

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

ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL:
ESTUDO DE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS

GIOVANA DUZZO GAMARO

Orientadora
Profa. 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 do grau de Mestre em Ciências Biológicas-Bioquímica

Porto Alegre
1998

As pessoas sem imaginação podem ter tido as mais imprevistas aventuras, podem ter visitado as terras mais estranhas. Nada lhes ficou. Nada lhes sobrou. Uma vida não basta apenas ser vivida: também precisa ser sonhada.

Mário Quintana

Alguns homens olham as coisas que existem e perguntam: por quê?
Eu sonho com as que nunca existiram e pergunto: por que não?

Bernard Shaw

Dedico esta dissertação a todos os pesquisadores
que se empenham no estudo do Estresse,
com vistas a contribuir para o bem da Humanidade.

AGRADECIMENTOS

À Carla Dalmaz, por ter persistido em minha orientação, colocando à minha disposição toda sua capacidade, competência e seu esforço.

À Bia, por ter sempre me feito acreditar que eu podia.

À Luciana, meu braço direito (talvez, os dois!!!!), pela amizade, pela dedicação, colaboração e empenho que teve em me auxiliar em todos experimentos.

Ao Pepê, ao meu pai e a minha mãe, pela disposição de ajudar sempre e me aturar nos momentos de estresse.

À Izabel e a nossa Vitória, pela amizade, pela paciência e valiosa ajuda.

Ao Carlos, pela grande ajuda e boa vontade com os problemas de computação.

À Márcia Xavier, pela grande amizade.

A todos os amigos do Centro de Memória, principalmente Lia, Patrícia, Rafael, João, Mônica, e especialmente ao Professor Izquierdo, pelo carinho, amizade e estímulo.

Ao Grupo do Estresse, particularmente Iraci e Mariana, pela colaboração, incentivo e amizade.

Ao Professor Adriano, por sua paciência em dispor de seu tempo para auxiliar nas contagens de corticosterona.

Ao Professor Alex, pelo empréstimo do computador.

Aos amigos da Biologia Celular do Instituto de Investigaciones Biologicas Clemente Estable, de Montevideu, pelo acolhimento em seus laboratórios durante minha estada em seu país, em especial ao Professor Rodolfo Silveira e à Cecília.

À Élida, pelo grande apoio em terras uruguaias.

Aos Laboratórios 24 e 34, pela solidariedade em compartilhar seus equipamentos.

À Nice, por sua disposição em ajudar sempre.

À Professora Magdolna, pela compreensão.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e do Curso de Pós-Graduação.

Ao CNPq, FINEP, FAPERGS e PROPESQ, pelo auxílio financeiro à pesquisa.

SUMÁRIO

Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	ix
Abreviaturas	x
Resumo	xi
INTRODUÇÃO.....	1
Estresse, Catecolaminas e Glicocorticóides.....	8
Estresse e Memória.....	13
Estresse e Nocicepção.....	16
Estresse e Desordens Afetivas.....	17
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
Animais Experimentais.....	23
Estresse Crônico Variável.....	23
Agentes Estressores.....	24
Estresse Agudo.....	26
Tarefas Comportamentais.....	29
Esquiva Inibitória.....	29
Esquiva Ativa de Duas Vias.....	31
Ingestão de Alimento Doce.....	33
Exposição ao Campo Aberto.....	34
Medida de Resposta Nociceptiva.....	37
Medidas Bioquímicas.....	39

Glicemia.....	39
Dosagem de Corticosterona no Plasma.....	40
Dosagem de Catecolaminas Cerebrais.....	41
Análise Estatística.....	42
RESULTADOS.....	44
Estabelecimento do Modelo de Estresse Crônico Variável.....	44
Peso Corporal.....	44
Consumo de Ração e Água ao Longo do Tratamento....	46
Peso das Adrenais.....	46
Efeito do Estresse Crônico Variável em Diferentes	
Tarefas comportamentais.....	50
Esquiva Inibitória.....	50
Esquiva Ativa de Duas Vias.....	52
Ingestão de Alimento Doce.....	54
Medida de Resposta Nociceptiva (<i>Tail Flick</i>).....	58
Exposição ao Campo Aberto.....	61
Medidas Bioquímicas.....	63
Medida da Glicemia.....	63
Medida da Corticosterona Plasmática.....	70
Catecolaminas.....	78
DISCUSSÃO.....	82
Estabelecimento do Modelo de Estresse Crônico	
Variável.....	84
Peso Corporal.....	84
Consumo de Ração e Água	85
Peso das Adrenais.....	87

Efeito do Estresse Crônico Variável sobre o Desempenho dos Animais em Diferentes Tarefas Comportamentais.	88
Esquiva Inibitória.....	88
Esquiva Ativa de Duas Vias.....	89
Teste da Ingestão de Alimento Doce.....	90
Medida de Resposta Nociceptiva (<i>Tail Flick</i>).....	94
Exposição ao Campo Aberto.....	96
Medidas Bioquímicas.....	97
Medida dos Níveis Plasmáticos de Glicose (Glicemia) e Medidas dos Níveis Plasmáticos de Corticosterona	97
Medidas das Catecolaminas.....	103
CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático dos agentes estressores aplicados nos animais submetidos aos tratamentos de estresse	27
Figura 2. Desenho esquemático da caixa de Esquiva Inibitória	30
Figura 3. Desenho esquemático da caixa de Esquiva Ativa de Duas Vias	32
Figura 4. Desenho esquemático da caixa onde realizou-se a tarefa de Comportamento Alimentar	35
Figura 5. Desenho esquemático da caixa de Campo Aberto (<i>Open Field</i>).....	36
Figura 6. Aparelho de (<i>Tail -Flick</i>).....	38
Figura 7. Comparação entre o peso corporal dos três grupos de animais no início e ao término do tratamento	45
Figura 8. Consumo de ração ao longo do tratamento	47
Figura 9. Consumo de água ao longo do tratamento	48
Figura 10. Peso das glândulas adrenais ao término do tratamento	49
Figura 11. Efeito do estresse crônico variável sobre o desempenho na tarefa de Esquiva Inibitória	51
Figura 12. Efeito do estresse crônico variável sobre o desempenho na tarefa de Esquiva Ativa de Duas Vias	53
Figura 13. Efeito do estresse crônico variável sobre o comportamento alimentar logo após o término do tratamento	55
Figura 14. Efeito do estresse crônico variável sobre o comportamento alimentar uma semana após o término do tratamento	56
Figura 15. Efeito do estresse crônico variável sobre o comportamento alimentar duas semanas após o término do tratamento	57
Figura 16. Efeito do estresse crônico variável sobre a resposta nociceptiva logo após o término do tratamento.....	59
Figura 17. Efeito do estresse crônico variável sobre a resposta nociceptiva duas semanas após o término do tratamento	60

Figura 18. Efeito do estresse crônico variável sobre a glicemia dos animais 24h após a última sessão de estresse	65
Figura 19. Efeito do estresse crônico variável sobre a glicemia dos animais imediatamente após o último estresse (natação ou imobilização)	66
Figura 20. Efeito do estresse agudo sobre a glicemia imediatamente e 24h após exposição ao estresse de imobilização por 1h	68
Figura 21. Efeito do estresse agudo sobre a glicemia imediatamente e 24h após exposição ao estresse por natação	69
Figura 22. Efeito do estresse crônico variável sobre os níveis plasmáticos de corticosterona 24h após exposição à última sessão de estresse	71
Figura 23. Efeito do estresse crônico variável sobre os níveis plasmáticos de corticosterona imediatamente após a última exposição ao estresse (natação por 10 min)	72
Figura 24. Efeito do estresse crônico variável sobre os níveis plasmáticos de corticosterona imediatamente após a última exposição ao estresse (imobilização por 1h)	73
Figura 25. Efeito do estresse agudo sobre os níveis plasmáticos de corticosterona imediatamente após exposição ao estresse por natação durante 10 min	75
Figura 26. Efeito do estresse agudo sobre os níveis plasmáticos de corticosterona imediatamente após exposição ao estresse por imobilização durante 1 h	76
Figura 27. Efeito do estresse crônico variável sobre os níveis de noradrenalina cerebral.....	80
Figura 28. Efeito do estresse crônico variável sobre os níveis de dopamina cerebral.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Protocolo padrão para aplicação dos agentes estressores 28

Tabela II. Efeito do estresse crônico variável sobre o desempenho na tarefa de Campo Aberto, considerando os seguintes parâmetros: A) respostas de orientação (*rearings*) , B) cruzamentos, C) número de bolos fecais e D) latência para deixar o primeiro quadrado..... 62

ABREVIATURAS

ACTH:	Hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina
ANOVA:	Análise de variância
β-adrenoceptores:	Receptores tipo β-adrenérgicos
CRH:	Hormônio liberador da corticotrofina ou ACTH
°C:	graus Célsius
cm:	centímetros
dB:	decibéis
DNA:	Ácido deoxirribonucleico
EP:	erro padrão da média
g:	gramas
Hz:	Hertz
h:	hora
H ₂ O:	água
mA:	miliampére
ml:	mililitros
min:	minutos
NMDA:	N-metil-D-aspartato
nm:	nanômetro
ng:	nanograma
nA:	nanoampére
NaOH:	Hidróxido de sódio
PVN:	núcleo hipotalâmico paraventricular
POMC:	pro-ópio-melanocortina
PCA:	ácido perclórico
pH:	potencial hidrogeniônico da solução
RNA:	Ácido ribonucleico
rpm:	rotações por minuto
s:	segundos
SOS:	Octil sulfato de sódio
THF:	Tetra-hidrofurano
TFL:	latência de retirada da cauda ou <i>tail-flick latency</i>
μl:	microlitro
μm:	micrômetro
V:	volts
W:	watts
5HT ₂ :	receptor tipo 2 para serotonina
5HT _{1A} :	receptor tipo 1A para serotonina

RESUMO

O estresse causa alterações na homeostasia do organismo, acarretando a liberação de hormônios e neurotransmissores que visam preparar o organismo para responder à ação do estímulo estressante.

Modelos de estresse em animais são bastante estudados. Alguns, por apresentarem como característica principal a previsibilidade, podem gerar respostas mais atenuadas ao agente estressor. Por esta razão, desenvolvemos em nosso laboratório um modelo de Estresse Crônico Variável, que apresenta como característica principal a imprevisibilidade.

Ratos Wistar machos foram submetidos a 40 dias de Estresse Crônico Variável, causado por 7 agentes estressores diferentes, de duração variável e apresentados em diferentes períodos do dia. Estes animais, ao final do tratamento, apresentaram diminuição em seu peso corporal em comparação com os dos grupos controle e manipulado, porém não houve diferença no consumo de ração e água entre os grupos. O peso das glândulas adrenais nos animais estressados foi maior, o que caracteriza uma maior atividade desta glândula.

Como os hormônios liberados em resposta ao estresse são hiperglicemiantes, foram analisados os níveis glicêmicos e os níveis de corticosterona nos modelos de estresse agudo e crônico. No caso do estresse agudo, 24 h após uma sessão de natação ou imobilização, não houve diferença nos níveis glicêmicos dos animais estressados. Na medida realizada imediatamente após uma sessão de imobilização, os animais estressados apresentaram maiores níveis glicêmicos do que os controles. Porém quando esta medida foi realizada após uma sessão de natação, não houve diferença significativa entre os grupos. Os níveis de corticosterona imediatamente após o estresse de natação e imobilização foram maiores nos animais estressados em comparação com os controles.

No tratamento crônico, não se observaram alterações nos níveis de corticosterona e glicose plasmáticos medidos 24h após a última sessão de estresse. Nas medidas realizadas imediatamente após natação e imobilização, os animais estressados não apresentaram diferença nos níveis glicêmicos em comparação com os demais grupos. Os níveis de corticosterona apresentaram aumento na medida realizada após o estresse, mas somente em comparação com o grupo manipulado, sendo que somente após a imobilização este resultado foi significativo. Importante ressaltar que os manipulados apresentaram menores níveis de corticosterona em comparação com os controles, sugerindo que a manipulação seja um estresse leve que acarreta uma possível adaptação ao estresse diário.

Sabe-se que a liberação contínua de hormônios do estresse, como glicocorticóides e adrenalina, pode causar danos em regiões cerebrais como o hipocampo, estrutura relacionada com processos de memória. Os animais foram submetidos assim a tarefas comportamentais como Esquiva Inibitória e Esquiva Ativa de Duas Vias, tarefas clássicas para testar memória. Os animais do grupo estressado apresentaram desempenho adequado para as tarefas. No Campo Aberto, os animais estressados apresentaram comportamento semelhante ao dos demais grupos, não apresentando alterações na atividade locomotora e nos comportamentos de exploração.

Os níveis de dopamina e noradrenalina foram medidos em quatro regiões do cérebro, córtex, hipocampo, hipotálamo e amígdala, sendo que somente os níveis de dopamina apresentaram-se aumentados no córtex frontal. Nas outras estruturas, não houve alterações.

Sabe-se que os estímulos estressantes podem modular a resposta nociceptiva. Os animais submetidos ao estresse e à manipulação apresentaram uma diminuição no limiar da dor, caracterizando hiperalgesia, que persistiu duas semanas após o término do tratamento no grupo estressado.

Alterações no comportamento alimentar são relatadas como consequência do estresse, e, particularmente em um modelo semelhante a este, existem relatos demonstrando uma diminuição no consumo de soluções adocicadas. Os nossos resultados concordam com os dados da literatura. Os animais estressados apresentaram uma diminuição no consumo de alimento doce, no estado alimentado. Já no jejum este grupo é apenas diferente do grupo manipulado, que ingere maior quantidade de alimento doce. Após o término do tratamento, os animais estressados consomem alimento doce da mesma forma que os demais grupos.

Estes resultados sugerem que este modelo de estresse representa efetivamente estresse crônico para os animais, visto que ocorre um aumento no peso das adrenais. Por outro lado, ocorre uma certa adaptação, pois a liberação de corticosterona e glicose nos animais crônicos apresenta um padrão diferente em relação ao estresse agudo. Nas tarefas comportamentais estudadas, não houve diferença entre os grupos. Em relação aos níveis de dopamina esses encontram-se aumentados somente no córtex frontal. Não houve alteração nos níveis de noradrenalina nas mesmas estruturas estudadas. Os animais estressados apresentam hiperalgesia que persiste duas semanas após o término do tratamento. Sob efeito do tratamento os animais estressados cronicamente ingerem menor quantidade alimento doce.

INTRODUÇÃO

O ser humano é uma totalidade integrada. O cérebro é o órgão de síntese e integração da relação do ser humano com o ambiente. Sua Biosfera inclui não apenas o ambiente físico e natural, mas também a sociedade, a família. Não existe ser humano fora desse ambiente, como não há peixe fora da água. Tudo o que altera e polui sua relação com as outras pessoas se reflete em seu organismo. O estresse causa alterações no organismo em resposta a diversas situações.

Como primatas, seres humanos vivem em sociedade, devendo cada indivíduo identificar o seu papel dentro dela e, em contrapartida, identificar o papel dessa sociedade em relação a si mesmo e às circunstâncias de estresse, encontrando atitudes para lidar com alterações da normalidade provocadas pelo estresse social e seus agentes estressores que atuam sobre a população, como por exemplo o caos do trânsito, problemas econômicos, assaltos, violência, poluição, e outros agentes, enfim, resultados de viver em sociedade moderna.

Entende-se por estresse alterações físicas ou psicológicas capazes de promover mudanças na homeostasia do organismo. A resposta ao estresse é parte integral de um sistema biológico adaptativo. Respostas comportamentais ou fisiológicas são requeridas no dia-a-dia, permitindo que os

seres humanos e outros animais sobrevivam, dentro de limites dinâmicos aos freqüentes desafios do ambiente (Charvat et al., 1964).

O estresse foi primeiro definido por Seyle em 1936. Ele descreveu o estresse como uma síndrome produzida por agentes nocivos diversos, sendo uma resposta não específica para um agente não específico. Seyle considerou que o primeiro estágio do estresse seria uma reação geral de alarme denominada "síndrome da adaptação geral". Esta definição foi de grande importância para estudos posteriores em relação ao estresse, pois serviu de substrato para outras indagações em relação ao tema.

Em mamíferos, a resposta ao estresse envolve vários processos, seguindo o conceito de Seyle da "Síndrome da Adaptação Geral" (Seyle, 1936). O principal componente neuroendócrino desta resposta é mediado pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Cullinan et al, 1995). O estresse é um complexo processo com *feedback* e mecanismos de controle, não menos e nem mais complicados do que qualquer outro dos sistemas do organismo (sistemas auto-controladores). Esses mecanismos afetam muitos processos orgânicos, podendo funcionar em situações de alarme sempre que exista um real ou aparente desafio à homeostasia do organismo (Ursin e Olff, 1993).

O conceito de estresse é composto, multidimensional, constituído de três principais elementos que podemos identificar como: a) estímulo estressante; b) sistema de processamento do estímulo, incluindo experiências de estresse subjetivas, e c) resposta ao estresse. Não podemos

encarar estes três elementos como estáticos, pois eles interagem entre si, ficando difícil separá-los. A experiência e as características dos *inputs* sensoriais originadas das respostas ao estresse poderiam ser incluídas como mais um elemento em sua conceituação (Ursin e Olf, 1993).

O cérebro como órgão integrador funciona autonomicamente ligando os estímulos às respostas. Responderá a um estímulo específico, dependendo das informações sobre este estímulo particular. Em outras palavras, a resposta depende de uma prévia experiência ou aprendizado.

A resposta normalmente ativada por um agente estressor consiste de várias fases. A fase inicial, imediata, segue-se à exposição ao agente estressor. Ela parece similar à resposta de alarme descrita por Seyle, exceto que não é uma toxicidade histamínica, conforme proposto inicialmente por esse autor e não atinge a intensidade por ele descrita. Esta fase consiste em muitas respostas que afetam quase todos sistemas regulatórios e órgãos. Todos os sistemas endócrinos e os sistemas autônomo e imunológico têm sido relatados como sensíveis a mudanças ambientais através destes mecanismos, além de também demonstrarem-se alterações bioquímicas no cérebro (Modigh, 1974; Anisman, 1978). As mudanças produzidas por estes subsistemas fazem parte de uma resposta total de ativação. As fases subseqüentes da resposta ao estresse são caracterizadas pela liberação mais lenta de hormônios do estresse, como por exemplo os glicocorticóides, e também podem levar à hipertrofia de algumas glândulas, como a adrenal.

Em recente revisão da literatura relacionada ao estresse, Levine e Ursin (1991) relatam a importância da carga emocional relacionada ao estímulo estressante. O aspecto emocional é de muita importância e varia com aspectos particulares de cada indivíduo. Desta forma podemos visualizar a interrelação do sistema límbico com os sistemas de resposta ao estresse.

Várias vias de entrada (*inputs*) relacionadas com o estresse convergem para os neurônios do núcleo hipotalâmico paraventricular (PVN). Estes neurônios, que sintetizam, entre outros, hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina, projetam-se para a eminência média, onde seus produtos são liberados na circulação porta, agindo na hipófise anterior e resultando na síntese e liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e outros peptídeos derivados de um precursor comum, a pro-ópio-melanocortina (POMC). O ACTH, por sua vez, ativa a biossíntese e liberação de glicocorticóides do córtex da adrenal (corticosterona nos roedores e cortisol nos primatas). Estes esteróides possuem uma atuação extremamente ampla, mediada por receptores especializados que afetam a expressão e regulação de genes através do organismo, resultando em mudanças em vários processos metabólicos. Entre os eventos observados em resposta aos glicocorticóides, incluem-se, por exemplo, alterações nas respostas imunes e processos inflamatórios, além da resposta ao estresse. Muitos destes processos são requeridos para uma adaptação e preparação do organismo para lidar com a situação estressante, incluindo mudanças na forma

de obtenção de energia e no metabolismo (Cullinan et al, 1995; Akil e Morano, 1995).

Devido a sua potência e largo campo de ação, os glicocorticóides devem ser mantidos em níveis apropriados. O excesso ou a falta destes hormônios pode causar efeitos deletérios ao organismo. Sua regulação é realizada através de complexas alças de *feedback* operando nos níveis de hipófise e cérebro. A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal representa a manifestação primária do estresse, mas deve-se levar em conta que aspectos adicionais da resposta do cérebro ao estresse, e suas interações potenciais, devem ser considerados para um completo entendimento dos efeitos do estresse.

Sabe-se que, em situações de estresse, uma rede complexa de hormônios é ativada para desempenhar diversas funções. Neurônios no hipotálamo são estimulados e estes vão aumentar a liberação de CRH, que conseqüentemente irá promover na hipófise a liberação de ACTH, que, por sua vez, irá ativar o córtex da glândula adrenal para liberar hormônios, os glicocorticóides (Horner et al, 1990; Berne & Levy, 1992; Tizabi & Aguilera, 1992). O aumento no plasma dos níveis de catecolaminas e cortisol (um dos glicocorticóides) em conjunto aumentará a produção de glicose (Berne & Levy, 1992). A adrenalina liberada ativará as vias da glicogenólise, enquanto que o cortisol exercerá sua ação para suprir os substratos de aminoácidos para a gliconeogênese. Ambos os processos têm como finalidade a defesa imediata do

organismo e irão desviar os “gastos” de energia periféricos para um melhor desempenho (Berne & Levy, 1992). Sendo assim, ocorre um aumento da pressão arterial, broncodilatação e vasoconstrição periférica. Atividades como as dos tratores gastrointestinal e urinário são diminuídas (Berne & Levy, 1992). Podemos perceber a importância destes hormônios diante de uma situação estressante. Em resposta a um estresse agudo os glicocorticóides são liberados a fim de adaptar o organismo à situação estressante. Porém uma liberação diária e contínua destes hormônios poderia levar a situações patológicas (Sapolsky, 1986).

Um modelo geralmente usado para o estudo da integração dos vários componentes do estresse é o tratamento crônico. O estresse agudo, por um lado, apresenta uma resposta fisiológica relativamente bem caracterizada. Sabe-se que o estresse crônico induz alterações comportamentais, neuroquímicas e endócrinas diferentes daquelas causadas pelo estresse agudo (Martí et al, 1993). O modelo de estresse crônico oferece a oportunidade de examinar a plasticidade do sistema, revelando diferentes possibilidades de adaptações (Akil e Morano, 1995).

Os efeitos do estresse crônico diferem em relação à natureza do agente estressor, duração do regime de estresse, idade e espécie de animal. Outras características fisiológicas dos estressores como controlabilidade e previsibilidade são importantes (Marti et al., 1993). Existem relatos em relação à regularidade da exposição ao estresse crônico mostrando

sua importância na determinação de variáveis fisiológicas como níveis plasmáticos de corticosterona, glicose e ácidos graxos livres (Martí et al., 1993). Sapolsky e colaboradores propõem que as alterações causadas pelo estresse crônico são comparáveis às alterações causadas pelo envelhecimento (Sapolsky et al., 1985).

Em nosso laboratório, desenvolvemos um modelo de estresse crônico por imobilização em ratos. Neste modelo, os animais são estressados cinco vezes por semana, sempre por imobilização, durante 1h a cada dia. Alguns efeitos sobre a memória foram observados (Xavier, 1995), sendo tarefa-específicos (amnésia na tarefa de exposição ao campo aberto, enquanto não se observou efeito nas tarefas de esquiva ativa de duas vias e inibitória).

Um determinante crítico para respostas fisiológicas e comportamentais dos animais cronicamente estressados é a previsibilidade do agente estressor, o que, de certa forma, ocorre no modelo descrito acima. Vários autores sugerem que as respostas fisiológicas ao estresse possam ser “amortecidas” se o animal tem informação prévia relativa ao começo, duração ou término de cada sessão de estresse (Konarska et al., 1990). Por esta razão, desenvolvemos em nosso laboratório um modelo que tem como característica principal a imprevisibilidade, o modelo de estresse crônico variável. Este modelo foi idealizado com base em trabalhos já descritos na literatura, porém com algumas modificações (Willner et al., 1987; Konarska et al., 1990;

Echandía et al., 1988; Muscat et al., 1992; Jordan et al., 1994; Willner and Muscat, 1991; Papp et al., 1991; Murua e Molina, 1992).

Conforme visto acima, a resposta ao estresse é parte integral de um sistema biológico adaptativo. Respostas comportamentais ou fisiológicas são necessárias para que seres humanos e outros animais enfrentem e sobrevivam, dentro de limites dinâmicos, os freqüentes desafios do ambiente (Charvat et al., 1964). Assim sendo, alterações neuroendócrinas e comportamentais são observadas em resposta ao estresse. Nesta dissertação, estudamos os efeitos do estresse tanto no campo neuroendócrino quanto comportamental.

Estresse, Catecolaminas e Glicocorticóides

A liberação de hormônios glicocorticóides (pelo córtex da glândula supra-renal) e adrenalina (pela medula da mesma glândula, em resposta à ativação do sistema nervoso simpático) é uma consequência clássica da resposta do organismo ao estresse. Tanto os glicocorticóides quanto a adrenalina são hormônios hiperglicemiantes, provocando a liberação de glicose a partir das reservas de glicose (glicogênio hepático) (Marks et al., 1996) para a circulação. A adrenalina tem o mesmo efeito do hormônio glucagônio (Marks et al., 1996), sinalizando a necessidade de energia, o que propicia uma estimulação na liberação da glicose armazenada na forma de glicogênio, e, o

mais importante, encaminhado-a para o cérebro, entre outros tecidos periféricos, mecanismo que já foi proposto como o responsável pelo efeito da adrenalina sobre a memória (Gold,1986; Gold e Hall, 1986; McEwen e Sapolsky, 1995).

Os níveis glicêmicos são considerados por alguns autores como sendo um parâmetro marcador da intensidade do estímulo estressor e também um índice de habituação ao estresse quando o animal é exposto repetidamente a um mesmo tipo de estressor (Armário et al., 1990). Os níveis glicêmicos funcionam também como uma medida indireta dos hormônios liberados nessa situação, através da avaliação de seus efeitos hiperglicemiantes.

Durante uma situação de estresse ocorre um aumento dos níveis de glicocorticóides, também encontrado em processos de envelhecimento, e tem sido sugerido que estes níveis aumentados acarretariam a aceleração da degeneração em neurônios hipocampais (Dachir et al., 1993; Sapolsky et al., 1985; Dachir et al., 1995). A influência do estresse e do sistema endócrino nos processos de envelhecimento parece ocorrer primariamente no hipocampo (Dachir et al., 1993; Sapolsky et al., 1985; McIntosh e Sapolsky, 1996).

Prolongadas exposições de ratos a altos níveis de corticosterona causam mudanças neuroquímicas com indução de neurotoxicidade no hipocampo, deixando os neurônios mais suscetíveis a

insultos neurológicos, possivelmente por alterar o transporte de glicose (substrato energético) nessa estrutura (Sapolsky, 1986, 1987; Horner et al., 1990), podendo acarretar degeneração do tecido (Moghaddam et al., 1994).

Os glicocorticóides atuam no hipocampo alterando sua função neuroquímica e atividade eletrofisiológica, afetando concomitantemente o comportamento, o humor, o controle neuroendócrino e a sobrevivência neuronal. Estas ações são mediadas por receptores intracelulares de dois tipos: mineralocorticóides (Tipo I) e glicocorticóides (Tipo II). Ambos os receptores são encontrados em grande quantidade no hipocampo (Yau et al., 1994). O receptor mineralocorticóide apresenta sítios de alta afinidade para ligação com corticosterona, sugerindo-se estar mais envolvido em funções basais ou “tônicas” circadianas.

Por outro lado, o hipocampo é uma estrutura do cérebro importante para os processos cognitivos, como, por exemplo, para aquisição de tarefas espaciais e comportamentos exploratórios e habituação ao ambiente novo (Dachir et al., 1995).

Os efeitos neurotóxicos têm sido atribuídos a um aumento da ativação dos neurônios glutamatérgicos causados pela secreção de glicocorticóides. Estudos recentes indicaram que a exposição a estressores físicos ou farmacológicos aumenta a liberação de glutamato no hipocampo e em outras regiões, como o córtex pré-frontal e glânglios da base (Moghaddam, 1993; Moghaddam et al., 1994).

As catecolaminas recebem este nome por apresentarem um núcleo catecol. Dopamina, noradrenalina e adrenalina são neurotransmissores e/ ou hormônios na periferia e no sistema nervoso central. São sintetizados a partir de um aminoácido, a tirosina. A noradrenalina é o principal neurotransmissor simpático. Dopamina, precursor da noradrenalina, tem atividade biológica periférica, mais particularmente no rim, e serve como neurotransmissor em muitas rotas importantes do sistema nervoso central. A adrenalina é formada pela N- metilação da noradrenalina; é o hormônio liberado da glândula supra-renal e estimula em diversos órgãos os receptores de catecolaminas. A adrenalina é encontrada em menor quantidade no sistema nervoso central, pois somente alguns neurônios usam-na como neurotransmissor.

Após um animal ser exposto a um estresse agudo ocorre a ativação do sistema de aminas biogênicas no cérebro. Por exemplo, uma única sessão de imobilização pode aumentar o *turnover* ou a liberação de noradrenalina, dopamina e serotonina no córtex frontal (Jordan et al., 1994). Pouco, porém, se sabe sobre a resposta das aminas biogênicas em situações de estresse crônico.

Existem estudos em relação às catecolaminas periféricas que sugerem que as quantidades de adrenalina e noradrenalina secretadas durante o estresse dependem do tipo do estresse, ou do tipo de emoção que este provoca. Uma teoria, a mais citada, é que o medo está ligado à secreção

de adrenalina, enquanto que a raiva acompanha-se de um aumento paralelo na liberação de ambas, adrenalina e noradrenalina (Stanford, 1993).

Em modelos de estresse repetido ou prolongado, alguns autores sugerem que a resposta das catecolaminas siga um padrão, com aumento progressivo até atingir um pico, seguido então por um declínio aos níveis basais, antes do término do estresse (Konarska et al., 1989; Winder et al., 1978; Stanford, 1993).

Sabe-se que estruturas como hipocampo, córtex cerebral, bulbo olfatório e núcleo amigdalóide são inervados por neurônios do *locus coeruleus* onde existem aferências de neurônios adrenérgicos do hipotálamo. Um estímulo não nocivo ativa os neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus*, resultando na liberação de noradrenalina nas fendas sinápticas. Um estresse previsível também pode influenciar a liberação de noradrenalina. Tsuda et al. (1989) sugeriram que a noradrenalina é liberada em maior quantidade quando o estresse é imprevisível em comparação com um estresse previsível.

Existem controvérsias em relação aos níveis de noradrenalina no estresse crônico. Alguns autores sugerem uma diminuição, causada pela adaptação, outros sugerem que tudo depende da natureza do estressor e das regiões estudadas (Anisman et al., 1980; Stanford, 1993).

Thierry et al demonstrou ocorrer mudanças no *turnover* de dopamina, sugerindo que somente neurônios dopaminérgicos mesocorticais inervariam o córtex pré-frontal, onde seriam ativados por estresse (Thierry et al,

1976). Este ponto de vista foi revisado, e sugere-se que os neurônios dopaminérgicos que inervam o córtex pré-frontal apresentam maior sensibilidade aos níveis de estresse, respondendo a estímulos moderados como choque nas patas. Os neurônios de outras áreas do cérebro responderiam a estímulos mais severos (ex: imobilização) ou prolongamento do período de estresse (Stanford, 1993). Entretanto, novas técnicas tornaram possível maior sensibilidade nas medidas, demonstrando liberação de dopamina no cérebro e no sistema mesolímbico sempre em resposta a um estresse moderado (Deutch et al., 1985).

Estresse e Memória

Vários dos sistemas moduladores envolvidos na resposta de adaptação ao estresse apresentam efeito sobre a memória. Entre eles estão os sistemas mediados por catecolaminas, como a adrenalina e a noradrenalina (Gold & van Buskirk, 1978; Izquierdo & Dias, 1983a; Armario et al, 1990; Martí et al, 1993), ou por neuropeptídeos, como a β -endorfina, o ACTH e a vasopressina (Izquierdo et al., 1982; Izquierdo & Dias, 1983b; Almeida & Izquierdo, 1984; Tizabi & Aguilera, 1992), todos liberados em resposta ao estresse (David et al., 1973; Almeida & Izquierdo, 1984).

Sabe-se que, em nível periférico, vários sistemas hormonais são ativados em resposta ao estresse, e que muitos podem atuar sobre o

processo de consolidação da memória (Izquierdo, 1984; Dilsaver et al., 1986). Os hormônios mais estudados nesse aspecto são a adrenalina, o ACTH e a vasopressina (Gold & McCarty, 1981; Izquierdo & Dias, 1983a; 1983b; Almeida & Izquierdo, 1984; Gamaro et al, 1997).

Vários sistemas de neurotransmissores, como o sistema colinérgico septo-hipocampal (Frikelstein et al., 1985), também são ativados em resposta ao estresse.

Os hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal estão intimamente relacionados com os mecanismos de memória em ratos (Gold et al., 1982; Izquierdo & Dias, 1983a; 1983b; Almeida & Izquierdo, 1984). Entre os diversos estudos demonstrando o envolvimento de hormônios hipofisários com a modulação da memória, encontram-se evidências de que a retirada do lobo anterior da hipófise, ou de toda a glândula, acarreta uma diminuição do aprendizado de fuga. Este efeito foi revertido por tratamento com ACTH (de Wied, 1977). Os efeitos do ACTH são semelhantes aos da adrenalina. Observa-se uma curva dose-resposta em U invertido, onde doses muito altas são amnésicas e doses moderadas são facilitadoras. Sua administração após o treino pode aumentar ou diminuir a memória, dependendo aparentemente dos níveis endógenos no momento da administração (Izquierdo & Dias, 1983b; Dalmaz et al., 1988).

A vasopressina, também liberada em situações de estresse, apresenta efeitos semelhantes aos da adrenalina e do ACTH (Izquierdo 1989).

Os efeitos de hormônios relacionados ao estresse sobre a memória são mediados por neurônios noradrenérgicos na amígdala (Ferreira, 1992). No entanto, a via que estabelece esta conexão entre as ações da adrenalina, do ACTH e da vasopressina periféricos com a atividade em nível de amígdala não é conhecida (Izquierdo, 1989; Ferreira, 1992).

Existem vários trabalhos na literatura que demonstram efeitos de estresse agudo ou de hormônios liberados pelo estresse agudo sobre a memória (Armario et al., 1988; Gold & Van Buskirk, 1978; Izquierdo & Dias, 1983a; 1983b; Almeida & Izquierdo, 1984; Gold & Hall, 1986). No entanto, pouco se sabe sobre estresse crônico e memória. Por esta razão, resolveu-se trabalhar com estresse crônico e com as alterações causadas por este. Dados da literatura demonstram que a liberação de glicocorticóides, que têm receptores principalmente no hipocampo, pode interferir no metabolismo de neurônios hipocâmpais, causando danos nutricionais. Esses hormônios diminuem o transporte de glicose, deixando os neurônios mais suscetíveis às agressões teciduais e podendo levar à morte destes (Sapolsky et al., 1988; Sapolsky, 1986). Isto pode acarretar um déficit das funções desta estrutura cerebral, como as funções relacionadas com os processos de memória (Izquierdo, 1989). O estudo dos danos causados por glicocorticóides foi referido como semelhante ao que ocorre no processo de envelhecimento (Sapolsky et al., 1988; Sapolsky, 1986, Sapolsky et al., 1985).

Várias evidências indicam que o estresse pode causar efeitos antinociceptivos. Este é um fenômeno relevante para percepção e resposta à dor e modulação de respostas comportamentais. Os tipos de estresse estudados incluem: choque nas patas, natação no frio e imobilização (Menendez et al., 1993; Kelly et al., 1993).

A analgesia é uma resposta adaptativa ao estresse, observada em seres humanos e em animais de laboratório. Pode ser desencadeada por diferentes mecanismos, de acordo com o agente estressor (Menendez et al., 1993). Diferentes mediadores têm sido sugeridos como envolvidos no aparecimento dos efeitos analgésicos causados pelo estresse, como dopamina, opióides, serotonina, histamina ou aminoácidos excitatórios, com atuação em receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Menendez et al., 1993).

Em modelos experimentais, a analgesia tem sido classificada em opióide e não opióide. A primeira caracteriza-se por ser revertida por naloxone e quando existe a presença de tolerância a efeitos analgésicos depois de um estresse repetido ou indução de tolerância cruzada com efeitos analgésicos da morfina (Kelly et al., 1993) enquanto que a analgesia não opióide não é revertida por naloxone.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o estresse crônico por imobilização, ao contrário do estresse agudo, é capaz de levar a um efeito hiperalgésico em ratos Wistar machos (Gamaro et al., 1998).

Estresse e Desordens Afetivas

Tem sido sugerido que anormalidades na resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal podem estar associadas com uma variedade de estados patológicos.

Algumas mudanças na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, falta de ativação ou modelos alternados de ativação são alguns dos problemas que podem aparecer, por exemplo, na síndrome de Cushing e na doença de Addison, patologias estas que refletem alterações nos níveis de glicocorticóides pelo mau funcionamento da glândula adrenal, acarretando distúrbios metabólicos na utilização de energia e na resposta ao estresse (Michelson et al., 1995). Outro exemplo de hiper-ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é a depressão maior, em que ocorre um aumento na produção de cortisol e possível excesso de CRH, devido a um defeito no hipotálamo. (Michelson et al., 1995).

Falamos acima sobre o efeito de disfunções no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, mas sabe-se que o estresse pode precipitar o aparecimento de doenças afetivas ou ser um fator de predisposição para estas

(Ferreti et al., 1995). Os glicocorticóides afetam o comportamento e o humor. O sistema serotoninérgico é muito importante em várias funções cerebrais, entre elas, reação ao estresse, depressão e ansiedade (Nishi e Azmitia, 1996).

Os glicocorticóides liberados através da resposta ao estresse induzem a atividade da enzima triptofano-hidroxilase no núcleo da rafe, estimulando a síntese e *turnover* de serotonina (Azmitia e McEwen, 1969; Azmitia et al., 1993). Os glicocorticóides podem também modular diretamente a neurotransmissão serotoninérgica através da regulação dos níveis de receptores (Biegon et al., 1985). Vários estudos demonstraram que os receptores para serotonina, no caso o 5HT_{1A}, são sensíveis aos níveis de glicocorticóides circulantes (Nishi e Azmitia, 1996).

Existe uma interrelação entre desordens afetivas e o estresse. O modelo de estresse crônico variável, por exemplo, tem sido utilizado na investigação experimental da depressão (Ferreti et al., 1995), uma vez que aquele modelo mostrou-se capaz de induzir anedonia, um dos efeitos mais importantes apresentado em desordens afetivas dessa natureza. Em geral, este efeito é testado por medidas de consumo de sacarose (Willner et al., 1987), condicionamento de preferência de lugar (Papp et al., 1991; Willner et al., 1992) e auto estimulação intracranial (Moreau et al., 1992).

Quando um animal é confrontado com uma ameaça à sua integridade física ou à sua própria sobrevivência, seja esta representada por um predador ou um agressor da mesma espécie, seja por uma simples mudança no

ambiente (estímulo) que o advirta, emitirá respostas comportamentais e neurodegenerativas que caracterizam a reação de medo (Graeff, 1989). Esta é a definição de ansiedade para este autor. Estas situações são semelhantes a situações de estresse, acarretando a liberação de hormônios, que, no caso dos glicocorticóides, têm seu tecido alvo no hipocampo, o qual está intimamente ligado a processos de memória e emoções (McNaughton, 1993).

Dados obtidos em nosso laboratório, utilizando o modelo de estresse crônico por imobilização, em um teste de comportamento alimentar (Ely et al., 1997), indicam que animais estressados repetidamente apresentam um aumento no consumo de alimento doce, sem haver, no entanto, aumento no consumo de ração padrão. Este aumento no consumo de alimento doce foi revertido pela administração de um ansiolítico, o diazepam. Sugere-se, então, que este modelo de estresse pode causar ansiedade no animal.

O estresse também está intimamente relacionado com doenças afetivas. No Sistema Nervoso Central os corticosteróides liberados em situações de estresse afetam o humor e o comportamento. Alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal são encontradas em pacientes deprimidos, o que sugere um papel importante destes hormônios na etiologia da depressão e de outras doenças afetivas (Chalmers et al, 1993). O sistema serotoninérgico também tem um papel importante em inúmeras funções cerebrais, incluindo reação ao estresse, depressão e ansiedade (Nishi e Azmitia, 1996).

Existem trabalhos sugerindo que o estresse atue como um fator de predisposição e precipitação em doenças afetivas, como por exemplo a depressão (Malysko et al, 1994; Ferreti et al, 1995). A depressão pode ser caracterizada como o mal do final do século. Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que 5% a 6% da população mundial sofre de depressão.

A exposição ao estresse agudo e crônico pode estar associada a desordens neurológicas e psicológicas, que têm sido atribuídas, em parte, a efeitos neurotóxicos do estresse em neurônios hipocampais (Moghaddam et al., 1994).

Com base no exposto anteriormente, este trabalho teve como objetivos gerais desenvolver um novo modelo de estresse crônico em nosso laboratório, o modelo de estresse crônico variável. Dados da literatura têm demonstrado que a previsibilidade pode ser considerada como um fator de habituação do animal ao estresse, o que pode "mascarar" alguns efeitos da resposta a um agente estressor. Foi desenvolvido um protocolo constituído de 7 agentes estressores diferentes, aplicados em diferentes períodos do dia, de duração variável.

Considerados os aspectos levantados acima, os objetivos gerais desta dissertação de mestrado são o desenvolvimento de um modelo de estresse crônico variável e avaliação de seus efeitos sobre parâmetros gerais, comportamentais e bioquímicos.

OBJETIVOS

1. Avaliar os efeitos do modelo de estresse crônico variável sobre parâmetros gerais e bioquímicos em ratos Wistar.

1.1 Avaliar o consumo de água e ração pelos animais submetidos ao estresse, em comparação com os animais dos grupos controle e manipulado.

1.2 Avaliar a curva de peso corporal dos animais ao início e ao final do tratamento.

1.3 Avaliar o peso das adrenais dos animais ao final do tratamento, levando em consideração seu peso corporal.

1.4 Avaliar os níveis glicêmicos.

1.5 Avaliar os níveis plasmáticos de corticosterona nos diferentes grupos estudados - animais cronicamente estressados e controles.

1.6. Avaliar os efeitos do modelo de estresse crônico variável sobre os níveis de catecolaminas (noradrenalina e dopamina) em quatro estruturas cerebrais diferentes: hipotálamo, hipocampo, amígdala e córtex frontal.

2. Avaliar os efeitos do modelo de estresse crônico variável sobre a memória, utilizando duas tarefas diferentes: Esquiva Ativa de Duas Vias e Esquiva Inibitória.

3. Avaliar os efeitos do modelo de estresse crônico variável sobre a resposta nociceptiva.

4. Avaliar os efeitos do modelo de estresse crônico variável sobre o comportamento alimentar de ratos Wistar, mais especificamente sobre a ingestão de alimento doce.

5. Avaliar os efeitos do modelo de estresse crônico variável sobre o comportamento dos animais estudados no Campo Aberto.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos (com 60 dias de idade no início do tratamento) provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, num total de 359 animais. Os animais foram pesados e divididos em 3 grupos, apresentando uma média de pesos semelhante ao início do tratamento. Foram mantidos em caixas - moradia de *plexiglass*, medindo 65 X 25 X 65 cm, com assoalho recoberto de serragem. Oito animais por caixa permaneceram no ratário sob condições controladas de temperatura e ciclo normal claro/escuro (luz acesa das 7h às 19h), com ração padronizada e água "ad libitum".

Estresse Crônico Variável

Os animais foram divididos em 3 grupos: Controle, Manipulado e Estressado. Os animais pertencentes ao grupo Controle permaneceram no ratário durante o período do tratamento, tendo sido expostos apenas à manipulação dos funcionários para limpeza das caixas-moradia. Os animais do grupo Manipulado receberam manipulação diária, consistindo na marcação de suas caudas durante o período de tratamento. Os animais do

grupo Estressado foram submetidos a um tratamento de estresse crônico variável durante pelo menos 40 dias. O modelo de estresse crônico variável foi desenvolvido com base em modelos pré-existentes (Willner et al., 1987; Konarska et al., 1990; Echandía et al., 1988; Muscat et al., 1992; Jordan et al., 1994; Willner e Muscat, 1991; Papp et al., 1991; Murua et al., 1992), porém com algumas modificações. O modelo baseia-se na exposição do animal a 7 agentes estressores diferentes: (1) luz piscante, (2) imobilização no frio, (3) isolamento, (4) natação forçada, (5) retirada de comida, (6) imobilização e (7) retirada de água, durante turnos variados. O tempo de exposição era variável, podendo ou não haver dias intercalados sem a presença de agentes estressores (Figura 1).

Após pelo menos 40 dias de tratamento, os animais foram submetidos a tarefas comportamentais e análises bioquímicas.

Agentes Estressores

Luz Piscante

A caixa-moradia dos animais era colocada dentro de uma caixa de madeira, medindo 50 cm de altura, 60 cm de largura e 40 cm de profundidade, com a face anterior de vidro. Na tampa da caixa de madeira havia uma lâmpada que poderia ser branca, verde ou azul (40 W) e que piscava numa frequência de 2 Hz. Esta caixa era colocada em uma sala escura durante

o tempo determinado para a sessão de estresse, que variava de 30 minutos até 4h.

Imobilização

Os animais eram imobilizados em cilindros plásticos de diâmetro regulável durante diferentes intervalos de tempo, que podiam variar de 30 minutos a 3 h, conforme o protocolo.

Imobilização no Frio

Constituiu-se do mesmo processo de imobilização descrito acima, porém os animais permaneciam imobilizados em ambiente com temperatura de 0-4°C.

Isolamento

Os animais permaneciam de 2 a 3 dias em caixas-moradia individuais, no ratário do Departamento de Bioquímica, com ciclo claro-escuro, de 12h, água e comida "ad libitum".

Natação Forçada

Os animais eram submetidos a natação forçada em um aquário de vidro, com 50 cm de altura por 40 cm de largura, com temperatura

entre 25 e 30° C . O animal era colocado na água e permanecia por um tempo que poderia variar de 10 a 15 minutos, de acordo com o protocolo.

Retirada da água

Os bebedouros dos animais eram retirados por 24 h.

Retirada da comida

A ração dos animais era retirada por 24 h.

Na Tabela I está descrito um protocolo típico para aplicação do Estresse Crônico Variável

Estresse Agudo

Os animais foram divididos em 2 grupos : Controle e Estressado. Os animais do grupo Controle permaneceram em suas caixas moradias, enquanto os do grupo Estressado foram submetidos a uma única sessão de estresse.

No tratamento agudo foram utilizados somente dois dos sete agentes estressores constituintes do modelo crônico, imobilização por 1h e natação forçada por 10 minutos.

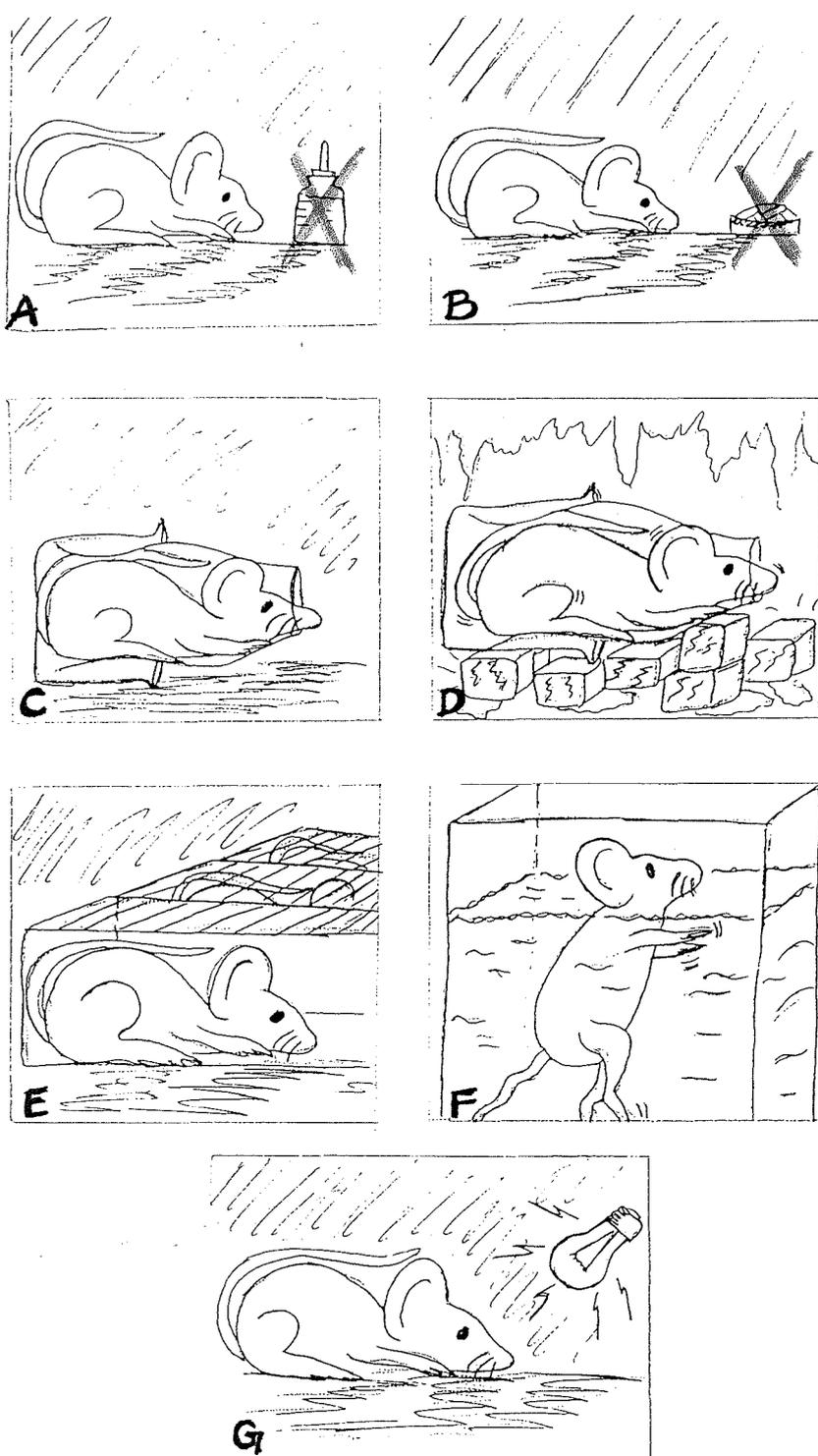


Figura 1. Desenho esquemático dos agentes estressores aplicados nos animais submetidos aos tratamentos de estresse. A- Retirada de água. B- Retirada de comida. C- Imobilização. D- Imobilização no Frio. E- Isolamento. F- Natação Forçada. G- Luz Piscante.

Tabela I. Protocolo padrão para aplicação dos agentes estressores.

<i>DIAS</i>	<i>AGENTE ESTRESSOR</i>	<i>HORÁRIO</i>
Dia 1	Imobilização + Frio 1h	11h-12h
Dia 2	Luz Piscante 2h	13h30-15h30
Dia 3	Imobilização 1h30min	14h-15h30
Dia 4	Isolamento	10h
Dia 5	Isolamento	
Dia 6	Isolamento	
Dia 7	Natação 10min/rato	13h30
Dia 8	Retirada da H2O	14h45
Dia 9	Retirada da comida	12h30
Dia10	Imobilização + Frio 45min	13h-13h45
Dia11	Luz Piscante 1h30min	15h30-17h
Dia12	Nada	
Dia13	Imobilização 2h	16h-18h
Dia14	Nada	
Dia15	Retirada da H2O	16h
Dia16	Retirada da comida	14h
Dia17	Luz Piscante 2h	15h-17h
Dia18	Imobilização + Frio 1h30min	9h30-11h
Dia19	Isolamento	9h
Dia20	Isolamento	
Dia21	Natação 10min/rato	10h
Dia22	Luz Piscante 3h	15h-18h
Dia23	Imobilização + Frio 1h	9h-10h
Dia24	Retirada da comida	15h
Dia25	Imobilização 2h	10h30-12h30
Dia26	Natação 15min/rato	16h
Dia27	Luz Piscante 1h	10h-11h
Dia28	Imobilização + Frio 2h	11h40-13h40
Dia29	Retirada da H2O	10h
Dia30	Imobilização 3h	9h-12h
Dia31	Retirada da comida	16h
Dia32	Natação 15min/rato	14h
Dia33	Isolamento	12h
Dia34	Isolamento	
Dia35	Isolamento	
Dia36	Luz Piscante 4h	10h-14h
Dia37	Imobilização + Frio 3h	16h-19h
Dia38	Retirada da H2O	17h
Dia39	Natação 10min/rato	16h
Dia40	Imobilização 1h	9h-10h

TAREFAS COMPORTAMENTAIS

Esquiva Inibitória

Foi realizada conforme descrito na literatura (Izquierdo & Dias,1981, Dias & Izquierdo,1983 e Almeida & Izquierdo,1984). Para tal, foi utilizada uma caixa de condicionamento automatizada (ALBARSCH), medindo 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 25 cm de altura, com a face frontal em vidro. O assoalho era constituído de uma grade de barras de bronze, com 1 mm de diâmetro, espaçadas 1 cm umas das outras, através das quais era possível aplicar uma diferença de potencial elétrico de intensidade variável. Parte da metade esquerda do assoalho consistia de uma plataforma de madeira compensada revestida por fórmica, com 7 cm de largura, 25 cm de comprimento e 5 cm de altura (Figura 2).

Na sessão de treino, o animal era colocado de frente para o canto posterior esquerdo da caixa de condicionamento, sobre a plataforma. A latência até a descida completa do animal (com as 4 patas na grade de bronze) era cronometrada. Imediatamente, o animal recebia choques de 60 Hz nas patas, de forma intermitente, por 4 segundos, de intensidade igual a 0,3 mA.

Na sessão de teste, 24h após o treino, o animal era recolocado na caixa de condicionamento, sobre a plataforma (da mesma maneira que foi colocado no treino), e a latência até descida para a grade era medida novamente, sendo omitidos os choques nas patas. Estipulou-se um teto

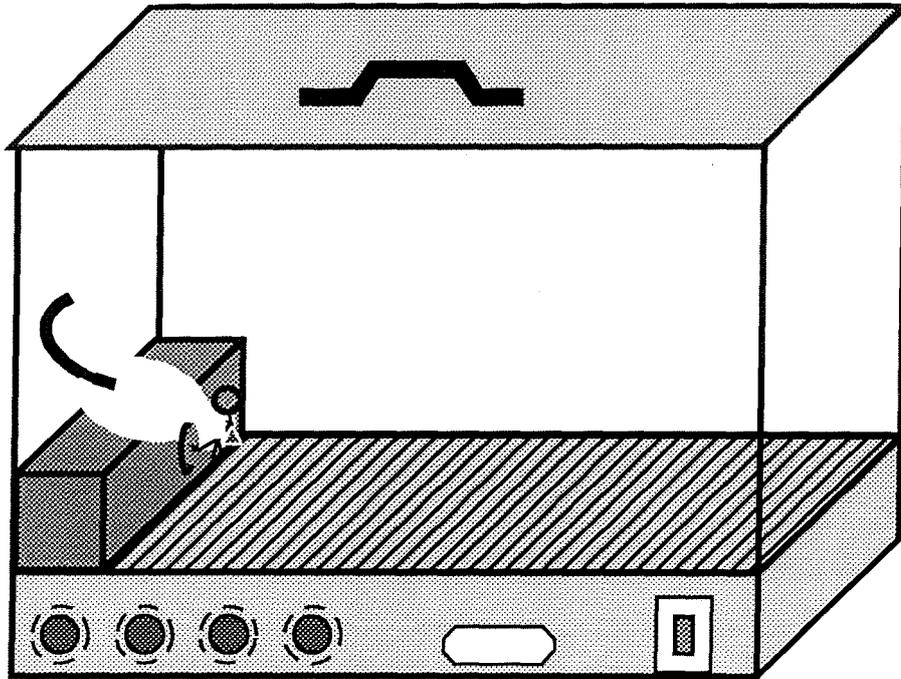


Figura 2. Desenho esquemático da caixa de Esquiva Inibitória.

(medida máxima de tempo para o rato permanecer na plataforma sem descer) de 300 segundos.

A diferença de latência teste-treino era tomada como medida de memória.

Foram utilizados 47 animais para realização desta tarefa (16 controles, 15 manipulados e 16 estressados).

Esquiva Ativa de Duas Vias

Foi realizada em uma caixa de condicionamento semelhante à da tarefa anterior, porém não continha a plataforma (Pereira et al, 1989; Bianchin et al, 1993) (Figura 3).

Na sessão de treino, o animal era colocado no lado esquerdo da caixa e, depois de um período de habituação de 3 minutos, iniciava-se a tarefa. Consistia na apresentação de um tom (1,0 Hz, 5s, 70dB) e, imediatamente após, no lado da caixa onde estava o animal, era aplicado um choque intermitente nas patas de 0,5 mA de intensidade, o qual era mantido até que o animal cruzasse para o outro lado da caixa, onde não havia choque, e assim sucessivamente. Os intervalos entre tons eram aleatórios (0 - 50 s). A tarefa compreendia um total de 30 tons, e, para evitar o choque, os animais aprendiam a emitir resposta de cruzamento durante a apresentação do tom (resposta de esquiva). Tanto os estímulos (choque e tom) quanto o registro dos

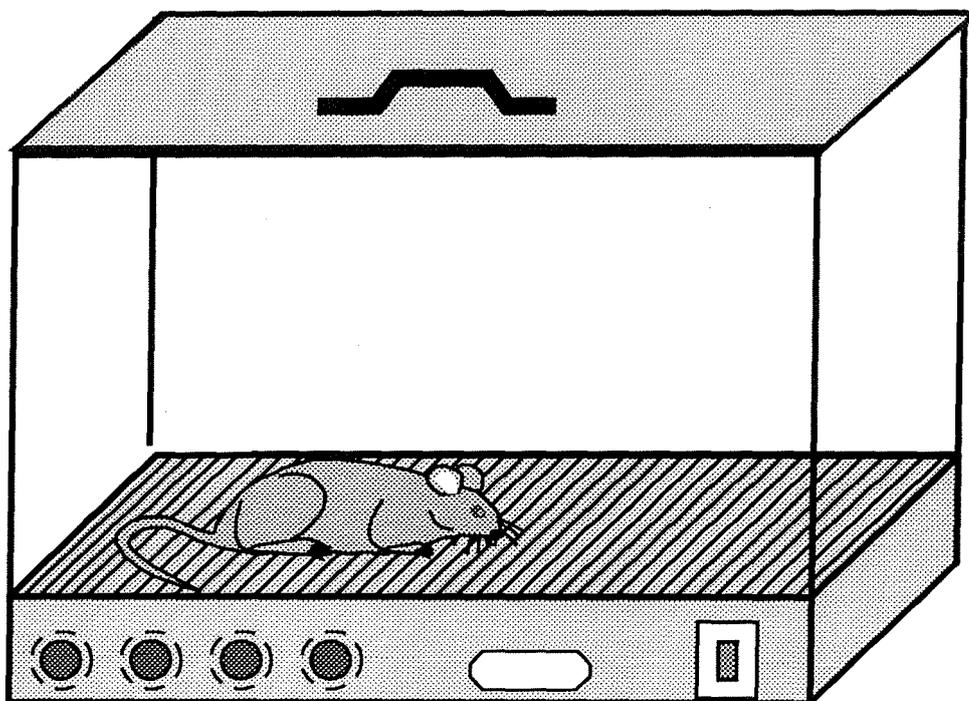


Figura 3. Desenho esquemático da caixa de Esquiva Ativa de Duas Vias.

cruzamentos eram controlados automaticamente. O número de cruzamentos e de choques emitidos era anotado.

A sessão de teste era realizada 24h após a sessão de treino, de forma semelhante à sessão de treino, apenas o tempo de habituação era de 2 minutos. A diferença entre o número de fugas ao choque no treino e no teste era comparada e tomada como medida de memória.

Foram utilizados 45 animais para realização da tarefa (15 controles, 14 manipulados e 16 estressados).

Ingestão de Alimento Doce (*froot-loops*)

O teste foi realizado em corredores de madeira com 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, com teto de vidro (Figura 4). Na extremidade oposta ao lado onde o rato era colocado havia um recipiente com 10 rosquinhas *froot-loops* da Kellogs^R (alimento doce) (Ely et al, 1997).

Uma semana antes do início do teste os animais foram habituados ao novo ambiente e ao novo tipo de alimento. Nesta semana de habituação os animais estavam em jejum e foram expostos à tarefa durante 3 minutos. O animal foi colocado dentro do corredor em lado oposto ao do alimento e de costas para este. Após os 3 minutos, os animais foram retirados e contava-se o número de *froot-loops* ingeridos. Após o término da tarefa, os animais recebiam ração padrão durante 2h e depois deste tempo retornavam ao jejum.

Após essa semana de habituação, os animais foram expostos ao teste propriamente dito, primeiramente em jejum e depois, no dia seguinte, alimentados.

O consumo de alimento doce foi medido em 3 ocasiões: ao final do tratamento, uma e duas semanas após o término do tratamento.

Foram utilizados 43 animais (14 controles, 14 manipulados e 15 estressados).

Exposição ao Campo Aberto (*Open Field*)

Esta tarefa foi realizada em uma caixa de madeira medindo 50 X 60 X 40 cm, com a parede frontal de vidro. O assoalho era dividido em 12 retângulos de 15 X 13,3 cm, com linhas escuras (Bianchin et al, 1993) (Figura 5).

Foi realizada somente uma sessão, onde o animal foi exposto ao ambiente novo por um tempo total de 5 minutos e foram medidos as respostas de orientação (*rearings*), os cruzamentos, o número de bolos fecais e a latência para saída do primeiro quadrado (aquele onde o animal era colocado no início da tarefa).

Foram utilizados 47 animais (16 controles, 15 manipulados e 16 estressados).

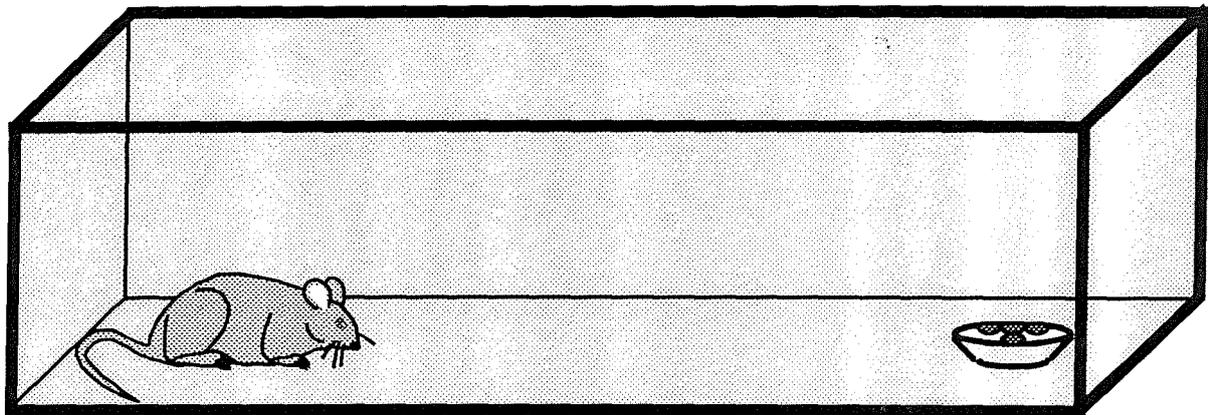


Figura 4. Desenho esquemático da caixa onde realizou-se a tarefa de Comportamento Alimentar.

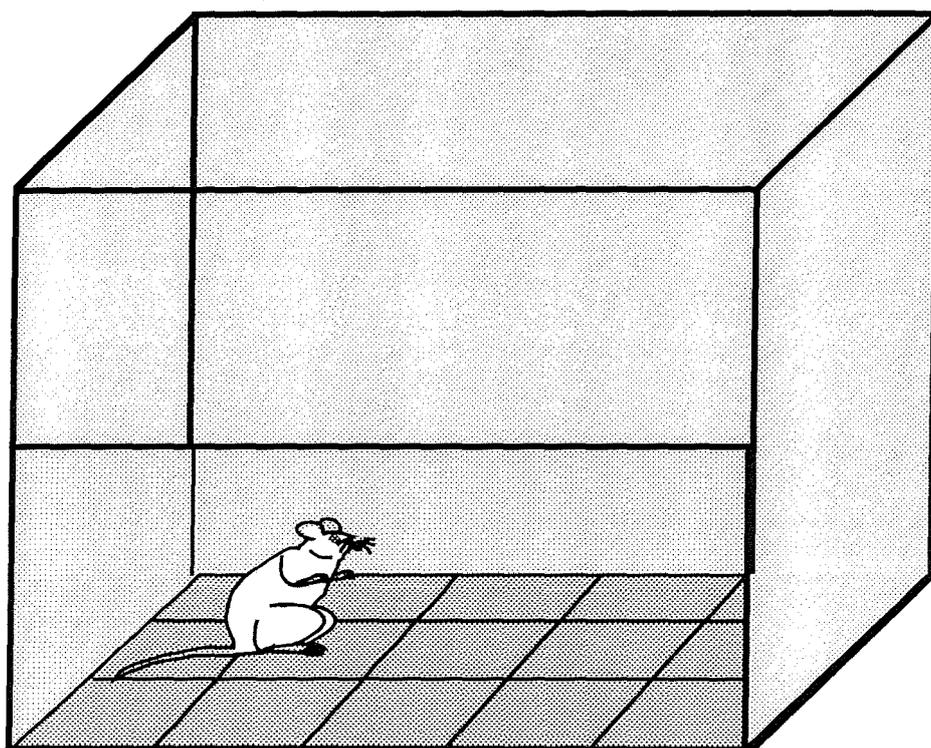


Figura 5. Desenho esquemático da caixa de Campo Aberto (*Open Field*).

Medida da Resposta Nociceptiva

Foi realizada num aparelho de *Tail Flick*, descrito por D'Amour e Smith (1941). Os animais eram contidos usando-se um pano, e colocados no aparelho com a cauda 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) (Figura 6). A intensidade de luz foi ajustada em 0,35 mA ,para obtenção de uma latência para retirada da cauda de 3 a 6 segundos. Um limite superior de 10 segundos foi imposto às medidas a fim de evitar danos teciduais aos animais. O teste baseia-se no princípio de que o calor intenso produzido pela focalização da luz na cauda provoca uma resposta nociceptiva (Siegfried et al, 1987a, 1987b)

Com a finalidade de habituá-lo ao aparelho, o animal era a ele exposto 24 horas antes da medida efetiva da latência de retirada da cauda. Esta foi realizada em dois tempos diferentes: ao final do tratamento e duas semanas após o término do mesmo. Um total de 24 animais foram utilizados (8 por grupo).

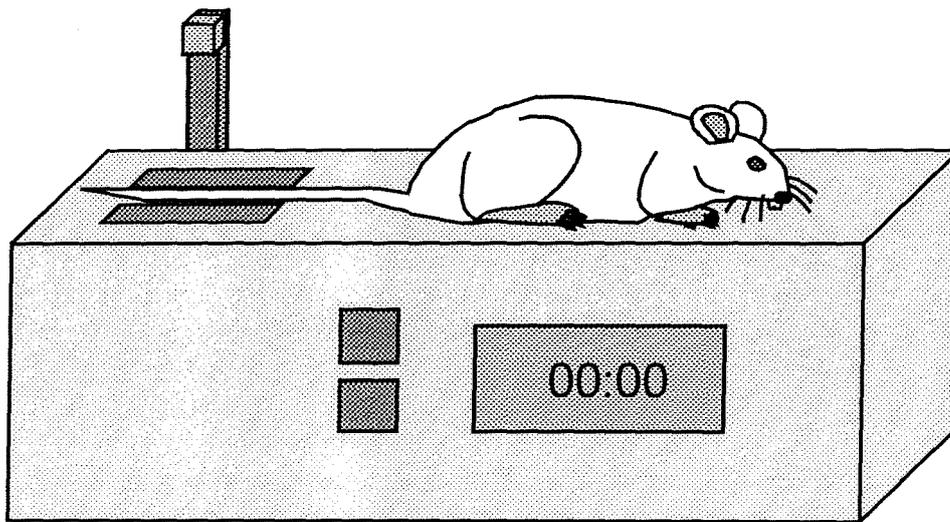


Figura 6. Aparelho de *Tail-Flick*, utilizado para medir a latência de retirada da cauda.

MEDIDAS BIOQUÍMICAS :

Glicemia

Os animais foram mortos por decapitação, no turno da tarde após um jejum de 6 a 8 horas desde o período da manhã. O sangue do tronco foi coletado em tubos de centrífuga, contendo 0,2 ml de heparina e fluoreto de sódio, sendo a seguir centrifugado por 10 minutos a 2.500 rpm para separação do plasma.

A glicemia foi medida através do método da glicose oxidase (Glicose Enz Color - Biodiagnóstica Indústria Química Clínica Ltda.), com espectrofotômetro BECKMAN DU SERIES 600 no espectro da luz visível, no comprimento de onda de 500 nm.

No Modelo de estresse agudo (N=51) a glicemia foi medida nos grupos controle (N=26) e estressado (N=25). No grupo estressado, a medida foi realizada após exposição a um de dois agentes estressores, imobilização por 1h ou natação forçada por 10 minutos. No grupo controle, a medida foi realizada nas mesmas condições, porém sem aplicação de agentes estressores. Estas medidas foram realizadas em dois tempos diferentes: imediatamente após o estresse e 24h após o mesmo.

No modelo de estresse crônico (N = 68) a glicemia foi medida nos grupos estressado (N=22), manipulado (N=22) e controle (N=24). No grupo estressado, a medida foi realizada em dois tempos diferentes, imediatamente após e 24h após a última sessão de estresse. No grupo manipulado a medida foi realizada .

imediatamente após e 24h após a última sessão de manipulação. No grupo controle seguiram-se as mesmas condições exceto a aplicação de agentes estressores.

Dosagem de Corticosterona no Plasma

Foi realizada através da técnica de Radioimunoensaio, utilizando um *kit* de dosagem *BIOTRAK - Rat [¹²⁵I] assay system* (Amersham LIFE SCIENCE). As medidas foram realizadas sempre no período da tarde às 14h nos modelos de estresse crônico e agudo, em diferentes tempos.

Os resultados, obtidos através de leitura em contador de radiação gama- COBRA Auto-Gamma PACKARD, foram calculados seguindo as instruções de cálculos do *Kit*, comparando-se com uma curva padrão. Os resultados foram expressos em ng de corticosterona /ml de plasma.

No Modelo de estresse agudo, as medidas foram realizadas imediatamente após uma sessão de natação ou imobilização (N = 27).

No Modelo de estresse crônico as medidas foram realizadas 24h após a última sessão de estresse (considerado por nós como basal), imediatamente após o estresse de imobilização ou imediatamente após o estresse de natação forçada por 10 minutos. Num total de 64 animais.

Dosagem de Catecolaminas

Foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detecção eletroquímica (HPLC - ED)(Jonsson et al, 1980). Para determinação de noradrenalina e dopamina, os animais foram sacrificados vinte e quatro horas após a última sessão de estresse. Dissecaram-se 4 estruturas cerebrais: hipocampo, córtex frontal, hipotálamo e amígdala, que foram imediatamente congeladas. Para realização das dosagens, as estruturas, depois de pesadas, foram homogeneizadas com 700 µl ou 800 µl de PCA (ácido perclórico), dependendo da estrutura. No córtex e no hipocampo, utilizaram-se 800 µl, enquanto em amígdala e hipotálamo utilizaram-se 700 µl. Após homogeneização com um sonicador "ultrasonic" com 8 pulsos para cada amostra, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm a 4^o C por 15 minutos. Foram retirados 50 µl do sobrenadante para injeção no aparelho de HPLC.

Para análise das amostras utilizou-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (ODS 220 mmX4,6 mm, BAS, USA), um detector amperométrico (BAS LC - 3A) equipado com um eletrodo de trabalho de carbono vítreo e um registrador gráfico RYT (BAS).

O fluxo da fase móvel foi de 1ml/min. A composição foi de 3,15% de ác. cítrico, 0,0156% de octil sulfato de sódio (SOS), em água bidestilada, contendo ainda 4,2% de acetonitrila e 1,7% de Tetra-hidrofurano(THF). Previamente à adição dos solventes orgânicos, a solução

teve seu pH ajustado em 3 com NaOH, foi filtrada com micro filtro (filtro de 0,29 μm) e desgaseificada.

Os resultados foram calculados em ng/g de tecido.

A sensibilidade do detector foi ajustada segundo as necessidades de 10 e 20 nA, e o potencial de oxidação foi de 0,85 V.

Foram utilizados 149 animais ao total.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos (peso corporal e peso das adrenais dos ratos, número de fugas e cruzamentos na tarefa de Esquiva Ativa de Duas Vias, ingestão de alimento doce, número de bolos fecais, cruzamentos, latência para sair do primeiro quadrado e respostas de orientação (*rearings*) no Campo Aberto, níveis de glicose, corticosterona e catecolaminas cerebrais) foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para análise dos dados utilizou-se ANOVA de uma via, seguida, quando necessário, pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Os experimentos em que havia apenas dois grupos (dosagens de glicose e corticosterona plasmáticas, no tratamento agudo e aos níveis de catecolaminas cerebrais) foram analisados pelo teste t de Student para amostras independentes.

Para análise do consumo de água e de ração os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Utilizou-se ANOVA para medidas repetidas.

Os dados não paramétricos (Esquiva Inibitória) foram expressos como mediana e intervalos interquartis e comparados pelo teste U de Mann-Whitney ou pela análise de variância de Kruskal-Wallis.

Para comparações entre sessões de treino e teste na Esquiva Inibitória foi utilizado o teste de Wilcoxon e na Esquiva Ativa o teste de t Student para amostras dependentes (delta = fugas no teste - fugas no treino).

Os dados referentes à resposta nociceptiva, por apresentarem uma distribuição normal, foram expressos como média \pm erro padrão e comparados por ANOVA de uma via, seguida, quando indicado, pelo Teste de Student-Newman-Keuls.

RESULTADOS

1. Estabelecimento do Modelo de Estresse Crônico Variável

Durante a implantação do novo modelo de estresse crônico em nosso laboratório foram analisados os seguintes parâmetros: peso corporal dos animais no início e ao término do tratamento, peso das glândulas adrenais, consumo de água e de ração ao longo do tratamento.

1.1 Peso Corporal

Os três grupos de animais foram pesados no início e ao término do tratamento. Na primeira medida, realizada no início do tratamento, os pesos entre os grupos não apresentaram diferença significativa (ANOVA de uma via, $p > 0,05$, $n = 115$). Ao fim de 40 dias de estresse, houve, porém, diferença significativa no peso corporal dos grupos (ANOVA de uma via, $p \leq 0,001$, seguida por teste de Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$, $n = 115$ animais). Os animais estressados apresentaram um peso corporal menor em comparação com os grupos manipulado e controle (Figura 7).

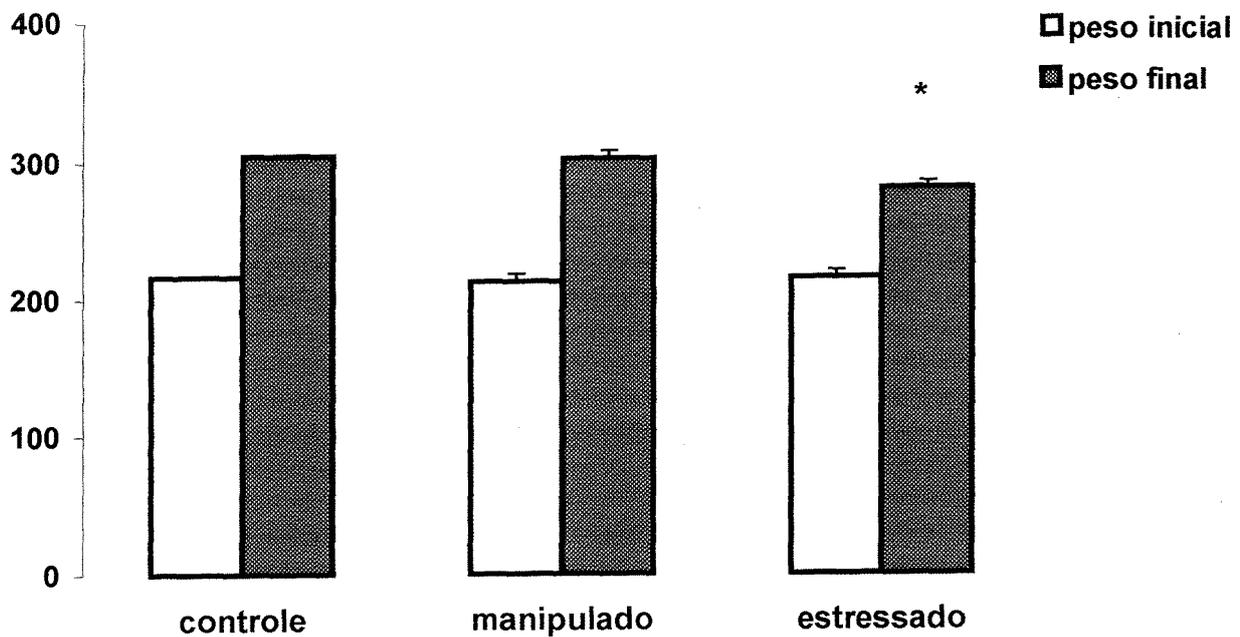


Figura 7. Comparação entre o peso corporal dos três grupos de animais no início e ao término do tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. No início do tratamento, os animais apresentam pesos semelhantes (ANOVA de uma via $F(2, 114) = 0,168$; $p > 0,05$). Ao final do tratamento, o grupo de animais submetido ao estresse crônico variável apresentou redução estatisticamente significativa no peso corporal ($n = 115$).

* Diferença significativa em relação aos demais grupos ao final do tratamento (ANOVA de uma via $F(2, 114) = 7,125$, seguida pelo Teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,050$).

1.2 Consumo de Ração e Água ao Longo do Tratamento

Foram monitoradas, ao longo do tratamento, as ingestões de ração e água. As medidas diárias foram agrupadas em blocos de 10 dias.

Não houve diferença significativa quando se considerou o consumo de ração entre os grupos (ANOVA para medidas repetidas, $p > 0,05$, $n = 115$).

Comportamento semelhante foi observado em relação ao consumo de água (ANOVA para medidas repetidas, $p > 0,05$, $n = 115$). Os animais submetidos a estresse crônico apresentaram comportamento similar aos grupos manipulados e controles (Figuras 8 e 9).

1.3 Peso das Adrenais

O peso das adrenais foi medido ao final do tratamento. As glândulas foram dissecadas e pesadas. A relação peso adrenal (mg) / peso corporal(g) foi analisada.

Houve diferença significativa para a relação peso adrenal/peso corporal entre os grupos (ANOVA de uma via, $p < 0,001$, $n = 30$). O grupo estressado apresentou maior relação em comparação com os demais grupos (Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$, $n = 30$). Portanto, aquele grupo apresenta uma glândula adrenal proporcionalmente maior do que os demais grupos (Figura 10).

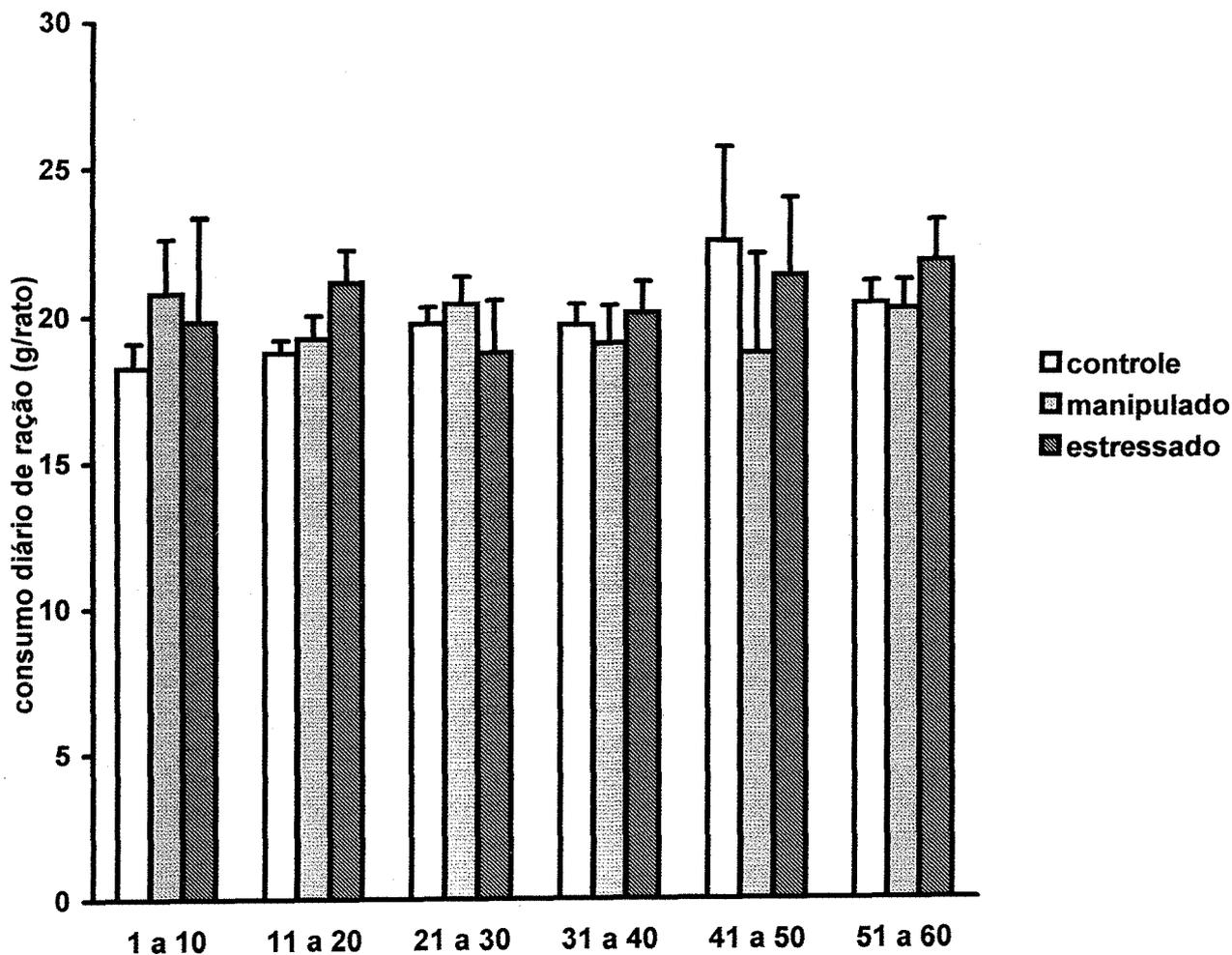


Figura 8. Consumo de ração ao longo do tratamento. Medidas diárias foram realizadas e agrupadas em blocos de 10 dias. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Não houve diferença entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas, tomando "dias" como medida dependente; $F(2, 12) = 0,29$ para os grupos, $p > 0,05$; $F(5, 60) = 0,34$ para "dias", $p > 0,05$; $F(10, 60) = 0,49$ para interação grupo x dias, $p > 0,05$). (n = 115 animais)

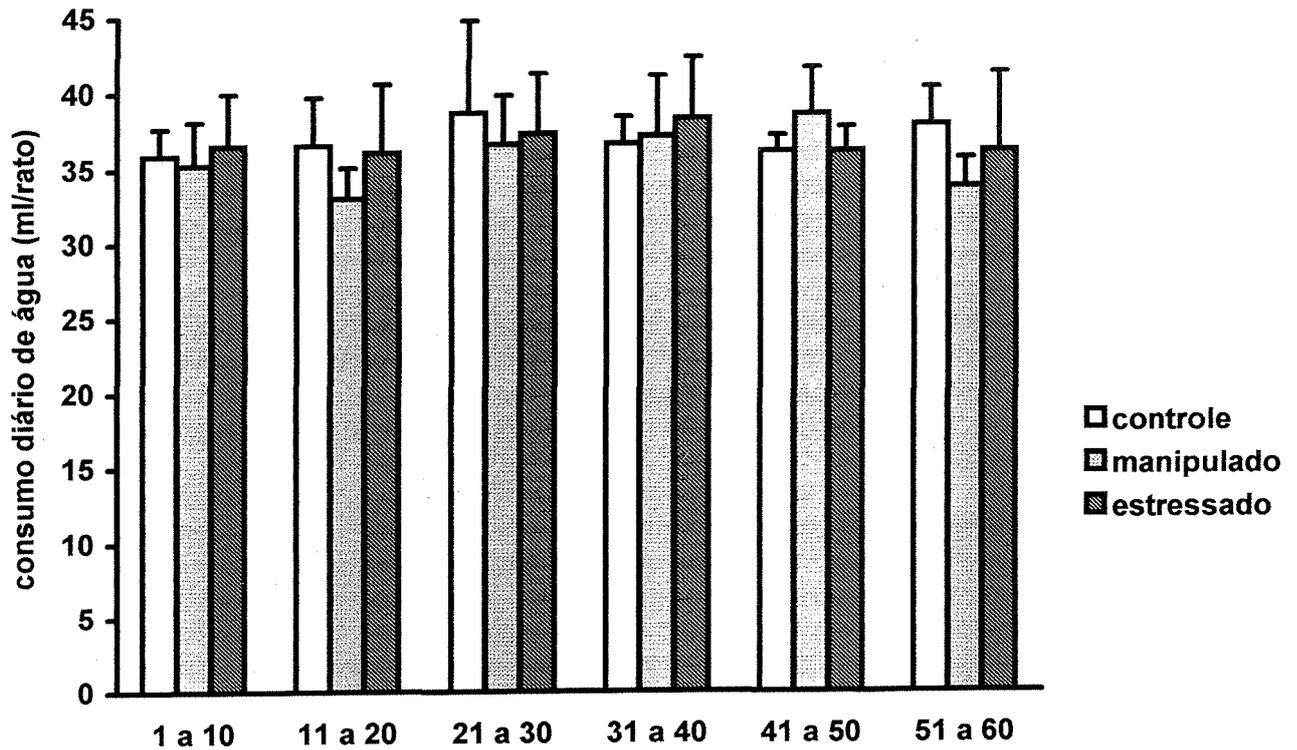


Figura 9. Consumo de água ao longo do tratamento. Medidas diárias foram realizadas e agrupadas em blocos de 10 dias. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Não houve diferença entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas, tomando "dias" como medida dependente; $F(2, 12) = 0,17$ para os grupos, $p > 0,05$; $F(5, 60) = 0,24$ para "dias", $p > 0,05$; $F(10, 60) = 0,18$ para interação grupo x dias, $p > 0,05$). (n= 115).

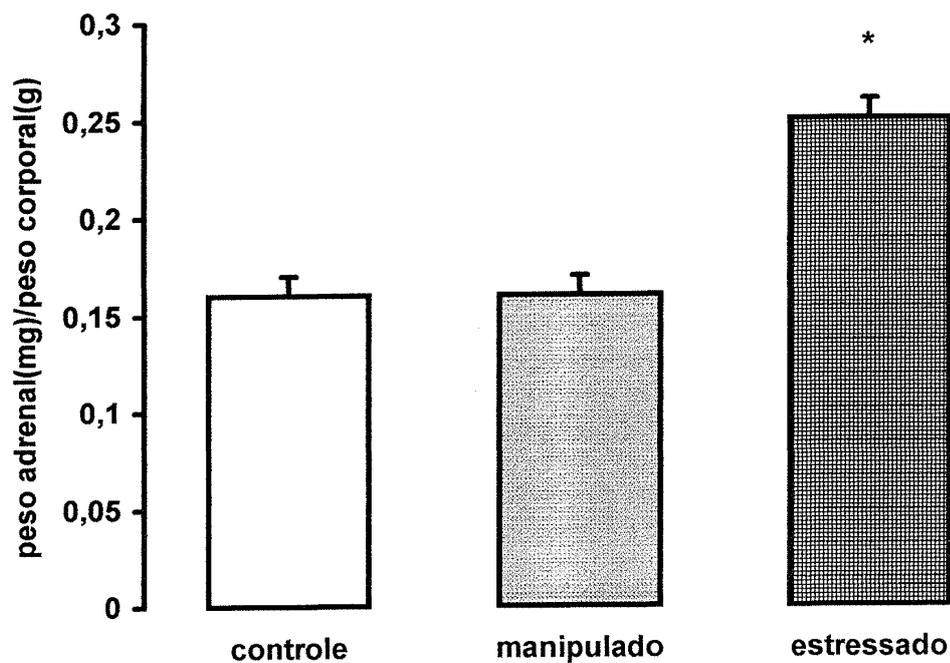


Figura 10. Peso das glândulas adrenais ao término do tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão da média da relação entre peso corporal e peso da adrenal em mg/g de peso corporal (n = 30 animais).

* Significativamente diferente dos demais grupos (ANOVA de uma via $F(2,26) = 33,4$; $p < 0,0001$, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,050$).

2. Efeito do Estresse Crônico Variável sobre o Desempenho em Diferentes Tarefas Comportamentais

2.1. Esquiva Inibitória

Após exposição ao Estresse Crônico Variável durante 40 dias, os animais foram submetidos à tarefa de Esquiva Inibitória, conforme descrito em Material e Métodos. Durante o período em que foram aplicados os testes comportamentais, a exposição dos animais ao estresse continuou. Os testes comportamentais foram realizados pela tarde (13h30-16h).

Como observado na Figura 11, não houve diferença entre os grupos na sessão de treino (ANOVA de uma via, $F(2, 46) = 0,53$; $p > 0,05$, $N = 49$ animais). Na sessão de teste, a análise de variância de Kruskal-Wallis não mostrou diferença significativa entre os grupos (qui quadrado = 2,566, $p > 0,05$). Os animais submetidos ao estresse crônico variável apresentaram um desempenho igual ao dos animais dos grupos controle e manipulado.

Todos os animais apresentaram memória adequada para a tarefa, o que se observa ao compararmos as sessões de treino e teste (teste pareado de Wilcoxon, $p < 0,005$ para os grupos controle e manipulado e $p < 0,001$ para grupo o estressado).

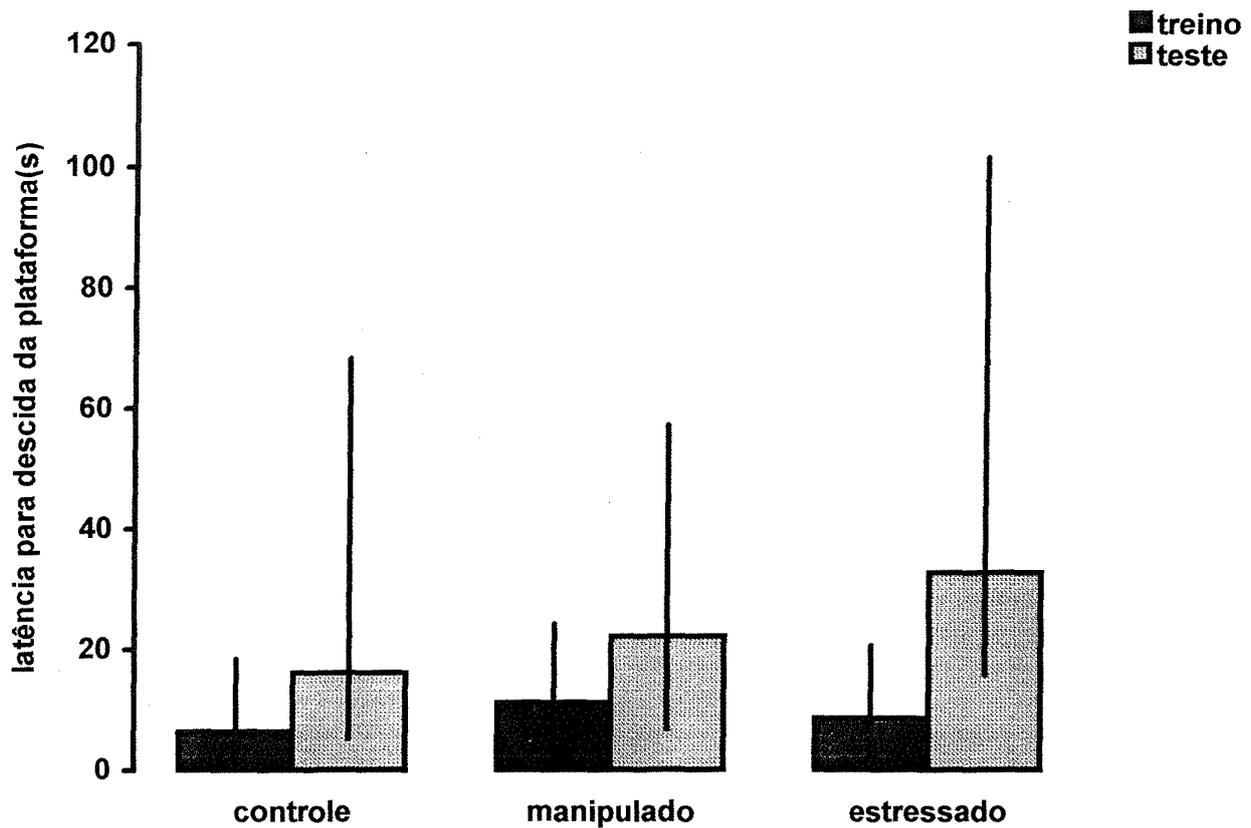


Figura 11. Efeito do estresse crônico variável sobre o desempenho na tarefa de Esquiva Inibitória. Dados expressos como mediana (intervalo interquartis) da latência para descida da plataforma(s) nas sessões de treino e teste. Ao compararmos treino e teste de cada grupo pelo teste de Wilcoxon, todos os animais apresentaram memória adequada para a tarefa (teste pareado de Wilcoxon, $Z = 2,844$ para o grupo controle; $Z = 2,730$ para o grupo manipulado; $Z = 3,464$ para o grupo estressado; $p < 0,01$ em todos os casos, $N = 47$).

2.2 Esquiva Ativa de Duas Vias

Esta tarefa foi realizada conforme descrito em Material e Métodos. Todos os animais apresentaram memória adequada para a tarefa (teste t de Student pareado; $p < 0,005$) Não existe diferença entre os grupos nas sessões de treino e teste (ANOVA de uma via, $F(2, 44) = 0,785$ para o treino e $F(2, 44) = 0,571$ para o teste; $p > 0,05$ em ambos os casos, $N = 45$ animais). Todos os animais apresentaram memória adequada para a tarefa, avaliada através da diferença de fugas ao choque entre estas sessões (teste-treino = delta) (teste t pareado de Student; $t(14) = 3,71$ para o grupo controle; $t(13) = 2,29$ para o grupo manipulado; $t(15) = 2,67$ para o grupo estressado; $p < 0,05$ em todos os casos) (Figura 12).

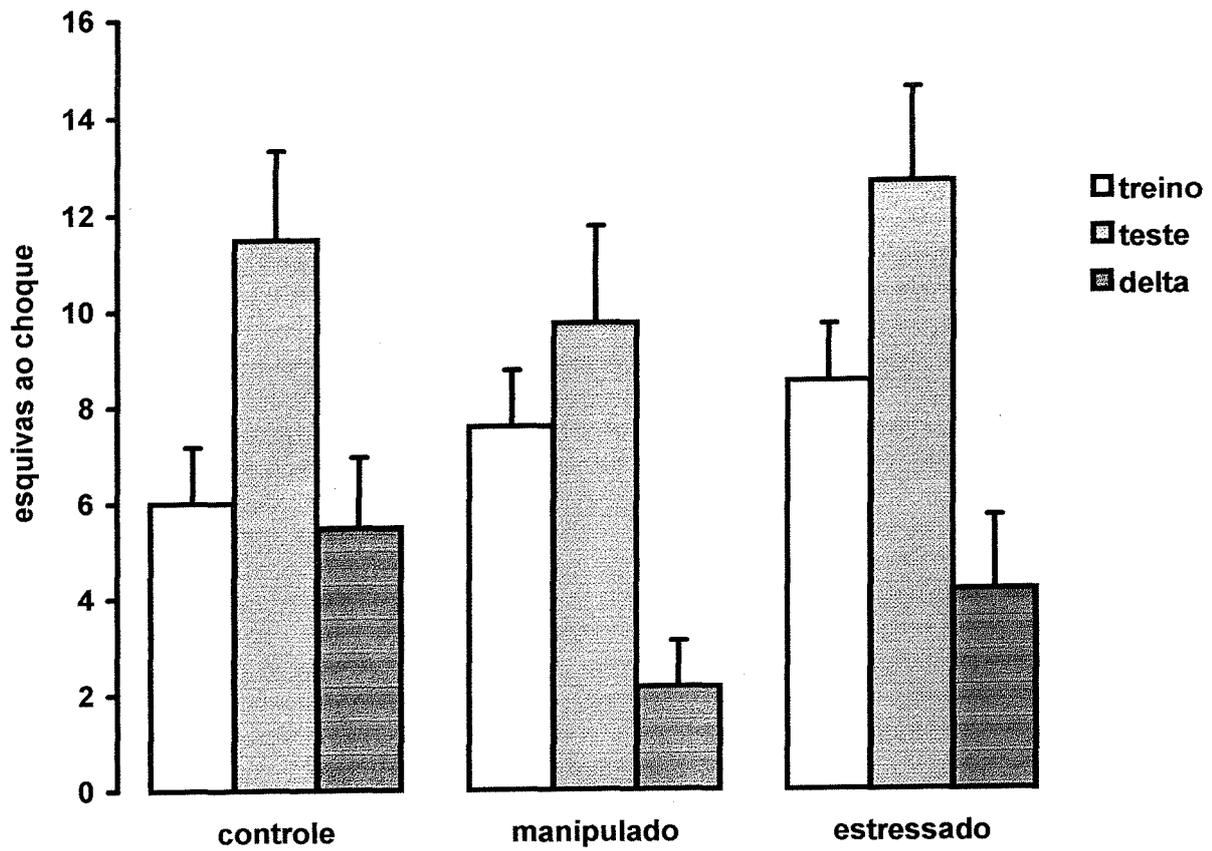


Figura 12. Efeito do estresse crônico variável sobre o desempenho na tarefa de Esquiva Ativa de Duas Vias. Dados expressos como média \pm erro padrão da média do número de esquivas ao choque nas sessões de treino e teste e diferença de esquivas ao choque entre estas sessões (teste-treino = delta).

2.3 Teste da Ingestão de Alimento Doce

Após habituação dos animais ao ambiente e ao alimento, foram realizadas medidas em três diferentes situações: ao final do tratamento, uma semana e duas semanas após o término do mesmo.

Conforme observado na Figura 13, na medida realizada ao final do tratamento, o grupo estressado apresentou um decréscimo significativo no consumo de alimento doce em comparação com os outros dois grupos no estado alimentado (ANOVA de uma via, $p < 0,01$, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, com $p < 0,05$, $N = 43$ animais). Em jejum, o grupo estressado apresentou diferença significativa somente em relação ao grupo manipulado (ANOVA de uma via, $p < 0,05$, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, com $p < 0,05$)(Figura 13).

Nos demais períodos testados, após o término do tratamento, não houve diferença significativa entre os grupos. Uma ou duas semanas após o tratamento ser descontinuado, os animais dos três grupos passaram a apresentar igual ingestão de alimento doce, tanto em jejum quanto no estado alimentado (ANOVA de uma via, $p > 0,05$) (Figuras 14 e 15).

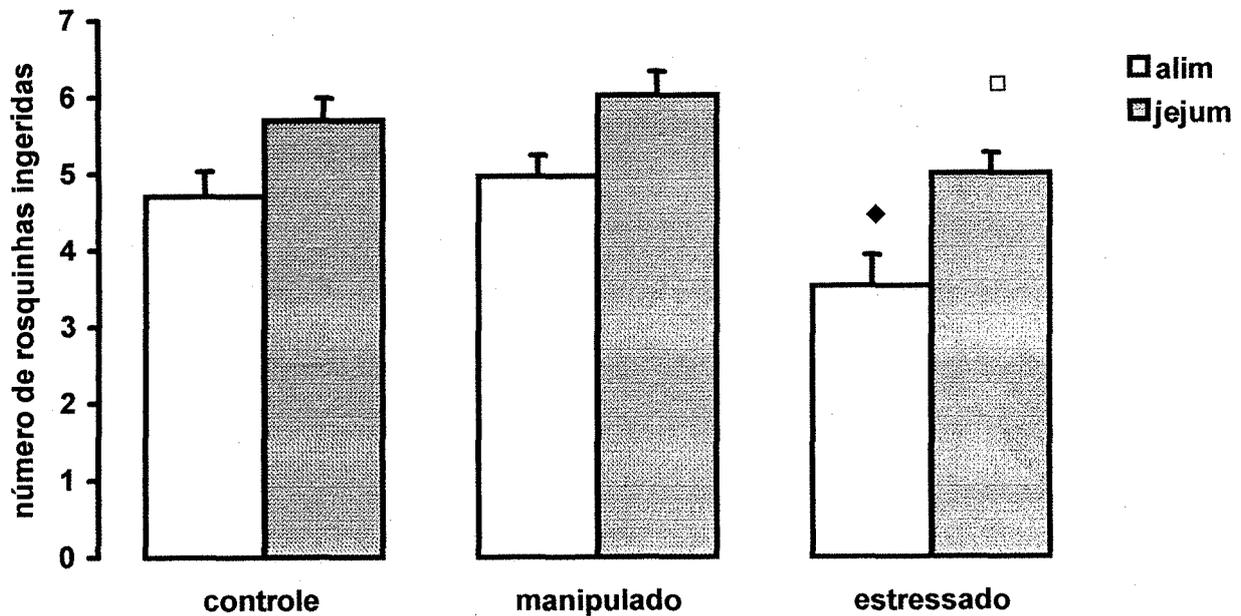


Figura 13. Efeito do estresse crônico variável sobre o comportamento alimentar logo após o término do tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão da média do número de rosquinhas ingeridas na sessão. Ao término do tratamento existe diferença significativa entre o grupo estressado e os demais grupos, tanto no estado alimentado (alim) (ANOVA de uma via $F(2, 42) = 4,989$; $p < 0,05$, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls) quanto em jejum (ANOVA de uma via $F(2, 42) = 3,294$; $p < 0,05$, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls). ($N = 43$ animais)

- ♦ Significativamente diferente dos demais grupos (Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).
- Significativamente diferente do grupo manipulado (Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

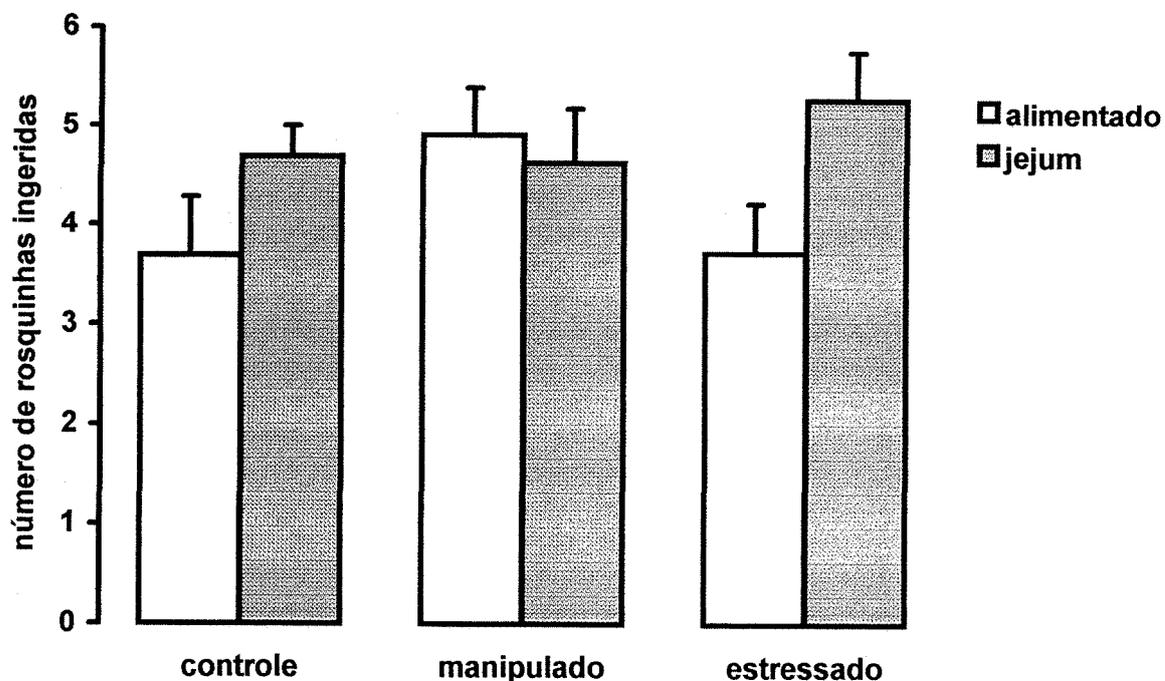


Figura 14. Efeito do estresse crônico variável sobre o comportamento alimentar uma semana após o término do tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Uma semana após o término do tratamento não há diferença significativa entre os grupos, tanto no estado alimentado como em jejum (ANOVA de uma via $F(2,23) = 1,764$, para o estado alimentado, e $F(2, 23) = 0,584$ para o jejum; $p > 0,05$ em ambos os casos, $N = 43$).

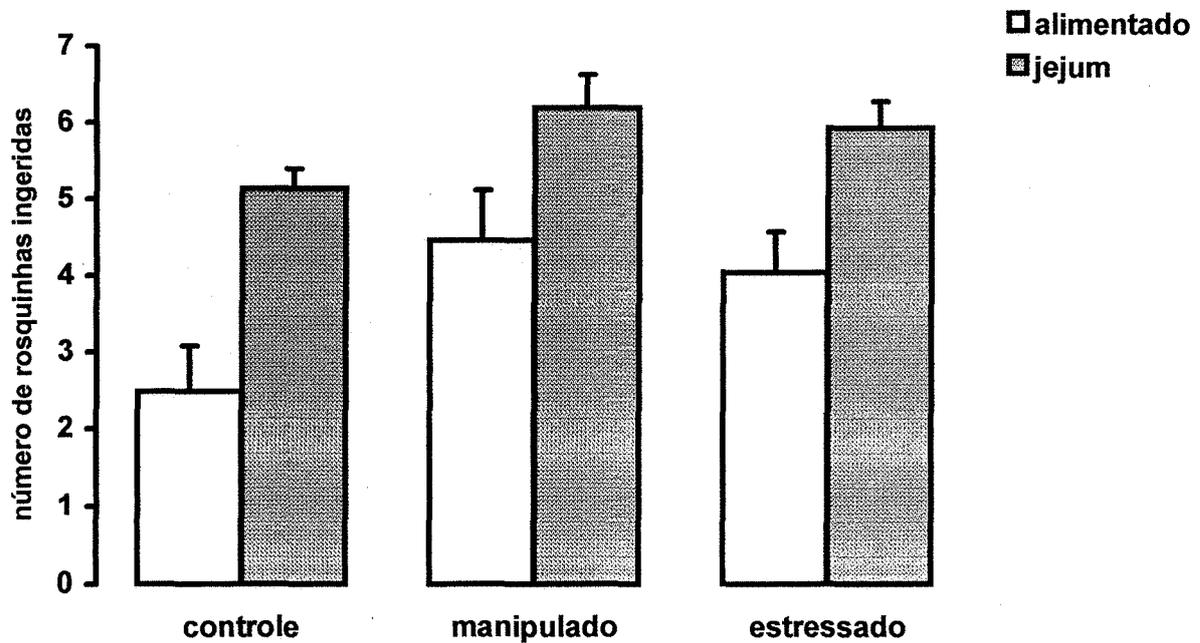


Figura 15. Efeito do estresse crônico variável sobre o comportamento alimentar duas semanas após o término do tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Duas semanas após o término do tratamento não há diferença significativa entre os grupos, tanto no estado alimentado como em jejum (ANOVA de uma via, $F(2,23) = 2,969$, para o estado alimentado, e $F(2, 23) = 2,410$ para o jejum; $p > 0,05$ em ambos os casos, $N = 43$).

2.4 Medida de Resposta Nociceptiva (Tail Flick)

Para avaliação de resposta nociceptiva, os animais foram submetidos a uma primeira medida a fim de familiarizá-los com o procedimento (Netto et al, 1985). Esta medida não foi utilizada. Nos dias que se seguiram, foram realizadas duas medidas: logo após o término do tratamento, isto é, após 40 dias de Estresse Crônico Variável, e duas semanas após o tratamento ter sido descontinuado, a fim de verificarmos se as alterações persistiam ou não.

Os dados apresentaram distribuição normal. Portanto, foram utilizados testes paramétricos para análise dos resultados.

Logo após o final do tratamento houve uma diminuição significativa do tempo para retirada da cauda nos grupos manipulado e estressado em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$, $N = 24$) (Figura 16).

Conforme pode-se observar na Figura 17, duas semanas após o término do tratamento, o efeito permanece somente no grupo estressado (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$).

Assim pode-se dizer que os animais estressados apresentaram uma diminuição na latência de retirada da cauda (diminuição do limiar da dor) que permanece por duas semanas após o término do estresse.

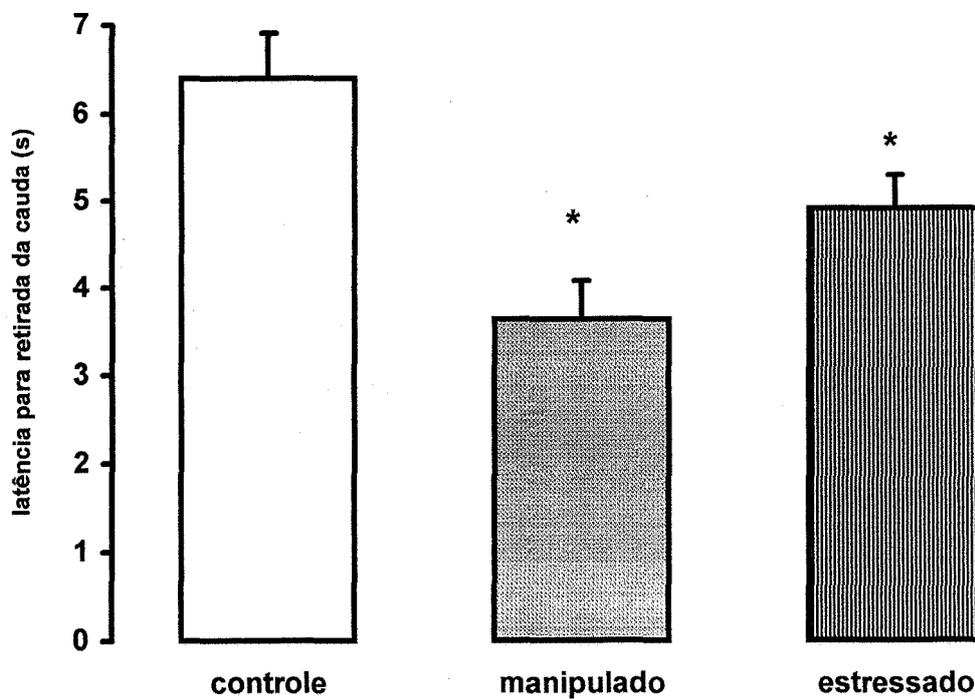


Figura 16. Efeito do estresse crônico variável sobre a resposta nociceptiva logo após o término do tratamento. Os animais estressados e manipulados apresentaram uma diminuição na latência para retirada da cauda. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Existe diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2, 23) = 9,727$; $p \leq 0,001$, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, $N = 24$).

* Diferença significativa em comparação com o grupo controle (teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

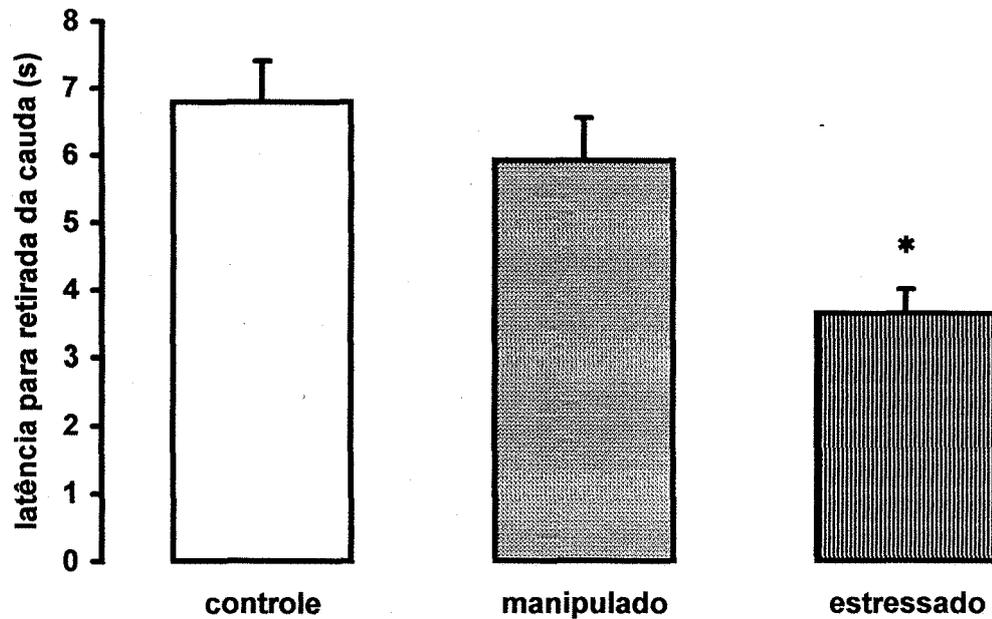


Figura 17. Efeito do estresse crônico variável sobre a resposta nociceptiva duas semanas após o término do tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Existe diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via $F(2,23) = 8,525$, $p \leq 0,001$, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, $N = 24$).
* Diferença significativa em comparação com os demais grupos (teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

2.5 Exposição ao Campo Aberto

A tarefa de exposição ao campo aberto foi realizada a fim de avaliarmos o comportamento dos animais em um ambiente novo. Tomaram-se como medidas as respostas de orientação, (*rearings*), que são consideradas uma medida do comportamento de exploração do novo ambiente, e os cruzamentos (passagem de um quadrado para outro) que o animal fazia durante um período de 5 minutos. Também foram analisados o número de bolos fecais e o tempo para o animal deixar o primeiro quadrado e iniciar a exploração do ambiente novo.

Conforme se pode observar na Tabela II, os animais estressados não diferem dos animais controle em relação a qualquer desses parâmetros: respostas de orientação (*rearings*), número de cruzamentos, número de bolos fecais e tempo para deixar o primeiro quadrado (ANOVA de uma via; $p > 0,05$, $N= 47$).

Tabela II. Efeito do estresse crônico variável sobre o desempenho na tarefa de Campo Aberto, nos seguintes parâmetros: A) respostas de orientação, (*rearings*) B) cruzamentos, C) número de bolos fecais e D) latência para deixar o primeiro quadrado. Dados expressos como média \pm erro padrão da média.

	A	B	C	D
Controle	15,19\pm3,23	28,19\pm5,27	3,88\pm0,45	31,06\pm18,45
Manipulado	13,67\pm2,46	28,07\pm4,32	4,60\pm0,59	45,27\pm21,35
Estressado	10,31\pm1,79	24,75\pm5,48	5,25\pm0,68	32,38\pm18,29

Não existe diferença entre os grupos em nenhum dos parâmetros estudados (ANOVA de uma via, $F(2, 46) = 0,962$ para "rearings"; $F(2,46) = 0,149$ para cruzamentos; $F(2, 46) = 1,433$ para número de bolos fecais e $F(2, 46) = 0,1612$ para latência para deixar o primeiro quadrado; $p > 0,05$ para todos os casos, $N = 47$).

3. Medidas Bioquímicas

3.1 Medida da Glicemia

As medidas glicêmicas foram realizadas em diferentes tempos após exposição dos animais ao estresse crônico. Uma das medidas foi realizada 24h após a última sessão de estresse (glicemia basal) e outra (com outro grupo de animais), logo após exposição a um estressor. Foram escolhidos dois agentes estressores (natação forçada por 10 minutos e imobilização por 1h) para a realização das medidas glicêmicas imediatamente após o estresse aplicado. A escolha deve-se ao fato de ser a imobilização um tipo de estresse em que o animal permanece sem poder se movimentar durante um tempo determinado, enquanto durante o estresse de natação o animal permanece em constante movimentação. Assim sendo, este último estressor deve acarretar um aumento no consumo da glicose liberada pela ação hiperglicemiante dos hormônios do estresse. A escolha destes dois agentes estressores deve-se também às características distintas de cada um, sendo o estresse de imobilização considerado um estresse de caráter emocional enquanto que o de natação é de um caráter físico. A fim de compararmos as diferentes respostas desencadeadas por agentes estressores de características distintas, o estresse agudo pode demonstrar a resposta desencadeada por diferentes agentes estressores no organismo.

No tratamento crônico, a glicemia basal (24h após à última sessão de estresse) é igual para os 3 grupos. Conforme se pode observar na

Figura 18, não existe diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $p > 0,05$, $N= 23$ animais). O mesmo ocorre quando a glicemia é medida imediatamente após estresse por natação (ANOVA de uma via, $p > 0,05$, $N= 23$) e imobilização (ANOVA de uma via, $p > 0,05$, $N=22$) (Figura 19).

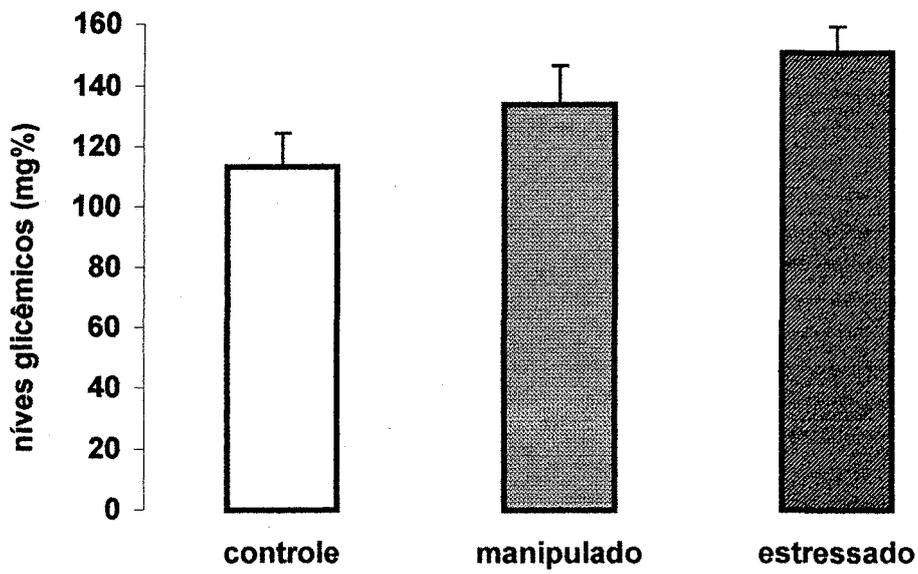


Figura 18. Efeito do estresse crônico variável sobre a glicemia avaliada 24h após a última sessão de estresse (glicemia basal). Não existe diferença entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2,22) = 3,101$, $p > 0,05$, $N = 23$).

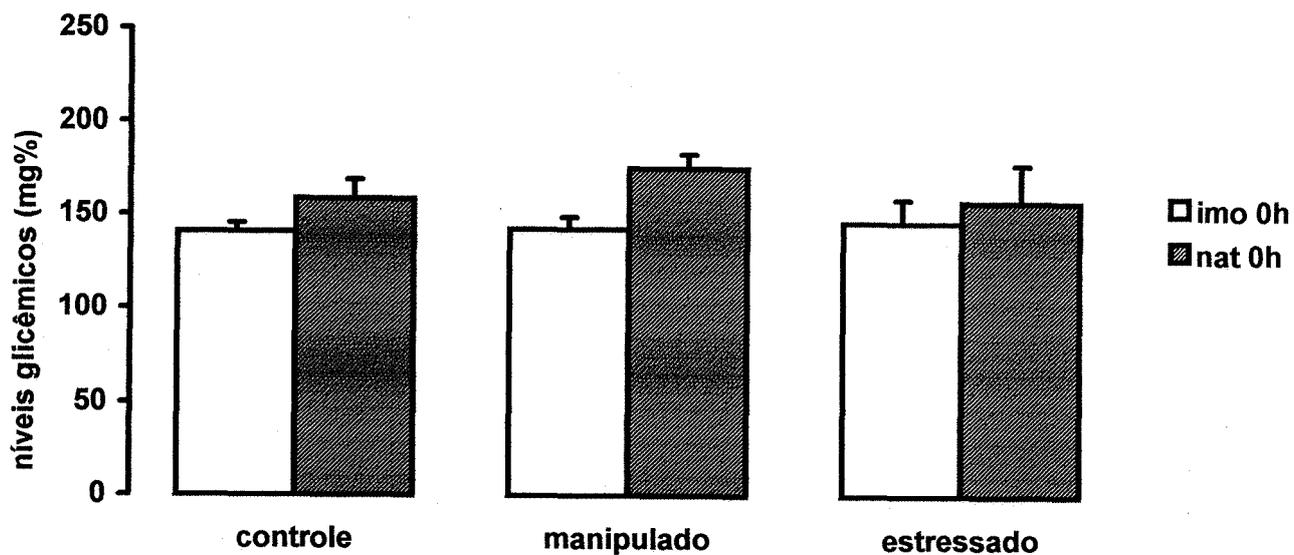


Figura 19. Efeito do estresse crônico variável sobre a glicemia dos animais imediatamente após o último estresse (natação (nat 0h) N= 23 ou imobilização (imo 0h) N= 22. Não houve diferença entre os grupos, seja utilizando imobilização, seja utilizando natação como agente estressor (ANOVA de uma via; $F(2, 22) = 0,710$, para natação, e $F(2, 21) = 0,097$, para imobilização; $p > 0,05$ em ambos os casos).

Com a finalidade de compararmos os efeitos da exposição aguda e crônica variável, também foram realizadas medidas glicêmicas após uma única sessão de estresse (estresse agudo), mantendo-se os mesmos agentes estressores (imobilização e natação forçada), em dois tempos diferentes: imediatamente e 24h após exposição ao estresse.

No caso do estresse agudo, onde o animal é submetido a uma única sessão de estresse, observou-se que a glicemia dos animais estressados é mais alta e difere significativamente daquela dos controles (teste t de Student para amostras independentes, $p \leq 0,001$), quando as medidas são realizadas imediatamente após a sessão de imobilização $N = 14$ (Figura 20). Quando a glicemia é medida 24h após o estresse, os níveis já retornaram à normalidade (teste t de Student para amostras independentes, $p > 0,05$ $N= 9$)(Figura 20).

Na Figura 21 podemos observar que a glicemia medida imediatamente após natação forçada não apresentou diferença significativa em relação à do grupo controle (teste t de Student para amostras independentes, $p > 0,05$, $N= 13$). O mesmo ocorre na avaliação realizada 24h após (teste t de Student para amostras independentes, $p > 0,05$, $N= 15$). Provavelmente, no caso do estresse agudo por natação forçada, o animal, ao mesmo tempo que libera glicose, a consome pelo exercício físico.

O tratamento crônico parece levar a uma habituação do organismo ao estresse, ao contrário do que ocorre com animais expostos a uma única sessão de estresse. Possivelmente, os animais submetidos ao estresse agudo estão liberando maior quantidade de hormônios hiperglicemiantes.

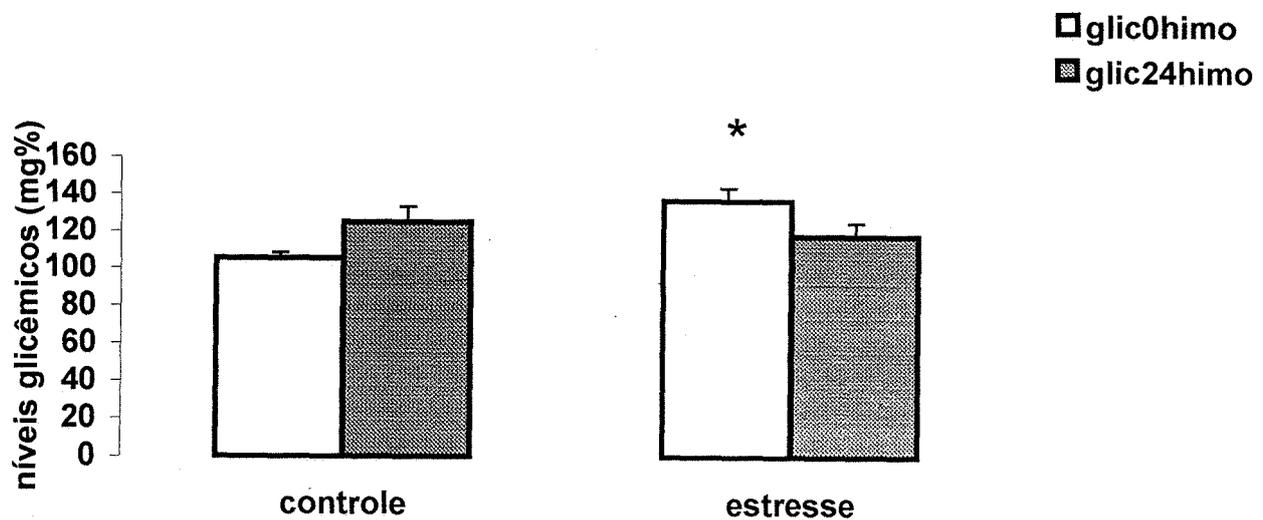


Figura 20. Efeito do estresse agudo sobre a glicemia avaliada imediatamente (glic0himo) N= 14 e 24h após exposição ao estresse de imobilização por 1h.(glic24himo) N= 9 Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Não houve diferença significativa 24 h após a realização do estresse ($t(7) = 0,54$; $p > 0,05$).

*Significativamente diferente do grupo controle (teste t de Student para amostras independentes, $t(12) = 4,13$, $p < 0,001$).

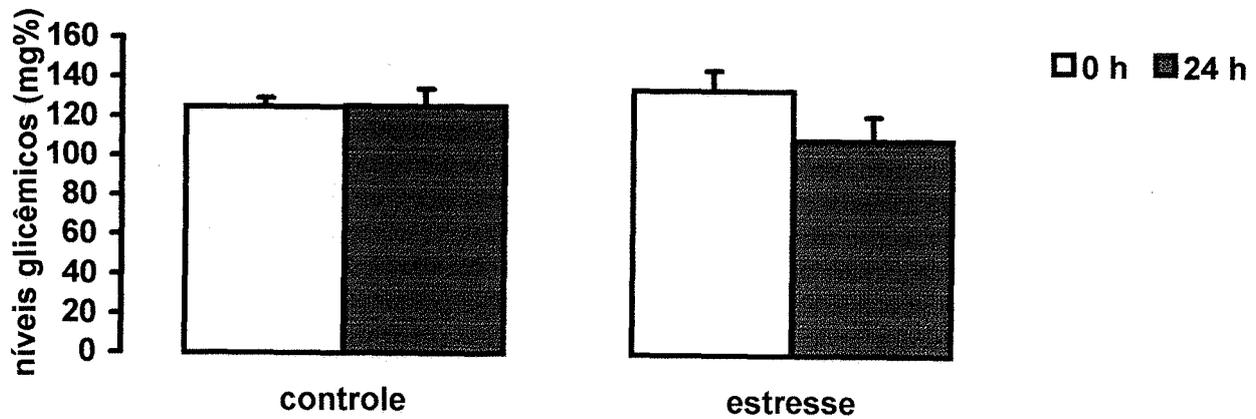


Figura 21. Efeito do estresse agudo sobre a glicemia avaliada imediatamente N=13 e 24h após exposição ao estresse por natação (10 min) N = 15. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Não existe diferença significativa entre os grupos (teste t de Student para amostras independentes; $t(11) = 0,79$ para 0h após e $t(13) = 1,04$ para 24h após; $p < 0,05$ em ambos os casos).

3.2 Medida da Corticosterona Plasmática

As medidas de corticosterona foram realizadas com a finalidade de verificarmos se ocorre habituação ao Estresse Crônico Variável quanto à liberação daquele hormônio. Assim sendo, no modelo de estresse crônico, foram feitas determinações de corticosterona no plasma 24h após exposição à última sessão de estresse (basal) (N=23) e imediatamente após sessão de natação forçada por 10 minutos (N=23) ou imobilização por 1h (N= 22). No modelo de estresse agudo, isto é, quando os animais foram submetidos uma única vez ao agente estressor, a corticosterona foi medida imediatamente após uma sessão de natação ou de imobilização.

No caso do tratamento crônico, 24h após exposição à última sessão de estresse, não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via; $p > 0,05$) (Figura 22). Na medida realizada imediatamente após a sessão de natação, não há diferença significativa dos níveis de corticosterona entre os grupos (ANOVA de uma via; $p > 0,05$) (Figura 23). Contudo, os níveis de corticosterona imediatamente após imobilização são significativamente diferentes (ANOVA de uma via, $p < 0,01$, seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$). Os animais estressados cronicamente apresentaram um aumento nos níveis de corticosterona em comparação com o grupo manipulado, mas não em comparação com o grupo controle. O grupo manipulado apresenta níveis de corticosterona menores do que os apresentados pelos animais dos grupos estressado e controle (ANOVA de uma via, $p < 0,01$, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) (Figura 24).

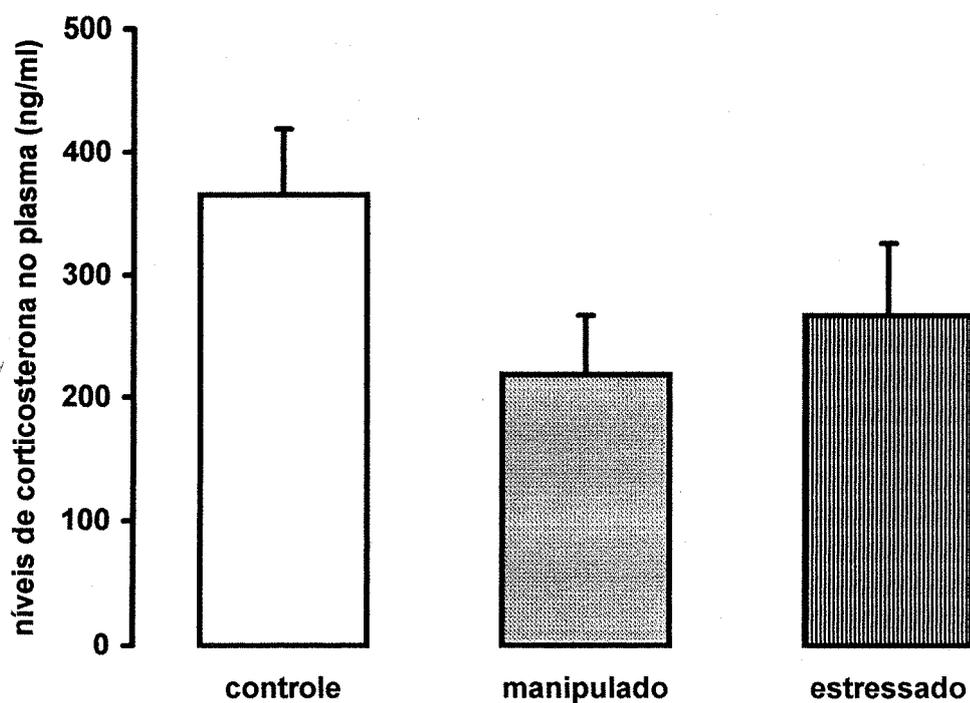


Figura 22. Efeito do estresse crônico variável sobre os níveis plasmáticos de corticosterona avaliados 24h após exposição à última sessão de estresse (níveis basais, N = 21). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Não existe diferença entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2, 20) = 1,665$; $p > 0,05$, N= 23).

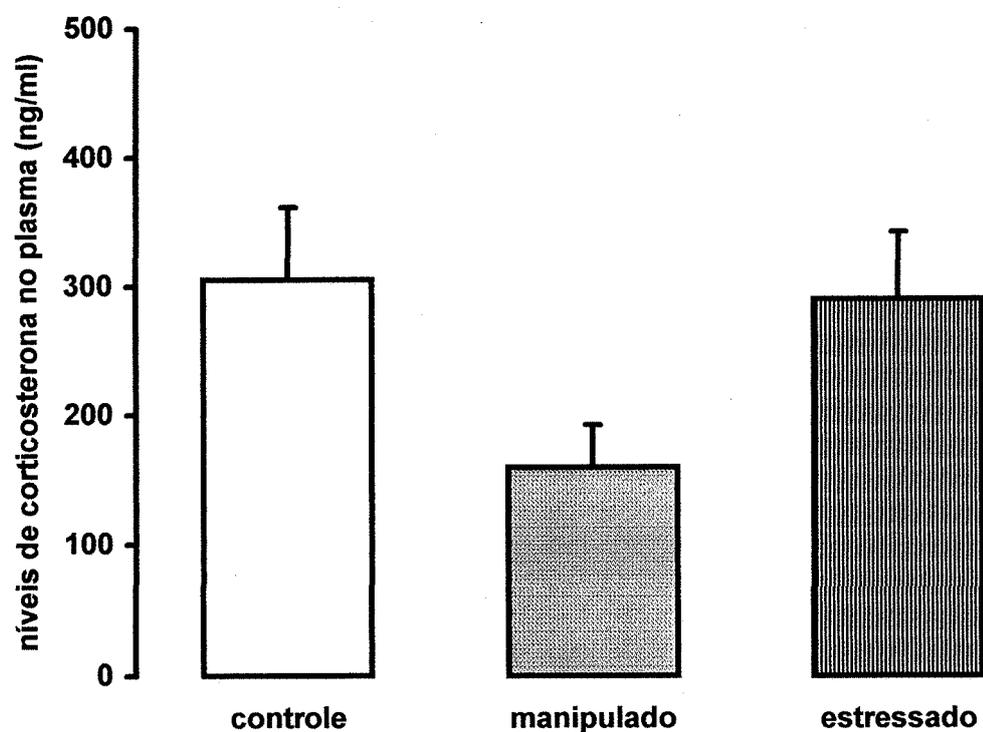


Figura 23. Efeito do estresse crônico variável sobre os níveis plasmáticos de corticosterona medidos imediatamente após a última exposição ao estresse (natação por 10 min) N= 21. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Não existe diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2, 20) = 3,476$; $p > 0,05$).

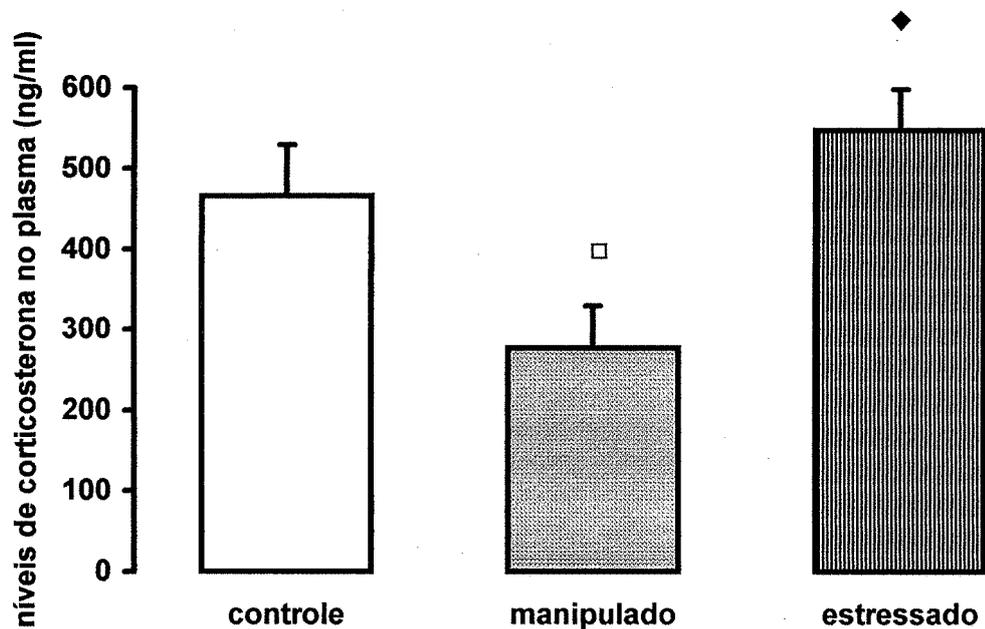


Figura 24. Efeito do estresse crônico variável sobre os níveis plasmáticos de corticosterona medidos imediatamente após a última exposição ao estresse (imobilização por 1h) N= 22. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Existe diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2, 21) = 5,370$; $p < 0,01$ seguida de teste de Student-Newman-Keuls).

□ Diferença significativa em relação aos grupos estressado e controle (teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

◆ Diferença significativa em relação ao grupo manipulado (teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

No modelo de estresse agudo, os níveis de corticosterona imediatamente após natação forçada apresentaram diferença significativa quando comparamos animais estressados com controles (teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,005$) (Figura 25). Os animais estressados agudamente apresentaram níveis mais altos de corticosterona em comparação com os controles. O mesmo ocorre com os níveis de corticosterona avaliados imediatamente após imobilização, onde os níveis dos animais estressados também diferem significativamente daqueles do grupo controle (teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,005$) (Figura 26). Este aumento foi de cerca de 100% no caso do estresse por imobilização e de cerca de 150% no caso do estresse por natação forçada.

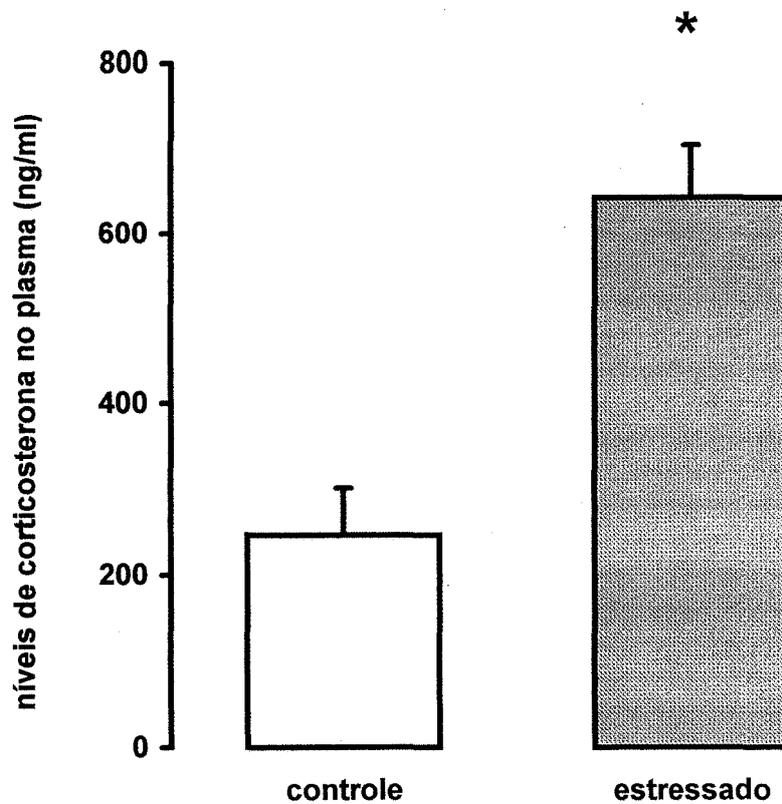


Figura 25. Efeito do estresse agudo sobre os níveis plasmáticos de corticosterona medidos imediatamente após natação durante 10 min. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. N=13

* Diferença significativa em relação ao grupo controle (teste t de Student para amostras independentes, $t(11) = 4,67$, $p < 0,001$).

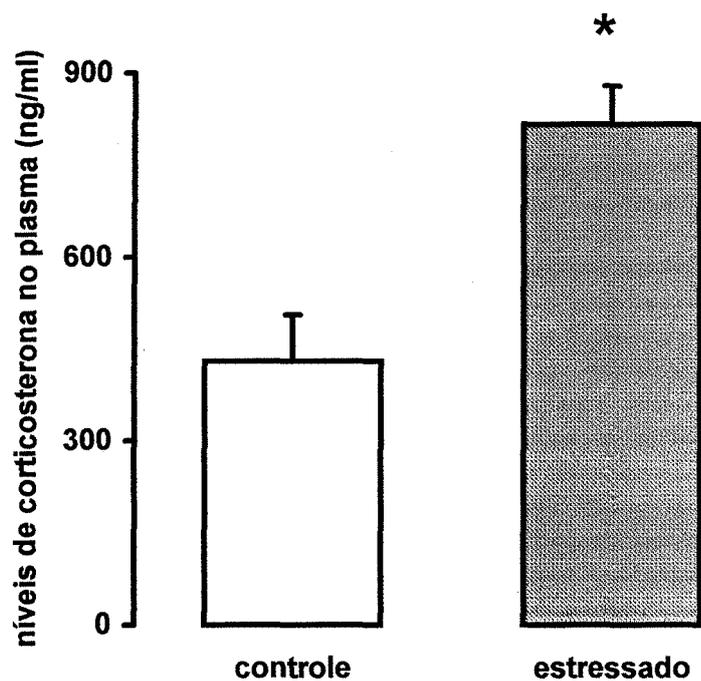


Figura 26. Efeito do estresse agudo sobre os níveis plasmáticos de corticosterona medidos imediatamente após à imobilização durante 1 h. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. N=14

* Diferença significativa em relação ao grupo controle (teste t de Student para amostras independentes $t(12) = 3,95$; $p < 0,005$).

Uma análise de variância (seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls) nos mostra que os níveis de corticosterona nos modelos de estresse crônico e agudo imediatamente após natação, apresentam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos controle nos dois modelos. Os animais estressados somente uma vez (modelo agudo) apresentam níveis mais elevados de corticosterona, e esta diferença é estatisticamente significativa. Este resultado pode ser interpretado como um tipo de adaptação, causada pela liberação continuada de glicocorticóides na circulação, acarretando uma resposta ao agente estressor diferente daquela do estresse agudo.

Comparamos também os níveis de corticosterona entre os dois tipos de tratamento (crônico e agudo), mas tomando outro agente estressor, a imobilização. Os animais imobilizados uma única vez apresentam níveis de corticosterona diferentes dos níveis observados em animais estressados cronicamente (teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos controle nos dois modelos. Os níveis de corticosterona dos animais estressados cronicamente são significativamente maiores em relação aos níveis dos animais manipulados (teste de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Assim sendo, animais submetidos ao estresse por natação ou imobilização após um regime de estresse crônico não apresentam as mesmas variações nos níveis destes hormônios quando comparados a animais submetidos aos mesmos estressores agudamente:

Pode-se sugerir que a manipulação diária dos animais pode causar uma modulação na resposta do organismo ao estresse. Os manipulados apresentaram níveis mais baixos de corticosterona em comparação com os estressados e controles. O animal estressado cronicamente responde ao estresse de imobilização com níveis elevados de corticosterona, embora menores do que o animal submetido uma única vez a este tipo de estresse. O fato de ocorrer um aumento nos níveis de corticosterona nos animais controle, o que torna os dados sem diferença significativa quando este grupo é comparado ao grupo estressado, pode ser devido ao estresse de manipulação diferenciada causado aos animais controle, assim como outras variáveis que podem ter causado estresse no dia da coleta do material.

3.3 Catecolaminas

Foram medidos os níveis de noradrenalina e dopamina em 4 regiões cerebrais: córtex frontal, hipocampo, amígdala e hipotálamo, de animais dos grupos controle e estressado cronicamente. As medidas foram feitas por HPLC 24h após a última exposição ao estresse. Os níveis de noradrenalina não diferiram em ratos estressados comparados com controles em todas as estruturas analisadas (teste t de Student para amostras independentes, $p > 0,05$ para todas estruturas) (Figura 27). Os níveis de dopamina apresentaram o mesmo comportamento da noradrenalina, porém, no córtex frontal, existe diferença significativa na quantidade

desta catecolamina, com um aumento nos animais estressados em relação aos controles. Os animais estressados apresentaram maiores níveis de dopamina no córtex frontal (teste t de Student para amostras independentes, $p > 0,05$ para todas amostras, exceto córtex, quando $p < 0,05$) (Figura 28).

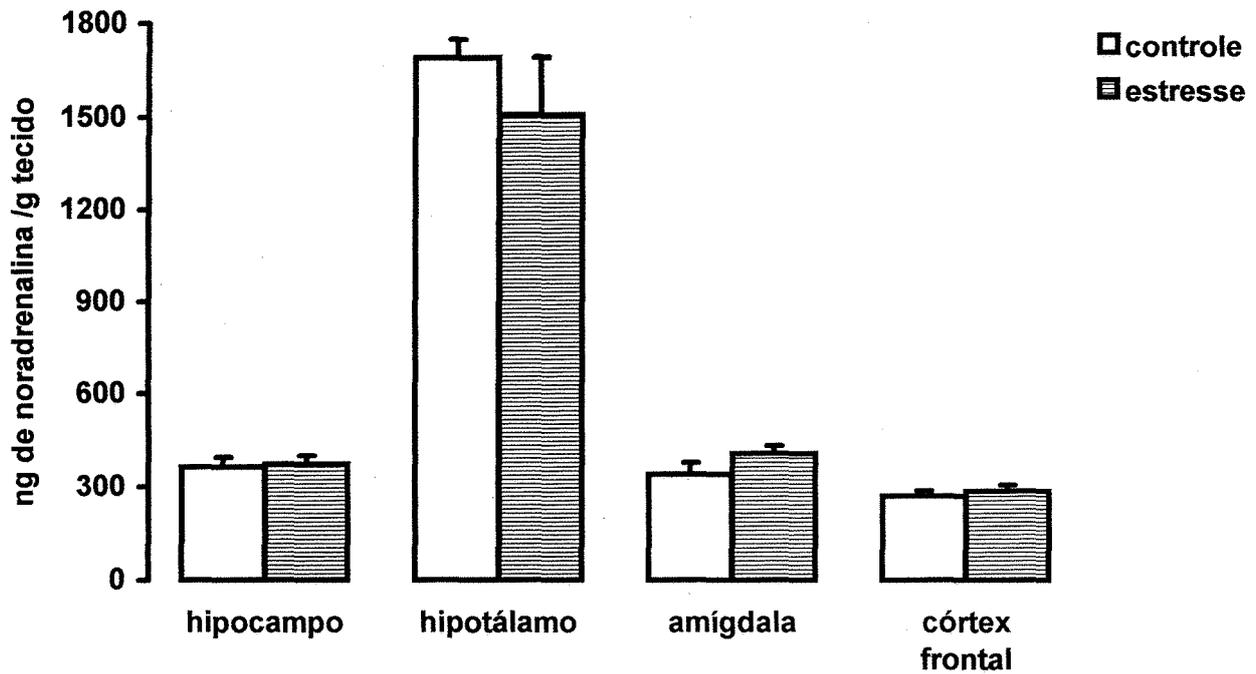


Figura 27. Efeito do estresse crônico variável sobre os níveis de noradrenalina de diferentes estruturas cerebrais medidos 24h após exposição à última sessão de estresse. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Não existe diferença entre os grupos nas quatro estruturas analisadas (teste t de Student para amostras independentes: para hipocampo, $t(17) = 0,18$; para hipotálamo, $t(16) = 0,95$; para amígdala, $t(18) = 1,47$; para córtex frontal, $t(16) = 0,59$; $p > 0,05$ para todos os casos). $N=75$

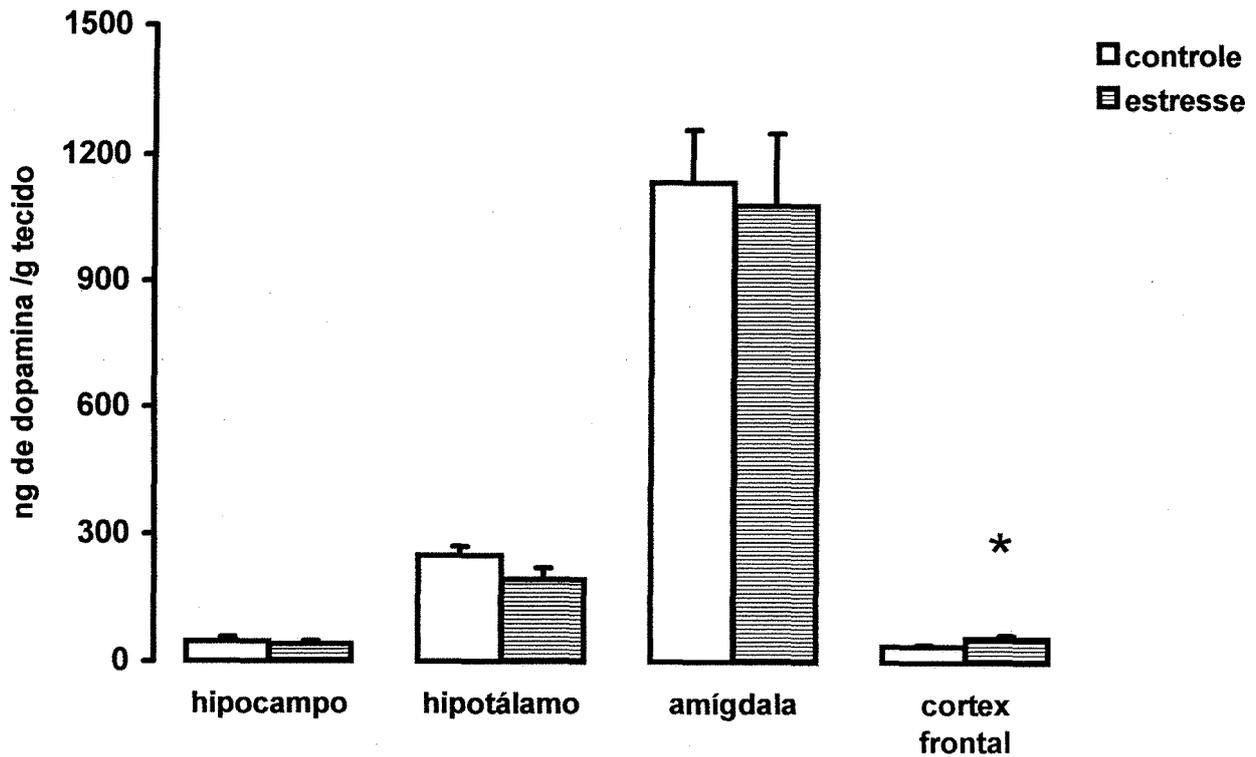


Figura 28. Efeito do estresse crônico variável sobre os níveis de dopamina de diferentes estruturas cerebrais medidos 24h após exposição à última sessão de estresse. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Não existe diferença entre os grupos em três das quatro estruturas analisadas (teste t de Student para amostras independentes: para hipocampo, $t(16) = 0,52$; para hipotálamo, $t(16) = 1,61$; para amígdala, $t(18) = 0,26$; $p > 0,05$ para as três estruturas). $N=74$

* Diferença significativa em relação ao grupo controle (teste t de Student para amostras independentes, $t(16) = 2,25$; $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de um novo modelo de estresse crônico em nosso laboratório foi importante para melhor caracterização das respostas do organismo a diferentes tipos de estresse.

O modelo de estresse crônico por imobilização tem como característica principal a previsibilidade, ou seja, pressupõe-se que o animal acaba aprendendo que será submetido a um mesmo agente estressor por um tempo fixo, durante uma frequência fixa. Alguns autores acreditam que a previsibilidade é um determinante crítico nas respostas comportamentais e fisiológicas de animais submetidos a estresse crônico, as quais podem ser "mascaradas" (Konarska et al., 1990), ou seja, habituadas, ou sensibilizadas. A repetida exposição de um animal a um agente estressor pode resultar em habituação ou sensibilização da resposta ao agente estressor (Pitman et al., 1988).

Os indivíduos podem ser submetidos a um tipo de estresse o qual tenha como característica a imprevisibilidade. São estímulos característicos da vida moderna que podem causar alterações neuroendócrinas em um organismo alterando sua homeostasia. Por esta razão torna-se importante estudar os efeitos deste tipo de estresse, que apresenta como principal característica a imprevisibilidade, a fim de analisar os tipos de resposta do organismo em relação a essas situações.

Para implantação do novo modelo de estresse em nosso laboratório, foi necessária a análise de uma série de parâmetros, como peso corporal

dos animais ao início e ao término do tratamento, ingestão de ração e água e peso das adrenais. Sabe-se que os glicocorticóides, entre outros hormônios liberados em situações de estresse, têm como uma de suas funções a estimulação da conversão de proteínas em glicose e seu armazenamento na forma de glicogênio, ou seja, os glicocorticóides mobilizam proteínas das reservas musculares, aumentando a entrada de aminoácidos liberados na via da gliconeogênese hepática, e a conversão de piruvato em glicogênio (Marks et al., 1996). Se os glicocorticóides forem liberados continuamente, como é o caso de um estresse crônico, seus efeitos podem tornar-se deletérios, pois irá ocorrer uma contínua depleção das proteínas corporais, o que pode causar uma diminuição de peso nos animais estressados.

O comportamento de animais estressados também pode variar em consequência da liberação contínua dos glicocorticóides, resultante de um estresse prolongado, causando danos em neurônios hipocâmpais (Sapolsky, 1986). Sendo o hipocampo uma estrutura do cérebro relacionada com os processos de aprendizado e memória envolvido com informações espaciais, foi analisado o comportamento destes animais em relação a tarefas de memória e em um ambiente novo. Além disso, existem evidências que demonstram a influência dos hormônios liberados em resposta ao estresse (além dos glicocorticóides, adrenalina, vasopressina, ACTH, opióides) na modulação da memória, facilitando ou inibindo estes processos, dependendo da quantidade liberada (Gold & van Buskirk, 1978; Izquierdo & Dias, 1983 a,b; Armario et al., 1990; Tizabi & Aguilera, 1992; Almeida & Izquierdo, 1984; David et al., 1973; Gold, 1981; Dilsaver et al., 1986).

Outros parâmetros comportamentais, como ingestão de alimento doce e resposta nociceptiva, foram também analisados.

Medidas bioquímicas, como níveis de glicose no plasma, catecolaminas em diferentes estruturas cerebrais e níveis plasmáticos de corticosterona, foram realizadas para auxiliar a interpretação das respostas do organismo ao estresse.

1. Estabelecimento do Modelo de Estresse Crônico Variável

1.1. Peso Corporal

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que, no modelo de estresse crônico por imobilização, ao avaliarmos a evolução do peso corporal durante o tratamento, não existem diferenças entre o peso corporal dos animais submetidos ao estresse crônico em comparação com animais controle. Apenas observa-se uma diferença na evolução de peso, onde os animais estressados ganham peso de maneira diferente dos controles. Todos os grupos ganham peso, porém o grupo estressado ganha peso de maneira mais lenta (Ely et al., 1997).

Dados da literatura relatam que, em alguns modelos, o peso corporal de animais submetidos ao tratamento de estresse crônico variável é menor em comparação com aquele dos animais controle e dos animais submetidos ao estresse crônico por imobilização (Konarska et al., 1990).

Em nosso modelo, os animais apresentaram peso corporal semelhante no início do tratamento, enquanto que, ao final do tratamento, podemos observar que os animais submetidos ao estresse crônico variável apresentaram menor peso corporal em comparação com os demais grupos, como demonstrado na Figura 7. Neste parâmetro, os resultados diferem do encontrado no modelo de estresse crônico por imobilização (Xavier, 1995), ao mesmo tempo em que é coerente com estudos de outros laboratórios (Martí et al., 1993; Martí et al., 1994).

1.2 Consumo de Ração e de Água

O menor peso corporal dos animais submetidos ao estresse crônico variável, em comparação com os demais grupos, poderia ser talvez resultante de uma diminuição na ingestão de ração. Não foi, porém, o que se observou. Na Figura 8 demonstramos que não existe diferença significativa em relação ao consumo de ração entre os grupos. Todos consomem ração de maneira semelhante.

Ao analisarmos o consumo de água ao longo do tratamento, o resultado foi o mesmo do item acima descrito. Não existe diferença significativa em relação ao consumo de água nos grupos estudados.

Esses resultados concordam com dados da literatura (Echandia et al., 1988), sugerindo que os animais estressados cronicamente não apresentam diferença no consumo de ração e água, apesar de apresentarem menor peso corporal ao final do tratamento. A diminuição do peso corporal nos animais estressados pode ser devido a uma alteração do metabolismo energético.

As catecolaminas são liberadas pelo sistema simpático-adrenal, o que é ativado em situações de estresse agudo e crônico (Marks et al., 1996). Essas atuam em receptores α e β adrenérgicos, no fígado, no músculo esquelético, no adipócito e nas células α e β do pâncreas, influenciando diretamente o metabolismo energético do organismo. O resultado de sua ação é a mobilização de combustíveis de seus sítios de armazenamento para oxidação em células, fornecendo a energia requerida por situações de estresse crônico e agudo (Marks et al., 1996). As catecolaminas suprimem a secreção de insulina, o que faz com que o fluxo de energia continue direcionado para a utilização pelo tempo em que persista o estímulo estressante. Soma-se a isso os efeitos das catecolaminas no coração e vasos sanguíneos, com um aumento nos batimentos cardíacos e a utilização destes combustíveis para tecidos ativos metabolicamente (Marks et al., 1996).

Glicocorticóides, como o cortisol, o principal glicocorticóide endógeno nos seres humanos, e a corticosterona, no rato, são liberados também em resposta ao estresse. Uma cascata neuroendócrina é ativada para a síntese de cortisol, o qual será liberado na circulação pelo córtex da adrenal em resposta ao estímulo fornecido pelo ACTH. Os efeitos dos glicocorticóides incluem diversas ações e afetam a maioria dos tecidos, como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, em relação ao seu metabolismo energético.

Em muitos tecidos, os glicocorticóides diminuem a síntese proteica, inibindo os processos de transcrição do DNA e RNA (Nichols et al., 1990) e estimulam a degradação destas macromoléculas. Em resposta ao estresse, os

glicocorticóides atuam fazendo com que os combustíveis fiquem disponíveis. Um alarme agudo, sinalizado pela liberação de adrenalina, faz com que o organismo possa lutar ou escapar. Quando os glicocorticóides estão elevados, a captação de glicose por diversas células e tecidos está inibida, ocorre lipólise no tecido adiposo e proteólise na pele, nas células linfóides e no músculo. Os ácidos graxos são liberados e oxidados pelo fígado para obtenção de energia e glicerol e aminoácidos servem como substrato para o fígado produzir glicose. Todos estes efeitos poderiam levar a uma diminuição do peso corporal.

1.3. Peso das Adrenais

O peso das adrenais foi medido ao final do tratamento. A relação entre o peso da adrenal, em mg, e o peso corporal, em gramas (A/C), foi analisada.

Os animais submetidos ao estresse crônico variável apresentaram maior relação A/C em comparação com os demais grupos (Figura 10). Portanto, os animais submetidos àquele tratamento apresentaram um aumento relativo na glândula adrenal, o que pode ser devido a uma hipertrofia na secreção dos seus hormônios, uma vez que, em situações de estresse, ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Kiss e Aguilera 1993; Michelson et al., 1995).

Este resultado é semelhante ao encontrado por nosso grupo em outro modelo de estresse crônico e por outros pesquisadores (Xavier, 1995; Marti et al., 1993; Giaume et al., 1995).

2. Efeito do Estresse Crônico Variável sobre o Desempenho dos Animais em Diferentes Tarefas Comportamentais

Os hormônios liberados durante o estresse podem influenciar os processos de aprendizado e armazenamento da memória (Gamaro et al., 1997, Armario et al., 1988, Gold e Van Buskirk, 1978). O ACTH e a adrenalina são hormônios que apresentam uma curva dose-resposta em U invertido, ou seja, doses baixas têm um efeito facilitatório, enquanto que doses mais altas podem prejudicar a memória (Izquierdo e Dias, 1983a; Izquierdo e Dias, 1983b; Almeida e Izquierdo, 1984). A contínua liberação de glicocorticóides em resposta ao estresse crônico pode acarretar danos aos neurônios hipocampais, pois esta estrutura do cérebro tem grande quantidade de receptores para estes hormônios, tornando-se assim um tecido alvo para sua ação. Sabe-se que os glicocorticóides inibem a captação de glicose nestes neurônios, tornando-os mais suscetíveis a insultos neurológicos (Horner et al., 1990; Sapolsky, 1986). Os glicocorticóides também ativam a neurotransmissão glutamatérgica, podendo apresentar efeito neurotóxico causado pelo estresse (Moghaddam et al., 1994). O hipocampo é importante estrutura relacionada com processos de aprendizado e memória (Izquierdo, 1989; Jarrad, 1993).

2.1 Esquiva Inibitória

Dados da literatura têm mostrado que os glicocorticóides atuam nos neurônios hipocampais causando lesões, deixando a estrutura mais suscetível a

danos. Sendo assim, o hipocampo não funciona bem e o animal pode vir a apresentar déficits de memória.

Trabalhos relatam que o estresse crônico por imobilização por 30 dias causa uma hipoatividade do sistema colinérgico, o que causa deficiência de memória (Zerbit e Laborit, 1990). Sabe-se, porém, que o estresse pode gerar respostas metabólicas marcadamente diferentes de acordo com a sua natureza e sua intensidade (Giaume et al 1995).

Conforme resultados apresentados na Figura 11, os animais submetidos a 40 dias de Estresse Crônico Variável apresentaram memória adequada para a tarefa. Pode-se sugerir uma adaptação de componentes fisiológicos e emocionais do estresse, ou que o estresse crônico tal como utilizado nesta Dissertação, simplesmente não interfere com o aprendizado e a memória. Não se sabe, se agudamente estes agentes estressores alterariam a memória, embora sejam conhecidos os efeitos de hormônios liberados pelo estresse agudo sobre os processos relacionados à consolidação da memória (McEwen & Sapolsky, 1995; Dantzer, 1993; Gold & McCarty, 1981; Almeida & Izquierdo, 1984).

2.2. Esquiva Ativa de Duas Vias

Esta é uma tarefa de caráter aversivo, assim como a Esquiva Inibitória, e pode ser considerada como um agente estressor, pois o animal é exposto a uma situação inesperada e ao receber choque libera uma série de hormônios. Dependendo do nível da resposta a esse estresse, este pode ser facilitador ou inibidor

de processos de memória (Gold e Van Buskirk, 1978). Nesta tarefa, os animais estressados apresentaram memória adequada para a tarefa, assim como os controles e manipulados, conforme demonstrado na Figura 12.

Existem trabalhos relacionando os níveis de noradrenalina liberada em animais submetidos ao estresse crônico em resposta a uma exposição a um novo estresse. O rato adaptado ao estresse crônico, quando em situação de um estresse novo, aumenta a ativação do sistema em níveis similares ao de ratos controle (Nisenbaum, 1991).

2.3. Ingestão de Alimento Doce

O comportamento alimentar reflete uma interação entre o estado fisiológico do organismo e as condições ambientais. Os centros hipotalâmicos tomam parte do amplo complexo de interações neuroregulatórias, que incluem sistemas periféricos de saciedade (hormônios gastrintestinais e pancreáticos liberados pela ação da comida ao atravessar o trato gastrointestinal) e a extensa rede neural afetando o comportamento alimentar em nível cerebral (Halmi, 1995).

Os efeitos do estresse sobre o comportamento alimentar têm sido estudados em animais submetidos ao estresse por imobilização ou à exposição a um ambiente novo. Estes modelos experimentais costumam estudar o papel de neurotransmissores centrais, neuropeptídeos e a fisiologia periférica e o metabolismo no comportamento alimentar. A noradrenalina administrada no núcleo paraventricular produz um efeito estimulante sobre o apetite, através da ligação com os receptores

α_2 adrenérgicos Antidepressivos tricíclicos estimulam a ingestão de comida pela ativação do sistema noradrenérgico no núcleo paraventricular (Halmi, 1995). A noradrenalina, quando injetada neste núcleo, causa um aumento na ingestão de alimentos ricos em carboidratos. Já os receptores β_2 adrenérgicos do hipotálamo perifornical inibem o comportamento alimentar quando estimulados.

Experimentos realizados por Hoebel em 1979, utilizando injeções no núcleo paraventricular, demonstram os efeitos da serotonina na facilitação da saciedade. A serotonina injetada periféricamente e centralmente, no núcleo paraventricular, suprime a ação induzida pela noradrenalina. Wurtmans, em 1979, demonstrou a existência de um mecanismo de *feedback* dos carboidratos ingeridos e um aumento na síntese de serotonina no cérebro de ratos. O aumento da ingestão de carboidratos aumenta a quantidade de triptofânio no sangue, o que facilita a passagem deste aminoácido, precursor da serotonina, através da barreira hematoencefálica, facilitando assim a síntese de serotonina.

Existem também evidências da ação dos sistemas dopaminérgico e de opióides endógenos no comportamento alimentar (Halmi, 1995). O CRH é um neuropeptídeo que pode atuar no núcleo paraventricular inibindo o comportamento alimentar. A contínua infusão de CRH produz uma perda de peso corporal associada com uma diminuição na ingestão de alimento e aumento na termogênese. Este fato pode explicar a diminuição do peso corporal nos animais estressados.

A exposição a uma variedade de agentes estressores leves caracteriza este tratamento crônico. A exposição dos animais a este tipo de tratamento

causa um decréscimo no consumo de soluções fracamente adoçadas com sacarose ou sacarina , acompanhado por um decréscimo nas propriedades de recompensa (Muscat e Willner, 1992). O tratamento de Estresse Crônico Variável pode ser considerado um modelo de depressão em animais, por causar alteração nos sistemas relacionados com recompensa (Papp et al.,1991; Willner et al.,1987). Este efeito é revertido por drogas antidepressivas administradas durante a aplicação do estresse (Muscat e Willner, 1992).

Resultados de nosso laboratório demonstraram que o estresse crônico por imobilização teve um efeito ansiogênico nos animais submetidos ao tratamento de estresse. Os animais, ao serem expostos a tarefa de ingestão de alimento doce, ingeriram maior quantidade de alimento doce em comparação com os demais grupos. Este efeito foi revertido por um ansiolítico, o diazepam (Ely et al., 1997).

Ao término de 40 dias de Estresse Crônico Variável, os animais foram submetidos à mesma tarefa descrita por Ely et al. (1997). Os animais estressados ingeriram menor quantidade de alimento doce, tanto no estado alimentado quanto em jejum, como observa-se na Figura 13. Uma semana após o término do tratamento (Figura 14), os animais foram expostos novamente à tarefa. Não se observou diferença significativa no consumo de alimento doce entre os grupos. Observou-se o mesmo comportamento duas semanas após o término do tratamento, conforme é mostrado na Figura 15. O efeito de diminuição do consumo de alimento doce só ocorreu logo após o término do tratamento. Deve-se lembrar que, como

descrito em Material e Métodos, nos períodos de aplicação das tarefas comportamentais, os animais continuam sendo submetidos ao estresse. O efeito perdura somente concomitantemente ao estresse. As medidas após o término deste demonstraram que o efeito desaparece, pelo menos após duas semanas.

O Estresse Crônico Variável determina não só uma diminuição no consumo de soluções de sabor adocicado, mas também uma diminuição no consumo de alimento doce. Isto pode ser devido a uma contínua liberação de CRH, causada pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Sabe-se que este hormônio tem ação de inibir a ingestão de alimento; por outro lado, a noradrenalina, também liberada em situações de estresse, embora cause um aumento preferencial na ingestão de carboidratos, quando injetada no núcleo paraventricular, apresenta ação inibitória através de seus receptores β_2 adrenérgicos.

A ingestão de carboidratos é acompanhada por um aumento de triptofânio, acarretando um aumento da síntese de serotonina. Por outro lado, injeção de serotonina demonstrou modular mecanismos de saciedade, e sabe-se que o Estresse Crônico Variável, pela ação dos hormônios corticosteróides, altera os mecanismos de transmissão serotoninérgica, estimulando a síntese e o *turnover* da serotonina, promovendo atividade da enzima triptofânio hidroxilase, responsável pelos processos de síntese de serotonina (Nishi e Azmitia, 1996; Malyszko et al., 1994).

Podemos sugerir que, logo após o término do estresse, os animais ingeriram menor quantidade de alimento doce por estarem produzindo maior quantidade de serotonina, causada pela liberação contínua de glicocorticóides, ou de outros

hormônios, como CRH e noradrenalina, por exemplo, que alteram o sistema serotoninérgico. Uma ou duas semanas após o término do tratamento, o efeito desaparece. Podemos sugerir que este efeito na diminuição do consumo de alimento doce seja causado pelo estresse e pelos hormônios liberados nesta situação. Mais estudos deverão ser realizados a fim de elucidar melhor as relações entre estresse, comportamento alimentar e sistema serotoninérgico.

2.4 Medida da Resposta Nociceptiva

O estresse induz analgesia como uma resposta adaptativa do organismo, que ocorre tanto em animais de laboratório quanto em seres humanos (Menendez et al, 1993). Porém, a maioria dos dados envolvendo os efeitos do estresse sobre a resposta analgésica foi obtida em modelos de estresse agudo. Neste caso, o estresse agudo induz analgesia, a fim de que o indivíduo possa lidar com esta situação de modo apropriado, ou seja, sentir menos dor, para poder lutar ou fugir. Pouco se sabe sobre os efeitos do estresse crônico sobre a nocicepção.

Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que os animais submetidos ao estresse por imobilização apresentavam uma resposta hiperalgésica (apresentavam diminuição no limiar da dor), em comparação com os animais estressados por imobilização agudamente, que apresentavam analgesia (Gamero et al., 1998).

A exposição repetida a um mesmo evento aversivo pode levar a processos de adaptação àquele estímulo (Gamero et al., 1998). Têm-se sugerido que

diferentes sistemas de neurotransmissores apresentem um papel nesses processos tais como mudanças adaptativas nos sítios aminérgicos, modulação opióide, função colinérgica e gabaérgica (Gamaro et al., 1998). Repetidas exposições a situações de estresse causam modificações na resposta comportamental opióide e em respostas fisiológicas à administração colinérgica (Zerbib e Laborit, 1990). A ativação de sistemas analgésicos endógenos pode mediar a indução de analgesia no estresse agudo, tendo um papel crítico na modulação de respostas de defesa em relação ao agente estressor, a fim de manter a integridade física (Dantzer,1993). O estresse induzindo analgesia é um fenômeno heterogêneo, desde que diferentes estressores ativam diferentes substratos analgésicos, incluindo tipos opióides/não opióides ou hormonal/não hormonal. Diferentes formas do estresse induzir analgesia parecem estar associadas com diferentes estratégias de lidar com a situação de estresse.

Na Figura 16, mostra-se a medida de *tail-flick* logo após o término do tratamento. Os animais do grupo estressado apresentaram o mesmo efeito de hiperalgesia encontrado no estresse crônico por imobilização, sendo que o grupo manipulado também apresentou hiperalgesia na medida realizada logo após o término do tratamento. A fim de avaliarmos a duração do efeito hiperalgésico, duas semanas após o término do estresse, os animais foram submetidos novamente à medida de latência de retirada da cauda (Figura 17). Os animais estressados permaneceram hiperalgésicos, enquanto que os manipulados apresentaram comportamento igual ao do grupo controle. Podemos sugerir que a exposição ao estresse repetido, seja de imobilização, seja variável, causa alterações no metabolismo opióide e/ou em outros

sistemas. Estas alterações são uma forma de adaptar o organismo à situação de estresse, acarretando mudanças comportamentais.

2.5 Exposição ao Campo Aberto

Esta tarefa foi realizada com o objetivo de avaliarmos a atividade motora dos animais e seu comportamento em relação a um ambiente novo. Dados da literatura relatam que a exposição ao estresse variável pode induzir depressão (Willner, 1991; Ferreti et al., 1995). Entre os efeitos da depressão está a anedonia. Em estudos com animais a diminuição do consumo de alimento doce pode ser considerada anedonia, assim como a alteração nos comportamentos de recompensa. De acordo com Willner (1991), a exposição habitual ao estresse, que ocorre diariamente, mas que não pode ser prevista, produz uma apatia perante o ambiente. Observa-se nos animais cronicamente estressados uma redução na atividade locomotora e menos respostas de orientação (Ferreti et al., 1995). O número de bolos fecais demonstra a atividade de defecação do animal e dados da literatura demonstram que este é um parâmetro similar em todos os grupos (Echandia et al 1988).

Foram analisados os seguintes parâmetros: número de cruzamentos, número de bolos fecais, número de respostas de orientação e latência para o animal deixar o primeiro quadrado. Não houve diferença significativa entre os grupos. O grupo estressado apresentou menor número de respostas de orientação e cruzamentos em comparação com os demais grupos, porém esta diferença não foi significativa.

Existem relatos sobre animais expostos a estresse crônico variável, que mostram uma diminuição na exploração de um *hole board* e na performance no teste de natação forçada (Echandia et al., 1988; Garcia-Marquez e Armario, 1987). Mudanças na atividade locomotora podem ser devidas à presença do fenômeno de *up regulation*, com um aumento no número de receptores β -adrenérgicos e 5HT₂ nos animais estressados cronicamente. Os processos de regulação de receptores estão baseados em suas propriedades dinâmicas em resposta a estímulos de hormônios ou de neurotransmissores. Quando existe um aumento na densidade de receptores denomina-se *up regulation*, enquanto uma diminuição é denominada *down regulation*. (Ferreti et al., 1995). No nosso estudo, porém, não houve diferenças na atividade locomotora e em nenhum dos outros parâmetros analisados.

3. Medidas Bioquímicas

3.1 Medidas dos níveis plasmáticos de glicose e corticosterona

Estes dois parâmetros serão discutidos ao mesmo tempo para que se tenha uma visão integrada da resposta dos hormônios ao estresse. Os hormônios liberados em resposta ao estresse apresentam a ação clássica de serem hiperglicemiantes. Os glicocorticóides estimulam a conversão de proteínas em glicose e seu armazenamento em forma de glicogênio. Os glicocorticóides mobilizam as proteínas do músculo, acarretando um aumento de aminoácidos que entram no fígado para produzir glicose através da via gliconeogênica (Marks et al., 1996). Esta glicose irá suprir a glicemia após a degradação completa do glicogênio hepático, que tem esta

função. O glicogênio hepático, em situações de estresse, é ativado através da liberação de adrenalina que exerce a mesma função do glucagônio, sinalizando a necessidade de glicose para tecidos periféricos. Sendo a adrenalina a resposta imediata do organismo ao estresse (McEwen e Sapolsky, 1995), as reservas glicogênicas do fígado já estarão sendo degradadas quando os glicocorticóides começarem sua ação. Por esta razão, a glicemia passa a ser um parâmetro de medida indireta da ação dos hormônios liberados em situações de estresse. Existem trabalhos demonstrando o envolvimento do sistema colinérgico hipocampal nos processos de glicorregulação. A ativação colinérgica pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo aumento da secreção de adrenalina e hiperglicemia (Tajima et al, 1996). Porém a ativação deste sistema colinérgico hipocampal está relacionada à exposição ao estresse crônico por imobilização.

Dados na literatura sugerem que a glicemia seja também um índice que podemos utilizar para avaliar a intensidade do estresse e a habituação do animal a esta situação (Armário et al., 1990).

Foram medidos os níveis plasmáticos de corticosterona nos animais submetidos ao estresse, a fim de complementar nossas análises de medidas glicêmicas e avaliarmos sua interrelação.

Primeiramente, realizamos experimentos em relação ao estresse agudo. Foram escolhidos dois agentes estressores: imobilização por 1h e natação forçada por 10 minutos, estressores estes que apresentam características diferentes. As medidas de corticosterona foram realizadas imediatamente após exposição ao

estresse. Para medida da glicemia utilizaram-se medidas imediatamente e 24h após exposição ao estresse. Como observa-se na Figura 20, a glicemia dos animais expostos a uma única sessão de estresse por imobilização apresentou um aumento significativo em comparação com aquela dos animais controle, na medida realizada imediatamente após o estresse. Os níveis glicêmicos 24h após o estresse não apresentaram diferença entre os grupos.

Os níveis de corticosterona na medida realizada imediatamente após uma única sessão de estresse por imobilização apresentam diferença significativa entre os grupos (Figura 26). Ou seja, no estresse agudo por imobilização ocorre um aumento nos níveis glicêmicos quando a medida é realizada imediatamente após, enquanto que, 24h após o estresse, este aumento desaparece, tornando os níveis glicêmicos dos animais estressados iguais aos dos controles. Os níveis de corticosterona também diferem entre os grupos na medida realizada imediatamente após o estresse. Pode-se sugerir que o aumento na glicemia seja devido à liberação de adrenalina, responsável pela primeira resposta do organismo ao estresse através da ativação do sistema nervoso simpático. Os níveis de corticosterona também apresentam-se aumentados, demonstrando a resposta do organismo ao estresse pela liberação de corticosterona, concordando com o aumento da glicemia, causado não só pela ação da adrenalina mas também pela corticosterona. Já os animais submetidos a uma única sessão de estresse por natação forçada não apresentaram diferença na glicemia, tanto imediatamente quanto 24h após o estresse, enquanto que os níveis de corticosterona apresentaram um aumento significativo nos animais estressados em

comparação com os controles na medida realizada imediatamente após a exposição ao estresse agudo. Os níveis glicêmicos imediatamente após o estresse não diferiram entre os grupos, porém a corticosterona nos animais estressados está aumentada, significando que o eixo hipotálamo-hipófise adrenal está ativado em resposta ao estresse, liberando entre outros hormônios a corticosterona, que provavelmente acarretou um aumento na glicemia que não foi detectado, pois o estresse de natação é um exercício físico e este requer energia. Portanto, supõe-se que a glicose liberada na circulação pela ação da adrenalina e da corticosterona está sendo consumida rapidamente pelos tecidos para obtenção de energia para realização de exercício físico, no caso o estresse por natação.

No tratamento de estresse crônico variável também foram realizadas medidas glicêmicas e dos níveis de corticosterona em diferentes tempos. Analisaram-se os níveis basais tanto de glicose quanto de corticosterona (24h após o estresse), a fim de avaliarmos se ocorre alguma alteração destes níveis causada pela contínua exposição a agentes estressores pela cronificação do tratamento. Foram também realizadas medidas imediatamente após o término do estresse crônico, sendo o último agente estressor natação ou imobilização. Esta escolha foi em função da possibilidade de avaliar se as respostas dos animais submetidos ao estresse crônico são diferentes dos animais submetidos ao estresse agudo em relação aos mesmos agentes estressores.

Na Figura 18 observa-se que os níveis glicêmicos basais não diferem entre os grupos. O mesmo observa-se na Figura 22, os níveis basais de

corticosterona não diferem entre os grupos. Este resultado nos sugere que não há qualquer alteração no metabolismo em relação aos níveis basais de corticosterona e de glicose em resposta ao estresse crônico.

Os animais submetidos ao estresse crônico, nas medidas realizadas imediatamente após os estresses de natação e imobilização, conforme observado na Figura 19, não apresentaram diferenças entre os grupos para os dois agentes estressores, em relação aos níveis glicêmicos. No caso dos níveis de corticosterona, imediatamente após imobilização, os animais estressados apresentaram maiores níveis em comparação com os manipulados, mas não em comparação com os controles. Por outro lado, imediatamente após natação não houve diferença entre os grupos, mas existe uma grande tendência dos animais do grupo estressado apresentarem um maior nível de corticosterona.

Assim sendo, a cronificação do estresse não acarreta uma completa habituação ao estresse, visto que, imediatamente após imobilização, os animais estressados apresentam maior quantidade de corticosterona no plasma, embora a glicemia seja igual em todos os grupos. Dados da literatura demonstram que os glicocorticóides inibem a captação de glicose por vários tecidos (Sapolsky et al., 1985; Sapolsky, 1986; Horner et al., 1990). Esperar-se-ia um aumento da glicose circulante, o que não foi observado. É possível que o organismo desenvolva mecanismos para compensar este estresse crônico, onde estariam envolvidos outros hormônios relacionados com a mobilização de glicose.

Ao analisarmos os níveis de corticosterona dos animais estressados observa-se que a diferença nos níveis de corticosterona imediatamente após imobilização foi em relação ao grupo manipulado. O estressado apresenta maior quantidade de corticosterona do que o manipulado. Pode-se sugerir que o estresse de manipulação diária, durante 40 dias, seja de pouca intensidade e possa causar uma adaptação na liberação dos hormônios, de forma que os animais manipulados respondem com menores níveis de corticosterona em comparação com controles e estressados. Trabalhos realizados por outros autores como Sapolsky (1997) e Liu e colaboradores (1997) demonstram que a manipulação neonatal pode influenciar a liberação de hormônios do estresse. Os animais submetidos a manipulação neonatal quando adultos respondem a um agente estressor com uma menor liberação dos hormônios do estresse. Diante deste dado podemos supor que a manipulação tenha causado o mesmo efeito apesar dos animais receberem a manipulação já na fase adulta. Por outro lado, o fato de que há diminuição nos níveis de corticosterona do grupo manipulado em relação ao grupo controle pode significar que a própria manipulação, no momento do experimento, funcione como um estresse leve para estes animais. Existem dados da literatura que analisam vários parâmetros comportamentais e hormonais em relação à manipulação dos animais (Gärtner et al, 1980).

Quando comparamos as respostas em relação aos níveis de corticosterona imediatamente após natação dos animais submetidos ao estresse crônico variável, com as respostas dos animais submetidos ao estresse agudo, estes últimos apresentam níveis mais elevados de corticosterona. Esta diferença é

significativa. Sugerimos que a contínua exposição dos animais cronicamente estressados tenha causado uma adaptação, ou uma dessensibilização destes animais, acarretando níveis menores de glicocorticóides quando expostos a um agente estressor, embora, como colocado acima, esta adaptação não seja completa.

Ao compararmos também as respostas ao estresse de imobilização tanto no tratamento crônico quanto no agudo, o mesmo se observou, ou seja, os animais agudamente estressados respondem ao estresse liberando maior quantidade de hormônio do que os animais cronicamente estressados. Porém é importante ressaltar que os animais cronicamente estressados apresentam níveis mais altos de corticosterona em comparação com animais manipulados.

3.2. Medidas das Catecolaminas

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal também libera as catecolaminas adrenalina e noradrenalina, e estas podem assumir papéis de hormônio ou de neurotransmissores, dependendo de sua localização no sistema nervoso periférico ou no sistema nervoso central. A dopamina, precursora da noradrenalina, tem atividade biológica periférica no rim e função de neurotransmissor em muitas rotas importantes do sistema nervoso central. Não só a localização é fator que diferencia a ação das catecolaminas como neurotransmissores ou hormônios. Os neurônios catecolaminérgicos contêm várias enzimas responsáveis pela síntese de neurotransmissores como por exemplo a tirosina hidroxilase, responsável por catalisar o primeiro passo da síntese de catecolaminas, convertendo tirosina em um precursor

da dopamina, que será convertido em dopamina pela ação de outra enzima no caso DOPA carboxilase. Os neurotransmissores são sintetizados e armazenados em grandes concentrações em terminais simpáticos, e são liberados quando estes terminais são estimulados (Levitan e Kaczmarek, 1991).

Neurônios noradrenérgicos estão situados no *locus coeruleus* e projetam-se para córtex cerebral e hipocampo, entre outras estruturas. Estudos relatam que os efeitos do estresse repetido sobre os níveis de noradrenalina dependem da natureza do estressor e da região estudada (Stanford, 1993). Existem evidências demonstrando aumento na síntese de noradrenalina com a repetição do estresse no córtex cerebral e hipocampo (Adell et al., 1988) e alguns estudos incluíam também o hipotálamo (Anisman et al., 1987).

Estudos demonstraram que ocorre *downregulation*, uma diminuição nos receptores β adrenérgicos do córtex, quando o animal é exposto repetidamente ao estresse. Dados da literatura são contraditórios em relação ao estresse crônico variável e alterações em receptores noradrenérgicos.

As catecolaminas, dopamina e noradrenalina, foram analisadas em quatro estruturas cerebrais: hipotálamo, hipocampo, amígdala e córtex frontal. As estruturas foram escolhidas por apresentarem inervações do sistema dopaminérgico e noradrenérgico, e por apresentarem importância sob vários aspectos da resposta ao estresse e efeitos deste sobre o organismo. As medidas foram realizadas 24h após a última exposição ao estresse crônico variável.

Na Figura 27 observa-se que não existe diferença significativa quanto aos níveis de noradrenalina entre os grupos estressado e controle nas 4 estruturas estudadas. Sabe-se que o estímulo estressante aumenta a atividade de neurônios, aumentando a liberação de noradrenalina, porém a resposta do animal ao estímulo estressante é complexa e depende do tipo do estressor (Fleckenstein et al., 1994b). Apesar de dados da literatura relatarem um aumento nos níveis de noradrenalina, em situações de estresse agudo, devido a ativação do *locus coeruleus* (Anisman et al., 1987). Assim como no estresse crônico ocorre um aumento em seus níveis basais no córtex e hipocampo (Adell, 1988; Anisman et al., 1987). Porém, não encontramos este efeito. Deverão ser realizados mais estudos em relação ao estresse crônico variável, pois pouco se sabe a respeito dos níveis de catecolaminas centrais neste modelo.

Na Figura 28 estão demonstrados os níveis de dopamina nas 4 estruturas estudadas. Não existe diferença entre os grupos em quaisquer das estruturas, exceto no córtex frontal, onde os níveis de dopamina estão aumentados nos animais estressados. Existem dados na literatura que indicam um aumento na atividade dos neurônios dopaminérgicos que projetam-se para o núcleo *accumbens*, o que aumenta a liberação de dopamina também nesta estrutura (Fleckenstein et al., 1994a).

Estudos em relação ao estresse agudo demonstram um aumento nos níveis de noradrenalina no córtex medial pré-frontal, enquanto os níveis de serotonina e dopamina não mudam. Entretanto, quando o mesmo estresse é repetido

no dia seguinte, o animal responde com aumento nos níveis de noradrenalina e dopamina, o que sugere uma sensibilização do sistema das catecolaminas no estresse repetido (Jordam et al., 1994).

O aumento nos níveis de dopamina no córtex pode ser devido a um aumento na sua síntese ou a uma diminuição em sua biotransformação, como por exemplo, inativação da enzima dopamina β -hidroxilase, que transforma dopamina em noradrenalina. Existem relatos sugerindo que a modulação dos receptores dopaminérgicos seja importante determinante da resposta ao estresse, porém existem dificuldades em detectar a ligação dos receptores D_2 no córtex pré-frontal (Stanford, 1993). Outro aspecto a ser considerado é a importância dos neurônios dopaminérgicos na sensibilidade em relação à intensidade do agente estressor (Stanford, 1993).

Portanto o modelo de Estresse Crônico Variável causa uma diminuição no peso corporal dos animais sem alteração do consumo de ração e água. Ocorre um aumento no peso das glândulas adrenais acompanhado de um aumento nos níveis de corticosterona, embora a glicemia não se apresente aumentada (talvez uma adaptação). Não ocorrem mudanças sobre a memória nas tarefas realizadas nesta dissertação, e também não ocorrem alterações na atividade locomotora e atividade exploratória. Ocorre uma diminuição do limiar da dor nos animais e um decréscimo no consumo de alimento doce. Os níveis de dopamina encontram-se elevados no córtex frontal e os níveis de noradrenalina nas quatro regiões do cérebro estudadas permaneceram inalterados.

CONCLUSÕES

1. Os animais submetidos ao Estresse Crônico Variável apresentaram uma diminuição no peso corporal ao final do tratamento, porém o consumo de ração e água foi igual ao dos animais controle. Esta perda de peso pode ser devida à liberação contínua de glicocorticóides, em resposta ao tratamento crônico.

2. Os animais cronicamente estressados apresentaram um aumento na relação peso da glândula adrenal/peso corporal, sugerindo uma produção aumentada de glicocorticóides, provavelmente decorrente de repetida ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta ao estresse.

3. Durante o estresse agudo, os níveis glicêmicos foram mais altos nos animais submetidos ao estresse por imobilização, na medida realizada logo após o estresse. Os animais submetidos ao estresse agudo por natação não diferiram dos demais grupos. Sugere-se que a glicose no plasma daqueles animais está sendo utilizada durante o exercício físico para obtenção de energia. Já os níveis glicêmicos dos animais submetidos ao estresse crônico variável não mostraram alterações basais. As medidas realizadas imediatamente após natação e imobilização também não apresentaram diferença em comparação com os demais grupos. Os animais cronicamente estressados responderam de maneira diferente dos animais estressados agudamente. Pode -se sugerir uma habituação ao estresse.

4. Os níveis de corticosterona nos animais submetidos ao estresse agudo, imediatamente após imobilização e natação, demonstraram um aumento significativo. Por outro lado, nos animais submetidos ao estresse crônico variável, os níveis basais não diferiram entre os grupos e somente na medida realizada imediatamente após imobilização houve diferença entre os grupos; observou-se, porém, um aumento não significativo imediatamente após natação.

5. Os animais submetidos ao Estresse Crônico Variável não apresentaram alteração de memória nas tarefas de Esquiva Inibitória e Esquiva Ativa de Duas Vias.

6. Os animais estressados cronicamente e os manipulados apresentaram uma diminuição no limiar da dor, que persistiu, no caso dos estressados, duas semanas após o término do tratamento.

7. Ao analisarmos o comportamento alimentar em relação ao alimento doce, os animais estressados ingeriram menor quantidade de alimento doce em comparação com os demais grupos. Uma semana após o término do tratamento, o efeito desaparece.

8. Na tarefa comportamental de Exposição ao Campo Aberto, os animais estressados demonstraram um comportamento semelhante ao dos controles, sugerindo uma habituação ao estresse.

9. Não houve diferença significativa nos níveis de noradrenalina nas quatro estruturas cerebrais estudadas, córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e amígdala, enquanto que a dopamina só apresentou aumento no córtex frontal.

REFERÊNCIAS

- ADELL, A. ; GARCIA-MARQUEZ, C.; ARMÁRIO, A. GELPI, E. Chronic stress increase serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *Journal of Neurochemistry* **50**: 1678-81, 1988.
- AKIL, H. A.; MORANO, M. I. Stress IN: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J.(eds) *Psychopharmacology: the fourth generation of progress* New York, Raven Press Ltd., 1995, p. 773-85 . ;.
- ALMEIDA, M. A. M. R. & IZQUIERDO, I. Effect of the intraperitoneal and intracerebroventricular administration of ACTH, epinephrine or β -endorphin on retrieval of an inhibitory avoidance task in rats. *Behavioral and Neural Biology*, **40**: 119-22.,1984.
- ANISMAN, H. Neurochemical changes elicited by stress behavioral correlates IN: ANISMAN, H.; BIGNAMI, G. (eds), *Psychopharmacology of Aversively Motivated Behavior*, New York, Plenum , 1978, 200 pp.
- ANISMAN, H.; IRWIN, J.; BOWERS, W. Variations of norepinephrine concentrations following chronic stressor application. *Pharmacology Biochemical Behavior* **26**: 653-59, 1987.
- ANISMAN, H.; PIZZINO, A. SKLAR, L. S. Coping with stress, norepinephrine depletion and escape performace. *Brain Research*, **191**: 583-88, 1980.

- ARMÁRIO, A.; MARTI, J.; GIL, M. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* **15 (5,6)**: 341-47 ; 1990.
- ARMARIO, A.; MARQUEZ, C. G., GIRALT, M. Previous chronic chlorimipramine treatment did not modify some physiological responses to acute and chronic stress in rats. *Psychopharmacology*, **94**: 217-20, 1988.
- AZMITIA, E. C.; LIAO, B.; CHEN, Y. Increase of tryptophan hydroxylase enzyme protein by dexamethasone in adrenalectomized rat midbrain. *Journal Neuroscience* **13**: 5041-55, 1993.
- AZMITIA, E. C.; McEWEN, B. S.; Corticosterone regulation of tryptophan hydroxylase in midbrain of rat. *Science* **166**: 1274-76, 1969.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. Medula e cortex da supra-renal. IN: BERNE, R. M.& LEVY, M. N. *Principios de Fisiologia*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992, p.498-503,.
- BIANCHIN, M.; WALZ, R.; RUSCHEL, A. C.; ZANATTA, M. S.; DA SILVA, R. C.; BUENO E SILVA, M.; PACZKO, N.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or amygdala several days after training. *Behavioral and Neural Biology*, **59**: 83-6, 1993.
- BIEGON, A.; RAINBOW, T. C.; McEWEN, B. S. Corticosterone modulation of neurotransmitter receptors in rat hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Brain Research* **332**: 309-14, 1985.

- CHALMERS, D. T.; KWAK, S. P.; MANSOUR, A.; AKIL, H.; WATSON, J.
Corticosteroids regulate brain hippocampal 5-HT_{1a} receptor mRNA expression. *The Journal of Neuroscience* **13** (3): 914-23, 1993.
- CHARVAT, J. DELL, P.; FOLKON, B. Mental factors and cardiovascular disorders.
Cardiologia **44**: 124-141, 1964.
- CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; HELMREICH, D. L.; WATSON, S. J. JR. ;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* , Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers 1995, p. 3-26 .
- D'AMOUR, F. E. AND SMITH, D. L. A method for determining loss of pain. *Journal of
Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **72**: 74-9,1941.
- DACHIR S.; KADAR, T.; ROBINZON, B.; LEVY, A.. Cognitive deficits induced in young
rats by long-term corticosterone administration. *Behavioral and Neural Biology*
60: 103-9 ; 1993.
- DACHIR S.; ROBINZON, B.; GRAUER, E.; LEVY, A Nimodipine counteracts
corticosterone-induced habituation impairments. *Neurobiology of Learning and
Memory* **63**: 241-5; 1995.
- DALMAZ, C.; GODOY, M. G. C.; IZQUIERDO, I. Post-training and pretest effects of
adrenocorticotropin on retention: the influence of the hour of the day, the training-
test interval, and pretest naloxone administration. *Behavioral and Neural Biology*,
49: 406-11, 1988.

- DANTZER, R. Coping with stress IN: Stress from Synapse to Syndrome . STANFORD, S. C.; SALMON, P.(eds), San Diego, Academic Press Inc, 1993, p.167-89.
- DAVID, M. C.; KENDALL, J. W.; GREER, M. A.; KRAMER, R. M. The effect of acute or chronic ether stress on plasma ACTH concentration in rat. *Endocrinology* **93 (5)**: 1019-25, 1973.
- de WIED, D. Peptides and Behavior. *Life Sciences*, **20**: 195-204 , 1977.
- DEUTCH, A. Y.; TAM, S. Y.; ROTH, R. H. Footshock and conditioned stress increase 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the ventral tegmental area but not substantia nigra. *Brain Research*, **333**: 143-6, 1985.
- DIAS, R. D & IZQUIERDO, I. Memory modulation by administration of ACTH, adrenaline or β -endorphin after training or prior testing in inhibitory avoidance task in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **16**: 333-7, 1983.
- DILSAVER, S. C.; SNIDER, R. M.; ALESSI, N. E. Stress induces supersensitivity of cholinergic system in rats. *Biological Psychiatry*, **21**: 1093-96, 1986.
- ECHANDIA, E. L. R.; GONZALVES, A. S.; CABRERA, R. AND FRACCHIA, L.N. A further analysis of behavioral and endocrine effects of unpredictable chronic stress. *Physiology & Behavior*, **43**: 789-95, 1988.
- ELY, D. R.; DAPPER, V.; MARASCA, J.; CORRÊA, J. B.; GAMARO, G. D.; XAVIER, M. H.; MICHALOWSKI, M. B.; CATELLI, D.; ROSAT, R.; FERREIRA, M. B. C. AND DALMAZ, C. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiology & Behavior*, **61 (3)**: 395-8, 1997.

- FERREIRA, M. B. C. Papel do sistema gabaérgico, modulado por receptores benzodiazepínicos, sobre a formação da memória em ratos. Porto Alegre, 229 pp. Tese de Doutorado de Ciências Biológicas, com ênfase em Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992.
- FERRETI, C.; BLENGIO, M.; GAMALERO, S. R.; GHI, P. Biochemical and behavior changes induced by acute stress in a chronic variate stress model of depression: the effect of amitriptyline. *European Journal of Pharmacology* **280**: 19-26; 1995.
- FLECKENSTEIN, A. E.; LOOKINGLAND, K. J.; MOORE, K. E. Differential role of histamine in mediating stress-induced changes in central dopaminergic neuronal activity in the rat. *Brain Research* **653**: 267-72, 1994a.
- FLECKENSTEIN, A. E.; LOOKINGLAND, K. J.; MOORE, K. E. Histaminergic neurons mediate restraint stress-induced increases in the activity of noradrenergic neurons projecting to the hypothalamus. *Brain Research* **653**: 273-7, 1994b.
- FRINKELSTEIN, Y.; KOFFLER, B.; RABEY, J. M.; GILAD, G. M. Dynamics of cholinergic synaptic mechanism in the rat hippocampus after stress. *Brain Research*, **343**: 314-9, 1985.
- GAMARO, G. D.; MICHALOWSKI, M. B.; CATELLI, D. H.; XAVIER, M. H.; DALMAZ, C. Effect of repeated restraint stress on memory in different tasks. *Brazilian Journal* (submetido), 1998.

- GAMARO, G. D.; XAVIER, M. H.; DENARDIN, J. D. JR.; PILGER, J. A.; ELY, D. R.; FERREIRA, M. B. C.; DALMAZ, C. The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Psychology & Behavior* **64(4)**: 693-8, 1998.
- GAMARO, G. D.; DENARDIN, J. D. JR.; MICHALOWSKI, M. B.; CATELLI, D.; CORREA, J. B.; XAVIER, M. H.; DALMAZ, C. Epinephrine effects on memory are not dependent on hepatic glucose release. *Neurobiology of Learning and Memory* **68 (3)**: 221-9, 1997.
- GARCIA-MARQUEZ, C.; ARMARIO, A. Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. *Physiology & Behavior* **40**: 33-8, 1987.
- GÄRTNER, K.; BÜTTNER, K.; DÖHLER, R.; FRIEDEL, R.; LINDEMA, J.; TRAUSTSCHOLD, I. Stress response of rat to handling and experimental procedures. *Laboratory Animals* **14**: 267-74, 1980.
- GIAUME, M.; GRANGE, E.; BAUBET, V.; GAY, N.; SERMET, E.; SARDA, N.; BOBILLIER, P. Cerebral protein synthesis alterations in response to acute and chronic immobilization stress in the rat. *Brain Research* **675**: 121-6, 1995.
- GOLD, P. E.; MCCARTY, T.; STENBERG, D. B. Peripheral catecholamines and memory modulation. IN: AJMONE-MARSAN, C. & MATTHINES, H. (eds). *Neuroplasticity and Memory Formation* New York, Raven Press, 1982, p. 327-338.

- GOLD, P. E. Glucose modulation of memory storage processing. *Behavioral and Neural Biology*, **45**: 342-9, 1986.
- GOLD, P. E.; McCARTY, R. Plasma catecholamines: changes after footshock and seizure-producing frontal cortex stimulation. *Behavioral and Neural Biology*, **31**: 247-60, 1981.
- GOLD, P. E.; VAN BUSKIRK, R. Posttraining brain norepinephrine concentrations: correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. *Behavioral Biology*, **23**: 509-20, 1978.
- GOLD, P. E.; HALL, J. L. Memory enhancement with posttraining glucose injections: possible involvement in epinephrine modulation of memory storage. *Behavioral Neural Biology*, **45**: 307-14, 1986.
- GRAEFF, F. G. Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. E.P.U. Editora pedagógica e universitária LTDA. 2ed. 135pp ;1989.
- HALMI, K. A. Basic Biological overview of eating disorders IN: *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress..* FLOYD, E.; KUPFER, D. J. (eds), New York, Raven Press, Ltd., 1995, p. 1609-16.
- HOEBEL, B. G. .Hypothalamic self-stimulation and stimulation escape in relation to feeding and mating *Feeding Protocols* **30**: 2454-61, 1979.

- HORNER, H. C.; PACKAN, D. R. SAPOLSKY, R .M. Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia *Neuroendocrinology* **52**: 57-64 1990.
- IZQUIERDO, I.; DIAS, R. D. Endogenous state-dependency: memory regulation by post-training and pre-testing administration of ACTH, β -endorphin, adrenaline and tyramine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **16**: 55-64, 1981.
- IZQUIERDO, I.; DIAS, R. D. 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, 1983a.
- IZQUIERDO, I.; DIAS, R. D. Memory as a state dependent phenomenon: role of ACTH an epinephrine. *Behavioral and Neural Biology*, **38**: 144-9, 1983b.
- IZQUIERDO, I. Different forms of posttraining memory processing. *Behavioral and Neural Biology*, **51**: 171-202, 1989.
- IZQUIERDO, I. Endogenous state-dependency: memory depends on the neurohumoral and hormonal states present after training and at the time of testing. IN: LYNCH, G.; McGAUGH, J. L.; WEINBERGER, N. H. *Neurobiology of Learning and Memory*. New York, Guilford, , 1984, p. 333-350.
- IZQUIERDO, I.; DIAS, R. D.; PERRY, M. L.; SOUZA, D. O., ELISABETSKY, E.; CARRASCO, M. A. . A physiological amnesic mechanism mediated by endogenous opioid peptides and it possible role in learning. IN: AJMONE-MARSAN, C. & MATHIES, H.(eds). *Neural Plasticity and Memory Formation*, New

York, Raven Press, 1982, p. 89-111.

JARRARD, L. E. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat.

Behavioral and Neural Biology, **60**: 9-26, 1993.

JONSSON, G.; HALLMAN, H.; MEFFORD, I.; ADAMS, R. N. The use of liquid chromatography with electrochemical 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, 1980, pp.59-71.

JORDAN, S.; KRAMER, G. L. ; ZUCAS, P. E.; PETTY, F. Previous stress increases in vivo biogenic amine response to swim stress *Neurochemical Research* **19(12)**: 1521-25; 1994.

KELLY, D. D.; SILVERMAN, A. J.; MURRAY, G.; BODNAR, R. J. Characterization of pituitary mediation of stress-induced antinociception in rats. *Psychology & Behavior* **53**: 769-75, 1993.

KISS, A.; AGUILERA, G.. Regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress: responses to repeated intraperitoneal hypertonic saline injection. *Brain Research* **630**: 262-70, 1993.

KONARSKA, M. ; STEWART, R. E.; MCCARTY, R Habituation of sympathetic-adrenal medullary responses following exposure to chronic intermittent stress. *Physiology Behavior*, **45**: 255-61; 1989.

KONARSKA, M; STEWART, R E; AND MCCARTY, R. Predictability of chronic intermittent stress: effects on sympathetic adrenal medullary responses of

- laboratory rats. *Behavioral and Neural Biology*, **53**: 231-43, 1990.
- LEMAIRE, V.; LE MOAL M.; MORMEDE, P. Regulation of catecholamine-synthesizing enzymes in adrenals of Wistar rats under chronic stress. *American Journal of Physiology* **264**: 957-62., 1993.
- LEVINE, S.; URSIN, H. What is stress? IN: BROWN, M. R.; RIVIER, C.; KOOB, G. (eds). *Neurobiology and Neuroendocrinology of Stress*, Marcel Decker, 1991.
- LEVITAN, I. B., KACZMAREK, L.K. *The Neuron Cell and Molecular Biology*. Oxford University Press, 450pp., 1991.
- LIU, D.; DIORIO, J., TANNENBAUM, B., CALDJI, C., FRANCIS, D., FREEDMAN, A., SHARMA, S., PEARSON, D., PLOTSKY, P. M., MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, **277**: 1659-62, 1997.
- MALYSKO, J.; URANO, T.; TAKADA, Y. TAKADA, A. Serotonergic systems in brain and blood under stress and tranylcypramine treatment in rats *Brain Research Bulletin*, **35 (1)**: 9-13; 1994.
- MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. Basic Medical Biochemistry- a clinical approach. WILLIAMS & WILKINS (eds) Baltimore, Williams & Wilkins, 1996, 806 pp.
- MARTÍ, O.; GAVALDA, A.; JOLIN, T. ARMÁRIO, A. Effect of regulatory of exposure to chronic immobilization stress on the circadian pattern of pituitary adrenal hormones, growth hormone, and thyroid stimulating hormone in the adult male rat. *Psychoneuroendocrinology* **18 (1)**: 67-77, 1993.

- MARTI, O.; MARTI, J.; ARMÁRIO, A; Effect of chronic stress on food intake in rats: Influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology Behavioral* **55**: 1179-85; 1994.
- McEWEN, B.; SAPOLSKY, R .M. Stress and cognitive function *Current Opinion in Neurobiology* **5**: 205-16 ; 1995.
- McINTOSH, L. J.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neural culture. *Experimental Neurology* **141**: 201-6, 1996.
- McNAUGHTON, N. Stress and behavioral inhibition IN: STANFORD, S. C.; SALMON, P. (eds). *Stress from synapse to syndrome* Academic Press Ltd. 191-204 pp., 1993.
- MENENDEZ, L.; TRELLES, F. A.; HIDALGO, A.; BAAMONDE, A. Opiod footschock-induced analgesia in mice acutely falls by stress prolongation. *Psysiology & Behavior* **53**: 1115-9, 1993.
- MICHELSON, D.; LICINIO, J.; GOLD, P. W. Mediation of stress response by the hipotalamic-pituitary-adrenal axis IN: FRIEDMAN, M. J.; CHARNEY, D. S.; DEUTCH, A. Y.(eds) *Neurobiological and clinical consequences of stress: from normal adaptation to PTSD* Lippincott-Raven Publishers 225-38 pp.; 1995.
- MODIGH, K. Effects of social stress on the turnover of brain catecholamines and 5-hydroxytryptamine in mice. *Acta Pharmacologic Toxicology*, **34**: 97-105, 1974.

MOGHADDAM, B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *Journal Neurochemistry* **60**: 1650-57 1993.

MOGHADDAM, B.; BOLINAO, M. L.; BEHRENS, B. S.; SAPOLSKY, R. M.. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate *Brain Research* **655**: 251-4; 1994.

MOREAU, J. L.; JENK, F.; MARTIN, J. R.; MORTAS, P. ; HAEFELY, W. E. Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable variate stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats, *European Neuropsychopharmacology* **2**: 43-50,1992.

MURUA, V. S.; AND MOLINA, V. A. Effects of chronic variable stress and antidepressant drugs on behavioral inactivity during an uncontrollable stress: interaction between both treatments. *Behavioral and Neural Biology*, **57**: 87-9,1992.

MUSCAT, R.; PAPP, M. AND WILLNER, P. Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline. *Psychopharmacology*, **106**: 821-6;1992.

MUSCAT, R.; WILLNER, P. Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **16**: 507-17, 1992.

- NETTO, C. A.; CAVALHEIRO, E. A.; CARRASCO, M. A.; VOLKMER, N.; DIAS, R. D.; IZQUIERDO, I. Response of rat brain β -endorphin system to novelty: importance of the fornix connection. *Behavioral and Neural Biology*, **43**: 37-46, 1985.
- NICHOLS, N. R.; MASTERS, J. N.; FINCH, C. E. Changes in gene expression in hippocampus in response to glucocorticoids and stress. *Brain Research Bulletin* **24**: 659-62, 1990.
- NISEBAUM, L. K.; ZIGMOND, M. J.; SVED, A. F.; ABERCROMBIE, E. D. Prior exposure to chronic stress results in enhanced synthesis and release of hippocampal norepinephrine in response to a novel stressor. *The Journal of Neuroscience* **11 (5)**: 1478-84, 1991.
- NISHI, M.; AZMITIA, E. 5-HT_{1a} receptor expression is modulated by corticosteroid receptor agonists in primary rat hippocampal culture *Brain Research* **722**: 190-4; 1996.
- PAPP, M; WILLNER, P; AND MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology* **104**: 255-9, 1991
- PAPP, M.; LAPPAS, S.; MUSCAT, R.; WILLNER, P. Attenuation of place preference conditioning but not place aversion conditioning by chronic mild stress. *Journal Psychopharmacology* **6**: 352-8, 1992.

PEREIRA, M. E.; ROSAT, R. M.; HUANG, C. H.; GODOY, M. G.; IZQUIERDO, I.

Inhibition by diazepam of the effect of additional training and extinction on the retention of shuttle avoidance behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*, **103**: 202-5, 1989.

PITMAN, D. L.; OTTENWELLER, J. E.; NATELSON, B. H. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiology & Behavior* **43**: 47-55, 1988.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *The Journal of Neuroscience* **5 (5)**: 1222-7, 1985.

+ SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels. *The Journal of Neuroscience* **6 (8)**: 2240-4; 1986.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids and hippocampal damage. *Trends in Neuroscience* **10**: 346-9, 1987.

SAPOLSKY, R. M.; PACKAN, D. R.; VALE, W. W. Glucocorticoids toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. *Brain Research*, **453**: 367-71, 1988.

SAPOLSKY, R. M. The importance of a well-groomed child. *Science*, **277**: 1620-1, 1997.

SEYLE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agent. *Nature*, **138**: 32, 1936.

- SIEGFRIED, B. FRISCHKNECHT, H. R.; RIGGIO, G.; WASER, P. G. Pre-exposure to a nonaggressive opponent prevents low intensity social conflict analgesia in mice. *Behavioral Neurosciences*, **101**: 423-6; 1987a.
- SIEGFRIED, B.; NETTO, C.A.; IZQUIERDO, I. Exposure to novelty induces naltrexone-reversible analgesia in rats. *Behavioral Neurosciences*, **101**: 436-9, 1987b.
- STANFORD, S. C.. Monoamine in response and adaptation to stress IN: STANFORD, S.C.; SALMON, P. (eds). *Stress from synapse to syndrome* , San Diego, Academic Press Ltd. , 1993, p.281-331.
- TAJIMA, T. ENDO, H.; SUZUKI, Y.; IKARI, H.; GOTOH, M. Immobilization stress-induced increase of hippocampal acetylcholine and of plasma epinephrine, norepinephrine and glucose in rats. *Brain Research*, **720**: 155-8, 1996.
- THIERRY, A. M.; FEKETE, M.; GLOWINSKI, J. Selective activation of the mesocortical DA system by stress. *Nature*, **263**: 242-4; 1976.
- TIZABI, Y.; AGUILERA, G. Desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis following prolonged administration of corticotrophin-releasing hormone or vasopressin *Neuroendocrinology* **56**: 611-8 , 1992.
- TSUDA, A.; IDA, Y.; SATOH, H. Stressor predictability and rat brain noradrenaline metabolism. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, **32**: 569-72; 1989.
- URSIN, H.; OLFF, M. The stress response IN: STANFORD, S. C.; SALMON, P. (eds). *Stress from synapse to syndrome* Academic Press Ltd. 3-22 pp., 1993.
- WILLNER, P. AND MUSCAT, R. Animal models for investigating the symptoms of depression and the mechanism of action of antidepressant drugs. IN: Oliver, B.;

- Mos, J.; Slongen, J.L. (eds) *Animal models in Psychopharmacology. Advances in Pharmacological Sciences*. Boston, Birkhäuser Verlag Basel, 183-98 p.p., 1991.
- WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEUS, S.; AND MUSCAT, R.
Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, **93**: 358-64, 1987.
- WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **16**:1-10, 1992.
- WINDER, W. W.; HAGBERG, J. M.; HICKSON, R. C. Time course of sympathoadrenal adaptation to endurance exercise training in man. *Journal Applied Physiology*, **45**: 370-6, 1978.
- WURTMAN, J. J.; WURTMAN, R. J. Drugs that enhance central serotonergic transmission diminish elective carbohydrate consumption by rats. *Life Science* **24**:895-903, 1979.
- XAVIER, M. H. Estresse Crônico e Sistema Benzodiazepínico Estudo de Parâmetros Bioquímicos e Comportamentais. (Dissertação apresentada ao Curso de PósGraduação em ciências Biológicas, com ênfase em Bioquímica, UFRGS, 96pp 1995).
- YAU, J. L. W.; MORRIS, R.G.M.; SECKL, J. R.. Hippocampal corticosteroid receptor mRNA expression and spatial learning in the aged Wistar rat. *Brain Research* **657**: 59-64; 1994.

ZERBIB, R.; LABORIT, H. Chronic stress and memory: implication of central cholinergic system. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* **36**: 897-900, 1990.