos como média da ingestão em mg.

Não houve diferença significativa entre interação grupos x dias e entre os grupos. $F = 0,20$ para os grupos, $p > 0,05$; $F = 1,31$ para dias x grupos, $p > 0,05$. Houve diferença significativa entre os dias ($F = 15,46$ $p < 0,001$). Controle $N = 8$; manipulado $N = 8$; estressado $N = 11$.

$p < 0,001$; $F = 1,31$ para dias x grupos, $p > 0,05$).

Os dados dos testes (Figura 12) foram analisados por ANOVA de medida repetida, tendo sido considerado o estado alimentar como fator dependente e grupos como fator independente, não foram observadas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). Embora haja efeito do jejum (os animais em jejum apresentaram maior apetite que os animais alimentados), não houve interação significativa entre as duas variáveis, grupo e estado alimentar ($F=1,24$ para grupos, $p > 0,05$; $F = 33,60$ para estado alimentar, $p < 0,001$; $F=0,20$ para estado alimentar x grupos, $p > 0,05$).

COMPORTAMENTO ALIMENTAR

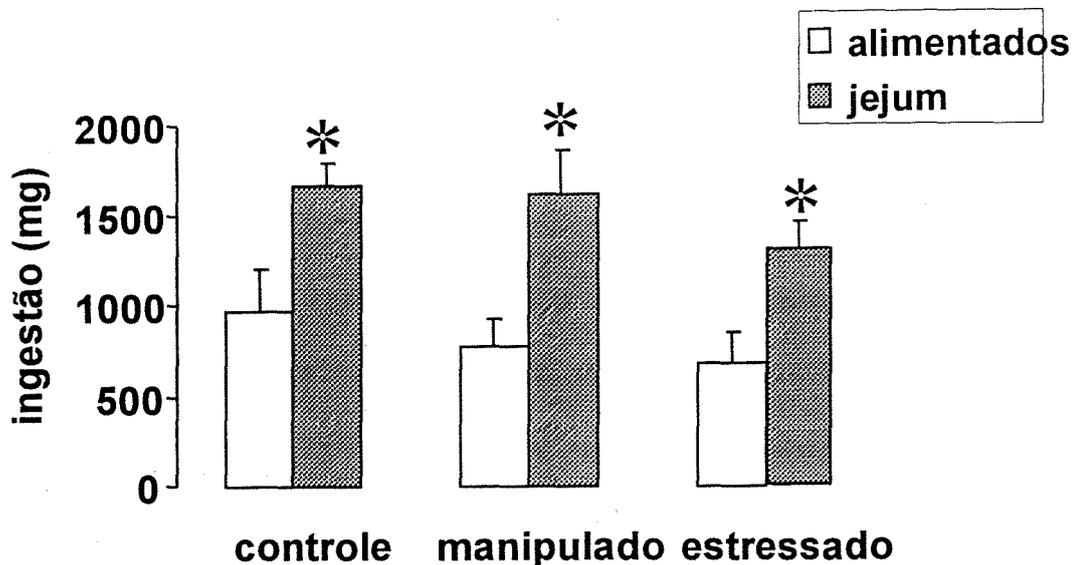


Figura 12: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre o consumo de alimento não-doce (amendoim) em duas situações: jejum e alimentado. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Diferença não significativa entre os grupos (ANOVA de duas vias, $p > 0,05$).

* Diferença significativa entre o estado de jejum e alimentado, ANOVA de medidas repetidas, $p < 0,05$. Controle N = 8; manipulado N = 8; estressado N = 11.

3. Efeito do estresse crônico por imobilização sobre a memória espacial.

Trabalhos anteriores de nosso laboratório mostraram que o estresse crônico por imobilização em ratos apresenta efeitos sobre a memória que são tarefa-específicos. Houve efeito na tarefa de exposição ao campo aberto, os animais dos grupos estressados cronicamente e manipulados não apresentaram memória adequada para a tarefa. Porém, não foram verificadas alterações em outras tarefas, como esQUIVA ativa de duas vias ou esQUIVA inibitória (Xavier, 1995), enquanto na tarefa de labirinto radial de oito braços foram observadas pequenas diferenças, mas em relação ao grupo manipulado (Cucco, 1998). Como a exposição crônica a glicocorticóides, segundo a literatura (Moghaddam *et al.*, 1994), pode levar a danos neuronais no hipocampo, estrutura sabidamente envolvida com a memória espacial (Dachir *et al.*, 1995), fazia-se necessário o estudo dos efeitos deste modelo de estresse crônico sobre a memória em outra tarefa de natureza espacial. Aqui relatamos os efeitos do estresse crônico por imobilização sobre a memória utilizando a tarefa de labirinto aquático. Foram explorados dois diferentes paradigmas comportamentais, envolvendo a memória espacial de referência e a memória de trabalho.

3.1. Memória de referência.

A tarefa padrão de esquiva da água, em que o rato é estimulado a localizar a plataforma submersa, mede predominantemente a memória espacial de referência (Mundy *et al.*, 1990). A memória de referência considera as informações *trial*-independentes (Barnes, 1988), em relação, por exemplo, à posição da plataforma no tanque de água.

Os animais foram colocados na água a partir de diferentes pontos pré-estabelecidos, e deveriam alcançar a plataforma. Esta não estava visível para o animal que deveria valer-se de dicas externas ao labirinto para localizá-la, conforme descrito em M & M.

Os três grupos utilizados (controle, manipulado, estressado cronicamente) apresentaram aprendizado, isto é, houve diferença significativa ao longo do tempo na latência para atingir a plataforma nas sessões de treino, conforme mostrado na Figura 13 (teste de Friedman, considerando as latências em cada *trial* como medida repetida; $\chi^2= 55,26$ $p < 0,0001$ para o grupo controle; $\chi^2=64,21$ $p < 0,0001$ para o grupo manipulado; $\chi^2 = 53,74$ $p < 0,0001$ para o grupo estressado).

Para cada um dos grupos estudados – controle, manipulado e estressado, foi comparada a latência para chegar à plataforma no 1º *trial* em cada um dos dois dias de treino e o 1º *trial* no dia do teste (Figura 14). Houve diferença significativa entre o *trial* 1 do primeiro dia do treino em relação aos demais dias, para cada grupo, isto é, a latência para achar a plataforma no 1º *trial* do 1º treino é significativamente maior do que esta mesma latência medida

WATER MAZE - MEMÓRIA DE REFERÊNCIA

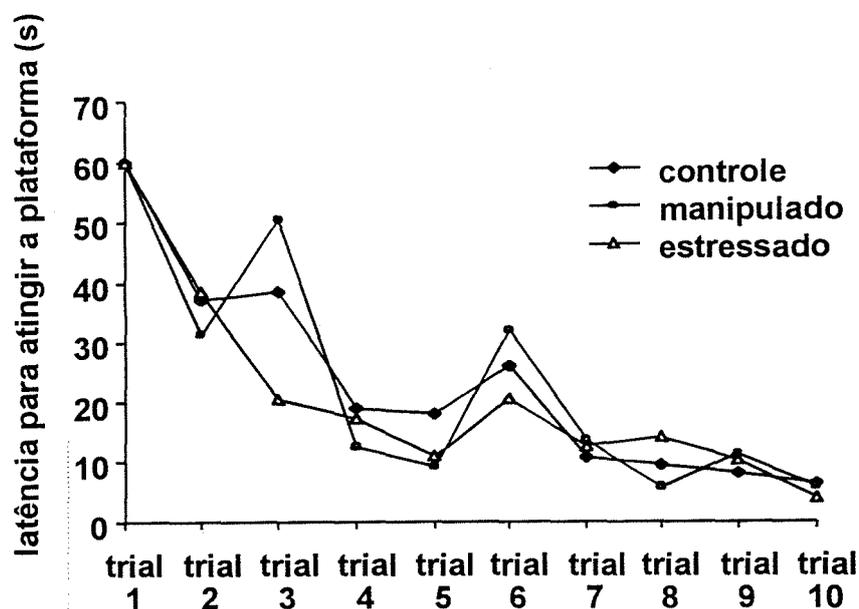


Figura 13: Latência para atingir a plataforma nos 10 *trials* na tarefa de memória espacial de referência no labirinto aquático. Dados expressos como mediana.

Diferença significativa ao longo dos *trials* em cada grupo pelo teste de Friedman ($\chi^2 = 18,87$, $p < 0,01$, para o grupo controle; $\chi^2 = 16,34$, $p < 0,05$, para o grupo manipulado; $\chi^2 = 29,80$, $p < 0,0001$, para o grupo estressado).

Não houve diferença entre os grupos quando comparados os tempos em cada *trial* (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$ em todos os casos). Controle N = 16 ; manipulado N = 16; estressado N = 15.

WATER MAZE - MEMÓRIA DE REFERÊNCIA

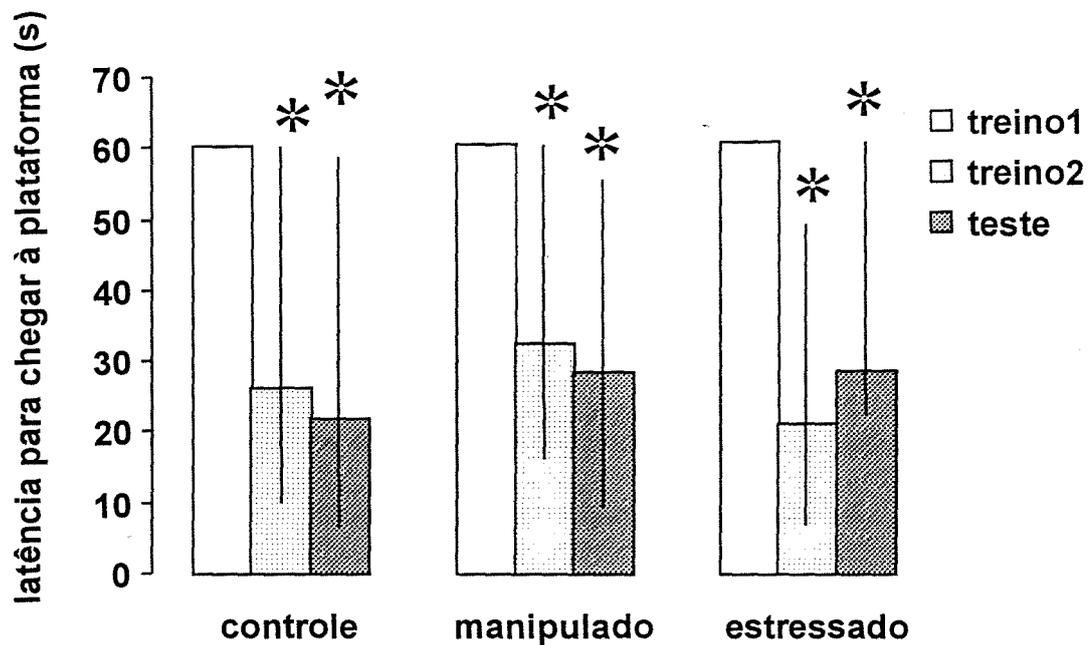


Figura 14: Latência para atingir a plataforma no primeiro *trial* das diferentes sessões na tarefa de memória espacial de referência no labirinto aquático. Dados expressos como mediana e intervalos interquartis.

* Diferença significativa em relação ao *trial* 1 do treino1 nos 3 grupos (teste de Wilcoxon; $p < 0,05$ para todos os grupos).

Não houve diferença significativa entre os grupos em qualquer dos *trials* desta figura pelo teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$.

nos primeiros *trials* do segundo treino e do teste, mostrando que os animais apresentaram memória para a posição da plataforma [teste de Friedman ($\chi^2 = 10,53$, $p < 0,005$ para o grupo controle; $\chi^2 = 12,78$, $p < 0,002$ para o grupo manipulado; $\chi^2 = 14,23$, $p < 0,001$ para o grupo estressado) seguido pelo teste de Wilcoxon; $p < 0,01$ para os três grupos (controle, manipulado e estressado), quando comparada a latência do primeiro *trial* no treino 1 em relação aos demais dias. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os três grupos (controle, manipulado e estressado) quando comparamos suas respectivas latências nos *trials* 1 e 2 e no teste (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,1$).

Quando comparados os tempos gastos em cada quadrante (i.e. quadrante alvo, quadrante oposto, quadrante adjacente 1 e quadrante adjacente 2 – conforme M & M) (Fig. 15) observou-se que houve diferença no tempo gasto em cada quadrante, mas não houve diferença entre os grupos (ANOVA de duas vias; $F(2) = 1,31$, $p > 0,1$ para a comparação entre os grupos; $F(3) = 8,76$, $p < 0,001$ para os tempos nos quadrantes; $F(6) = 0,96$, $p > 0,1$ para a interação grupos e tempo). Esta diferença nos tempos gastos em cada quadrante deveu-se ao fato dos animais passarem mais tempo no quadrante alvo e no quadrante adjacente1, de onde são largados no dia do teste.

Também foi comparado o número de cruzamentos no local correspondente à plataforma (Figura 16). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(44) = 1,069$, $p > 0,1$).

WATER MAZE - MEMÓRIA DE REFERÊNCIA

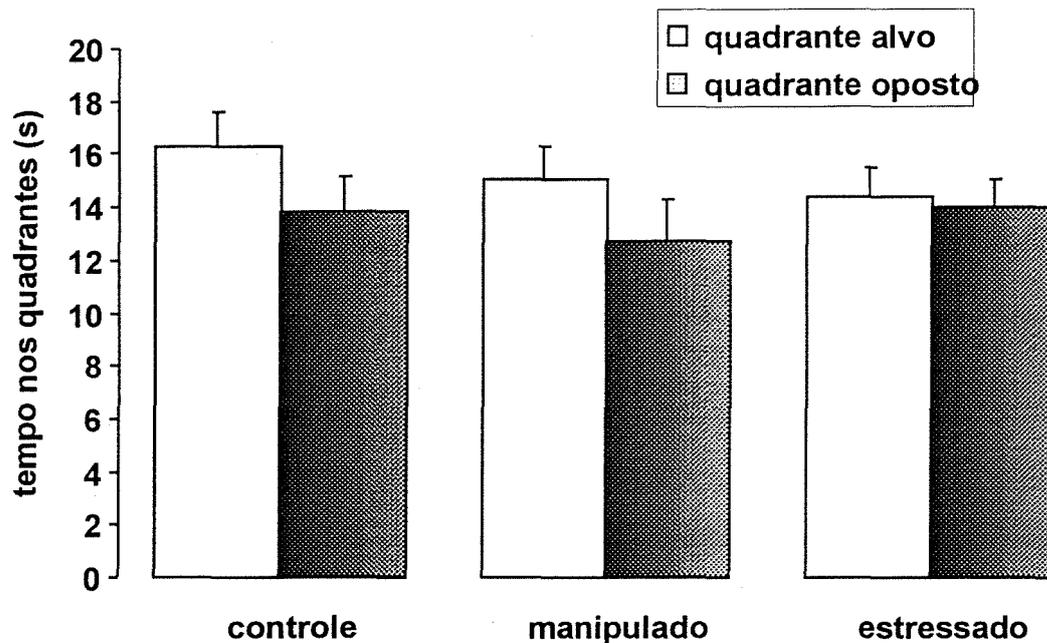


Figura 15: Tempo gasto nos quadrantes alvo e oposto do labirinto aquático na tarefa de memória espacial de referência. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de duas vias, $F(2) = 1,31$, $p > 0,1$; $F(3) = 8,76$, $p < 0,001$ para os tempos no quadrantes; $F(6) = 0,96$, $p > 0,1$ para interação grupos e tempo). Controle $N = 16$; manipulado $N = 16$; estressado $N = 15$.

WATER MAZE - MEMÓRIA DE REFERÊNCIA

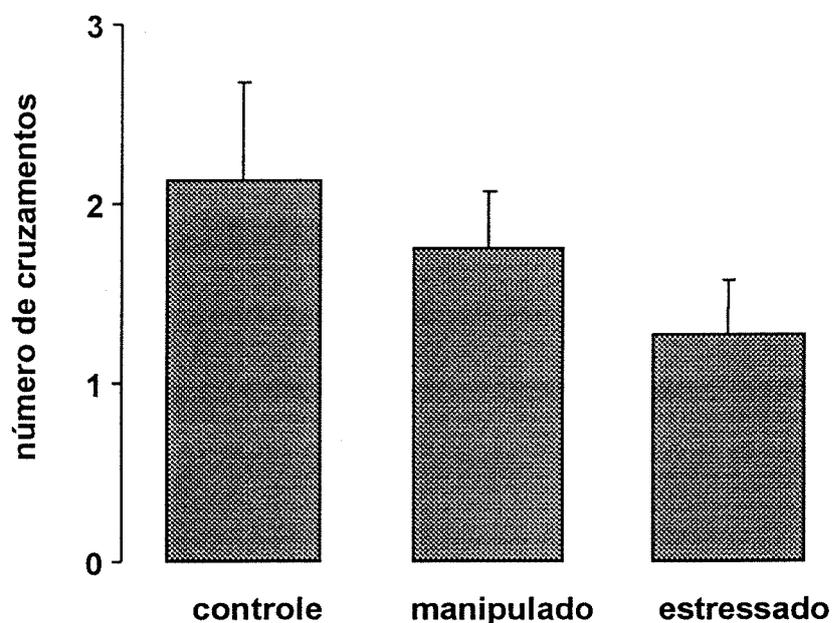


Figura 16: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre o número de cruzamentos no labirinto aquático. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(44) = 1,69$, $p > 0,1$). Controle $N = 16$; manipulado $N = 16$; estressado $N = 15$.

b) Memória de trabalho.

Nesta tarefa, no dia do treino foram realizados 8 *trials*, em que o animal, largado de diferentes posições pré-determinadas, deveria alcançar a plataforma num teto máximo de 60 s. Esta estava visível para o animal e ficava em diferentes posições a cada *trial*. No dia do teste, a latência para alcançar a plataforma foi medida e comparada com a latência no treino.

Os três grupos utilizados (controle, manipulado, estressado cronicamente) apresentaram aprendizado, isto é, houve diferença significativa ao longo do tempo na latência para atingir a plataforma, conforme mostrado na Figura 17 (teste de Friedman, considerando as latências em cada *trial* como medida repetida; $\chi^2 = 18,91$, $p < 0,01$ para o grupo controle; $\chi^2 = 16,34$, $p < 0,05$ para o grupo manipulado; $\chi^2 = 29,80$, $p < 0,0001$, para o grupo estressado). Não houve diferença entre os grupos quando comparados os tempos em cada *trial* (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$, em todos os casos).

Houve diferença entre as latências para atingir a plataforma no teste quando comparadas com as latências no *trial* 1 do treino (Fig. 18; teste de Wilcoxon, $p < 0,05$, para todos os grupos), indicando memória para esta tarefa. Não houve diferença significativa entre as latências para alcançar a plataforma no teste quando comparados os 3 grupos (teste de Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 0,802$, $p > 0,05$).

WATER MAZE - MEMÓRIA DE TRABALHO

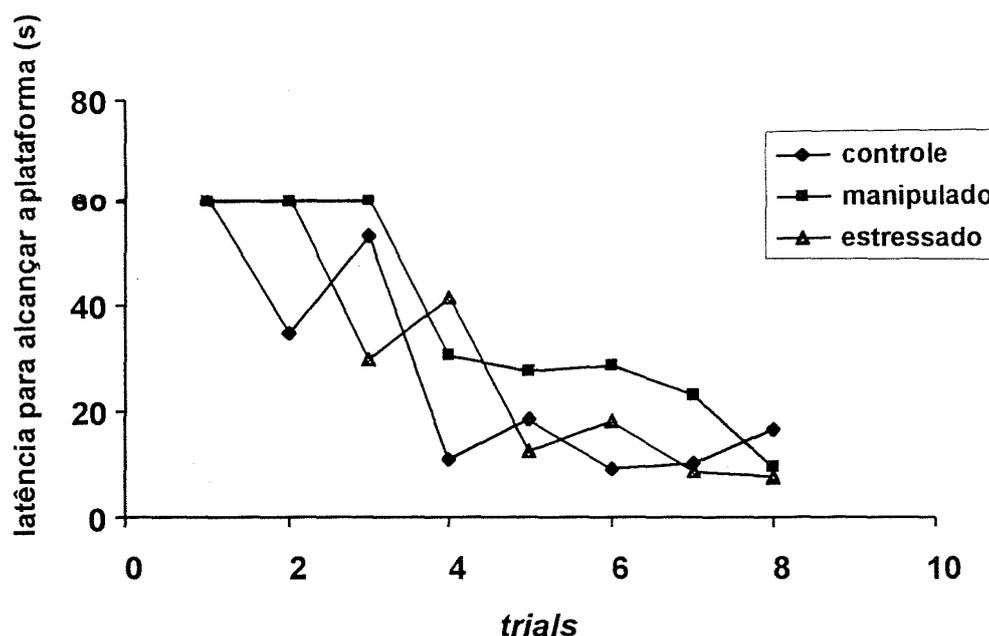


Figura 17: Latência para atingir a plataforma ao longo dos 8 *trials* na tarefa de memória espacial de trabalho no labirinto aquático. Dados expressos como mediana e intervalos interquartis.

Existe diferença significativa entre os *trials*, em cada grupo pelo teste de Friedman ($\chi^2 = 18,91$, $p < 0,01$, para o grupo controle; $\chi^2 = 16,34$, $p < 0,05$, para o grupo manipulado; $\chi^2 = 29,80$, $p < 0,0001$, para o grupo estressado).

Não houve diferença significativa entre os grupos quando comparados os tempos em cada *trial* do treino (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$ em todos os casos). Controle $N = 8$; manipulado $N = 8$; estressado $N = 8$.

WATER MAZE - MEMÓRIA DE TRABALHO

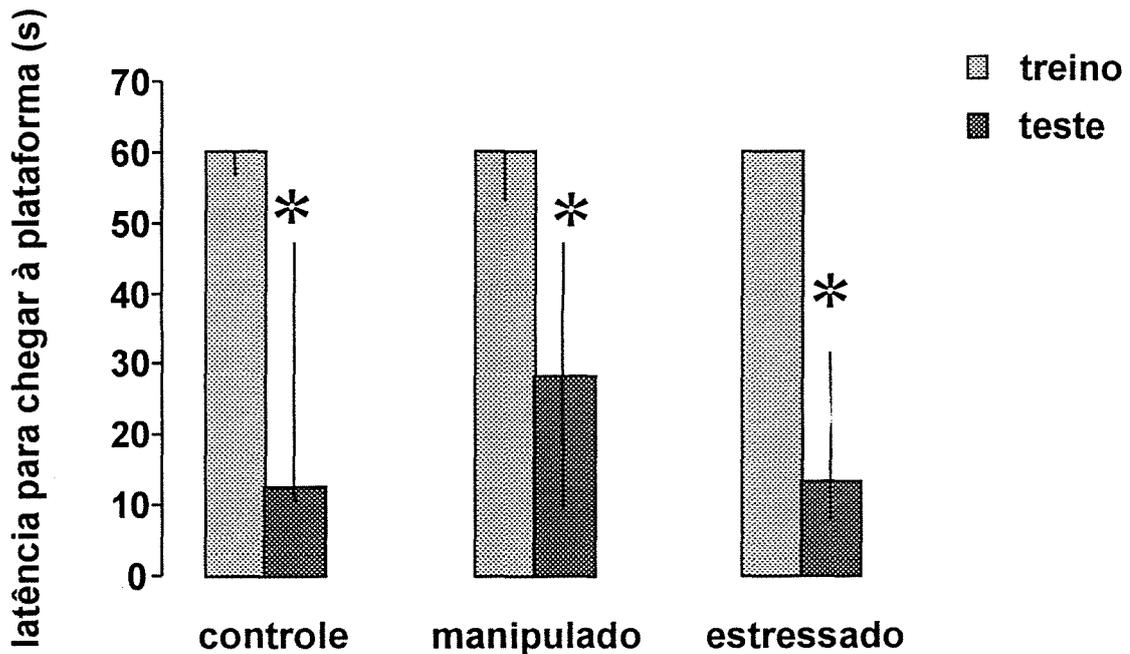


Figura 18: Latência para atingir a plataforma na tarefa de memória espacial de trabalho no labirinto aquático. Dados expressos como mediana e intervalos interquartis.

* Diferença significativa entre a primeira latência no treino e o teste nos 3 grupos (teste de Wilcoxon; $p < 0,05$ para todos os grupos).

Não houve diferença significativa entre as latências para alcançar a plataforma no teste quando comparados os 3 grupos (teste de Kruskal - Wallis, $\chi^2 = 0,802$, $p > 0,05$). Controle N = 8 ; manipulado N =8; estressado N = 8.

4. Alterações nos níveis de corticosterona plasmática

Neste experimento foram determinados os níveis de corticosterona plasmática em animais submetidos a estresse crônico por imobilização, ou a única sessão de imobilização sacrificados imediatamente ou 24 h após sessão de estresse, conforme descrito em M & M.

No modelo crônico, foram avaliados 3 grupos – controle, manipulado e estressado. No modelo agudo, estudaram-se 2 grupos – controle e estressado.

Quando a corticosterona foi medida 24 h após a última sessão de estresse no modelo crônico não houve diferença entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(24) = 1,790$, $p > 0,05$), embora os grupos manipulado e estressado tenham apresentado diminuição do nível plasmático não significativa em relação ao grupo controle (Figura 19). Houve diferença significativa do grupo manipulado em relação aos demais quando a corticosterona foi medida logo após a sessão de estresse (ANOVA de uma via, $F(12) = 5,823$, $p < 0,05$; teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$ para o grupo manipulado em relação aos demais), como mostrado no Figura 20.

Quando foi verificado o efeito do estresse agudo por imobilização (1 hora) sobre os níveis do corticosterona plasmática, imediatamente após a sessão de imobilização foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo controle (Fig. 21) (teste t para amostras independentes, $t(12) = 3,95$; $p < 0,002$). Os animais do grupo estressado agudamente apresentaram medidas mais altas de corticosterona plasmática em comparação com o grupo controle.

CORTICOSTERONA PLASMÁTICA *estresse crônico - 24h*

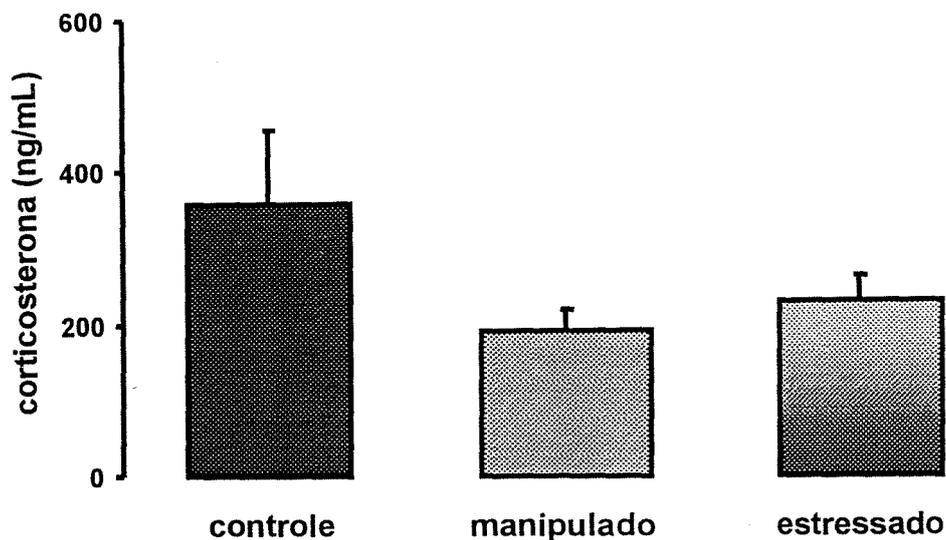


Figura 19: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis plasmáticos de corticosterona medidos 24 h após a última exposição ao estressor. Dados expressos como média \pm erro padrão da média.

Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2,4) = 1,790$, $p > 0,05$. Controle $N = 10$; manipulado $N = 9$; estressado $N = 8$).

CORTICOSTERONA PLASMÁTICA

estresse crônico - 0h

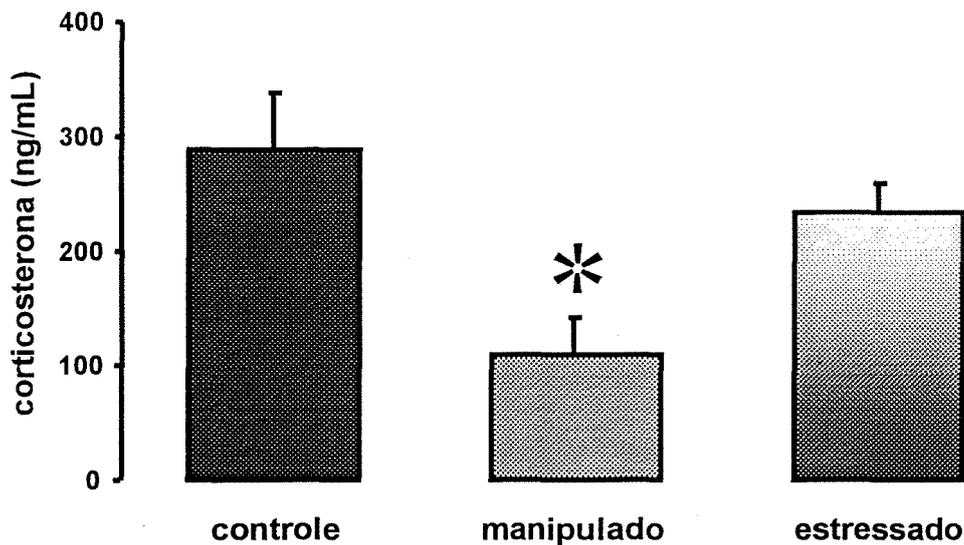


Figura 20: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis plasmáticos de corticosterona medidos imediatamente após a última exposição ao estresse. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. * Houve diferença significativa do grupo manipulado em relação aos grupos estressados e controle (ANOVA de uma via, $F(2) = 5,823$ $p < 0,05$; teste de Student - Newman - Keuls, $p < 0,05$). Controle $N = 5$; manipulado $N = 5$; estressado $N = 5$.

CORTICOSTERONA PLASMÁTICA

estresse agudo - 0h

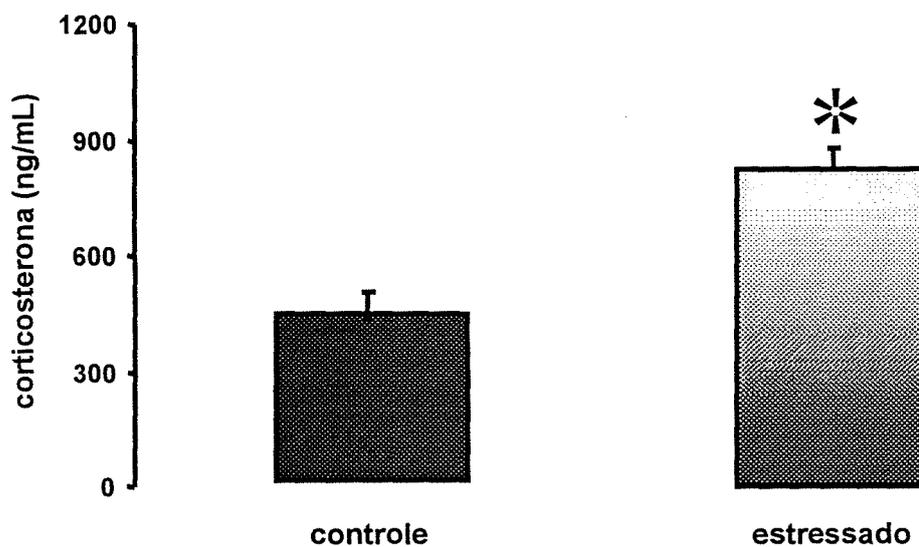


Figura 21: Efeito do estresse agudo sobre os níveis plasmáticos de corticosterona imediatamente após a última exposição ao estresse. Dados expressos como média \pm erro padrão da média.

* Diferença significativa em relação ao grupo controle (teste t de Student para amostras independentes, $t(12) = 3,95$; $p < 0,002$). Controle $N = 7$; estressado $N = 7$.

5. Estudo dos níveis de catecolaminas e indolaminas em diferentes estruturas cerebrais.

A ativação do sistema de de indolaminas e catecolaminas cerebrais cerebrais parece ocorrer após exposição de ratos a um estressor agudo. Uma única exposição ao estresse (por exemplo: choque nas patas e estresse por imobilização) pode aumentar o *turnover* ou a liberação das aminas biogênicas noradrenalina (NE), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) em córtex frontal de ratos (Como citado em Jordan *et al.*, 1994). Por outro lado, a resposta das aminas biogênicas ao estresse repetido tem sido menos estudada.

Neste experimento foram utilizadas quatro estruturas cerebrais: córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e amígdala. Estas estruturas foram escolhidas por estarem relacionadas com estresse e memória. As medidas das aminas e seus metabólitos foram feitas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção eletroquímica (Hallman *et al.*, 1984) 24 horas após a última sessão de estresse. Foram medidas noradrenalina, dopamina, serotonina, ácido di-hidroxi-fenilacético (DOPAC), ácido 5-hidroxi-indolacético (HIAA).

Não houve diferença significativa nos níveis de noradrenalina entre os grupos controle e estressado cronicamente (Figura 22) em quaisquer das estruturas analisadas $t(16) = 1,79$ para a amígdala; $t(16) = 0,36$ para o córtex; $t(16) = 0,00$ para o hipocampo; $t(16) = 0,18$ para o hipotálamo; $p > 0,05$ em todos os casos).

Houve diferença significativa nos níveis de dopamina em hipocampo, no qual o grupo estressado apresentou uma diminuição em relação ao grupo

controle (teste t para amostras independentes, $t(16) = 2,14$; $p < 0,05$), e em hipotálamo (teste t para amostras independentes, $t(16) = 3,14$; $p < 0,005$) e amígdala (teste t para amostras independente, $t(16) = 3,14$; $p < 0,01$), sendo nestas duas últimas estruturas o grupo estressado mostrou um aumento nos níveis de dopamina em relação ao grupo controle (Figura 23). Não houve diferença significativa nos níveis de dopamina do grupo estressado em relação ao controle no córtex frontal (teste t para amostras independentes, $t(16) = 0,04$; $p > 0,05$).

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e estressado nos níveis do metabólito da dopamina (DOPAC) em nenhuma das estruturas analisadas (teste t para amostras independentes, $t(16) = 0,54$ para a amígdala; $t(16) = 1,96$ para o córtex; $t(16) = 1,55$ para o hipocampo; $t(16) = 0,93$ para o hipotálamo; $p > 0,05$ em todos os casos), como mostrado na Figura 24.

O grupo estressado mostrou um aumento na razão DOPAC/DA na amígdala em relação ao grupo controle (teste t para amostras independentes; $t(16) = 4,75$; $p < 0,001$), enquanto que nas demais estruturas analisadas não foi observada diferença significativa entre os grupos (teste t para amostras independentes; $t(16) = 0,96$ para o córtex; $t(16) = 0,53$ para o hipocampo; $t(16) = 0,81$ para o hipotálamo; $p > 0,05$ em todos os casos), como pode ser observado na Figura 25. Observou-se, no caso do hipotálamo, um aumento não significativo nessa relação ($p = 0,052$).

Os níveis de serotonina não mostraram diferença significativa entre os grupos controle e estressado (Figura 26) em quaisquer das estruturas

NOREPINEFRINA

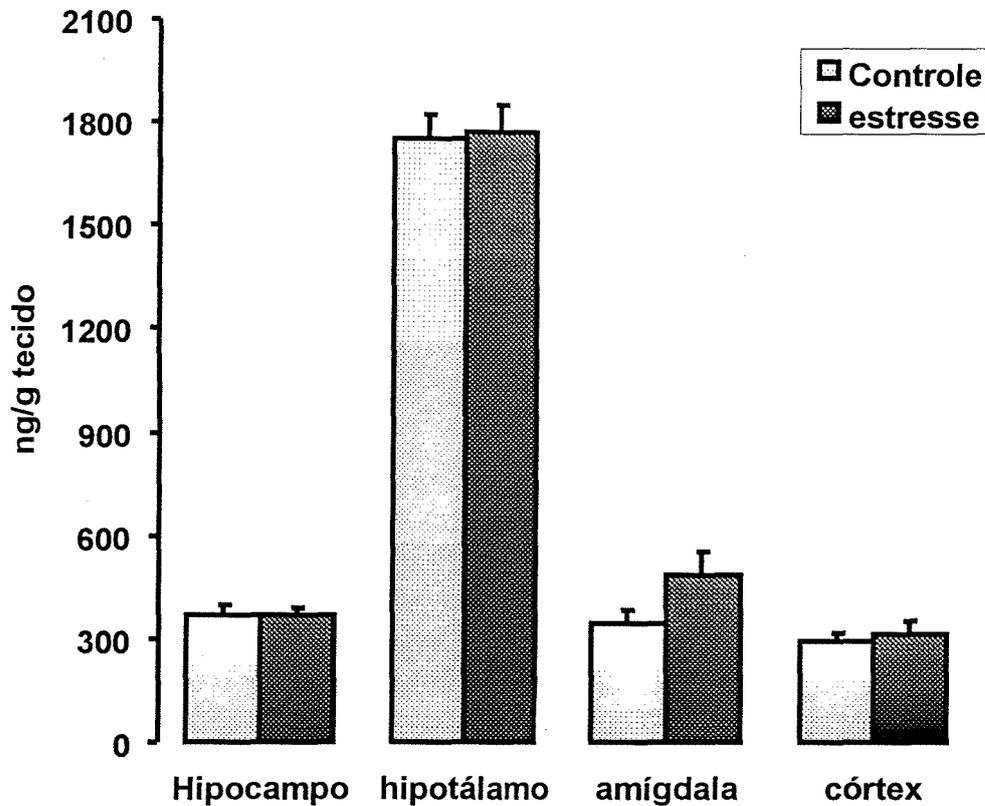


Figura 22: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de norepinefrina 24 h após a última exposição ao estresse. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Não existe diferença significativa entre os grupos, pelo teste t de Student para amostras independentes ($t(16)=1,79$ para a amígdala; $t(16)=0,36$ para o córtex; $t(16)=0,00$ para o hipocampo; $t(16)=0,18$ para o hipotálamo; $p > 0,05$ em todos os casos). Controle N = 10; estressado N = 8.

DOPAMINA

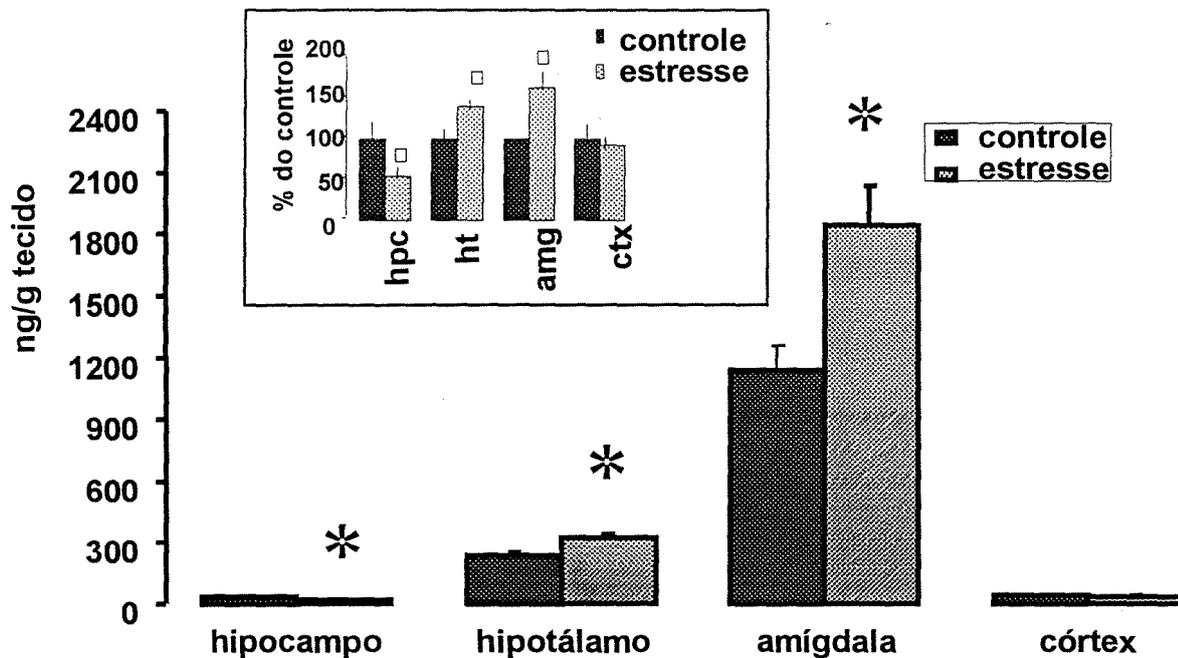


Figura 23: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de dopamina 24 h após a última exposição ao estresse. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Não houve diferença significativa nos níveis de dopamina entre os grupos no córtex frontal pelo teste t Student para amostras independentes ($t(16) = 0,04$; $p > 0,05$).

* Houve diferença significativa nos níveis de dopamina em hipocampo ($t(16) = 2,14$; $p < 0,05$), hipotálamo ($t(16) = 3,14$; $p < 0,005$) e amígdala ($t(16) = 3,14$; $p < 0,01$). Controle N = 10; estressado N = 8.

Inserto: dados expressos em % do controle para melhor visualização dos efeitos. Hpc: hipocampo; Ht: hipotálamo; Amg: amígdala; Ctx: córtex.

DOPAC

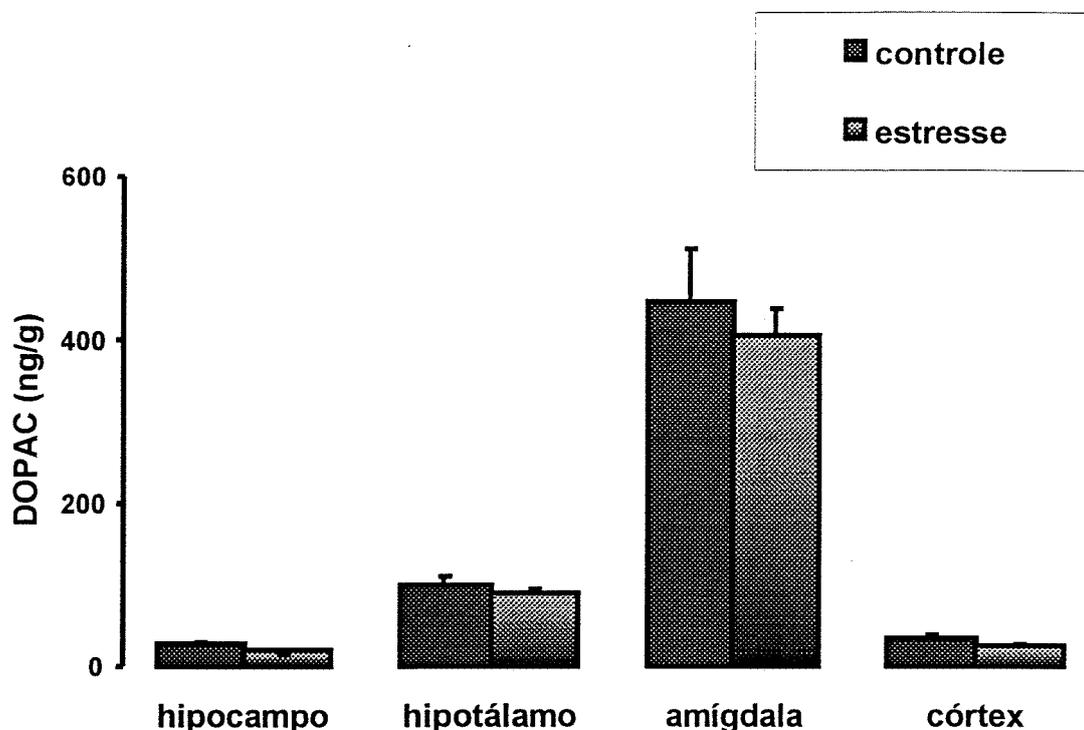


Figura 24: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de DOPAC 24 h após a última exposição ao estresse. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e estressado em nenhuma das estruturas analisadas, (teste t para amostra independentes; $t(16) = 0,54$ para a amígdala; $t(16) = 1,96$ para o córtex; $t(16) = 1,55$ para o hipocampo; $t(16) = 0,93$ para hipotálamo; $p > 0,05$ em todos os casos). Controle $N = 10$; estressado $N = 8$.

DOPAC / DA

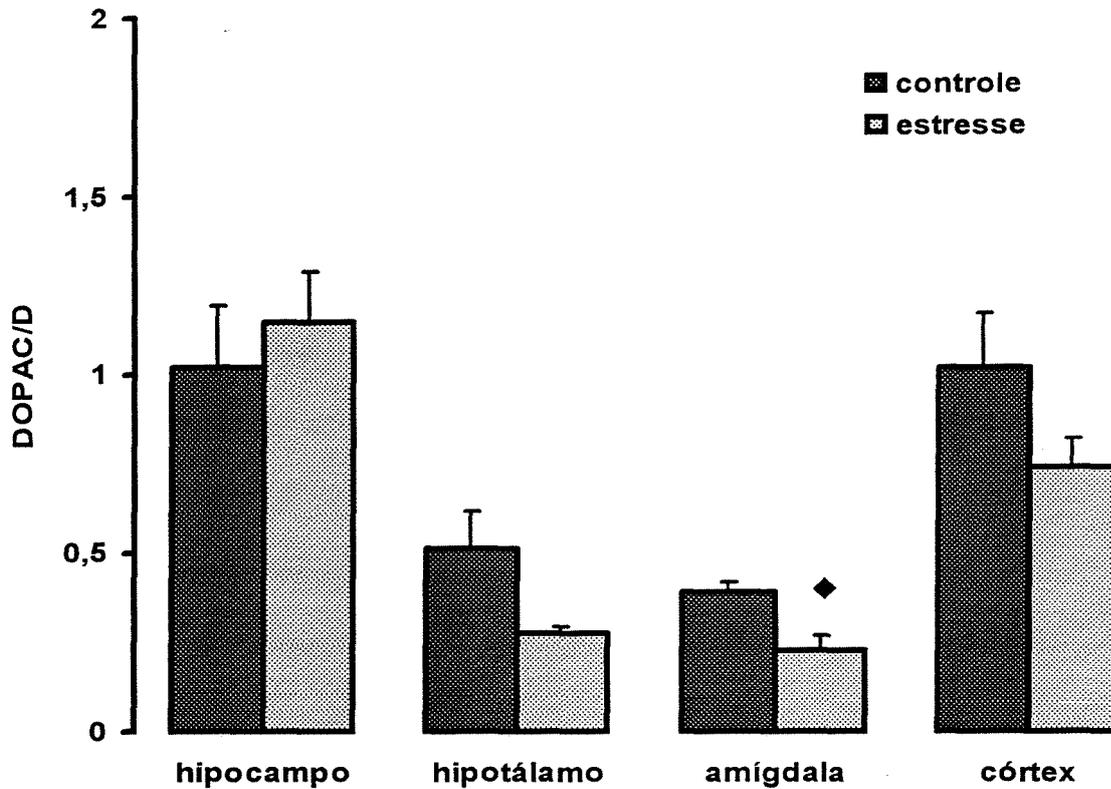


Figura 25: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre a relação DOPAC/DA, 24 h após a última exposição ao estresse. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Não existe diferença entre os grupos em córtex ($t(16) = 1,46$), hipocampo ($t(16) = 0,53$) e hipotálamo ($t(16) = 1,99$), $p > 0,05$.

◆ Diferença significativa em amígdala ($t(16) = 4,75$; $p < 0,001$, teste t de Student para amostras independentes).

analisadas (teste t para amostras independentes; $t(16) = 0,99$ para a amígdala; $t(16) = 0,34$ para o córtex; $t(16) = 1,28$ para o hipocampo; $t(16) = 0,82$ para o hipotálamo; $p > 0,05$ em todos os casos). Os níveis do metabólito da serotonina (HIAA) não apresentaram diferença significativa entre os grupos controle e estressado em hipocampo, amígdala e hipotálamo (teste t para amostras independentes; $t(16) = 0,44$ para o hipocampo; $t(16) = 0,83$ para a amígdala; $t(16) = 0,12$ para o hipotálamo; $p > 0,05$ em todos os casos), porém o grupo estressado apresentou níveis diminuídos de HIAA em córtex frontal em relação ao grupo controle (teste t para amostras independentes, $t(16) = 2,43$; $p < 0,05$), como mostrado na Figura 27. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e estressado na razão HIAA/5-HT em quaisquer das estruturas analisadas (teste t para amostras independentes; $t(16) = 0,09$ para a amígdala; $t(16) = 0,96$ para o córtex; $t(16) = 2,03$ para o hipocampo; $t(16) = 0,88$ para o hipotálamo; $p > 0,05$ em todos os casos) (Figura 28).

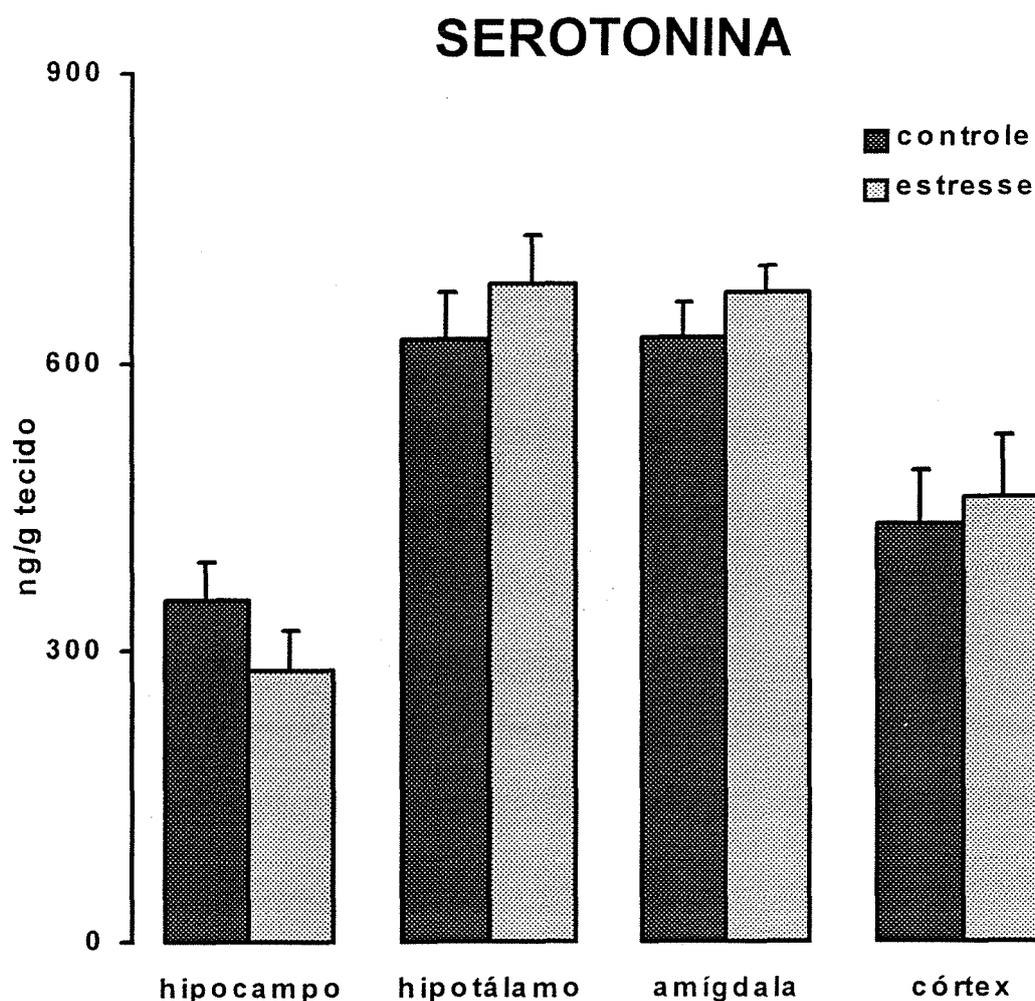


Figura 26: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de serotonina 24 h após a última exposição ao estresse. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Não existe diferença entre os grupos, pelo teste t de Student para amostras independentes em amígdala ($t(16) = 0,99$), córtex ($t(16) = 0,34$), hipocampo ($t(16) = 1,28$), hipotálamo ($t(16) = 0,82$); $p > 0,05$). Controle $N = 10$; estressado $N = 8$.

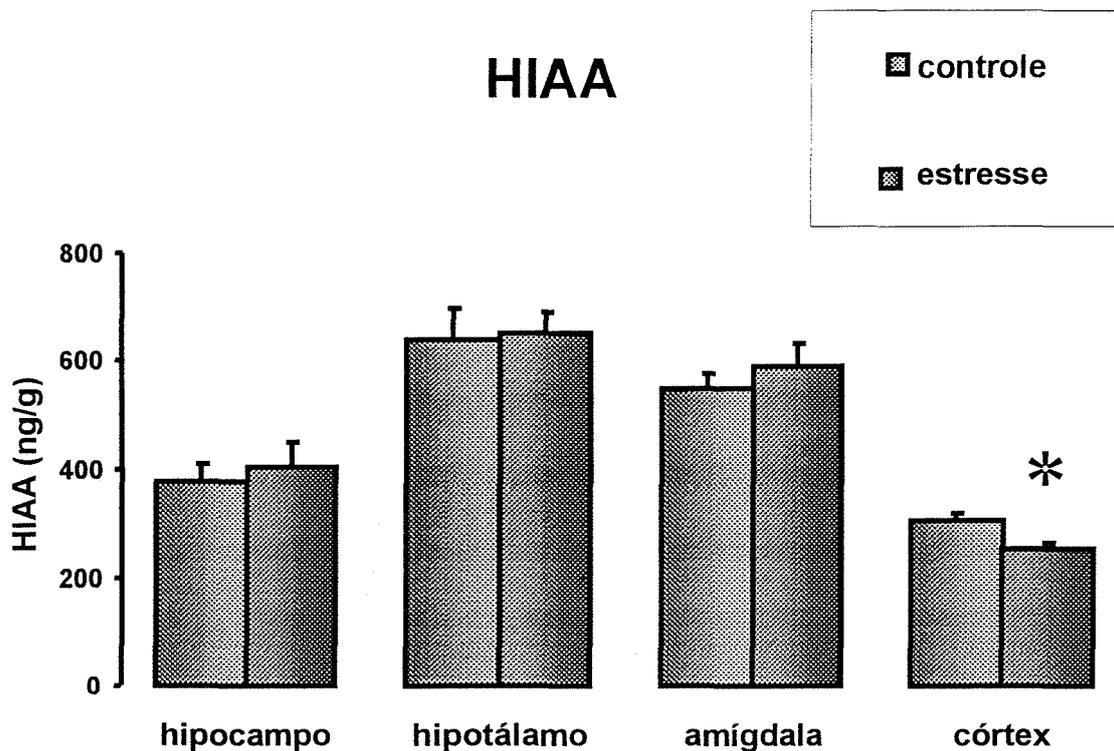


Figura 27: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre os níveis de 5-HIAA, 24 h após a última exposição ao estresse. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Não existe diferença entre os grupos pelo Teste t de Student para amostras independentes, em amígdala ($t(16) = 0,83$); hipocampo ($t(16) = 0,44$) e hipotálamo ($t(16) = 0,12$); $p > 0,05$ em todos os casos.

* Diferença significativa em córtex frontal no grupo estressado ($t(16) = 2,43$; $p < 0,05$). Controle $N = 5$; estressado $N = 5$.

HIAA / 5-HT

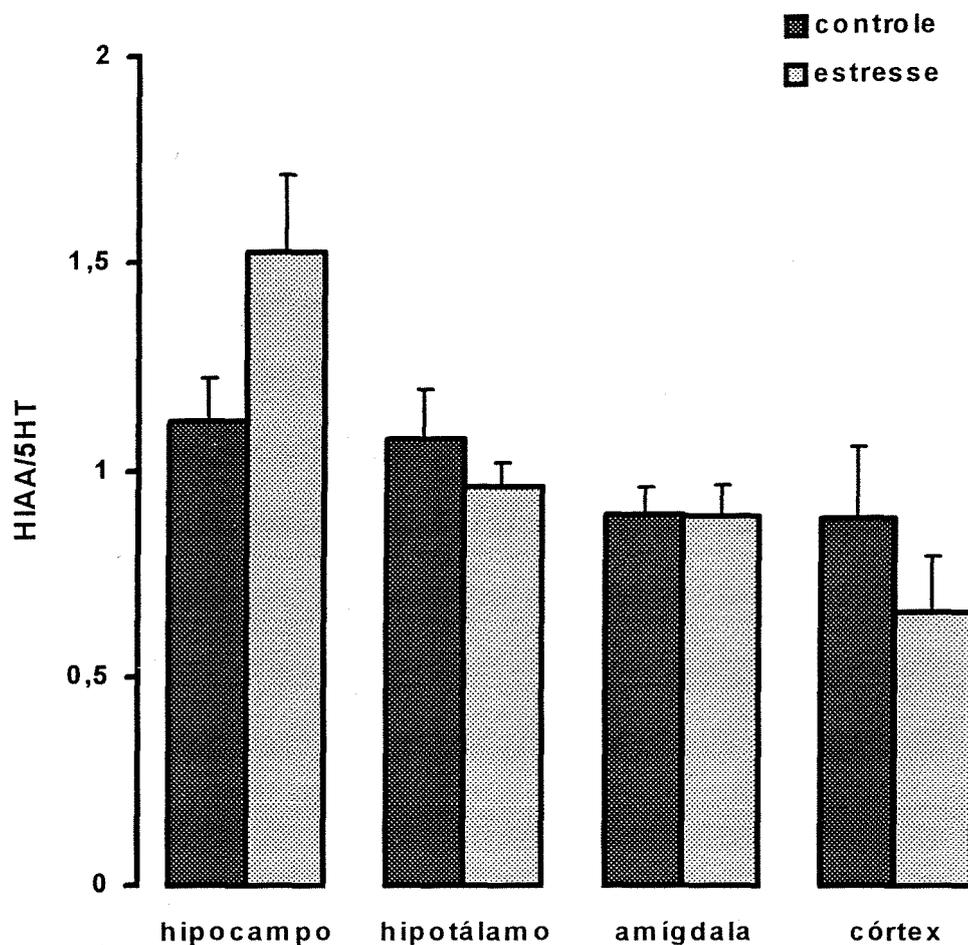


Figura 28: Efeito do estresse crônico por imobilização sobre a relação HIAA/5-HT 24 h após a última exposição ao estresse. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Não existe diferença entre os grupos ($t(16) = 0,96$ para córtex; $t(16) = 2,03$ para hipocampo; $t(16)=0,81$ para hipotálamo; $t(16)=0,09$ para amígdala; $p > 0,05$ para todos os casos pelo teste t de Student para amostras independentes). Controle N = 10; estressado N = 8.

DISCUSSÃO

Seguindo os trabalhos de Seyle, um maior entendimento do mecanismo de estresse tem sido obtido e tornou-se possível identificar diferentes doenças relacionadas aos mecanismos de adaptação ao estresse. Especulações de que o estresse pode ser neurodegenerativo e o mecanismo de envelhecimento patológico pode estar associado a eventos estressantes são de considerável interesse.

Em termos neuroendócrinos, o estresse refere-se à resposta hormonal a alterações no ambiente, com o objetivo de manter a homeostasia. Junto ao sistema endócrino, é ativado pelos estressores o eixo LHPA.

Há consideráveis evidências mostrando que a resposta do eixo LHPA é progressivamente reduzida após repetida exposição ao estressor. Este fenômeno é conhecido como habituação e pode ocorrer após exposição a estresse crônico repetido, como manipulação, imobilização, barulho etc. A habituação depende de vários fatores: intensidade do estresse, intervalo de tempo entre as sessões, variabilidade individual (Lachuer *et al*, 1994). Este processo de dessensibilização coincide temporariamente com o início das mudanças no sítios monoaminérgicos. A partir disto, foi sugerido que um regime prévio de estresse crônico modifica as conseqüências comportamentais provocadas pela subsequente exposição a uma situação estressante de novidade (Cancela *et al*, 1995).

A exposição crônica a um estímulo estressante induz mecanismos compensatórios que atenuam os efeitos deletérios do estresse repetido, um

mecanismo de defesa que mantém a homeostasia. Esta habilidade para adaptar-se ao estresse repetido e prolongado parece ocorrer em nível de eixo HPA e eixo simpatoadrenal (AS), os dois maiores sistemas envolvidos na resposta ao estresse (Mansi e Drolet, 1997).

A atenuação da resposta da hipófise ao estresse crônico pode envolver mecanismos que incluem aumento no *feedback* dos glicocorticóides, diminuição da secreção hipotalâmica de CRH, exaustão da capacidade secretória de corticotróficos e diminuição nos receptores da hipófise para reguladores de ACTH (como citado em Hauger *et al.*, 1988).

No sistema nervoso central, os corticosteróides afetam o humor e o comportamento. Alterações do eixo LHPA têm sido identificadas em pessoas depressivas, sugerindo um envolvimento dos corticosteróides na etiologia da depressão e de outras doenças (Young *et al.*, 1991). O sistema serotoninérgico também tem um papel importante em numerosas funções cerebrais, incluindo reação a estresse, depressão e ansiedade (Giral *et al.*, 1988).

Muitas ações comportamentais dos glicocorticóides são sabidamente mediadas pelas alterações que estes causam na função hipocampal (Bohus *et al.*, 1982; McEwen, 1982). Isto sugere que os glicocorticóides podem influenciar os processos de aprendizado e memória (Bohus *et al.*, 1982).

MEDIDA DA RESPOSTA NOCICEPTIVA

A exposição a estressores produz uma diminuição na responsividade à dor (analgesia) (Amir & Amit, 1978; Menendez *et al.*, 1993). O cérebro

possui um sistema de inibição da dor em que os opióides endógenos estão envolvidos (Bruehl *et al.*, 1996), e o estresse, como indutor de analgesia, tem recebido grande atenção por fornecer uma indicação do envolvimento dos opióides endógenos no fenômeno comportamental e adaptativo.

Estudos têm sugerido que algumas formas de analgesia induzida pelo estresse são mediadas pelo sistema opióide, uma vez que animais desenvolveram tolerância cruzada entre os efeitos analgésicos da morfina e o estresse, e a analgesia pôde ser revertida por antagonistas opióides (Maier *et al.*, 1980). Já outras formas de analgesia por estresse são mediadas por mecanismos não-opióides (Lewis, 1986, MacLennan *et al.*, 1982).

A descoberta de que a hipofisectomia reduz a analgesia induzida pelo estresse mediada por opióide sugere que a β -endorfina pode mediar este tipo de analgesia (Amir, *et al.*, 1980). É possível que a β -endorfina hipofisária possa ser mobilizada pelo estresse e transportada até o cérebro pelo fluxo retrógrado através do sistema porta, e então diminuir a responsividade ao estímulo doloroso pela interação com estruturas centrais (MacLennan, *et al.*, 1982).

A β -endorfina hipotalâmica é liberada em resposta à novidade (Izquierdo *et al.*, 1984; Izquierdo & Netto, 1985 a), e a β -endorfina pituitária, bem como as encefalinas da adrenal, são liberadas na circulação em resposta ao estresse (Lewis *et al.*, 1982; Hayden-Hixson & Nemeroff, 1993).

Animais cronicamente estressados não mostram o mesmo comportamento e nem apresentam as mesmas conseqüências quando comparados com animais estressados agudamente (Armário *et al.*, 1990;

Cancela *et al.*, 1995). Diferentes sistemas neurotransmissores têm sido sugeridos como tendo função no processo de dessensibilização ao estresse, incluindo modulação opióide (Cancela *et al.*, 1988; Cancela *et al.*, 1995). Por exemplo, repetida exposição a situações de estresse modifica a resposta comportamental dos opióides e a resposta fisiológica à administração colinérgica (Cancela *et al.*, 1995; Dilsaver *et al.*, 1986; Filkelstein *et al.*, 1985). Nesta dissertação, observamos que a hiperalgesia observada nos animais cronicamente estressados permanece por pelo menos 28 dias após cessar o tratamento. Tempos maiores de interrupção devem ser testados a fim de determinarmos se essas alterações são ou não permanentes. Por outro lado, esses animais cronicamente estressados não respondem com analgesia a um estresse agudo de mesma natureza que aquele utilizado no tratamento (Xavier, 1995). Continuam não respondendo 14 dias após o término do tratamento crônico, porém começam a responder 28 dias após, embora continuem hiperalgésicos. As modificações no limiar de dor observadas nos animais cronicamente estressados podem ser devidas a alterações nos receptores opióides centrais ou periféricos, em número e ou afinidade, ou ainda a modificações em outros sistemas de neurotransmissores ou neuromoduladores.

O CRH induz a liberação de ACTH e β -endorfina da hipófise anterior (Vale *et al.*, 1981). A β -endorfina e outros opióides estão envolvidos em uma série de funções, tais como dor, excitabilidade de célula nervosa e epilepsia, imunomodulação, estresse e outros (Millan, 1986). A analgesia induzida pelo estresse é um fenômeno bem conhecido e a função da β -

endorfina no estresse tem sido estudada (Amir *et al.*, 1980). Muitos estudos indicam que corticosteróides e ACTH também têm função de modulação da dor (Lewis *et al.*, 1980; MacLennan *et al.*, 1982) e na excitabilidade cerebral (McEwen *et al.*, 1986). Uma série de investigações tem indicado que corticosteróides, tais como dexametasona, exercem consistente inibição sobre efeitos induzidos pela morfina na sensibilidade à dor e excitabilidade hipocampal. Há evidências de que o ACTH e corticosteróides reduzem a analgesia opióide (Chatterjee *et al.*, 1982). Dados indicam que em cérebro de roedores existe uma importante interação funcional entre os corticosteróides e o sistema opióide pelo menos em nível de receptor μ , enquanto receptores δ e κ são modulados por outras vias (Pieretti *et al.*, 1994). Um pré-tratamento com dexametasona foi capaz de reduzir a analgesia induzida pela morfina tanto na placa quente (Pieretti *et al.*, 1991) quanto no teste de *tail-flick* (Capasso *et al.*, 1992). Como no estresse crônico os níveis de corticosterona em resposta ao estresse são bastante diferentes do estresse agudo (ver figuras 21 e 22), é possível que estejam relacionados com a hiperalgisia observada anteriormente em nosso laboratório, nesse modelo de estresse crônico (Gamaro *et al.*, 1998b) e confirmada pelos dados desta dissertação.

Estados hiperalgésicos são observados comumente como um sintoma de inflamação tecidual ou após injúria de nervo central ou periférico, em que estímulos não-nocivos produzem dor ou o estímulo nocivo é percebido com uma dor muito mais intensa (Levine, *et al.*, 1986). A diminuição do limiar de dor ocorre por ativação dos nociceptores aferentes primários (Markenson,

1996). Mediadores hiperalgésicos podem atuar diretamente no nociceptor aferente primário para produzir hiperalgesia, como, por exemplo, a prostaglandina E₂, Prostaciclina, adenosina e serotonina. Outros, como norepinefrina, bradicinina e leucotrienos, atuam indiretamente em células neurais e não-neurais, para liberar prostaglandinas (Khasar *et al.*, 1994).

A modulação de *inputs* sensoriais (neste caso a dor) ocorre em muitos níveis. Neuroceptores são também neuroefetores, e a transmissão pode ser modulada por seus corpos celulares, com a secreção de mediadores inflamatórios, neuropeptídeos ou outras substâncias que produzam dor. Vias descendentes do hipotálamo, que possuem receptores opióide-sensíveis e são estimuladas por estresse emocional, podem transmitir sinais para o corno dorsal da medula espinhal, que modula transmissões nociceptivas ascendentes. A modulação para alterar a percepção da dor também pode ocorrer em centros altos (por exemplo: córtex frontal, mesencéfalo, bulbo) por opióides, agentes anti-inflamatórios, assim como antagonistas e agonistas de neurotransmissores (Markenson, 1996).

A dor crônica de origem periférica envolve mecanismos inflamatórios e neuropáticos. Na inflamação, há ativação de fibras aferentes C e A, com indução de reflexo axonal e liberação de substância P, neurocinina A e peptídeo relacionado a calcitonina. Esses alteram excitabilidade de fibras sensoriais e autonômicas simpáticas, ativando células imunitárias e liberando outras substâncias através do extravasamento plasmático (Wannmacher e Ferreira, 1998a). Bradicininina, citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral), prostaglandinas, serotonina, histamina, óxido nítrico, opióides

endógenos em sítios periféricos e fator de crescimento neural participam em recepção e transmissão de estímulos dolorosos de origem inflamatória. A dor neuropática relaciona-se à atividade anormal de canais de sódio que se acumulam em sítios de danos neurais e a receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), responsáveis por produzir excitabilidade central, além de liberação excessiva de ácido glutâmico que medeia excitotoxicidade, preponderante sobre a ação de interneurônios inibitórios (Wannmacher e Ferreira, 1998a).

Na medula espinhal tem sido sugerido que a ativação de receptores AMPA/cainato é responsável por transmissões sinápticas rápidas associadas com respostas reflexas fisiológicas, enquanto que a ativação de receptores NMDA está envolvida em transmissão nociceptiva de circuito local, reforçando uma expressão comportamental de hiperalgesia (Coderre, 1993). Os receptores AMPA são responsáveis pela formação de sinal para a localização, intensidade e duração da dor, temporal e espacialmente (Thompson *et al.* 1990).

Estudos comportamentais demonstram que a ativação de receptores NMDA espinhais resulta em hiperalgesia térmica (*apud* Meller *et al.* 1996). Relatos demonstram que receptores NMDA têm uma função na hiperalgesia produzida por injúria tecidual ou nervosa (Coderre & Melzack, 1991). Provavelmente a ativação de receptores NMDA produz uma variedade de segundos mensageiros (por exemplo: óxido nítrico, GMP cíclico e ácido araquidônico) e a ativação de várias enzimas intracelulares (por exemplo: óxido nítrico-sintase, guanilato ciclase solúvel, proteína quinase C e fosfolipase A₂) que resulta em prolongada alteração na sensibilidade celular

(Coderre, 1993).

A formação reticular do tronco cerebral pode exercer influências inibitórias na transmissão em todos os níveis sinápticos do sistema sensorial. Esta habilidade tônica depende do *input* sensorial normal. Perda dos *inputs* sensoriais normais após amputação, lesão nervosa periférica, uso de certas drogas e estresse emocional prejudicam a eficácia dos mecanismos e levam ao aumento da dor (Markenson, 1996).

As prostaglandinas formam-se a partir do ácido araquidônico, são envolvidas em processos inflamatórios, além de promoverem vasodilatação, sensibilizarem os nociceptores (hiperalgesia) e estimularem os centros hipotalâmicos de termorregulação. A histamina e a bradicinina aumentam a permeabilidade vascular e ativam receptores nocigênicos (Wannmacher e Ferreira, 1998b).

A hiperalgesia desenvolve-se quando terminações nervosas de nociceptores polimodais são sensibilizados por mediadores de inflamação, tais como prostaglandinas (Levine *et al.*, 1984). As prostaglandinas sensibilizam nociceptores aferentes primários ao estímulo nocivo (químico calor ou mecânico), provavelmente via ativação de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O nociceptor aferente primário pode ser ativado primária ou secundariamente por mediadores inflamatórios, neuropeptídeos ou outras substâncias indutoras de dor. A sensibilidade destes nociceptores pode ser alterada positiva ou negativamente pelas mesmas substâncias (Markenson, 1996).

Os leucotrienos também têm função na hiperalgesia por meio da

ativação de segundos mensageiros, tais como AMPc (*Apud* Markenson, 1996). Agentes que atuam elevando AMPc intracelular podem levar à hiperalgesia pelo bloqueio da fosforilação da proteína quinase dependente-AMPc (Taiwo & Levine, 1991). Nociceptores aferentes primários utilizam a proteína guanosina estimulatória (proteína G_s) para *ligar* e ativar AMPc intracelular (Taiwo & Levine, 1989).

Proteínas *C-fos* e *C-jun* são fatores transcricionais que regulam a expressão de grande número de outros genes. Proteína *Fos* pode servir como terceiro mensageiro, sinalizando a passagem de eventos neurológicos de curta duração para eventos de longa duração (por exemplo: dor aguda em dor crônica). Em experimentos animais, o número de neurônios reativos à proteína *fos* está relacionado com o comportamento de dor provocado por estímulos nocivos (Gogas *et al.*, 1991). Com o monitoramento da expressão de proteína *fos* nos neurônios do corno dorsal, pode-se estudar o mecanismo de sensibilização central, que ocorre por meio da ativação de receptor NMDA localizado nos neurônios do corno dorsal.

Assim sendo, a hiperalgesia observada nos animais estressados cronicamente e que permanece por pelo menos 28 dias após cessar o estresse crônico pode envolver alterações em quaisquer desses sistemas de neurotransmissores ou neuromoduladores citados acima, além das possíveis alterações no sistema opióide endógeno sugeridas nesta dissertação. Alterações na transcrição gênica, conforme observado no parágrafo anterior, devem também estar relacionadas com os efeitos de longa duração no parâmetro sensibilidade à dor observados nesta dissertação.

Há relatos de antinocicepção induzida pela novidade (Netto *et al.*, 1987; Dalmaz *et al.*, 1991) e de que esta seja revertida pelo antagonista opióide naltrexona (Siegfried *et al.*, 1987).

Nossos resultados mostraram que os ratos controle apresentaram antinocicepção induzida pela novidade, o que concorda com dados da literatura, sugerindo que certas formas de novidade podem alterar a sensibilidade à dor (Fanselow, 1985; Netto, *et al.*, 1987). Por outro lado, quando testamos os animais cronicamente estressados, não houve diferença significativa entre as latências antes e depois da novidade. Visto que a antinocicepção induzida pela novidade, avaliada por meio do aparelho de *tail-flick* em ratos, tem sido sugerida como mediada pela liberação de β -endorfina (Siegfried *et al.*, 1987; Netto *et al.*, 1987), a ausência deste efeito no grupo estressado sugere uma alteração no padrão de resposta daquele sistema nos animais imobilizados cronicamente. Estas alterações poderiam estar relacionadas ao efeito hiperalgésico em animais submetidos ao estresse crônico observado anteriormente e comprovado nos atuais experimentos.

Dados prévios de nosso laboratório indicam que animais estressados cronicamente por imobilização apresentam uma diminuição na latência do *tail-flick*, caracterizando uma resposta hiperalgésica, tanto na medida basal quanto após exposição à imobilização (Gamaro *et al.*, 1998 a). Este resultado mostrou-se reprodutível, visto que os animais cronicamente estressados utilizados nos experimentos desta dissertação também apresentaram hiperalgesia.

Nós investigamos o efeito da suspensão do estresse por imobilização sobre a nocicepção após 14 e 28 dias de interrupção do tratamento. Após este período, a nocicepção foi novamente medida por meio do aparelho de *tail-flick*. Os animais foram então submetidos a um estímulo estressante (3 h de imobilização) e a nocicepção foi avaliada. Os resultados obtidos indicam, que tanto 14 quanto 28 dias após a suspensão do estresse, os animais continuam hiperalgésicos em relação aos controles. A exposição a um novo estímulo estressante após a interrupção do tratamento crônico provocou antinocicepção nos animais controle, conforme era esperado, enquanto que, somente após 28 dias, um efeito antinociceptivo dessa nova exposição ao estresse foi observado nos animais estressados. É possível que a ausência de resposta a uma nova exposição ao estresse, observada nos animais cronicamente estressados, até 14 dias de suspensão do tratamento, se deva a uma adaptação a esse agente estressor. É sabido que a exposição repetida ao estresse pode causar adaptação e diversos neurotransmissores têm sido implicados nesse fenômeno. Essa adaptação seria menor resposta opióide (à novidade ao estresse que induz analgesia, à morfina) Por outro lado, esse efeito seria de natureza diferente daquele envolvida na gênese de uma resposta hiperalgésica, uma vez que o seu desaparecimento não segue o mesmo curso temporal visto que após 28 dias de suspensão do tratamento os animais continuam hiperalgésicos, mas começam a responder com analgesia característica a um novo estímulo estressor. Assim, é possível que mais de um sistema esteja envolvido nas adaptações ao estresse crônico no que tange a seus efeitos nociceptivos.

nociceptivos.

Quando injetamos morfina (1,0 e 5,0 mg/Kg) em ratos controles e cronicamente estressados, observamos que os ratos controle apresentaram efeito de ambas as doses de morfina aos 60 min, enquanto que, 30 min após a injeção, o efeito aparece somente com a dose de 5 mg/kg. Provavelmente, o efeito não aparece aos 30 min para a dose de 1 mg/kg devido à dispersão dos dados, que foi bastante grande neste grupo (vide figura 8a). Já o grupo manipulado apresentou efeito analgésico aos 30 e 60 min para ambas as doses de morfina. No caso dos animais estressados, observou-se efeito significativo somente aos 60 min e após a administração da dose maior de morfina (5 mg/kg), sugerindo que o tratamento de estresse crônico pode estar provocando alterações no sistema opióide endógeno. Observamos ainda que, aos 60 min, os animais deste grupo injetados com salina ou morfina 1 mg/kg apresentaram uma diminuição na sensibilidade à dor em relação às medidas realizadas aos 30 min. Uma observação que podemos constatar é que a repetição da medida de retirada da cauda produz eventualmente uma diminuição na latência quando comparamos as latências aos 30 e 60 minutos após a administração de salina ou morfina na dose mais baixa. Esta diminuição pode ser explicada pelo aprendizado do animal, que passará a retirar a cauda mais rapidamente quando a medida é repetida várias vezes. Por que esta diminuição não apresentou efeito significativo nos demais grupos? Talvez porque, sendo estes animais hiperalgésicos, as possibilidades de aprendizado (i.e., aprenderem que na situação experimental em questão serão submetidos a um estímulo doloroso) serão

maiores, uma vez que a hiperalgesia pode aumentar a aversividade da situação.

É interessante observar, porém, que os animais manipulados respondem normalmente à administração de morfina, de modo semelhante ao que ocorre com os animais controle. Por outro lado, estes animais não apresentaram o efeito antinociceptivo que é observado após exposição à novidade. Este fato levanta outras possibilidades. Por exemplo, é possível que o tratamento crônico leve a alterações no sistema opióide endógeno, que seriam maiores nos animais estressados (por exemplo, alterações em receptores e nos níveis de peptídeos endógenos) e alterações mais leves nos animais manipulados (alterações apenas nos níveis de peptídeos opióides ou na resposta à novidade com liberação de β -endorfina hipotalâmica). Por outro lado, é possível que outros sistemas estejam envolvidos, conforme discutido acima.

A potenciação da magnitude e duração do efeito analgésico de drogas opióides em ratos expostos a estresse agudo por imobilização (1 h de imobilização) quando comparado com ratos não estressados tem sido demonstrada. É possível que o mecanismo responsável por este efeito envolva sítios espinhais e supraespinhais (Calcagnetti & Holtzman, 1992). Esta conclusão é apoiada por observações de que a analgesia induzida por agonistas opióides administrados i.c.v. é aumentada em ratos estressados por imobilização (*apud* Calcagnetti *et al.* 1992). Vários estudos têm determinado que a potenciação da analgesia induzida por opióides provocada pela exposição ao estresse agudo provavelmente não envolva

alteração na afinidade de receptores opióides, e é mais proeminentemente produzida por agonistas com atividade intrínseca em receptor opióide μ (*apud* Calcagnetti *et al.* 1992).

Assim, enquanto que o estresse agudo potencializa a ação antinociceptiva da morfina, o estresse crônico, além de por si só apresentar efeito hiperalgésico (ao contrário do estresse agudo), também provoca uma diminuição na sensibilidade à morfina. Estes dados sugerem uma alteração em nível de receptores opióides, que pode estar envolvida na gênese do efeito efeito hiperalgésico do estresse crônico. Por outro lado, é possível que outras alterações (em outros sistemas de neurotransmissores ou neuromoduladores) causadas pelo estresse repetido levem a alterações na nocicepção, justificando ainda a diminuição na sensibilidade à morfina observada nesta dissertação.

COMPORTAMENTO ALIMENTAR

A expressão do apetite reflete um complexo funcionamento do sistema psicobiológico. A psicobiologia do comportamento alimentar envolve o apetite, os estados motivacionais e a necessidade de ingestão calórica, coordenados pela atividade dos sistemas nervosos periférico e central (Halmi, 1996). Alterações emocionais podem alterar o comportamento alimentar. Em humanos, foi observado que alterações emocionais podem induzir uma alimentação excessiva (Timo-laria, 1985; Yates, 1992).

Tem sido relatado que alguns agentes podem exercer efeito sobre a ingestão de substâncias doces. Por exemplo, sabe-se que há um aumento

do consumo de sacarose em ratos submetidos a choque inescapável (Dess *et al.*, 1988). Sistemas opióides, que podem estar alterados no estresse crônico, também têm sido implicados nas respostas de prazer a alimentos, especialmente de sabor doce (Blundell, 1991). O CRH é um neuropeptídeo que pode atuar no núcleo paraventricular, inibindo o comportamento alimentar. A epinefrina, quando administrada no núcleo paraventricular, produz um efeito estimulante sobre o apetite, causando um aumento na ingestão de alimentos ricos em carboidratos por meio de ligação com os receptores α_2 (Blundell & Hill, 1993; Halmi, 1995). Os receptores β_2 do hipotálamo perifornical inibem o comportamento alimentar quando estimulados. A serotonina, quando injetada no núcleo paraventricular, suprime a ação induzida pela norepinefrina, facilitando a saciedade (Hoebel, 1979). Existem também evidências da ação dos sistemas dopaminérgico e de opióides endógenos no comportamento alimentar (Halmi, 1995).

Resultados prévios de nosso laboratório mostraram que a exposição ao estresse crônico por imobilização leva a um aumento na ingestão de alimento doce, mas não de ração-padrão. Por outro lado, a exposição ao estresse crônico variável levou a uma diminuição na ingestão de alimento doce (Gamaro, 1998).

Os resultados obtidos não mostraram diferença significativa entre os grupos (controle, manipulado e estressado). Observou-se somente efeito do jejum, isto é, os animais em jejum consumiram mais alimento (amendoim) que os alimentados, em todos os grupos.

Estes resultados sugerem que o aumento na ingestão observado

anteriormente em nosso laboratório é específico para alimento doce, uma vez que tal não ocorre quando é utilizado um alimento bastante palatável mas não doce, como é o caso do amendoim. É possível que os efeitos do estresse crônico sobre o consumo destes alimentos estejam relacionados não somente ao sabor do alimento, mas à seleção de macronutrientes específicos (glicídios, no caso do alimento doce utilizado em trabalhos anteriores, e lipídios, no caso do amendoim). É importante considerar que esteróides adrenais estão envolvidos com o comportamento alimentar, tanto no que se refere à ingestão quanto à qualidade dos macronutrientes. Por exemplo, a estimulação de receptores de esteróides adrenais do tipo I aumenta especificamente a ingestão de gordura, enquanto a estimulação de receptores do tipo II aumenta a ingestão de carboidratos (Tempel *et al.*, 1992). Como os efeitos observados neste modelo de estresse crônico referem-se à ingestão de carboidratos especificamente, é possível que alterações no número ou na sensibilidade desses receptores estejam presentes nesses animais. Esta hipótese poderá ser testada em futuros trabalhos.

MEMÓRIA ESPACIAL.

A administração de hormônios glicocorticóides em animais não submetidos a estresse tem sido utilizada para o estudo das conseqüências dos níveis elevados do hormônio da adrenal nos processos de aprendizagem e memória (McEwen *et al.*, 1986).

O estresse quando muito intenso ou de longa duração pode levar a danos no hipocampo, estrutura cerebral sabidamente envolvida com memória espacial (Dachir *et al.*, 1995).

Os resultados obtidos ao avaliarmos a memória espacial de ratos estressados cronicamente por imobilização, utilizando o labirinto aquático com plataforma visível (memória de trabalho) e plataforma invisível (memória de referência), indicam não haver efeito do modelo de estresse utilizado sobre a memória espacial. O desempenho é similar quando comparados os três grupos propostos (controle, manipulado e estressado) quanto à latência para encontrar a plataforma, ao tempo de permanência em cada quadrante e ao número de cruzamentos, sendo que os dois últimos parâmetros só foram considerados para a tarefa de memória de referência.

Apesar de haver sugestões na literatura de que o estresse crônico ou a exposição a glicocorticóides cause injúria em neurônios do hipocampo (Bohus *et al.*, 1982; McEwen & Sapolsky, 1995), não encontramos efeito do estresse crônico por imobilização sobre a memória espacial de ratos nas duas tarefas escolhidas (memória de trabalho e memória de referência). É possível que o modelo de estresse em questão não seja tão agressivo a ponto de comprometer a memória nesta tarefa.

MEDIDA DE CORTICOSTERONA

Estudos têm sido feitos no sentido de avaliar o delicado balanço entre os efeitos protetores dos esteróides secretados pelas adrenais em resposta a experiências estressantes e as conseqüências negativas que estes mesmos

hormônios podem ter em muitos processos. Enquanto que, por um lado, o excesso de esteróides suprime os mecanismos de defesa imune e produz conseqüências negativas, tais como dano neuronal, atrofia muscular e perda de cálcio dos ossos (Sapolsky *et al.*, 1986), por outro lado a falta destes hormônios torna o organismo vulnerável a doenças inflamatórias e a respostas autoimunes, febre, danos no metabolismo das catecolaminas e do álcool (Spencer & McEwen, 1990), bem como aumento nas respostas ao medo e à ansiedade (Weiss *et al.*, 1970).

A habituação seguida ao estresse crônico intermitente tem sido observada em vários sistemas neuroendócrinos. Sistema LHPA e a regulação dos níveis de corticosterona plasmática têm sido bastante estudados. Em ratos de laboratório, a resposta da corticosterona plasmática foi reduzida após estresse crônico intermitente (barulho, imobilização e flashes de luz) (Armário *et al.*, 1986).

Os resultados obtidos mostraram que os níveis plasmáticos de corticosterona medidos logo após imobilização crônica sofreram uma diminuição significativa no grupo manipulado em relação aos demais grupos (controle e estressado). Estes resultados nos apontam para a possibilidade de que a manipulação diária dos animais possa levar a uma adaptação na liberação hormonal como uma resposta do organismo ao estresse, já que os níveis de corticosterona plasmática neste grupo apresentaram-se menores que os grupos controle e estressado crônico. Embora não existam dados semelhantes com animais adultos, cabe lembrar que a manipulação no período neonatal leva a alterações na resposta ao estresse, com diminuição

na liberação de glicocorticóides (Liu *et al.*, 1997). Uma série de estudos têm mostrado que manipulação cirúrgica ou comportamental reduz a exposição cumulativa de glicocorticóides (Sapolsky, 1992; Landfield *et al.*, 1981), assim como analisam vários parâmetros comportamentais e hormonais em relação à manipulação de animais (Gärtner *et al.*, 1980).

Quando os níveis basais de corticosterona foram medidos (24 h após a última sessão de estresse por imobilização), não houve diferença entre os grupos, embora os animais manipulados e estressados tenham apresentado uma diminuição não-significativa em relação ao grupo controle. Esta medida foi realizada a fim de verificarmos se ocorrem alterações nos níveis de corticosterona pela cronificação do tratamento de estresse, já que agudamente observou-se elevação dos níveis de corticosterona. Devemos também considerar estudos prévios de nosso laboratório, que nos mostraram que os níveis basais de glicose plasmática dos animais cronicamente estressados por imobilização não diferem do grupo controle (Xavier, 1996). Hormônios liberados pelo estresse (epinefrina e glicocorticóides) são hiperglicemiantes, e o aumento na glicemia seria uma medida indireta da liberação destes hormônios (Armário *et al.*, 1990).

O resultado obtido nos sugere uma adaptação ao estresse utilizado, de forma que os animais estressados cronicamente passam a responder com menores alterações hormonais ao estresse por imobilização.

Quando os animais foram submetidos a uma única sessão de estresse por imobilização houve uma diferença significativa entre os grupos nos níveis de corticosterona. O estresse agudo por imobilização leva a um aumento nos

níveis de corticosterona imediatamente após estresse. Embora os experimentos não tenham sido realizados conjuntamente, e não possamos fazer esta análise estatística, podemos observar que os animais estressados cronicamente apresentam níveis aumentados de corticosterona plasmática, porém menores do que os obtidos dos animais estressados agudamente (medidas realizadas imediatamente após a última sessão de estresse em ambos os modelos). Isto nos leva novamente sugerir a uma possível modulação na resposta do organismo ao estresse, mas sem que haja uma completa adaptação ao estresse crônico por imobilização, visto que os níveis de corticosterona encontrados nos animais cronicamente estressados são significativamente mais altos do que os níveis encontrados nos animais manipulados.

MEDIDAS DE CATECOLAMINAS

Vias catecolaminérgicas no cérebro são ativadas durante o estresse e estão envolvidas no controle de mudanças fisiológicas e comportamentais provocadas pelo mesmo. No estresse repetido, têm sido observadas mudanças adaptativas da atividade catecolaminérgica no cérebro (Gil & Armario, 1998).

A ativação do sistema de aminas biogênicas cerebrais parece ocorrer após exposição de ratos a um estressor agudo. Única sessão de estresse (por exemplo, choque ou estresse por imobilização) pode aumentar o *turnover* ou a liberação de catecolaminas e indolaminas [norepinefrina (NE), dopamina (DA), e serotonina (5-HT)] no córtex frontal de ratos (como citado

em Jordan *et al.*, 1994). Por outro lado, a resposta das catecolaminas e indolaminas ao estresse repetido tem sido menos estudada.

O efeito do estresse repetido nos níveis de norepinefrina depende da natureza de estressor bem como da região do cérebro estudada. Embora a liberação de norepinefrina possa estar aumentada quando o estresse é repetido (Anisman *et al.*, 1987), os níveis basais deste neurotransmissor em ratos cronicamente estressados geralmente não estão diminuídos. Esta alteração nos níveis de norepinefrina após a exposição a um agente estressor é tempo-dependente e os níveis retornam progressivamente ao normal após a cessação do estresse (Anisman *et al.*, 1987).

Nossos resultados foram obtidos 24 horas após a última sessão de estresse. Portanto, os níveis de norepinefrina nas estruturas estudadas, caso tenham apresentado aumento, provavelmente já haviam retornado aos valores normais. Assim, os resultados do presente trabalho de dissertação mostram que não ocorrem alterações basais nos níveis de norepinefrina após exposição dos animais ao estresse crônico por imobilização.

Os tratos dopaminérgicos no cérebro parecem ser relevantes para comportamentos e emoção e compreendem 3 grandes divisões, todas derivadas da área tegumental ventral e da substância negra. Os principais sistemas de fibras dopaminérgicas no cérebro são o *nigrostriatal* (da substância negra compacta para os núcleos caudato e putamen), o mesolímbico (da área do tegumento ventral para o *nucleus accumbens*), o mesocortical (da área do tegumento ventral para o córtex cerebral) e o tuberoinfundinbular (do *nucleus arcuate* para a eminência média).

de vários fatores, incluindo sexo do animal e tipo de estressor (Fleckenstein *et al.*, 1994). Sabe-se pouco sobre como o estresse repetido afeta os receptores dopaminérgicos e a modulação neuroquímica da transmissão dopaminérgica.

Existem evidências conflitantes de mudanças na liberação de dopamina quando o estresse é repetido intermitentemente por vários dias. Há várias evidências de que o estresse afeta atividade neuronal dopaminérgica. O mecanismo central que envolve este efeito ainda não está bem definido. O estresse induz a um aumento na atividade dos neurônios dopaminérgicos projetados para o núcleo *accumbens*, o que se reflete no aumento da liberação de dopamina ou no seu metabolismo (*apud* Fleckenstein *et al.*, 1994).

Existem estudos demonstrando que o estresse por imobilização afeta diferencialmente a atividade dos neurônios dopaminérgicos (Fleckenstein *et al.*, 1994). Especificamente, o estresse por imobilização aumenta a atividade dos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos de ratos machos e diminui sua atividade nos neurônios peri-ventricular-hipofisais (Fleckenstein *et al.*, 1994).

Nossos resultados mostraram um aumento significativo dos níveis de dopamina na amígdala, estrutura sabidamente envolvida com emoção e comportamento. A amígdala é uma parte importante do circuito neuronal que medeia ajustes comportamentais, autonômicos e neuroendócrinos ao estímulo ambiental e ao estresse (Gray, 1991). DOPAC, um metabólito da dopamina, aparece como um metabólito complementar da biossíntese da norepinefrina e epinefrina. Os níveis do DOPAC representam um índice de

atividade das catecolaminas (Lachuer *et al.*, 1992). Além do aumento nos níveis de dopamina, observamos uma diminuição na relação DOPAC/DA, sugerindo uma menor taxa de metabolização para este neurotransmissor.

Os corpos dos neurônios que contêm dopamina do *arcuate* e PVN do hipotálamo mandam axônios que inervam o lobo intermediário da pituitária e a eminência média. Estes neurônios têm a importante função de regular a liberação de hormônios da pituitária, especialmente prolactina, hormônio sabidamente envolvido com a resposta ao estresse (Siegel *et al.*, 1993). Esta relação pode ser uma explicação para o aumento de dopamina encontrado no hipotálamo de ratos estressados cronicamente por imobilização.

No hipocampo foi observada uma diminuição nos níveis de dopamina, que pode ser explicada por uma diminuição em sua síntese ou um aumento na sua biotransformação, como, por exemplo, alteração na atividade da tirosina hidroxilase, enzima chave para a síntese de catecolaminas.

Nossos resultados mostraram uma redução significativa na relação DOPAC/DA na amígdala, uma tendência à redução no hipotálamo e no córtex, não significativa em relação ao grupo controle. Esta relação é utilizada como índice do metabolismo de DA, sugerindo então que o metabolismo da dopamina pode estar diminuído na amígdala. Estrutura do sistema límbico, sistema este bastante envolvido com a emocionalidade do animal.

Em resultados obtidos em nosso laboratório, utilizando o modelo de estresse crônico variável citado anteriormente, analisamos as mesmas

estruturas e somente foi observado aumento nos níveis de dopamina no córtex frontal (Gamaro, 1998), o que concorda com dados da literatura de que a resposta dos neurônios dopaminérgicos varia conforme o tipo de estressor utilizado. Cabe ressaltar aqui que, além dessas diferenças encontradas nos níveis de catecolaminas cerebrais, os dois modelos de estresse crônico estudados por nosso laboratório também apresentam diferenças em parâmetros comportamentais. Por exemplo, os animais estressados em modelo de estresse crônico variável apresentam menor ingestão de alimento doce em relação aos animais controle, ao contrário do que ocorre com os animais submetidos ao estresse crônico por imobilização, em que há um aumento no consumo de alimento doce. Cabe aqui lembrar que a liberação de dopamina no hipotálamo está também relacionada com o comportamento alimentar do animal (Orosco e Nicolaidis, 1992).

Em relação à serotonina, uma revisão na literatura sugere que o estresse agudo induz mudanças nas concentrações centrais de 5-HT e 5-HIAA, variando muito em função do tipo de estressor utilizado, sua duração e a região do cérebro estudada (Paris *et al.*, 1986). Há evidências que mostram que o estresse agudo por imobilização estimula a captação de L-triptofânio, precursor imediato da serotonina (Kennet & Joseph, 1981). Poucos estudos têm focalizado o efeito do estresse repetido sobre o *turnover* de serotonina.

Nossos resultados sobre os níveis de serotonina não mostraram diferença significativa entre os grupos estressado e controle nas 4 estruturas analisadas, enquanto que os níveis de seu metabólito (HIAA) apresentaram

diferença significativa entre os dois grupos somente no córtex frontal, onde o grupo estressado apresentou níveis diminuídos. Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e estressado em relação à relação HIAA/5-HT em quaisquer das estruturas analisadas.

A diminuição observada nos níveis de 5-HIAA no córtex frontal pode sugerir uma inibição no metabolismo da serotonina, visto que os níveis da serotonina não estão alterados nesta estrutura, porém essa possibilidade não é reforçada pela relação HIAA/5-HT, que não apresentou variação.

Concluindo, o modelo de estresse crônico por imobilização leva a uma alteração no sistema nociceptivo dos animais (hiperalgesia), que permanece inalterada por até 28 dias após a suspensão do tratamento, e somente após este período começa a responder a uma exposição a um novo estímulo estressor com a analgesia característica. Os animais cronicamente estressados respondem à administração de morfina apenas em doses mais elevadas (5 mg/kg) e após 60 minutos da injeção. Não apresentam alteração no comportamento alimentar, isto é, não apresentaram mudanças no consumo do alimento palatável, porém não-doce (amendoim). Não ocorreram mudanças sobre a memória espacial nas duas tarefas realizadas. Os níveis plasmáticos de corticosterona mostraram-se aumentados apenas imediatamente após a última sessão de estresse. Os níveis de dopamina mostraram-se aumentados no hipotálamo e na amígdala e diminuídos no hipocampo. A relação DOPAC/DA também apresentou diminuição na amígdala. O metabólito HIAA mostrou-se diminuído no córtex cerebral.

CONCLUSÕES

- ◆ Os animais submetidos ao estresse crônico por imobilização apresentaram uma diminuição do limiar de dor (hiperalgesia), que permanece por até 28 dias após a interrupção do tratamento, e somente após este período respondem a uma nova sessão de estresse com a resposta analgésica característica ao estresse agudo. Esses animais apresentaram tolerância à morfina (só respondem à dose mais alta utilizada e após 60 min da injeção). Também não apresentaram o efeito analgésico característico após exposição à novidade. Estes dados podem significar uma importante alteração em sistema opióide endógeno, com possível alteração nas β -endorfinas.
- ◆ Os animais cronicamente estressados por imobilização não apresentaram alteração no consumo de alimento palatável, porém não-doce, em relação aos animais controles, indicando que a alteração observada anteriormente em nosso laboratório é específica para alimento doce.
- ◆ Os animais estressados cronicamente por imobilização não apresentaram déficit na memória espacial, em ambas as tarefas realizadas (memória de referência e memória de trabalho).
- ◆ Os animais apresentam habituação ao estresse, uma vez que as variações nos níveis de corticosterona plasmática após uma sessão de estresse nos animais estressados cronicamente não ocorrem da mesma maneira que o observado em estresse agudo. Os níveis basais não diferem entre os grupos expostos ao tratamento crônico.
- ◆ Não existe diferença significativa entre os grupos nos níveis de norepinefrina

nas quatro estruturas cerebrais analisadas. Ocorreu um aumento significativo nos níveis de dopamina na amígdala (com redução na relação DOPAC/DA) e no hipotálamo e uma diminuição no hipocampo (com aumento na relação DOPAC/DA). Os níveis de DOPAC não apresentaram alteração em qualquer das estruturas analisadas.

- ◆ Os níveis de serotonina não apresentaram diferença significativa entre os grupos nas quatro estruturas cerebrais analisadas, embora seu metabólito HIAA apresente uma pequena diminuição no córtex cerebral frontal. A relação HIAA/5HT não apresentou alteração em qualquer das estruturas analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIL, H. A.; MORANO, M.I. (1995). Stress. *IN*: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. (eds) *Psychopharmacology: the fourth generation of progress* 773- 85 pp.
- ALMEIDA, M.A. M.R.; IZQUIERDO, I. (1984). Effect of the intraperitoneal and intracerebroventricular administration of ACTH, epinephrine on β -endorphin on retrieval of an inhibitory avoidance task in rats. *Behav. N. Biol.*, 40: 19-22.
- AMIR, S.; AMIT, Z. (1978). Endogenous opioid ligands may mediate stress-induced changes in the affective properties of pain related behaviour in rats. *Life Sci.*, 23: 1143-1152.
- AMIR, S.; BROWN, Z.; AMIT, Z. (1980). The role of endorphins in stress: evidence and speculations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 4:77-86.
- ANISMAN H.; IRWIN, J.; BOWERS, W. (1987). Variations of norepinephrine concentrations following chronic stressor application. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26: 653-59.
- ARCHER, T. (1993). Serotonin and fear retention in the rat. *J. Com. Physiol. Psychol.*, 96: 491-516.
- ARCHER, T.; OGREN, S.O.; ROSS, S.B. (1982). Serotonin involvement in aversive conditioning: reversal of the fear retention deficit by long-term p-chloroamphetamine but not p-chlorophenylalanine. *Neuroci. Lett*, 34(1):75-82.
- ARMARIO, A.; LOPEZ-COLDERON, A.; JOLIN, T.; BALASCH, J. (1986). Response of pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 10: 245-250.

- ARMARIO, A.; MARTI, J.; GIL, M. (1990). The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology*, 15: 341-347.
- BARNES, C.A. (1988). Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rats. *TINS*, 11: 163-169.
- BERGER, T.W.; THOMPSON, R. F. (1982). Hippocampal cellular plasticity during extinction of classically conditioned nictitating membrane behavior. *Behavi. Brain Res.*, 4: 63-76
- BHATNAGAR, M.; CINTRA, A.; CHADI, G.; LINDBERG, J.; OITZL, M.; DE KLOET, E.R.; MÖLLER, A.; AGNATI, L.F.; FUXE, K. (1997). Neurochemical changes in the hippocampus of the brown norway rat during aging. *Neurobiol. Aging*, 18: 319-327.
- BIEGON, A.; RAINBOW, T.C.; McEWEN, B.S. (1985). Corticosterone modulation of neurotransmitter receptors in rat hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.*, 332: 309-314.
- BLUNDELL, J.L. (1984). Serotonin and appetite. *Neuropharmacology*, 23: 1537-1551.
- BLUNDELL, J., (1991). Pharmacological approaches to appetite suppression. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12: 147-157.
- BLUNDELL, J.L.; HILL, A.J. (1986). Behavioral pharmacology of feeding: relevance of animal experiments in man. **IN**: CARRUBA N; BLUNDELL J.E. (eds). *Pharmacology of eating disorders*. New York: Raven Press, 51-70.
- BODNAR, R.J. (1986). Neuropharmacological and neuroendocrine substrates of stress-induced analgesia. *Ann. N.Y. Acad. Sciences*, 467: 345-360.

- BOHUS, B.; DE WIED, D. (1981). Actions of ACTH and MSH-like peptides on learning, performance and retention. *IN: J. L. MARTINEZ, Jr.; R. A. JENSEN; R. B. MESSING; H. RIGTER; J. L. McGAUGH (eds). Endogenous peptides and learning and memory processes, New York: Academic Press. pp. 59-77.*
- BOHUS, B.; DE KLOEL, R.E.;VELDHUIS, H.D. (1982). Adrenal steroids and behavioral adaptation:relationship to brain corticoid receptors. *IN: GANTEN,D.; PFAFF,D. Adrenal actions on brain. New York: Springer-Verlag. Pp. 107-148.*
- BOHUS, B.; GRUBITS, J.;KOVACS, G. AND LISSAK, K. (1970). Effects of corticosteroids on passive avoidance behaviour of rats. *Acta Physiol. Acad. Scientiarum Hungaricare, 38:381-391.*
- BONAMIN, L. V. (1984). O estresse e as doenças. *Ciência Hoje, 17: 25-30.*
- BRANDEIS, R.; BRABDY, Y.; YEHUNDA, S.(1989). The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Intl. J. Neuroscience , 48:1-2, 29-69.*
- BRIONI, J.D.; IZQUIERDO, I. (1988). Retention enhancement by pre-test β -endorphin and oxotremorine and its reversal by scopolamine. *Behav. Neural Biol. 50:251-254.*
- BRIONI, J. D.; MCGAUGH, J. L.(1989). Posttraining administration of GABAergic antagonists enhances retention of aversively motivated tasks. *Psychopharmacology, 96: 341-345.*
- BRIONI, J.D.; DECKER, M. W.; GAMBOA, L.P.; IZQUIERDO, I; McGAUGH. J.I. (1990). Muscimol injections in the medial septum impair spacial memory. *Brain*

Res., 522: 227-234.

BRUEHL, S.; CARLSON, C.R.; WILSON, J. F.; NORTON, J.A.; COLCLOUGH, G.; BRADY, M.J.; SHERMAN, J.J.; McCUBBIN, J.A. (1996). Psychological coping with acute pain: an examination of the role of endogenous opioid mechanisms. *J.Behav. Med*, 19: 129-42.

CALCAGNETTI, D.J.; HOLTZMAN, S. G. (1992). Potentiation of morphine analgesia in rats given a single exposure to restraint stress immobilization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41: 449-453.

CALCAGNETTI, D.J.; STALFINSKY, J.L.; CRISP, T. (1992). A single restraint stress exposure potentiates analgesia induced by intrathecally administered DAGO. *Brain Res.* 592: 305-309.

CANCELA, L.M.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V.A., (1988). Chronic stress attenuation α_2 -adrenoceptor reactivity is reversed by naltrexone. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 31: 25-33.

CANCELA, L.M.; BREGONZIO, C.; MOLINA, V.A. (1995). Anxiolytic-like effect induced by chronic stress is reversed by naloxone pretreatment, *Brain Res. Bull.*, 36: 209-213.

CAPASSO, A.; DI GIANNUARIO, A.; LOIZZO, A.; PIERETTI, S. & SORRENTINO, L. (1992). Central interaction of dexamethasone and RU-38486 on morphine antinociception in mice. *Life Sci.*, 51: 139-143.

CARRASCO, M.A.; DIAS, R.D.; PERRY, M.L.S.; WOFCHUK, S.T.; SOUZA, D.O.; IZQUIERDO, I. (1982). Effect of morphine, ACTH, epinefrine, Met-Leu- and des-tyr-Met-enkephalin on β -endorphin-like immunoreactivity of the rat brain.

Psychoneuroendocrinology, 34: 352-357.

CARROL. B. J.; CURTIS, G. C.; MENDEL, J. (1976). Neuroendocrine regulation in depression in limbic system-adrenocortical dysfunction. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 33: 1039-1044.

CHATTERJEE, T. K.; SUMANTRA, D.; BANERJE, P. & GHOSH, J.J. (1982). Possible physiological role of adrenal and gonadal steroids in morphine analgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, 77: 119-121.

CODERRE, T.J. (1993). The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. *Molec. Neurobiol.*, 7: 229-246.

CODERRE, T.J. AND MELZACK, R. (1991). Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. *Neurosci. Lett.* 131: 71-74.

CUCCO, S. N. (1998). Estudo do estresse agudo e crônico por imobilização sobre o consumo de glicose e sobre a memória espacial em ratos. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com ênfase em Bioquímica, UFRGS. 123pp.

CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; HELMREICH, D. L.; WATSON, S.J. JR., (1995). A neuroanatomy of stress **IN**: FRIEDMAN, M.J.; CHARNEY, D. S.; DEUTCH, A.Y.(eds) *Neurobiological and clinical consequences of stress: from normal adaptation to PTSD*. New York: Lippincott-Raven Publishers, pp. 3-26.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. (1941). A method for determining loss of pain. *J. Pharmacol. Ther.*, 72: 74-9.

- DACHIR, S.; ROBINZON, B.; GRAUER, E.; LEVY, A. (1995). Nimodipine counteracts corticosterone-induced habituation impairments. *Neurobiol. Learning Memory*, 63: 241-5.
- DALMAZ, C.; NETTO, C.A.; OLIVEIRA-NETTO, C.B.; IZQUIERDO, I. (1991). Chronic ethanol treatment effects on the activation of brain β -endorphin system by novelty. *Psychobiology*, 19: 70-74.
- DESS, N.K.; RAIZER, J.; CHAPMAN, C.D.; GARCIA, J. (1988). Stressors in the learned helplessness paradigm: effects on body weight and conditioned taste aversion in rats. *Physiol. Behav.*, 44: 438-490.
- DE WIED, D. (1977a). Peptides and Behavior. *Life Science*, 20: 195-204.
- DE WIED, D. (1977b). Behavioral effects of neuropeptides related to ACTH, MSH, and B-LPH. *Ann. N. Y. Acad. Science*, 297: 263-274.
- DE WIED, D. (1984). Neurohypophyseal hormone influences on learning and memory processes. *IN*: LYNCH, G.; McGAUGH, J.L.; WEINBERGER, N.M. (eds). *Neurobiology of learning and memory*. New York: Guilford, pp. 289-312.
- DISALVER, S.C.; SNIDER, R.M.; ALESSI, N.E. (1986). Stress induced supersensitivity of a cholinergic system in rats. *Biol. Psych.*, 21: 1093-1106.
- DUMAN, R. S. (1995). Regulation of intracellular signal transduction and gene expression by stress. *IN*: FRIEDMAN, M.J.; CHARNEY, D. S.; DEUTCH, A.Y.(eds) *Neurobiological and clinical consequences of stress: from normal adaptation to PTSD*. New York: Lippincott-Raven Publishers , pp. 27-43.
- ELY, D.R.; DAPPER, V.; MARASCA, J.; CORREA, J.B.; GAMARO, G.D.; XAVIER,

- M.H.; MICHALOWSKY, M.B.; CATELLI, D.; ROSAT, R.; FERREIRA, M.B.C.; DALMAZ, C. (1997). Effects of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol. Behav.*, 61(3): 395-8.
- FANSELOW, M. S. (1985). Odors released by stressed rats produce opioid analgesia in unstressed rats. *Behav. Neuros.*, 99: 589-592.
- FENTON, A.A.; AROLFO, M.P.; NERAD, L.; BURES, J. (1994). Place navigation in the Morris water maze under minimum and redundant extra-maze cue conditions. *Behav. Neural Biol.*, 62: 178-89.
- FILKESTEIN, Y.; KOFFLER, B.; RABEY, J.M.; GILAD, G.M. (1985). Dynamics of cholinergic synaptic mechanisms in rat hippocampus after stress. *Brain Res.*, 343: 314-319.
- FLECKENSTEIN, A.E.; LOOKINGLAND, K.J.; MOORE, K.E. (1994). Differential role of histamine in mediating stress-induced changes in central dopaminergic neuronal activity in the rats. *Brain Res.*, 653: 267-272.
- FOY, M.R.; STANTON, M.E.; LEVINE, S.; THOMPSON, R.F. (1987). Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. *Academic Press. Inc.*, 163-1047: 138-149pp.
- FRIEDMAN, M.J.; SOUTHWICK, S.M. (1995). Towards pharmacotherapy for post-traumatic stress disorder. **IN:** FRIEDMAN, M.J.; CHARNEY, D. S.; A..Y.(eds) *Neurobiological and clinical consequences of stress: from normal adaptation to PTSD*. New York Lippincott-Raven Publishers. Pp. 465-481.
- GAMARO, G.D. (1998). Estresse crônico variável: estudo de alguns parâmetros bioquímicos e comportamentais. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com ênfase em Bioquímica, UFRGS.

123pp.

- GAMARO, G.D.; DENARDIN, J.D.; MICHALOWSKI, M.B.; CATELLI, D.; CORREA, J.B.; XAVIER, M.H.; DALMAZ, C. (1997). Epinephrine effects on memory are not dependent on hepatic glucose release. *Neurobiol. of Learning Memory*, 68: 221-9.
- GAMARO, G.D.; MICHALOWSKI, M.B.; CATELLI, D.H.; XAVIER, M.H.; DALMAZ, C. (1998a). Effect of chronic restraint stress on memory in different tasks. submetido a *Braz. J. Med. Biol. Res.*
- GAMARO, G.D.; XAVIER, M.H.; DENARDIN, J.D.; PILGER, J.A.; ELY, D.R.; FERREIRA, M.B.C.; DALMAZ, C. (1998b). The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiol. Behav.*, 63:693-697.
- GÄRTNER, K.; BÜTTNER, K.; DÖHLER, R.; FRIEDEL, R.; LINDEMA, J.; TRAUSTSCHOLD, I. (1980). Stress response of rat to handling and experimental procedures. *Laboratory Animals*, 14: 267-74.
- GIBSON, A.; HART, S.; PATEL, S. (1986). Effects of 6-hydroxydopamine-induced lesions of the paraventricular nucleus and of prazosin on the corticosterone response to restraint in rats. *Neuropharmacology*, 25: 257-260.
- GIL, M; ARMARIO, A. (1998). Chronic immobilization stress appears to increase the role of dopamine in the control of active behaviour in the forced swimming test. *Behav. Brain Res.* 91:91-97.
- GIRAL. P.; MARTIN, P.; SOUBRIE, P.; SIMON, P. (1988). Reversal of helpless behaviour in rats by putative 5-HT_{1A} agonists. *Biol. Psychiatry.*, 23: 237-

242.

- GOGAS, K.R.; PRESLEY, R.W.; LEVINE, J.D. (1991). The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behavior and C-fos expression. *Neuroscience*, 42:617-628.
- GOLD, P.E., (1986). Glucose modulation of memory storage processing. *Behav. Neural Biol.*, 45: 342-249.
- GOLD, P.E., (1991). An integrated memory regulation system: from blood to brain. **IN:** FREDERICKSON, C.A.; McGAUGH, J.L.; FELTEN, D.L. (eds). *Peripheral signaling of the brain*. Toronto: Hogrefe & Huber. pp. 391-419.
- GOLD, P. E.; MCGAUGH, J. L. (1975). A single-trace, two-process view of memory storage processes. **IN:** DEUTSH, D.; DEUTSCH, J. A. (eds). *Short-term memory*. . New York: Academic Press pp. 355-378.
- GOLD, P. E.; McCARTY, R. (1981). Plasma catecholamines: changes after footshock and seizure-producing frontal cortex stimulation. *Behav. Neural Biol.* 31: 247-260.
- GOLD, P.E.; VAN BUSKIRK, R., (1978a). Posttraining brain norepinephrine concentrations: correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. *Behav. Biol*, 23: 509-20.
- GOLD, P.E.; VAN BURSIRK, R.B. (1978b). Effects of α -and- β adrenergic receptors antagonists on post-trial epinephrine modulation of memory: relationship to post-training brain norepinephrine concentrations. *Behav.*

Biol., 24: 168-184.

GOLD, P.E.; McCARTY, R.; STERNBERG, D.B.(1982). Peripheral catecholamines and memory modulation. **IN:** MARSAN, C.A.; MATTHIES, H. (eds). *Neuronal plasticity and memory formation*. New York: Raven Press, pp. 327-338.

GRAEF, F. (1993). Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Rev. Neurosci.*, 4: 181-211.

GRAY, J. A.; GARUD, P. (1977). Adrenopituitary hormones and frustrative reward. **IN:** MILLER, L. H.; SANDMAN, C. A.; KASTIN, A. J. (eds). *Neuropeptide influences on the brain and behavior*. New York: Raven Press pp. 201-212.

GRAY, T. S. (1991). Amygdala: role in automatic and neuroendocrine responses to stress. **IN:** McCUBBIN, J. A. ; KAUFMANN, P. G.; NEMEROFF, C. B. (eds). *Stress, neuropeptides, and systemic disease*. San Diego: Academic Press; pp. 37-53.

HALLMAN, H.; SUNDSTRÖM, E.; JONSSON, G. (1984). Effects of the noradrenaline neurotoxin Dsp on monoamine neurons and their transmitter turnover in rats CNS. *J. Neural Transmission*, 60: 89-102.

HALMI, K. (1995). Basic biological overview of eating disorders, **IN:** BLOOM. F. E.; KUPFER, D.J. (eds). *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press. Pp. 1609-1616.

HALMI, K. A, (1996). The psychology of eating behavior in anorexia nervosa. *Psychiatry Res.*, 62:23-29.

HAUGER, R. L.; MILLAN, M. A.;LORANG, M.; HARWOOD, J.P.; AGUILERA, G. (1988). Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal

- responses during immobilization stress. *Endocrinology*, 123:396-405.
- HAYDEN-HIXSON, D.M.; NEMEROFF, C.B. (1993). Role(s) of neuropeptides in responding and adaptation to stress: a focus on corticotrofin-releasing factor and opioid peptides. **IN:** Stanford, S.C.; Salmon, P. (ed.). *Stress: From synapse to syndrome*. London: Academic Press. pp.356-391.
- HAYES, R.L.; BENNETT, G.L.; NEWLON, P.G.; MAYER, D.J. (1978). Behavior and physiological studies on non-narcotic analgesia in the rat elicited by certain environmental stimuli. *Brain Res.*, 155: 69-90.
- HENRY, J.P. (1993). Biological basis of the stress response. *Int. Union Physiol. Sci./Am. Physiol. Soc.*, 8: 69-73.
- HOLMES, M.C.; FRENCH, K.L.; SECKL, J.L. (1995). Modulation of serotonin and corticosteroid receptor gene expression in the rat hippocampus with circadian rhythm and stress. *Mol. Brain Res.*, 28: 186-192.
- HOEBEL, B.G.(1979). Hypothalamic self-stimulation and stimulation escape in relation to feeding and mating. *Feeding Protocols*, 30: 2454-61.
- IZQUIERDO, I. (1984). Endogenous state-dependency: memory depends on the relation between the neurohumoral and hormonal states present after training and at the time of testing. In: LYNCH, G.; MCGAUGH, J. L.; WEINBERGER, N.M.(eds). *Neurobiology of Learning and Memory*. New York: Guilford. pp. 333-50.
- IZQUIERDO, I., (1989a). Aprendizaje y memoria. **IN:** CINGOLANTI, H.E. & HOUSSAY, A.B. (eds), *Fisiologia Humana de Bernardo A Houssay*, 6 ed. Buenos Aires, El Ateneu, IX: 311-319.
- IZQUIERDO, I., (1989b). Different forms of post-training memory processing.

Behavioral and Neural Biology, 51: 171-202.

- IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D. (1981). Endogenous state-dependency: memory regulation by post-training and pre-testing administration of ACTH, β -endorphin, adrenaline and tyramine. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 16: 55-64.
- IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D (1983a). Effect of ACTH, epinephrine, β -endorphin, naloxone and of the combination of naloxone or β -endorphin with ACTH or epinephrine on memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, 8: 81-7.
- IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D. (1983b). Memory as a state dependent phenomenon: role of ACTH and epinephrine. *Behav. Neural Biol.*, 38: 144-9.
- IZQUIERDO, I. AND MEDINA, J., (1991). GABA- A regulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *TIPS*. 18: 260-265.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H., (1997). Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory*, 68: 285-316.
- IZQUIERDO, I.; NETTO, C.A. (1985a). The role of β -endorphin on memory regulation. *Ann. N. Y. Acad. Science*, 444: 162-167.
- IZQUIERDO, I.; NETTO, C.A. (1985b). Factors that influence test session performance measured 0, 3 or 6 h after inhibitory avoidance training. *Behav. Neural Biol.*, 43: 260-273.
- IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D.; PERRY, M.L.; SOUZA, D.O.; ELIZABETSKY, E.; CARRASCO, M.A.. (1982). A physiological amnesic mechanism mediated by endogenous opioid peptides and its possible role in learning. **IN:** AJMONEMARSAN, C.; MATHIES, H. (eds). *Neural Plasticity and Memory*

Formation. New York: Raven Press. pp.89-111.

IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D.; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L.; CARRASCO, M.A.; VOLKMER, N.; NETTO, C.A. (1984). Effect of various behavioral training and testing procedures on brain: β -endorphin-like immunoreactivity and the possible role of β -endorphin in behavioral regulation.

Psychoneuroendocrinology, 9: 381-389.

JONSSON, G.; HALLMAN, H.; MEFFORD, I.; ADAMS, R. N. (1980). The use of liquid chromatography with eletrochemical detection for the determination of adrenaline and other biogenic monoamines in the CNS. IN: FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.;HOKFELT, B.; HOKFELT, T. (eds). *Central adrenaline neurons*. Oxford: Pergamon. pp. 59-71.

JORDAN, S.; KRAMER, G.L.; ZUCAS, P.E.; PETTY, F. (1994). Previous stress increase *in vivo* biogenic amine response to swin stress. *Neurochem. Res.* 19: 1521-25.

KHASAR, S.G.; GREEN, P.G.; AND LEVINE, J.D. (1994). Comparison of prostaglandin E₁- and prostraglandin E₂- induced hiperalgesia in the rat. *Neuroscience*, 62:345-350.

KENDLER, H.H. & GASSER, W.P., (1948). Variables in spatial learning: I.Number of reinforcements during training. *J. Comparative and Physiological Psychology*, 41: 178-187.

KENNET, G.A. AND JOSEPH, M.H. (1981). The functional importance of increase brain tryptophan in the serotonergic response to restraint stress. *Neuropharmacology*, **20**: 39-43.

- KIM, M., ; McGAUGH, J.L. (1990). Microinfusion of an NMDA antagonist into the amygdala impairs avoidance learning in rats. *Society for Neuroscience Symposia*, 20: 316-18.
- KONARSKA, M.R.; STEWART, E.; McCARTY, R. (1989). Habituation of sympathetic-adrenal medullary responses following exposure to chronic intermittent stress. *Physiol. & Behav.*, 45: 255-261.
- LACHUER, J.; DELTON, I.; BUDA, M.; TAPPAZ, M. (1994). The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Res.*, 638: 196-202.
- LANDFIELD, P. W.; BASKIN, R. K.; PITLER, T. A.. (1981). Brain aging correlates: Retardation by hormonal – pharmacological treatments. *Science*, 214: 581-584.
- LEVINE, J.D.; TAIWO, Y.O.; COLLINS, S.D. AND TAM, J.K. (1986). Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals. *Nature*, 323:158-160.
- LEVINE, J.D.; LAU, W.; KWIAT, G. AND GOLETZ, E. J. (1984). Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leucocytes. *Science*, 225: 743-745.
- LEVINE, S.; SMORTHERMAN, W. P.; HENNESSY, J. W. (1977). Pituitary-adrenal hormones and learned taste aversion. In L. H. MILLER, C. A. SANDMAN, & A. J. Kastin (eds), *Neuropeptide influences on the brain and behavior*. Raven Press. New York: pp. 163-177.
- LEWIS, J W. (1986). Multiple neurochemical and hormonal mechanisms of stress-induced analgesia **IN**: Kelly, D. D. (eds). *Stress-induced analgesia*. New

- York: The New York Academy of Science, p.p. 194-204.
- LEWIS, J.W.; TORDOFF, M.G.; SHERMAN, J.C.; LIEBESKIND, J.C. (1982). Adrenal medullary enkephalin-like peptides may mediate opioide stress analgesia, *Science*, 217, 557-559.
- LEWIS, J. W.; CANNON, J.T. AND LIEBESKIND, J.C. (1980). Opioid and non-opioid mechanism of stress analgesia. *Science*, 208: 523-625.
- LIANG, K.C.; McGAUGH, J.L.; YAO, H.Y. (1990). Involvement of amygdala pathways in the influence of pos-training intra-amygdala norepinephrine and peripheral epinephrine on memory storage. *Brain Res.*, 508: 225-233.
- LIDDLE, G.W. (1981). The Adrenals. *IN*: WILLIAMS, R.H. (eds), *Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: SAUNDERS, W.B. pp.249-292.
- LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FEEDMAN, A.; SHARMA, S.; PEARSON, D.; PLOSTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277: 1659-1662.
- LUINE, V.; MARTINEZ, C.; VILLEGAS, M.; MAGARINOS, A.M.; McEWEN, B.S. (1996). Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiol. Behav.* 59: 27-32.
- LUPIEN, V.; McEWEN, B.S. (1997). The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res. Rev.* 24:1-27.
- MACLENNAN, A.J.; DRUGAN, R.C.; HYSON, R.L.; MAISER, S.F. (1982). Corticosterone: a critical factor in an opioid form of stress-induced analgesia. *Science*, 215: 1530-32.

- MAGARIÑOS, A. N.; VERDUGO J.M.G.; McEWEN B.S. (1997). Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proceedings of the National Academic of Sciences, USA*, 94: 14002-14008.
- MAIER, S.F.; DAVIES, S.; GRAU, J.W.; JACKSON, R.L.; MORRISON, D.H.; MOYE, T.; MADDEN IV, J.; BARCHAS, J.D. (1980). Opioid antagonists and long-term analgesic reaction induced by inescapable shock in rats. *Com. Physiol. Psychol.* 94: 6, 1172-83.
- MANSI, J. A.; DROLET, G. (1997). Chronic stress induces sensitization in sympathoadrenal responses to stress in borderline hypertensive rats. *Am. Physiol. Society*, 363-6119: R813-19.
- MARKENSON, J.A. (1996). Mechanisms of Chronic Pain. *The Am. Jour. of Medicine*, 101: 06-18.
- MARTIGNONI E.; COSTA, A.; SINFORIANI, E.; LIUZZI A.; CHIODONI, P.; MAURI, M.; BONO, G.; NAPPI, G. (1992). The brain as a target for adrenocortical steroids: cognitive implications. *Psychoneuroendocrinology*, vol 17, 4: 343-354.
- McEWEN, B.S. (1982). Glucocorticoids and hippocampus: receptors in search of a function. **IN**: Ganten, D.; Pfaff, D. (eds). *Adrenal Actions on Brain*. New York: Springer-Verlag. pp 1-22.
- McEWEN, B.; SAPOLSKY, R.M. (1995). Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology* 5: 205-16.
- McEWEN, B.S.; GERLACH, J.L.; & MICCO, D.J. (1975). Putative glucocorticoid receptors in hippocampus and other regions of the rat brain. **IN**: R. ISSACSON & K. PRIBRAN (Eds). *The hippocampus: A comprehensive*

- treatise, *Plenum*, New York, pp 1-22.
- McEWEN, B. S.; DE KLOET, E. R.; ROSTENE, W. H. (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. Rev.* 66:1121-1125.
- McGAUGH, J.L., (1983). Hormonal influences on memory. *Annual Review of Psychology*, 27: 297-323.
- McGAUGH, J.L. (1989a). Dissociating memory and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Res. Bull.* 23: 339-345.
- McGAUGH, J.L. (1989b). Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Ann. Rev. Neuroscience*, 12: 255-287.
- McGAUGH, J.L. (1990). Involvement of the amygdala in the influence of neuromodulatory system on memory storage. *IN: SQUIRE, L.R.; MISHKIN, M.; SHIMAMURA A. (eds). Learning and Memory. Discussions in Neuroscience* 6: 56-64.
- McGAUGH, J.L.; INTROINI-COLLISON, I.B.; NAGAHARA, A.H. (1988). Memory-enhancing effects of posttraining naloxone: involvement of β -noradrenergic influences in the amygdaloid complex. *Brain Res.* 446: 37-49.
- MELLER, S.T.; DYKSTRA, C. AND GEBHART, G.F. (1996). Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl-d-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. *Neuroscience*, 71: 327-335.
- MELLO AIRES, M. (1985). *Fisiologia Básica*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 654 pp.
- MENENDEZ, L.; TRELLES, F.A.; HIDALGO, A.; BAAMONDE, A. (1993). Opioid

- footschock-induced analgesia in mice acutely falls by stress prolongation. *Physiol. & Behav.* 53: 1115-9.
- MESSIER, C., DURKIN, T., MRABET, O., DESTRADE, C. (1990). Memory-improving action of glucose: indirect evidence for a facilitation of hippocampal acetylcholine synthesis. *Behav. Brain Res.* 39: 135-143.
- MILLAN, J. M. (1986). Multiple opioid system and pain. *Pain*, 27: 303-347.
- MILLER, A. L.; CHAPTAL, C.; McEWEN, B. S.; PECK, E. J. (1978). Modulation of high affinity GABA uptake into hippocampal synaptosomes by glucocorticoids. *Psychoneuroendocrinology*. 3: 155-164.
- MOGHADDAM, B.; BOLINAO, M.L.; BEHRENS, B.S.; SAPOLSKY, R.M. (1994). Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res.* 655: 251-4.
- MORRIS, R.G.M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motivation*, 12: 239-60.
- MULLER, R.U.; STEAD, M.; PACH, J. (1996). The hippocampus as a cognitive graph. *J. Gen. Physiol.*, 107: 663-94.
- MUNDY, W. R.; BARONE, S.; TILSON, H. A. (1990). Neurotoxic lesions of the nucleus basalis induced by colchicine: effects on spacial navigation in the water maze. *Brain Res.* 512: 221-228.
- NATELSON, B.H.; TAPP, W.N.; ADAMUS, J.E.; MITTLER, J.C; LEVIN, B.E. (1981). Humoral indices of stress in rats. *Physiol. Behav.*, 26: 1049-1054.
- NATELSON, B.N.; CREIGHTON, D.; McCARTY, R.; TAPP, W.N.; OTTENWELLER, J.E. (1987). Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiol. Behav.* 39(1): 117-125.

- NESTLER, E. J.; RAINBOW, T. C.; McEWEN, B. S.; McEWEN, P. (1981). Corticosterone increases the level of protein I, a neuron-specific protein, in rat hippocampus. *Science*, 212: 1162-1164.
- NETTO, C.A.; SIEGFRIED, B.; IZQUIERDO, I. (1987). Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav. Neural Biol.* 48: 304-309.
- NISENBAUM, L.; ZIGMOND, M.; SVED, A.; ABERCROMBIE, E. (1991). Prior exposure to chronic stress results enhance synthesis and release of hippocampal norepinephrine in response to a novel stressor. *J. Neurosci.*, 11: 1478-1484.
- OLTON, D. S.; BECKER, J. T.; HANDELMANN, G. E. (1980). Hippocampal function: working memory or cognitive mapping. *Physiological Psychology*, 8: 239-246.
- OROSCO, M.; NICOLAIDIS, S. (1992). Spontaneous feeding-related monoaminergic changes in the rostromedial hypothalamus revealed by microdialysis. *Physiol. & Behav.*, 52: 1015-1019.
- PARIS, J. M.; LORENS, S. A.; VAN DER KAR, L. D.; URBAN, J.H.; RICHARDSON-MORTON, K.D.; BETHER, C.L. (1986). A comparison of acute stress paradigms: hormonal responses and hypothalamic serotonin. *Physiol. & Behav.* 39: 33-34.
- PIERETTI, S.; CAPASSO, A.; DI GIANNUARIO, A.; LOIZZO, A. AND SORRENTINO, L. (1991). The interaction of peripherally and centrally administered dexamethasone and RU 38486 on morphine analgesia in mice. *Gen. Pharmacol.*, 22: 929-933.

- PIERETTI, S.; DI GIANNUARIO, A. A.; DOMENICI, M.R.; SAGRATELLA, S.; CAPASSO, A.; SORRENTINO, L.; LOIZZO, A. (1994). Dexamethasone-induced selective inhibition of the central μ opioid receptor: functional *in vivo* and *in vitro* evidence in rodents. *Br. J. Pharmacology*, 113: 1416-1422.
- PLOTSKY, P. M.; CUNNINGHAM, E.T.; WIDMAIER, E. P. (1989). Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocrine Rev.* 10: 437-458.
- RAGOZZINO, M.E.; UNICK, K.E.; GOLD, P.E. (1996). Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 93: 4693-98.
- REISINE, T.; AFFOLTER, H. U.; ROUGAN, G.; BARBET, J. (1986). New insights into the molecular mechanisms of stress. *TINS* (nov-dec): 574-579.
- RODGERS, R.J.; HENDRIE, C.A. (1983). Social conflict activates status-dependent endogenous analgesic or hyperalgesic mechanisms in male mice: effects of Naloxone on nociception and behaviour. *Physiol. Behav.* 30: 775-780.
- ROMERO, L. M.; LEVINE, S.; SAPOLSKY, R.M. (1995). Adrenocorticotropin secretagog release: stimulation by frustration and paradoxically by reward presentation. *Brain Res.* 676: 151-156.
- ROOZENDAAL, B.; MCGAUCH, J. L. (1996). Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol. Learn. Memory.* 65: 1-8.
- ROOZENDAAL, B.; SCHOORLEMMER, G.H.M.; KOOLHAAS, J.M.; BOHUS, B.

- (1993). Cardiac, neuroendocrine, and behavioral effects of central amygdaloid vasopressinergic and oxytocinergic mechanisms under stress-free conditions in rats. *Brain Res. Bull.* 32: pp.573-579.
- SAPOLSKY, R.M. (1992). The stress-response and the emergence of stress-related disease **IN**: Bradford book (ed), *Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death*, London: 3-9.
- SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C.; McEWEN, B.S. (1984). Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. USA: *Proceedings of the National Academic of Sciences.* 81: 6174-6177.
- SAPOLSKY, R.; KREY, L.; McEWEN, B.S. (1986). Neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr. Rev.*, 7: 284-301.
- SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. (1982). The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res. Rev.*, 4: 275-325.
- SIEGEL, J. G. (1993). Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. **IN**: AGRANOFF, B.W.; ALBERS R.W.; MOLINOFF. P.B. (eds). *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. pp. 899-918.
- SIEGFRIED, B.; NETTO, C.A.; IZQUIERDO, I. (1987). Exposure to novelty induces naltrexone-reversible analgesia in rats. *Behav. Neuroscience.* 101: 436-438.
- SOUTHWICK, S.M., YEHUDA, R., MORGAN III, C. A.. (1995). Clinical studies of neurotransmitter alterations in post-traumatic stress disorder. **IN**: FRIEDMAN, M.J.; CHARNEY, D. S.; A..Y.(eds). *Neurobiological and clinical consequences of stress: from normal adaptation to PTSD*. New York:

- Lippincott-Raven Publishers. pp. 335-349.
- SPENCER, R.; McEWEN, B.S. (1990). Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic ethanol stress. *Neuroendocrinology*, 51: 481-489.
- STONE, W.S.; WALSER, B.; GOLD, S.D.; GOLD, P.E. (1991). Scopolamine and morphine-induced impairments of spontaneous alternation performance in mice: reversal with glucose and with cholinergic and adrenergic agonists. *Behav. Neurosciences*, 105: 264-271.
- STONE, W.S.; RUDD, R.J.; GOLD, P.E. (1995) Glucose attenuation of atropine-induced deficits in paradoxical sleep on memory. *Brain Res.*, 694(1-2): 133-138.
- SUTANTO, W.; DE KLOET E.R. (1993). The role of GABA in the regulation of the stress response *IN*: STANFORD, S.C.; SALMON, P. (eds). *Stress from synapses to syndrome*. London: Academic Press. pp. 333-348.
- SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E.; RIVIER, J.; VALE, W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. 36: 165-186
- TAIWO, Y. O. AND LEVINE, J.D. (1991). Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience*, 48: 485-490.
- TAIWO, Y. O. AND LEVINE, J.D. (1989). Contribution of guanine nucleotide regulatory proteins to prostaglandin hyperalgesia in the rat. *Brain Res.*, 492: 397-399.
- TEMPEL, D. L.; MCEWEN, B.S. AND LEIBOWITZ, S.F. (1992). Effects of adrenal steroids agonists on food intake and macronutrient selection. *Physiol.*

Behav., 52: 1161-1166.

TIMO-IARIA, C. (1985). Comportamentos. **IN:** Mello Aires, M.(eds). *Fisiologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. pp.163-300.

TIZABI,Y.; AGUILERA, G. (1992). Desensitization of hypothalamic-pituitary-adrenal axis following prolonged administration of corticotropin-releasing hormone or vasopressin. *Neuroendocrinology*, 56: 611-8.

THOMPSON, S.W.N.; KING, A.E.; WOOLF, C.J. (1990). Activity-dependent changes in rat ventral horn neurons in vitro: summation of prolonged afferent evoked postsynaptic depolarization produce a D-2-amino-5-phosphonovaleric acid sensitive windup. *Eur. J. Neurosci.*, 2:638-649.

TSUDA, A.; IDA, Y.; SATOH, H.; TSUJIMARU, S.; TANAKA, M. (1989). Stressor predictability and rat brain noradrenaline metabolism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32: 569-572.

TUSEK, S. (1983). Acetylcoenzyme A and the synthesis of acetylcholine in neurones: Review of recent progress. *Gen. Physiol. Biophysics*. 2: 313-324.

TYRREL, J.B.; FORSHAM, P.H. (1983). Glucocorticoids and adrenal androgens. **IN:** GREENSPAN, F.S.; FORSHAM, P.H. (eds). *Basic and clinical Endocrinology*. Los Altos: Lange Medical Publications, pp. 258-294.

URSIN, H.; OLFF, M. (1993). The stress response **IN:** STANFORD, S.C.; SALMON, P. (eds). *Stress from synapses to syndrome*. London: Academic Press. pp. 3-22.

VALE, W.; SPIESS, J.; RIVIER, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotropin and β -

- endorphin. *Science*, 231: 1394-1397.
- VAN DE KAR; L.D. KARTESZI, M.; BETHEA, C.L.(1982). Pharmacological evidence that serotonergic stimulation of prolactin secretion is mediated via the dorsal raphe nucleus. *Neuroendocrinology*, 35: 225-230.
- VAN LOON, G.R.; SHUM, A.; SOLE, M.J. (1981). Decreased brain serotonin turnover after short term (two hour) adrenalectomy in rats: a comparison of four turnover methods. *Endocrinology*, 108: 1392-1402.
- VAN WINMERSMA GRIEDANUS (1970). Effects of steroids on extinction of naive active avoidance response in rats. *Prog. Brain Res.* 32: 185-191.
- XAVIER, G.F. (1989). Memória espacial no rato. *IN: Etologia de animais e de homens*. SP. pp.61-74.
- XAVIER, G.F.(1985). Atividade exploratória em ratos com lesões no hipocampo dorsal e com secção do fórnix. Implicações para as teorias sobre a função hipocampal. Tese de Doutorado apresentada à escola Paulista de medicina.
- XAVIER, M.H. (1995). Estresse crônico e sistema benzodiazepínico: estudo de parâmetros bioquímicos e comportamentais. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com ênfase em Bioquímica. UFRGS. 96pp.
- WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. (1998a). Fármacos utilizados em dor crônica. *IN: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.. (Eds). Farmacologia Clínica. Fundamentos de terapêutica racional. 2ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, pp. 178-185.*
- WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. (1998b). Antiinflamatórios não esteróides. *IN: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. Farmacologia Clínica.*

- Fundamentos de terapêutica racional. 2^a ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, pp. 188-193.
- WEISS, J.M.; McEWEN, B.S.; SILVA, M.; KALKUT, M. (1970). Pituitary-adrenal alterations and fear responding. *Am. J. Physiol.*, 218: 864-868.
- WOOLFOLK, D.R. AND HOLTZMAN, S.G. (1993). Restraint stress potentiates analgesia induced by 5'- N – ethylcarboxamidoadenosine: Comparison with morphine. *Eur. J.of Pharmacology*, 239: 177-182.
- YATES, A.. (1992). Biologic condideration in the etiology of eating disorders. *Pediatric Annals*, 21: 739-744.
- YOUNG, E.A.; HASKETT, R.F.; MURPHY-WEINBERG, V.; WATSON, S.J.; AKIL, H. (1991). Loss of glicocorticoid fast feedback in depression. *Arch. Gen. Psychiatry*, 48: 693-699.
- ZERBIT, R.; LABORIT, F. (1990).Chronic stress and memory implication of the central cholinergic system. *Pharmacol., Biochem. Behav.* 36: 897-900.