

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação Comportamental e dos Níveis Séricos e
Metabolismo Periférico dos Hormônios Tireoidianos
em Ratos Submetidos ao Estresse Social Seriado**

Fernanda Marques Pestana

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E DOS NÍVEIS SÉRICOS E
METABOLISMO PERIFÉRICO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS
EM RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE SOCIAL SERIADO**

FERNANDA MARQUES PESTANA

Sob a Orientação do professor
Emerson Lopes Olivares

e Co-orientação do Professor
Fábio Fagundes da Rocha

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Ciências Clínicas

Seropédica, RJ
Março de 2010

599.35

P476a

T

Pestana, Fernanda Marques, 1985-

Avaliação comportamental e dos níveis séricos e metabolismo periférico dos hormônios tireoidianos em ratos submetidos ao estresse social seriado / Fernanda Marques Pestana - 2010.

65 f.

Orientador: Emerson Lopes Olivares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Patologia e Ciências Clínicas.

Bibliografia: f. 65

1. Rato - Comportamento - Teses. 2. Glândula tireóide - Teses. I. Olivares, Emerson Lopes, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Patologia e Ciências Clínicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(CIÊNCIAS CLÍNICAS)

FERNANDA MARQUES PESTANA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária** no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31/03/2010

Emerson Lopes Olivares. Ph.D. UFRuralRJ
(Orientador)

Wellington da Silva Cortes. Ph.D. UFRuralRJ

Andréa Claudia Freitas Ferreira. Ph.D. UFRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, o grande Arquiteto do Universo, por permitir que o meu sonho do Mestrado se tornasse realidade, me fazendo ter a certeza que mesmo diante dos momentos em que tudo parece estar perdido a fé pode tornar tudo possível. Obrigada Senhor!

Agradeço aos meus pais Fátima e Paulo pelo apoio e dedicação incessantes, os quais não me proporcionaram somente a graça da vida, mas também o esteio e educação, base imprescindível para a realização deste trabalho. Tudo o que fiz foi por vocês, para vocês e é por vocês que vou seguir em frente: a grande e maior razão da minha vida! Amo vocês!

Aos meus irmãos Felipe e Bruno e ao meu lindo sobrinho Pedrinho pela agradável convivência em família.

Ao Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares, meu orientador, por me estender a mão no momento mais crítico de minha trajetória pelo Mestrado. Uma pessoa imprescindível para que este trabalho de fato acontecesse. Obrigada por depositar sua confiança em mim! Um grande exemplo e competência e dedicação, com o qual aprendi não só a “fazer ciência” mas a lapidá-la com excelência. Posso dividir minha vida antes e depois do mestrado e você Emerson, faz parte disto! O meu eterno e muito obrigada!

As Professoras Dr. Michelle Porto Marassi e Dr. Denise Pires de Carvalho pelo apoio e parceria na realização dos testes para avaliação tireoidiana.

Ao Prof. Dr. Fábio Fagundes da Rocha pela co-orientação e pelo auxílio fundamental na avaliação dos testes envolvendo os modelos comportamentais.

A prof. Dr. Rita Botteon por me apoiar e incentivar no momento do ingresso no Curso de Mestrado. Obrigada por me ensinar que: “Pedras no meu caminho: pego todas, junto e vou construir o meu castelo!”.

Ao Prof. Dr. Marcelo Abidu, profissional de extrema competência, marcante em minha vida acadêmica, por me despertar e incentivar para a trajetória científica e o interesse pela docência, participou ativamente do meu crescimento intelectual, meu eterno orientador, uma inspiração para mim! Obrigada por acreditar no meu trabalho!

Ao amigo e companheiro de trabalho Marcelo Soares por me incentivar e ajudar no momento do meu ingresso no Curso de Mestrado.

Aos Professores Dr. Wellington da Silva Côrtes, Dr. Luis Carlos Reis, Dr. Frederico Argollo Vanderlinde pelo incentivo e presteza diários, com os quais pude aprender mais que fisiologia e farmacologia, mas a amadurecer a cada dia de trabalho.

Aos alunos estagiários do DCF, verdadeiros amigos, Camila Pedreira, Ana Carolina Morais, Carina Santoro, Ligia de Castro, Iracema Araújo, Roberto Laureano, Virgínia Santos, Gúinever Eustáquio, Juliana Calazans, André Mecawi, Nayana Coutinho Gislaine Pereira, Jorge Santana, Rafael Côrtes e em especial, Cláudio Silva Almeida por participarem do exaustivo experimento estresse, por se “estressarem” junto comigo nesta fantástica empreitada! Sem vocês nada disto seria possível! Muito obrigada por dispor de suas muitas noites, madrugadas e fins de semana para me apoiar, e, sobretudo pela convivência agradável e divertida.

Ao técnico de laboratório Antonio Vicente Conrado Leite Jose da Costa pela constante disponibilidade em ajudar nos procedimentos laboratoriais.

As minhas grandes amigas e cúmplices, Michele Freitas, Vivian Suane, Íris Soares, Leziane Araújo, Juliana Cunha, por toda ajuda e incentivo nos difíceis momentos vividos ao longo desse período. Obrigada por me ensinarem o verdadeiro sentido e propósito da palavra amizade! Vocês são fantásticas! Amo vocês!

Aos meus colegas Professores, técnicos, estagiários e alunos da Área de Anatomia Animal pelo apoio e compreensão pelos momentos de ausência em prol deste trabalho.

Aos animais utilizados neste trabalho, aos quais através de suas vidas, proporcionaram novos conhecimentos a comunidade científica.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por me oferecer bem mais que um local para trabalho, com ensino de qualidade inquestionável, mas também um ambiente afável de beleza ímpar, onde pude construir mais do que títulos e sim uma verdadeira filosofia de vida. Muito obrigada!

RESUMO

PESTANA, Fernanda Marques. **Avaliação Comportamental e dos Níveis Séricos e Metabolismo Periférico dos Hormônios Tireoidianos em Ratos Submetidos ao Estresse Social Seriado**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O estresse tem um impacto profundo sobre o desenvolvimento de diversas psicopatologias, afetando vários processos fisiológicos, como o sistema endócrino, imunitário e nervoso central. A exposição a eventos estressantes é capaz de perturbar a regulação normal dos eixos neuroendócrinos, e embora a maioria dos estudos neste campo apontem, principalmente, os hormônios clássicos do estresse: glicocorticóides e catecolaminas têm aumentado às evidências que indicam que os hormônios tireoidianos (HT) também são alterados em resposta ao estresse crônico. Após o conflito social repetido ocorrem mudanças na produção de hormônios da tireóide que já foram descritos em estudos clínicos e experimentais. Os efeitos do estresse sobre a função da tireóide são complexos e dependem do tipo e duração do estresse e os mecanismos envolvidos são desconhecidos. Do ponto de vista médico veterinário, é importante considerar os freqüentes erros de manipulação que ocorrem por proprietários e criadores, inclusive em zoológicos, em que animais novos são introduzidos sem qualquer critério em ambientes dominados por residentes. Sabendo-se que o conflito social é um determinante importante das mudanças comportamentais, e que estes podem constituir um risco para a saúde e produção animal, aliada à escassez de estudos que avaliam o metabolismo dos HT (atividade iodotironinas desiodases enzimas) associados ao estresse social crônico, este estudo pode ser considerado de grande importância. No presente estudo foram avaliados os níveis séricos de hormônios tireóideos (HT) e a atividade das enzimas iodotironinas desiodases tipo 1 (D1) e tipo 2 (D2) no modelo de derrota social, que é considerado o modelo mais fiável para simular situações de estresse do cotidiano a que são submetidos diariamente os seres humanos e também os animais. Para esclarecer dados controversos da literatura quanto aos níveis de HT em resposta ao estresse, tanto a curto e longo prazo, foi realizado um estudo seriado do estresse social. Ratos *Wistar* adultos foram submetidos a estresse subordinação diariamente por um período de um a oito semanas. Amostras de sangue foram obtidas antes, 1, 4 e 8 semanas após o início do estímulo estressante para avaliar os níveis séricos de T4, T3 e corticosterona. As atividades da D1 e da D2 foram avaliadas no final de cada protocolo. As alterações comportamentais foram avaliadas por testes comportamentais, sendo as alterações mais importantes observadas na semana 4, sendo associada ao hipotireoidismo que tenha ocorrido antes, desde a semana 1 no grupo estressado. Os níveis séricos de T4 e T3 foram restaurados na semana 8, no momento em que as principais alterações no comportamento não foram mais observados. Em outro protocolo, o tratamento com fluoxetina (10 mg / kg PO durante quatro semanas), evitou parcialmente o comportamento referente ao estresse e normalizou o T4, mas não foi capaz de restaurar os níveis séricos de T3 no grupo estressado em relação ao grupo controle 4 semanas após o início do tratamento. O trabalho atual acrescenta novos conceitos sobre alterações no metabolismo da tireóide induzidas pelo estresse e sugere que o hipotireoidismo pode fazer parte de nos eventos-chave, e em última análise, até mesmo conduzir a alterações comportamentais desencadeadas pelo estresse social.

Palavras-chave: estresse, comportamento e tireóide.

ABSTRACT

PESTANA, Fernanda Marques. **Behavioral Evaluation, of Serum Levels and Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones in Rats Subjected to Social Stress series.** 2010. 75 f. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Clinical Sciences) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Stress has a profound impact on the development of many psychopathologies, affecting numerous physiological processes, such as endocrine, immune and central nervous. Exposure to stressful events is able to disrupt the normal regulation of neuroendocrine axes, and although most research in this field has mainly pointed to the classic stress hormones: glucocorticoids and catecholamines, increasing evidences indicate that thyroid hormones (TH) also change in response to chronic stress. After repeated social stress there are changes in serum thyroid hormones that have already been described in either clinical or experimental studies. The effects of stress on thyroid function are complex and depend on the kind and time of stress and the mechanisms involved are largely unknown. From the standpoint of veterinary surgeon, it is important to consider the frequent handling errors occurring by pet owners and breeders, including zoos, without introducing any criteria, new animals in environments dominated by residents. Knowing that social conflict is an important determinant of behavioral changes, and they may constitute a risk to health and livestock production, coupled with the scarcity of studies evaluating the metabolism of TH (expression / activity Iodothyronine deiodinases enzymes) with chronic social stress, this study can be considered of great importance. In the current study we evaluated serum thyroid hormones (TH) levels and type 1 (D1) and type 2 (D2) deiodinase activity in a model of social defeat, which is considered the most reliable model to mimic daily stress situations occurring in humans and also with the animals. To clarify controversial data in literature regard TH response to stress, both short and a long-term stress protocols in a time-course fashion were performed herein. Adult male Wistar rats underwent daily subordination stress for a period of one or eight weeks. Blood samples were obtained just before and 1 or 4 and 8 weeks after the beginning of stressful stimulus to assess serum T4, T3 and corticosterone levels. D1 and D2 activity was assessed in the end of each protocol. Stress-like behavior, assessed by Behavioral tests, was mainly observed in week 4, and was associated with hypothyroidism which has been occurred before, since week 1 in stressed group. Serum T4 and T3 was restored to control levels in week 8 at the time when the main behavior changes were no more observed. In another protocol, fluoxetine treatment (10 mg/kg PO during four weeks) partially avoided stress-like behavior and normalized T4, but was not be able to restore serum T3 levels in stressed group compared to control 4 weeks after the beginning of the treatment. The current work adds new concepts concerning thyroid metabolism changes induced by stress and suggests that hypothyroidism may take part in the key events which ultimately lead to behavioral changes induced by social stress.

Keywords: stress, behavior and thyroid.

LISTA DE ABREVIACOES

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrfico
BAT	Tecido Adiposo Marrom (<i>Brown Adipose Tissue</i>)
CA	Campo Aberto
D1	Desiodase Tipo I
D2	Desiodase Tipo II
D3	Desiodase Tipo III
<i>Grooming</i>	Auto limpeza
HT	Hormônio Tireoidiano
HHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HHG	Hipotálamo-Hipófise-Gonadal
HHT	Hipotálamo-Hipófise-Tireóide
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
NF	Nado Forçado
PPS	Preferência Pela Sacarose
<i>Rearing</i>	Levantamento do corpo
SAP	<i>Stretch Attend Posture</i>
SNS	Sistema Nervoso Simpático
RIE	Radioimunoensaio
TSH	Hormônio Estimulante da Tireóide (<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>)
T3	Triiodotironina (3,5,3' triiodotironina)
T3r	T3 reverso (3,3',5 triiodotironina)
T4	Tiroxina (3,5,3',5' tetraiodotironina)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Estresse e Homeostase	3
2.2 Resposta ao Estresse	4
2.3 Estresse, Transtornos de Humor e Depressão	5
2.4 Estresse e Ansiedade	6
2.5 Estresse Ambiental e Estresse Social	6
2.6 Efeitos do Estresse	7
2.7 Estresse Social e Modelos de Derrota Social	7
2.8 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide (HHT)	8
2.9 Fisiologia do Eixo HHT	8
2.10 Hormônios Tireoidianos e As Enzimas Iodotironinas Desiodases	9
2.11 Relação Entre o Estresse, o Eixo HHT e as Enzimas Iodotironinas Desiodases	10
2.12 Estresse e Serotonina	11
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Animais	13
4.1.1 Ratos Wistar machos	13
4.1.1.1 Intrusos	13
4.1.1.2 Residentes	13
4.1.1.3 <i>Sparrings</i>	13
4.1.2 Ratas Wistar fêmeas	13
4.2 Estudo Seriado do Estresse Social	14
4.2.1 Primeira etapa	14
4.2.2 Segunda etapa	14
4.2.3 Terceira etapa	14
4.3 Procedimentos Gerais do Experimento	14
4.3.1 Estresse social: modelo de derrota social	14
4.3.2 Estudo da percentagem de ganho de peso	16
4.3.3 Testes comportamentais	16
4.3.3.1 Teste de preferência pela sacarose (PPS)	16
4.3.3.2 Teste do campo aberto (CA)	16
4.3.3.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	18
4.3.3.4 Teste do nado forçado (NF)	19
4.3.4 Coleta de sangue para radioimunoensaio (RIE)	20
4.3.4.1 RIE para TSH sérico	20
4.3.4.2 RIE para T3 e T4 totais e corticosterona séricos	21
4.3.5 Determinação da atividade das iodotironinas desiodases	21
4.3.5.1 Determinação da atividade da iodotironina desiodase tipo I	21
4.3.5.2 Determinação da atividade da iodotironina desiodase tipo II	22
4.3.6 Anatomopatologia	22

4.4 Protocolos Experimentais	23
4.4.1 Protocolo experimental da primeira etapa	23
4.4.2 Protocolo experimental da segunda etapa	23
4.4.3 Protocolo experimental da terceira etapa	24
4.5 Análise Estatística	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Resultados Gerais	26
5.1.1 Ganho de peso	26
5.1.2 Teste de preferência pela sacarose (PPS)	26
5.2 Primeira Etapa: Animais Estressados Durante Uma Semana	27
5.2.1 Testes comportamentais	27
5.2.1.1 Teste do campo aberto	27
5.2.1.1.1 Quadrados percorridos	27
5.2.1.1.2 Número de <i>groomings</i>	28
5.2.1.1.3 Tempo de <i>grooming</i>	29
5.2.1.1.4 Número de <i>rearings</i>	29
5.2.1.1.5 Tempo de inatividade	30
5.2.1.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	31
5.2.1.2.1 Tempo gasto nos braços abertos	31
5.2.1.2.2 Número de entradas nos braços fechados	31
5.2.1.2.3 SAP	32
5.2.1.3 Teste do nado forçado	32
5.2.2 Níveis séricos de T4 e T3 (dosagem por RIE)	33
5.2.3 Atividade da desidase Tipo I (D1)	34
5.2.4 Anatomopatologia	34
5.3 Segunda Etapa: Animais Estressados Durante Três e Oito Semanas	35
5.3.1 Testes comportamentais	35
5.3.1.1 Teste do campo aberto	35
5.3.1.1.1 Quadrados percorridos	35
5.3.1.1.2 Número de <i>groomings</i>	35
5.3.1.1.3 Tempo de <i>grooming</i>	36
5.3.1.1.4 Número de <i>rearings</i>	37
5.3.1.1.5 Tempo de inatividade	37
5.3.1.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	38
5.3.1.2.1 Tempo gasto nos braços fechados	38
5.3.1.2.2 Tempo gasto nos braços abertos	39
5.3.1.2.3 Número de entradas nos braços fechados	39
5.3.1.2.4 SAP	40
5.3.1.3 Teste do nado forçado	40
5.3.2 Níveis séricos de T4 e T3 (dosagem por RIE) na semana 4	41
5.3.3 Níveis séricos de T4 e T3 (dosagem por RIE) na semana 9	41
5.3.4 Níveis séricos de TSH (dosagem por RIE) na semana 9	42
5.3.5 Níveis séricos de Corticosterona (dosagem por RIE) na semana 9	43
5.3.6 Atividade da desidase Tipo I (D1)	43
5.3.7 Atividade da desidase Tipo II (D2)	44
5.3.8 Anatomopatologia	45
5.4 Terceira Etapa: Animais Estressados Durante Três Semanas Tratados com Fluoxetina	45
5.4.1 Testes comportamentais	45
5.4.1.1 Teste do campo aberto	45

5.4.1.1.1	Quadrados percorridos	45
5.4.1.1.2	Número de <i>groomings</i>	46
5.4.1.1.3	Tempo de <i>grooming</i>	47
5.4.1.1.4	Número de <i>rearings</i>	47
5.4.1.1.5	Tempo de inatividade	48
5.4.1.2	Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	49
5.4.1.2.1	Tempo gasto nos braços abertos	49
5.4.1.2.2	Número de entradas nos braços fechados	49
5.4.1.2.3	SAP	50
5.4.1.3	Teste do nado forçado	51
5.4.2	Níveis séricos de T4	51
5.4.3	Níveis séricos de T3	52
6.	DISCUSSÃO	54
7.	CONCLUSÕES	63
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

O estresse tem um impacto profundo sobre o desenvolvimento de psicopatologias que afetam diversos processos fisiológicos como endócrino, imunológico e do sistema nervoso central. A exposição a eventos estressantes é capaz de perturbar a regulação normal do eixo neuroendócrino e, embora a maioria das pesquisas neste campo apontem, principalmente, para os hormônios clássicos do estresse, como os glicocorticóides e as catecolaminas, estão aumentando as evidências que indicam que os hormônios tireoidianos (HT) também participam da resposta ao estresse.

Alterações na função da tireóide têm sido descritas em transtornos psiquiátricos e o hipotireoidismo clínico também tem sido relacionado à depressão e à menor capacidade de resposta ao tratamento antidepressivo. Em conjunto, estes resultados sugerem uma complexa relação bilateral entre a função da tireóide e distúrbios psiquiátricos.

Para obter uma avaliação mais consistente da função da tireóide, diante de psicopatologias, têm sido utilizados muitos modelos comportamentais de estresse. Infelizmente, esses trabalhos têm gerado bastante controvérsia. Os efeitos do estresse sobre as funções da tireóide são complexos e dependem de vários fatores, tais como: o agente estressor, sua duração, intensidade e previsibilidade, e finalmente, as linhagens de animais utilizados em cada experimento.

O principal produto da secreção tireoidiana é a tiroxina (3,5,3',5' tetraiodotironina) ou T4, que é conhecida como um pró-hormônio por não ser biologicamente ativo. Para isso, há a necessidade da conversão do T4 a T3 (3, 5, 3' triiodotironina), o componente que pode efetivamente ligar-se aos receptores para hormônios tireoidianos e mediar ações celulares hormônio-dependente. Já que a meia-vida do T4 é longa (uma semana em humanos), o papel do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) em regular a disponibilidade de T3 é complementado pela ação das enzimas iodotironina desiodases, as quais ativam ou inativam os hormônios tireoidianos. Considerando-se a relação entre o metabolismo dos HT e o estresse, há poucos dados na literatura sobre a atividade das desiodases em modelos de estresse e praticamente ausência de trabalhos relacionados-as ao estresse social.

Considerando-se a vida moderna, foi constatado que dentre os estressores mais comuns no ser humano, estão aqueles de origem psicológica ou social. Isso demonstra uma clara vantagem na escolha do modelo animal e também no uso de conflito social entre membros da mesma espécie como gerador de estresse, em comparação aos demais modelos de estresse, os quais utilizam estímulos físicos aversivos, como por exemplo, choque nas patas, contenção, privação hídrica ou exposição ao frio. Numerosos estudos têm mostrado que a perda temporária do controle social (derrota social) é um importante fator que pode levar a alterações psicopatológicas.

Além disso, as modernas relações do homem com a criação e manutenção de animais em cativeiro se dão de diversas formas, dentre elas: animais direcionados para produção, exposição, companhia, reintrodução na natureza ou oriundos de apreensão. Em comum estas relações apresentam a manipulação e a interferência direta e muitas vezes repentina das condições ambientais e relações sociais intra-específicas, refletindo-se diretamente no bem-estar animal e conseqüentemente na produção, quando os animais são utilizados para este fim. Estas influências muitas vezes se refletem em diferentes formas de estresse e a presença constante destes agentes estressores está diretamente relacionada a diferentes transtornos comportamentais.

Do ponto de vista médico-veterinário, é importante considerar os frequentes erros de manejo ocorridos por parte de proprietários de animais e criadores, sobretudo em zoológicos,

que introduzem, sem critério algum, animais novos em ambientes dominados por residentes. Tendo-se conhecimento de que o conflito social é um importante determinante de alterações comportamentais, e que estas podem representar prejuízos para a saúde e produção animal, associado á escassez de estudos relacionando à avaliação dos níveis séricos e o metabolismo dos HT (atividade das enzimas iodotironinas desiodases) com o estresse social, o presente estudo pode ser considerado de grande relevância.

Portanto, neste trabalho, objetivou-se padronizar o modelo de estresse social crônico e concomitantemente, avaliar a influência deste no eixo HHT e no metabolismo dos HT, através da determinação da atividade das enzimas iodotironina desiodases.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estresse e Homeostase

O termo estresse tem origem da palavra latina *stringere* que significa provocar tensão (PAVÓN, 2004). Na língua portuguesa, registra-se o anglicismo "estresse", um termo originário da Física, definido como a força aplicada a um material capaz de alterar a sua estrutura, ou seja, é a força capaz de romper a resistência oferecida pelo material ao qual ela é aplicada. A transposição do termo estresse da Física para a Biologia gerou e ainda gera controvérsias.

Claude Bernard, no século XIX, deu uma nova noção de harmonia orgânica, introduzindo o conceito de Meio Interno, o princípio de um equilíbrio interno. Mais tarde, Walter Cannon introduziu o termo homeostase (tendência ao equilíbrio ou estabilidade orgânica por mecanismos de auto-regulação) e estendeu seu conceito para o plano emocional, além dos parâmetros físicos. Além disso, descreveu a reação de luta ou fuga (*fight or flight reaction*) e relacionou a resposta adaptativa ao estresse com a secreção de catecolaminas (DOUGLAS, 1988).

A vida existe devido á manutenção da homeostase, constantemente desafiada por forças adversas intrínsecas e extrínsecas. O organismo reage a essas forças por meio de ajustes vegetativos e respostas comportamentais (FRANCI, 2005).

Em seus estudos experimentais, Selye (1946, 1955) observou que os ratos apresentavam respostas inespecíficas a diversos agentes nocivos e descreveu a síndrome geral de adaptação. Ele observou aumento do tamanho da adrenal, atrofia do timo e de outros tecidos linfóides, presença de ulcerações no trato gastrointestinal, perda de peso corporal, inibição do crescimento somático, involução de órgãos sexuais acessórios, anomalia do ciclo sexual, cessação da lactação, aumento temporário do potássio e perda de cloreto no plasma. Em sequência Selye demonstrou que a involução do timo era mediada pela adrenal e que os corticóides inibiam a resposta inflamatória.

O termo estresse não foi utilizado por Selye (1946) em seus primeiros trabalhos publicados. Isso ocorreu posteriormente e foi difundido na literatura científica e médica. Para Selye, estresse seria a situação gerada por um desafio ao qual um organismo estaria submetido.

A homeostase é constantemente desafiada por forças adversas. Sendo assim, foi determinado que o agente causador (o estímulo) é denominado de agente estressor, e estresse é a condição provocada pelo desafio (SELYE, 1973).

O estresse é uma questão crucial nas sociedades modernas. Atualmente o termo é difundido inclusive na literatura não científica e não médica (FRANCI, 2005).

Estímulos estressores são os que desafiam a homeostase. Eles podem ser classificados em quatro grupos: estressores físicos/químicos (calor, frio, radiação intensa, barulho, vibração, substâncias tóxicas e algésicas etc.); psicológicos (alteram processos emocionais e comportamentais, como ansiedade, medo, frustração); sociais (ambiente hostil, rompimento de relações); os que alteram a homeostase vegetativa (exercício, ortostase, inclinação corporal, hipoglicemia, hemorragia etc.). Quanto à duração os estressores podem ser agudos (único, intermitente, exposição em tempo limitado) ou crônicos (exposição intermitente mas prolongada, exposição contínua) (PACÁK e PALKOVITS, 2001).

Todas as formas de vida têm desenvolvido mecanismos para combater o estresse em suas vidas, uma vez que são notórios os efeitos danosos do estresse sobre o indivíduo. Gradualmente foi aceito que os animais também sofrem da carga de estresse e desenvolvem

patologias similares aos seres humanos, quando expostos a situações adversas ao seu organismo, podendo sucumbir a doenças, atraso no crescimento ou prejuízos reprodutivos (MOBERG, 1996). O reconhecimento dos efeitos nocivos do estresse demonstra sua importância para o bem estar de um animal.

O efeito do estresse no organismo induz à mudanças na secreção de hormônios da glândula pituitária, também chamada hipófise, implicando em falhas de reprodução (RIVIER & RIVEST, 1991), alterações metabólicas (ELSASER *et al*, 2000), resposta imunológica (BLECHA, 2000) e comportamento animal (MORBEG, 1996).

2.2 Resposta ao Estresse

A resposta a um estímulo estressor é fundamental para a homeostase de um ser vivo e sua sobrevivência. Na condição de homeostase desafiada (estresse), o organismo reage por meio da ativação e desativação de mecanismos de controle de várias funções para recuperar e manter a homeostase. A recuperação da homeostase, por meio de mecanismos homeostáticos, pode ocorrer pela eliminação do estressor. No entanto, mesmo em situações em que o estressor não é eliminado, é possível recuperar e manter a homeostase. Essa condição de homeostase mantida na presença do estressor é chamada de alostase e representa uma sobrecarga para o organismo (carga alostática). Os mecanismos alostáticos representam um esforço adicional para o organismo e maior gasto e redistribuição de energia. No combate ao estressor o organismo lança mão de diferentes respostas alostáticas (McEWEN, 1998). Este processo se dá através de alterações fisiológicas imediatas e prolongadas.

Uma das principais respostas imediatas aos estressores psicológicos e sociais é mediada pela ativação da divisão simpática do sistema nervoso autônomo, consistindo na liberação de adrenalina pela medula da adrenal e noradrenalina pelos neurônios pós-ganglionares simpáticos. Esta ativação desencadeia uma série de alterações fisiológicas visando um maior aporte de oxigênio ao cérebro e à musculatura esquelética, em função de alterações cardiovasculares (ao aumento da pressão arterial, taquicardia, redistribuição do fluxo sanguíneo etc.) e maior disponibilidade de substratos energéticos em função de alterações metabólicas (lipólise e glicogenólise), características de uma reação de luta ou fuga (FRANCI, 2005).

As alterações fisiológicas prolongadas são caracterizadas principalmente pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e conseqüentemente liberação de glicocorticóides. Estes por sua vez auxiliam os efeitos metabólicos e cardiovasculares da ativação simpática através da gliconeogênese a partir de aminoácidos e do aumento do armazenamento de glicogênio no fígado, provendo o organismo de fontes de energia rapidamente mobilizáveis, além de facilitar a reação dos vasos sanguíneos à adrenalina e à noradrenalina, facilitando ainda mais a sua ação constritora (FRANCI, 2005)..

A secreção de corticosterona é modulada pelo mecanismo de *feedback* negativo, que envolve o eixo HHA. A síntese de cortisol, o mais potente dos glicocorticóides, requer três hidroxilações nos carbonos 11, 17 e 21, se o carbono 21 for hidroxilado antes do carbono 17, este não será mais hidroxilado e serão sintetizados então mineralocorticóides ao invés de glicocorticóides. Portanto, a rota mais frequente para a obtenção de cortisol é a 17 alfa-hidroxilação da pregnenolona. A ação 17 alfa-hidroxilase, necessária para obter cortisol a partir da pregnenolona e da progesterona, é própria dos mamíferos. Por essa razão, a maioria desses animais produz mais cortisol do que corticosterona. O cortisol predomina no cão, gato, porco, cavalo e em humanos. A corticosterona predomina no coelho, camundongo e no rato. Na vaca os dois hormônios se encontram em quantidades similares. (AXELROD & REISINE, 1984; CHROUSOS, 1998; KOOB, 1999).

No entanto, a persistência dessa resposta prolongada pode gerar efeitos deletérios ao organismo. A ação prolongada de glicocorticóides diminui a resistência a infecções em função da sua ação imunossupressora e antiinflamatória, retarda a formação do tecido cicatricial em feridas, além da predisposição à úlcera gástrica e duodenal, além disso o estresse persistente reduz a secreção do hormônio somatotrófico e deprime a atividade tireoidiana, além da redução de várias funções orgânicas relacionadas ao comportamento sexual (BRANDÃO & LACHAT, 1995).

Apesar dos mecanismos alostáticos serem importantes para adaptação e proteção do organismo, falhas na mobilização e desmobilização desses mecanismos podem estar relacionados a diferentes doenças como hipertensão, diabetes, doenças auto-imunes, distúrbios inflamatórios, ulceração gástrica, assim como diferentes transtornos comportamentais (FRANCI, 2005).

2.3 Estresse, Transtornos de Humor e Depressão

Atualmente, além dos estressores físicos inicialmente descritos por Selye, fatores psicológicos, como novidade ou problemas sociais, também são aceitos como agentes estressores capazes de induzir alterações comportamentais e fisiológicas significativas (McEWEN, 1998). Dentre as últimas está a liberação de glicocorticóides pela supra-renal, como consequência da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (HERMAN & CULLINAN, 1997). Os glicocorticóides servem para preparar o organismo para desafios fisiológicos ou ambientais e são importantes para a consolidação da resposta ao estresse (PEETERS, BWMM & BROEKKAMP, CLE, 1994). A persistência e a intensidade exagerada do estresse, bem como a incapacidade do organismo em finalizar o processo, podem tornar o eixo hiperreativo, com prejuízos potenciais ao organismo (HUETHER *et al.*, 1999).

Os transtornos de humor são condições médicas com incidência e prevalência bastante elevadas. De natureza crônica e, na maioria das vezes, recorrentes, levam os indivíduos doentes a perdas substanciais na capacidade de exercer suas atividades diárias (UEBELACKER *et al.*, 2004). As causas e manifestações de transtornos de humor podem variar. Acredita-se que, além dos fatores psicossociais, existam componentes genéticos e biológicos que tornem alguns indivíduos mais predispostos a desenvolver estas patologias. Neste sentido, tem sido sugerida uma maior incidência destes transtornos em mulheres (WHO, 2000).

Dentre os transtornos de humor, a depressão maior é bastante comum. Calcula-se que cerca de 121 milhões de pessoas no mundo sofram de depressão (WHO, 2003a) e estima-se que mais de 150 milhões de pessoas experimentem algum episódio depressivo em algum momento da vida (WHO, 2003b). Destes pacientes, 2 a 3 % requerem hospitalização, com sérios prejuízos das atividades diárias (GUIMARÃES, 2000).

Na América Latina, e no Brasil em particular, existe uma série de fatores que contribuem para a elevada prevalência de eventos de vida estressantes e de transtornos mentais na população, tais como processos acelerados de urbanização e industrialização, acesso desigual aos cuidados de saúde, condições de moradia inadequadas, distribuição desigual da renda, desemprego, altas taxas de violência e criminalidade (LOPES, 2003).

O estresse parece ser um dos principais fatores ambientais que predispõem um indivíduo à depressão. Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial (POST, 1992). Além disso, a conhecida influência de fatores genéticos no desenvolvimento da depressão poderia ser decorrente de um aumento da sensibilidade a eventos estressantes (KENDLER *et al.*, 1995).

Em pacientes deprimidos, o controle inibitório da atividade do eixo HHA parece estar comprometido. Eles podem apresentar níveis basais elevados de cortisol e não responderem ao teste de supressão com o corticosteróide sintético dexametasona (BAUNGARTNER *et al.*, 1988). O envolvimento do eixo HHA na neurobiologia da depressão é apoiado, ainda, pela observação de que indivíduos com síndrome de *Cushing* apresentam déficits cognitivos e alterações na estrutura e função hipocampais, semelhantes àsquelas encontradas em pacientes deprimidos (STARKMAN *et al.*, 1992).

2.4 Estresse e Ansiedade

A ansiedade é utilizada para descrever um estado emocional normal associado ao estresse ou dificuldade psicológica associada a uma condição patológica. Quando a ansiedade é crônica e não está claramente associada a um evento bem definido, ela é geralmente considerada anormal e própria para uma intervenção psicológica ou psiquiátrica.

Em termos biológicos, a ansiedade induz a uma forma particular de inibição comportamental, que ocorre em resposta aos eventos ambientais que são novos, não recompensadores (em condições em que a recompensa é esperada) ou à punição. Em animais, esta inibição comportamental pode tomar forma de imobilidade ou de supressão de uma resposta comportamental (RANG *et al.*, 2003).

2.5 Estresse Ambiental e Estresse Social

As modernas relações do homem com a criação e manutenção de animais em cativeiro se dão de diversas formas, dentre elas: animais voltados para produção, exposição, companhia, reintrodução na natureza ou oriundos de apreensão. Em comum, estas relações apresentam a manipulação e a interferência direta, muitas vezes repentina, das condições ambientais e relações sociais intra-específicas, refletindo diretamente no bem-estar animal e conseqüentemente na produção, quando os animais são utilizados para este fim. Estas influências muitas vezes se refletem em diferentes formas de estresse e a presença constante destes agentes estressores está diretamente relacionada a diferentes transtornos comportamentais.

Considerando-se este fato, duas formas de estresse que incidem diretamente sobre estes animais podem ser destacadas. O estresse ambiental é bastante comum. O ambiente empobrecido, definido como não apropriado às necessidades sociais e físicas dos indivíduos pode desencadear uma série de respostas não adaptativas, muitas vezes manifestadas em transtornos comportamentais, caracterizadas por comportamentos estereotipados, déficits cognitivos, distúrbios emocionais (como agressividade e depressão), acasalamento inadequado e morte (BOERE, 2001).

Além do estresse ambiental, outro tipo de estresse bastante comum tem origem psicossocial. A introdução de novos indivíduos em ambientes onde já existe dominância pré-estabelecida é cada vez mais comum, sendo as razões as mais variadas, como redução de custos (animais de produção), física (espaços limitados para comportar diversos espécimes) ou ética (ressocialização para reintrodução na natureza ou simulação de ambiente natural). Todas essas situações podem desencadear alterações comportamentais, em função das alterações nas relações de dominância ou posição social, refletindo diretamente na qualidade de vida dos animais. Neste tipo de situação, geralmente, o animal introduzido, após conflito com o dominante apresenta comportamento de submissão. O conflito persistente e os conflitos constantes muitas vezes desencadeiam uma série de respostas não adaptativas resultando na manifestação clínica de sinais de depressão, como perda de peso, perda de

interesse por estímulos novos ou perda de prazer na realização algumas atividades (BOERE, 2001).

2.6 Efeitos do Estresse

Torna-se necessária a diferenciação de duas situações: nem todos os estados de perturbação da homeostase são nocivos. Acredita-se que estados leves, passageiros e controláveis são apenas uma sobrecarga para o organismo, podendo ser estímulos positivos para o crescimento emocional e intelectual. Já as situações severas e incontroláveis são encaradas como estresse e geralmente levam à estados de franca doença.

O estresse tem um impacto profundo sobre o desenvolvimento de psicopatologias que afetam diversos processos fisiológicos como endócrino, imunológico, sistema nervoso central e respostas cardiovasculares. A exposição a eventos estressantes é capaz de perturbar a regulação normal do eixo neuroendócrino e, embora a maioria das pesquisas neste campo tem apontado, principalmente, para os hormônios clássicos do estresse: glicocorticóides e catecolaminas (McEWEN *et al.*, 1998), vêm aumentando as evidências que indicam que os hormônios tireoidianos (HT) também participam da resposta ao estresse crônico (CREMASCHI *et al.*, 2000; SILBERMAN *et al.*, 2002).

A atividade de outros eixos hipotalâmicos-hipofisários também é afetada pela ativação da resposta ao estresse, incluindo o sistema Hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) (WILDER, 1995).

2.7 Estresse Social e Modelos de Derrota Social

O impacto dos eventos estressantes no desenvolvimento de psicopatologias tem sido constantemente estudado em ensaios pré-clínicos em animais. Neste sentido, diversos trabalhos têm demonstrado que diferentes tipos de estressores assim como sua duração, previsibilidade e intensidade geram diferentes respostas fisiológicas ao estresse (PUGLISI-ALLEGRA *et al.*, 1991). Sendo assim, diferentes modelos animais têm sido desenvolvidos no intuito de estudar estas psicopatologias.

Considerando-se a vida moderna, foi constatado que, dentre os estressores mais comuns no ser humano, estão aqueles de origem psicológica ou social (BJORKQVIST, 2001) o que demonstra uma clara vantagem, na escolha do modelo animal, do uso de conflito social entre membros da mesma espécie como gerador de estresse sobre aqueles modelos que utilizam estímulos físicos aversivos, como choque nas patas, contenção, privação hídrica ou exposição ao frio.

Numerosos estudos têm mostrado que a perda temporária do controle social (derrota social) é um importante fator que pode levar as alterações psicopatológicas (FUCHS & FLUGGE, 2002). Em ratos, esta condição pode ser obtida no paradigma amplamente difundido denominado “interação residente-intruso” (KOOLHAAS *et al.*, 1997). Neste paradigma, um macho adulto (o intruso) é introduzido na caixa de um animal não-familiar e agressivo (o residente). Os animais interagem rapidamente e o intruso normalmente perde o conflito (1 a 3 min.). Em ratos, esta derrota social por um macho agressivo é um estressor natural e produz uma série de alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais que muitas vezes são persistentes (KOOLHAAS *et al.*, 1997).

Apesar de diversos dados na literatura demonstrando as alterações descritas acima após a derrota social aguda, a informação sobre os efeitos crônicos do estresse social é relativamente escassa. Recentemente foi proposto o modelo de estresse social crônico como modelo animal de depressão, sendo então evidenciado que os animais submetidos à derrota social diariamente, após algumas semanas, desenvolvem um quadro semelhante ao observado

na depressão humana, manifestando dentre os sintomas anedonia (que pode ser medida pela diminuição do consumo de solução palatável como sacarose e interpretado como perda de prazer). Esta condição é revertida pelo tratamento com antidepressivos, mas não pelo tratamento com drogas que não são eficazes na depressão (RYGULA, 2005).

2.8 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide (HHT)

O hipotálamo é uma estrutura do sistema nervoso central que está envolvida em uma série de processos fisiológicos, tais como controle da temperatura corporal e ingestão alimentar. Apresenta também grupamentos neuronais que se relacionam ao controle da função endócrina, os quais, em conjunto, constituem o chamado hipotálamo endócrino. De fato, o hipotálamo representa funcionalmente, uma interface entre o sistema nervoso e endócrino (NUNES, 2008).

A hipófise ou pituitária é uma glândula que se apresenta dividida basicamente em duas porções: hipófise anterior ou adeno-hipófise e hipófise posterior ou neuro-hipófise. A adeno-hipófise é constituída de cinco tipos celulares fenotipicamente distintos. Essas células são responsáveis pela síntese e secreção de: hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio tireotrófico (TSH), hormônio do crescimento (GH), gonadotrofinas (hormônio luteinizante ou LH e hormônio folículo-estimulante ou FSH) e prolactina (Prl). A neuro-hipófise se ocupa principalmente da secreção dos hormônios antidiurético (ADH) e ocitocina (NUNES, 2008).

A hipófise se mantém conectada, através da haste hipofisária ou pedúnculo hipofisário ao sistema nervoso central, mais precisamente ao hipotálamo, com quem guarda importantes relações anatômicas e funcionais. Ocorre também o sistema vascular porta-hipotálamo-hipofisário ou sistema porta-hipofisário que é responsável pelo transporte de hormônios do hipotálamo para adeno-hipófise. Estudos dinâmicos da microcirculação local revelaram que o sangue dos vasos portais flui, principalmente, do hipotálamo para a adeno-hipófise (sendo denominado fluxo anterógrado), onde os hormônios hipotalâmicos exercem suas funções. No entanto há evidências de um fluxo sanguíneo retrógrado, por meio do qual os hormônios adeno- e, possivelmente, neuro-hipofisários têm acesso ao SNC, onde podem influenciar a secreção dos hormônios hipofisiotróficos. Desta forma, ocorrem transmissões de informações do hipotálamo para a glândula hipófise através da liberação de hormônios específicos, o que resulta em modificações de, basicamente, todas as secreções endócrinas do indivíduo (NUNES, 2008).

A tireóide é uma glândula endócrina, localizada na região cervical sobre os primeiros anéis da traquéia. Produz dois hormônios, o T3 e o T4, que são responsáveis pelo metabolismo celular. Contêm iodo e regulam a velocidade do metabolismo e o gasto calórico do nosso corpo. Os HT controlam o funcionamento de diversos órgãos como coração, fígado, rins, ovários, e outros, por isso, interferem diretamente em processos como: crescimento, ciclo menstrual, fertilidade, sono, raciocínio, memória, temperatura do corpo, batimentos cardíacos, eliminação de líquidos, funcionamento intestinal, força muscular e controle do peso corporal (MAZZAFERRI, 1980).

2.9 Fisiologia do Eixo HHT

O TRH, hormônio liberador de tireotrofina, é expresso em neurônios parvicelulares dos núcleos paraventriculares do hipotálamo, sendo armazenado nos axônios e liberado sob condições específicas, ao sistema porta hipotálamo-hipofisário, participando, assim, da regulação da atividade tireotrófica (NUNES, 2008).

A região promotora do gene do pré-pró-TRH apresenta elementos responsivos a vários hormônios e fatores transcricionais, o que revela a complexa regulação da sua expressão.

Foram identificados elementos responsivos aos hormônios tireoidianos, aos glicocorticóides, entre outras substâncias (NUNES, 2008).

O TRH atua em receptores de membrana nos tireotrofos da glândula hipófise estimulando a transcrição gênica e a secreção de TSH.

O hormônio tireotrófico ou tireotrofina (TSH) é sintetizado e secretado pelos tireotrofos, os quais representam cerca de 5 a 10% da população de células da adeno-hipófise. O TSH é o principal regulador do crescimento e da função da glândula tireóide. Ele interage com receptores presentes na membrana da célula folicular tireoidiana estimulando a expressão de proteínas envolvidas na indução de seus efeitos proliferativos e na biossíntese e secreção de hormônios tireoidianos (NUNES, 2008).

Os principais reguladores da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide são os próprios hormônios tireoidianos que atuam no hipotálamo e hipófise, modulando tanto a síntese quanto a secreção de TRH e de TSH nas diferentes situações fisiológicas.

Além da regulação neuroendócrina, os efeitos fisiológicos dos hormônios tireoidianos são regulados por complexo mecanismo extratireoidiano, resultante do metabolismo periférico dos hormônios exercido pela ação enzimática das selenioproteínas desidases e da disponibilidade de iodo no organismo (NUNES, 2008).

Outros fatores, contudo, são capazes de alterar a atividade desse eixo, como: temperatura e luz ambiente, estado alimentar e estresse, levando à ajustes homeostáticos que confirmam a importante função desse sistema na adaptação ao frio, e às alterações no metabolismo energético e ao estresse (NUNES, 2008).

2.10 Hormônios Tireoidianos e As Enzimas Iodotironina Desidases

Os hormônios tireoidianos (HT) são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de vários órgãos e tecidos de vertebrados. Embora essa ação já ocorra no período embrionário, alguns desses órgãos e tecidos apresentam-se imaturos ao nascimento e requerem um padrão de desenvolvimento temporal específico, o qual depende de um aporte adequado de T3, o principal hormônio tireoidiano. O T3 também participa do crescimento, diferenciação e da regulação da atividade e metabolismo desses mesmos órgãos e tecidos na vida adulta, razões pelas quais os HT são considerados essenciais para a manutenção da qualidade de vida (NUNES, 2003).

O hormônio tireoidiano é produzido pela glândula tireóide na forma de um precursor inativo, a tiroxina (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tiroxina, T4). Em humanos, apenas 20% da forma biologicamente ativa do hormônio, a triiodotironina (3,5,3'-triiodo-L-tironina, T3), é secretada diretamente pela tireóide. Assim, a maior parte do T3 circulante é derivada da desidatação do anel externo da molécula de T4 nos tecidos periféricos, através da ação de enzimas denominadas iodotironinas desidases (BIANCO *et al.*, 2002). Já que a meia-vida do T4 é longa (uma semana em humanos) o papel do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide em regular a disponibilidade de T3 é complementado pela ação das iodotironinas desidases, enzimas que ativam ou inativam os hormônios tireóideos (BIANCO *et al.*, 2002; BIANCO & KIM, 2006).

As enzimas desidases são divididas em duas classes: as ativadoras (desidase tipo 1, D1; desidase tipo 2, D2) e a inativadora (desidase tipo 3, D3 ; desidase tipo 1, D1) dos hormônios tireóideos. A diferença quanto ao papel ativador ou inativador dessas enzimas sobre T3 e/ou T4 está no local de desidatação (Figura 1): as enzimas D1 e D2 retiram resíduo de iodo da posição 3' ou 5' do anel externo da tiroxina, enquanto que a D3 remove tal resíduo do anel interno do T4 e do T3 (BIANCO & KIM, 2002; GEREBEM *et al.*, 2007).

A desidase tipo 1 (D1) é expressa no fígado, tireóide e rim e catalisa conversão de T4 em T3. A desidase tipo 2 (D2), que também converte T4 em T3, é expressa na tireóide,

tecido adiposo marrom, pituitária e no cérebro onde se considera que são importantes locais para a manutenção estável da concentração dos hormônios tireoidianos (BIANCO & KIM, 2006), embora ela também contribua para a manutenção dos níveis de T3 circulantes, em particular no estado hipotireóideo (MAIA *et al.*, 2005). Em contrapartida, estudos mostram que a enzima D2 (que é amplamente expressa e apresenta uma elevada afinidade pelo T4) é a predominante via de geração do T3 apresentando, conseqüentemente, uma importante função na homeostasia dos hormônios tireóideos (VISSER TJ *et al.*, 1983; SILVA JE & LARSEM PR, 1982; GEREBEN *et al.*, 2007).

Já a enzima D3, que normalmente é expressa no sistema nervoso central e na placenta tem por função determinar o término da ação dos hormônios tireóideos atuando, conjuntamente com a D2, em um fino mecanismo de regulação externa ao eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (GEREBEN *et al.*, 2007). A D3 inativa T4 e T3 pela conversão para rT3 e 3,3-diiodotironina (T2), respectivamente, e, portanto, é reconhecido como sendo o principal meio para a depuração do plasma do HT (BIANCO & KIM, 2006).

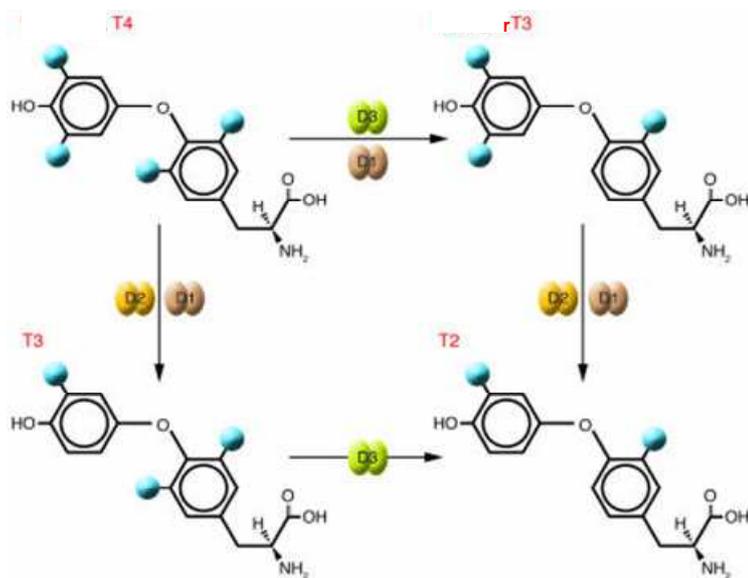


Figura 1: Reações básicas de desiodação (BIANCO & KIM, 2006).

2.11 Relação Entre o Estresse, o Eixo HHT e as Enzimas Iodotironinas Desiodases

As alterações na função tireoidiana foram descritas em transtornos psiquiátricos e hipotireoidismo clínico também foi relacionado à depressão e baixa resposta ao tratamento antidepressivo. Em conjunto, estes resultados sugerem uma complexa relação bilateral entre a função tireoidiana e distúrbios psiquiátricos.

Considerando-se a relação entre o metabolismo dos HT e o estresse, existem poucos dados sobre a atividade das desiodases no modelo de estresse (SILVA E LARSEN, 1986; BALZANO *et al.*, 1990; ANGUIANO *et al.*, 1995) e as conclusões relativas a atividade das desiodases no estresse social crônico são efetivamente ausentes. Sabendo-se do papel essencial das desiodases na fisiologia dos HT, é razoável que se admita que os estudos sobre a atividade das desiodases iria acrescentar novos conhecimentos para melhor compreender a complexa relação entre a tireóide e o estresse induzido por distúrbios psiquiátricos.

2.12 Estresse e Serotonina

Inúmeras evidências favorecem a hipótese de que a neurotransmissão serotoninérgica seja sensível a diferentes estresses e que esteja envolvida com os processos de adaptação a eventos aversivos (DEAKIN & GRAEFF, 1991; CHAOULOFF, 1993). Por exemplo, a adaptação à imobilização forçada é acompanhada de aumento da sensibilidade da neurotransmissão serotoninérgica e a administração de agonistas para receptores serotoninérgicos previne o desenvolvimento dos déficits comportamentais induzidos por esse estresse (KENNETT *et al.*, 1987).

Várias evidências apontam o hipocampo como local desta interação entre estresse repetido e serotonina (DEAKIN & GRAEFF, 1991). Baseados nelas, foi também sugerido que projeções serotoninérgicas que partem do núcleo mediano da rafe (NMR) para o hipocampo, estrutura rica em receptores serotoninérgicos, seriam as responsáveis por esta adaptação ao estresse repetido, desconectando as associações aversivas previamente aprendidas de suas consequências comportamentais. Assim, projeções hipocampais oriundas deste núcleo, através da ativação de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}, poderiam atenuar a formação de memórias relacionadas ao medo e diminuir as respostas do hipocampo a eventos ameaçadores. Quando muito intenso, o estresse repetido diminui o número e a função de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo (VAN RIEDEL *et al.*, 2003; FLUGGE, 1995), um efeito possivelmente mediado por glicocorticóides. Em humanos, a depressão maior está associada com diminuição de 5-HT_{1A} em regiões prosencefálicas (SARGENT *et al.*, 2000). Dessa maneira, o prejuízo da neurotransmissão serotoninérgica hipocampal causado por exposição a estressores severos dificultaria a adaptação ao estresse crônico e predisporia ao desenvolvimento de depressão (DEAKIN & GRAEFF, 1991).

Drogas antidepressivas, por aumentarem, com o uso prolongado (BLIER, 2003), a neurotransmissão serotoninérgica, reverteriam este quadro. Estudos realizados anteriormente têm dado suporte a tal hipótese. Assim, foi demonstrado que a administração hipocampal de inibidores seletivos da recaptção de serotonina previne o efeito ansiogênico provocado pela exposição de ratos à imobilização forçada (GUIMARÃES, 2000).

A fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptção da serotonina (ISRS), é uma substância reconhecidamente eficaz para o tratamento dos sintomas da depressão humana (EDWARDS, 1995; O'SHEA, 1991).

O cloridrato de fluoxetina é o primeiro representante da chamada nova geração de antidepressivos, drogas que garantem eficácia no tratamento da depressão maior e ansiedade com menor risco de causar efeitos colaterais (WOOD, 1994).

Anteriormente, vários estudos apresentaram resultados ambíguos quanto aos efeitos dos ISRS (antidepressivos tricíclicos, a classe mais comum de antidepressivos estudados até agora), sobre a função da tireóide (BRADY & ANTON 1999; JOFFE & SINGER, 1990). Sabe-se que poucos estudos têm avaliado o efeito dos ISRS sobre a função da tireóide em experimentos relacionados ao estresse.

3 OBJETIVOS

1. Padronizar o modelo de estresse social como um modelo de estresse em nosso laboratório;
2. Realizar um estudo seriado do estresse social, avaliando seus efeitos à curto e longo prazo;
3. Avaliar as possíveis alterações comportamentais de ratos submetidos ao estresse social em diferentes períodos de exposição ao estímulo estressor;
4. Avaliar as possíveis alterações séricas dos HT em ratos submetidos ao estresse;
5. Investigar o papel das enzimas iodotironinas desidases no metabolismo dos HT de ratos estressados;
6. Avaliar os efeitos do tratamento com a fluoxetina no comportamento dos animais estressados;
7. Determinar se o tratamento com fluoxetina pode evitar as possíveis alterações nos níveis séricos dos hormônios da tireóide, induzidas pelo estresse nesse modelo experimental.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os animais utilizados foram procedentes do biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ. Os animais permaneceram em sala climatizada em temperatura controlada ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) e controle de claro-escuro (12 horas por período), sendo a iluminação acionada a partir das 6 horas da manhã até as 6 horas da noite com água e ração *ad libitum*.

Todos os experimentos foram desenvolvidos seguindo normas internacionais de utilização de animais de laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*) publicado pelo *US National Institutes of Health (NIH Publication n^o 85-23, revised 1996; <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309053773>)* e aprovado pelo comitê de ética institucional: CEPBE/IB/UFRRJ- número 014/2008.

4.1.1 Ratos Wistar machos

4.1.1.1 Intrusos

Animais jovens, inicialmente com aproximadamente 200 gramas (g), (n = 26) utilizados no conflito social e (n = 26) mantidos em situação controle, e um grupo estressado tratado com fluoxetina (n = 8), os quais permaneceram ao longo de todo o experimento em caixas individuais de plástico (20 cm x 30 cm x 25 cm), inclusive na fase de adaptação (durante duas semanas antes do experimento).

4.1.1.2 Residentes

Animais mais velhos, inicialmente com aproximadamente 450 gramas (g), sendo (n = 20), utilizados no conflito social com os intrusos. Permaneceram ao longo de todo o experimento alojados com fêmeas ovariectomizadas, exceto durante os conflitos sociais, quando os residentes ficavam em contato com os intrusos. Os residentes em companhia das fêmeas ovariectomizadas foram alojados em caixas de plástico (35 cm x 50 cm x 35 cm), com o objetivo de estimular a agressividade territorial.

4.1.1.3 Sparrings

Animais jovens, inicialmente com aproximadamente 200 gramas (g), (n = 10) utilizados para treinamento dos residentes, antes do conflito social direto com os intrusos. Permaneceram alojados individualmente durante a fase de treinamento dos residentes (durante duas semanas antes do início do experimento) em caixas individuais.

4.1.2 Ratos Wistar fêmeas

Fêmeas mais velhas, inicialmente com aproximadamente 250 gramas (g), (n = 20), não utilizadas no conflito social, as quais permaneceram ao longo do experimento alojados com os machos residentes, com o objetivo de estimular a agressividade territorial. As fêmeas eram retiradas da caixa imediatamente antes da interação entre os machos residente e intruso.

4.2 Estudo Seriado do Estresse Social

4.2.1 Primeira etapa

Nesta etapa o objetivou-se avaliar os efeitos do estresse social à curto prazo, ou seja, após uma semana de conflito social, nos parâmetros comportamentais e na função tireoidiana, bem como no metabolismo dos HT, através da avaliação da atividade da desidase tipo I na tireóide e no fígado.

Foi realizada a interação residente-intruso (estresse social) durante sete dias com a utilização de dois grupos experimentais: controle (n = 10) e estressado (n = 10). Na semana 2 (após uma semana de estresse social) foram realizados testes comportamentais, eutanásia e coleta de sangue para dosagem hormonal (avaliação dos níveis séricos dos HT), coleta de órgãos para a anatomopatologia e avaliação da atividade das desidases.

4.2.2 Segunda etapa

Nesta etapa objetivou-se avaliar seriadamente os efeitos do estresse social a longo prazo. Ampliou-se o tempo de exposição ao estresse social com o objetivo de estudar os mesmos parâmetros da etapa anterior com um tempo maior de exposição ao conflito social. Foram realizados testes comportamentais e avaliação dos níveis séricos dos HT após três e oito semanas de estresse. Para complementar a primeira etapa, procedeu-se neste momento ao estudo seriado dos parâmetros comportamentais e hormonais, com avaliações na semana 4 e na semana 9, bem como no estudo do metabolismo dos HT, através da avaliação da atividade da desidase tipo I na hipófise, tireóide e fígado e da atividade da desidase tipo II na hipófise, BAT (*Brown Adipose Tissue*) e coração, ao término do experimento.

Foi procedida a derrota social pelo período de oito semanas, utilizado-se dois grupos experimentais: controle (n = 8) e estressado (n = 8), e na semana quatro os animais foram submetidos a testes comportamentais e também à coleta de sangue para dosagens hormonais (HT). Na nona semana foi feita a repetição dos testes comportamentais e logo em seguida a eutanásia e a partir de então foram coletadas as amostras de sangue e órgãos para a anatomopatologia e avaliação da atividade das desidases.

4.2.3 Terceira etapa

O principal objetivo desta etapa foi estudar o papel da transmissão serotoninérgica nos parâmetros comportamentais e hormonais (HT) em ratos submetidos ao estresse social.

Foi procedido o estresse social pelo período de três semanas. Nesta etapa havia três grupos experimentais: controle (n = 8), estressado (n = 8) e estressado tratado com fluoxetina (n = 8). O grupo estressado tratado com fluoxetina recebeu por via oral diariamente, 10 mg/kg de cloridrato de fluoxetina, através de gavagem. Os outros dois grupos receberam água destilada por via oral, através de gavagem. Na semana quatro os animais foram submetidos a testes comportamentais e também à coleta de sangue para dosagens hormonais (HT).

4.3 Procedimentos Gerais do Experimento

4.3.1 Estresse social: modelo de derrota social

Para o estabelecimento do modelo de estresse social, foi utilizado o procedimento de derrota social descrito inicialmente por MICZEK (1979). Para tanto, após a transferência da fêmea da companhia do macho residente, o animal experimental (intruso) foi colocado na

caixa do animal residente e após demonstrar o comportamento de submissão (postura corporal submissa, ou seja, animal imobilizado pelo residente, em decúbito dorsal, vista na Figura 2) foi separado por uma gaiola de arame permanecendo neste local por um período uma hora, tempo este suficiente para estressar o intruso. Durante este período, o animal experimental foi protegido de ataques repetidos e de potenciais lesões, no entanto, sendo ainda exposto a estímulos visuais e olfativos oriundos do residente. Após este tempo, o animal experimental (intruso) era reconduzido a sua caixa e a fêmea reconduzida para a caixa do macho residente. Os animais foram submetidos diariamente ao estresse social. Para tanto, utilizamos um sistema rotacional, ou seja, os animais eram submetidos a derrota social diariamente por animais residentes diferentes, para que não ocorresse habituação entre o residente e o intruso, desfavorecendo desta forma o conflito social.

O grupo controle foi manipulado conforme o grupo estresse, porém não foi submetido ao conflito social, simplesmente retornando à sua caixa de origem. É importante lembrar que o estresse foi realizado no período noturno (a partir das 18 horas), período este mais propício, pois é o de maior atividade dos animais.

Duas semanas antes do experimento, durante a fase de adaptação dos intrusos em suas caixas individuais, concomitantemente foi realizado o treinamento dos residentes. O treinamento consiste no conflito social entre o residente e o animal *sparring*. Da mesma forma como no modelo de derrota social com o intruso, o *sparring* é colocado em contato com o residente macho, após a transferência da rata que ocupava a mesma caixa para uma outra caixa individual.

Originalmente, *sparring* é uma palavra inglesa que se referia ao ataque do galo usando seus esporões. Como o boxe adotou várias práticas e termos das rinhãs, ficou a tradição de usar o verbo "*spar*", ou seu gerúndio *sparring*, quando ocorre a luta com sentido de treino (COLLE *et al.*, 2002). Nesse contexto se originou o substantivo *sparring* para denominar o animal que tenha estilo semelhante ao do próximo adversário e que é utilizado para auxiliar no preparo para o conflito com o intruso, fazendo conflitos sociais de treinamento. Além disso, o próprio alojamento do residente com uma fêmea na mesma caixa é realizado com o objetivo de estimular a sua agressividade, e desta forma favorecer o conflito social.



Figura 2: O animal intruso submisso, em decúbito dorsal. Algumas características de dominância são observadas como pêlos ouriçados e a utilização do olfato para reconhecimento do intruso (Fonte: RYGULA, 2006).

4.3.2 Estudo da percentagem de ganho de peso

Semanalmente os animais tiveram o seu peso corpóreo aferido com a utilização de uma balança (*eletronic Kitchen scale* – SF-400). O ganho de peso corporal foi calculado como uma percentagem da média do peso corporal basal (antes do experimento). Os valores basais foram transformados em percentagens do valor médio, a partir deste momento.

4.3.3 Testes comportamentais

4.3.3.1 Teste de preferência pela sacarose (PPS)

Toda semana, rigorosamente no mesmo dia e horário, foi avaliado a ingestão de sacarose (solução de 0,8%) como medida de anedonia, através de um teste de preferência. Para tanto, pesou-se inicialmente as garrafas de água pura e solução de sacarose (peso inicial). Daí pôde-se oferecer as duas garrafas para os ratos por um período de 24 horas e depois disto pesou-se novamente as garrafas (peso final). O consumo, tanto de água como de sacarose foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final (WILLNER *et al.*, 1991). A preferência (vista na fórmula abaixo) foi calculada em valores percentuais, pela razão entre o consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e o consumo total (consumo de água (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de água) + consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose)) e multiplicando-o por 100.

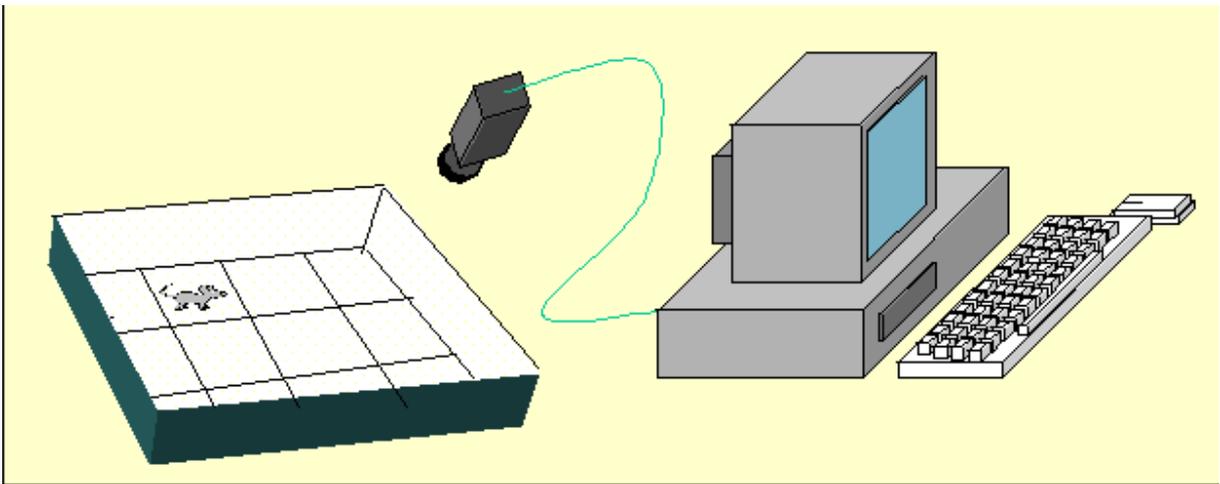
$$\text{Preferência} = \frac{\text{Consumo de Sacarose}}{\text{Consumo de Sacarose} + \text{Consumo de Água}} \times 100$$

4.3.3.2 Teste do campo aberto (CA)

Este teste foi realizado seguindo o modelo proposto inicialmente por Archer, 1973. O teste consiste em um simples protocolo, cuja avaliação dos seus componentes têm sido amplamente utilizada para mensuração de emocionalidade, atividade exploratória (MATTO & ALLIKMETS, 1999), atividade geral ou locomotora (COURVOISIER *et al.*, 1996), medo (COURVOISIER *et al.*, 1996) e ansiedade. Neste experimento os animais foram submetidos individualmente à análise de sua capacidade locomotora/exploratória e avaliados através de diferentes parâmetros. Este teste é considerado um excelente modelo sensível à drogas com atividade ansiolítica (PRUT & BELZUNG, 2003). O ensaio experimental foi realizado em uma sala escura com luz vermelha onde os ratos foram individualmente inseridos em uma caixa de acrílico branca (80 x 80 x 30 cm) dividida igualmente em 25 quadrantes. Cada animal foi colocado no centro do arranjo experimental imediatamente antes do teste e autorizado a explorá-lo por 5 min. Durante este tempo, a atividade locomotora foi gravada e elementos da atividade exploratória pontuadas pela observação e contados *off-line* (figura 3A e B). Durante 5 minutos eles puderam livremente explorar os quadrantes, onde foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: Atividade locomotora (número de vezes em que o animal invade com as quatro patas um dos campos da arena): contabilizado como o número total de quadrados percorridos ou atravessados; *Rearing* (animal apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando

ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto) (Figura 3C): contabilizado como o número total de *rearings*; Tempo de imobilidade (o tempo gasto imóvel): contabilizado como tempo total sem movimentação; Episódios de *grooming* (número de execuções de movimentos com as patas anteriores e posteriores em direção à boca ou à cabeça, podendo haver continuidade destes em direção aos pavilhões auriculares e/ou movimento de *lamber* dirigidos principalmente às porções laterais do corpo e à região genital) (Figura 3D): contabilizado como o número total de *groomings*; Tempo de “*grooming*”(tempo utilizado para a realização das atividades de *grooming*) :contabilizado como tempo total gasto para realizar o *grooming*. A arena foi limpa com uma solução etanólica 5% entre cada animal testado.

A



B



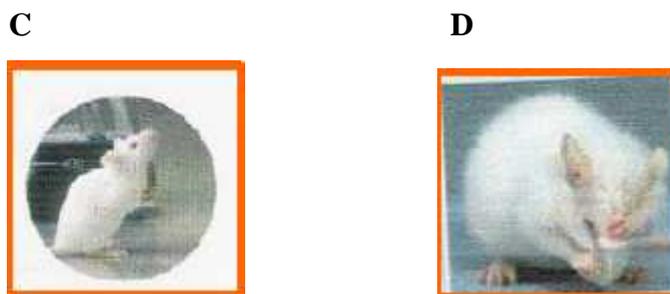


Figura 3: Campo aberto: (A) - Esquema da caixa de acrílico dividida em quadrantes para o teste do CA. Os testes foram gravados para avaliação off-line (MELLO, 2006). (B) Foto obtida na sala de testes comportamentais no laboratório de fisiologia (DCF-UFRRJ). O teste é realizado no escuro e monitorado por câmeras infravermelho, evitando - se assim qualquer tipo de influência externa, (C) Animal em atividade de *rearing* (MELLO, 2006), (D) Animal em atividade de *grooming* (MELLO, 2006).

4.3.3.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Para avaliação de aspectos relacionados à ansiedade dos animais foi realizado o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), baseado no modelo proposto em ratos por Pellow *et al.* (1985). O LCE tem sido amplamente utilizado em roedores como um protocolo de avaliação do medo, ansiedade (PELLOW *et al.*, 1985), e mais recentemente, da avaliação de risco em camundongos (RODGERS *et al.*, 1996) e ratos (MIKICS *et al.*, 2005).

O aparelho consiste de dois braços abertos opostos (50 x 10 x 40 cm) e dois fechados (50 x 10 x 1 cm), também opostos, em forma de cruz grega, conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm) e elevado a 45 cm do nível do chão (Figura 4A e B). Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 minutos.

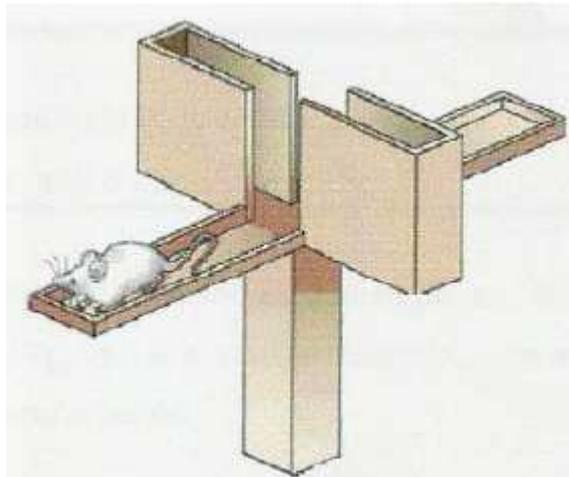
Uma alteração nos parâmetros relativos aos braços (frequência de entradas e o tempo gasto em cada tipo de braço) é indicativa de parâmetros relacionados à ansiedade. A frequência total de entradas foi obtida pela soma simples das frequências de entrada nos braços abertos e nos fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas nos braços abertos e fechados, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a porcentagem de tempo em que os animais permaneceram em cada braço em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100.

Foi quantificado também no labirinto medidas de avaliação etológica como o número de *rearings*, utilizado na avaliação da atividade exploratória (RODGERS & COLE, 1993) e "*stretch attend posture*" (SAP), quando o animal estende seu corpo completamente com as patas dianteiras, mantendo as patas traseiras no mesmo lugar, e volta para a posição anterior, sendo utilizado como medida do comportamento de "avaliação de risco", utilizado na avaliação do grau de ansiedade.

Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entrada e tempo) revela um efeito ansiolítico, e o inverso é verdade. O número de entradas no braço fechado avalia a atividade motora dos animais. Este teste é considerado um excelente modelo de avaliação do status de ansiedade (RODGERS *et al.*, 1999). Além disso, durante este teste é

possível avaliar aspectos que envolvem emocionalidade e a tomada de decisão dos animais que está diretamente relacionado com o status de ansiedade.

A



B



Figura 4: (A) - Esquema do aparelho utilizado no teste do LCE, com os braços fechados e abertos opostos conectados pela plataforma central. Os testes foram gravados para avaliação *off-line*. (MELLO, 2006). (B) Labirinto em cruz elevado (LCE). A foto acima foi obtida na sala de testes comportamentais no laboratório de fisiologia (DCF-UFRRJ). O LCE também é realizado no escuro e monitorado por câmeras infravermelho, evitando - se assim qualquer tipo de influência externa.

4.3.3.4 Teste do nado forçado (NF)

Neste teste, os animais foram submetidos individualmente à análise do status depressivo, através de um modelo adaptado de Porsolt *et al.*, em 1977, no qual foi quantificado o período de imobilidade, e quanto maior este tempo, menor o estímulo do animal em querer escapar do tubo (RUSSELL *et al.*, 2008) durante um período de 5 minutos. Neste teste, os ratos foram inseridos individualmente dentro de um cilindro de acrílico de 25 cm de diâmetro contendo água a 25°C e uma profundidade de 30 cm, sendo incapazes de

escapar ou tocar no fundo do cilindro (Figura 5A e B). Vinte e quatro horas antes, os ratos foram submetidos a 15 minutos de sessões de nado forçado para reconhecimento e adaptação do teste programado. No dia seguinte, os ratos foram submetidos ao teste válido da natação forçada.

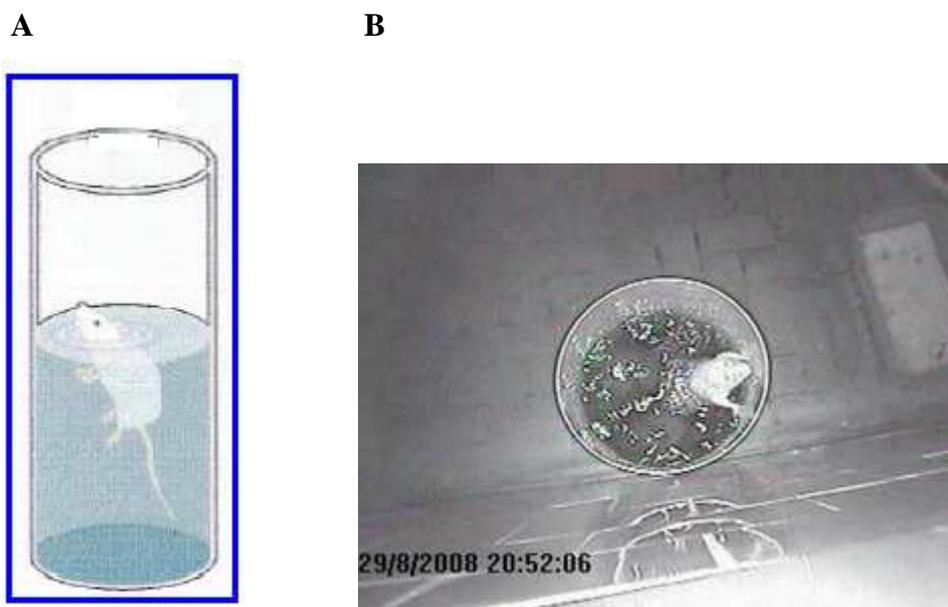


Figura 5: (A) Esquema do teste do nado forçado (MELLO, 2006). (B). Foto do teste do nado forçado que é realizado no escuro, e visualizado através de câmeras especiais (infravermelho). A foto acima foi obtida na sala de testes comportamentais no laboratório de fisiologia (DCF-UFRRJ).

4.3.4 Coleta de sangue para radioimunoensaio (RIE)

Amostras de sangue foram coletadas antes (basal), durante e ao término do experimento (no dia da eutanásia, a qual foi realizada por decapitação). As amostras foram coletadas da veia jugular com a utilização de seringa descartável de 3 ml acopladas a agulhas 25x7 com anticoagulante (heparina). A coleta foi feita após anestesia com ketamina (50mg/kg, ip) e Xilazina (5mg/kg, ip), sempre entre 18:00 horas e 21:00. O sangue coletado foi colocado em tubos de polipropileno para centrífuga de fundo cônico (tipo *Falcon*) de capacidade 15 ml, modelo 91015 da marca TPP. Posteriormente, o sangue foi centrifugado (3000 rpm por 20 min) e o plasma separado das amostras com a ajuda de uma pipeta e colocado em microtubos tipo eppendorf, previamente identificados, sendo posteriormente armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das dosagens das concentrações séricas por RIE.

4.3.4.1 RIE para TSH sérico

A avaliação dos níveis de TSH sérico foram realizadas utilizando-se um kit específico de RIE, obtidos do *National Institute of Diabetes, and Kidney Diseases* (NIDDK - Bethesda, EUA), e expressos em termos da preparação de referência 3 (PR-3). Esse kit é composto por TSH murino purificado para a preparação das amostras utilizadas na curva padrão (0,625 a 25 ng/ml), TSH murino purificado para ser iodado e anticorpo de coelho anti-TSH murino (1^o anticorpo).

A iodinação da molécula de TSH com ^{125}I foi realizada no laboratório de Fisiologia endócrina Doris Rosenthal - IBCCF/UFRJ pelo método da cloramina T, sendo a molécula marcada purificada em uma coluna de gel de poliácridamida (Biogel-P60 fino da Bio-rad, EUA), conforme previamente descrito (Ortiga, 1992).

O RIE para TSH foi realizado pelo método do 2º anticorpo (anti-rabbit Ig G, sigma), em adição de 6% de polietilenoglicol. O TSH sérico foi expresso em ng/ml.

4.3.4.2 RIE para T3 e T4 totais e corticosterona séricos

As concentrações séricas de T3 e T4 foram determinadas através de kit comercial para RIE Kits (MP Biomedicals, LLC, E.U.A.) contendo anticorpos específicos aderidos á parede dos tubos de polipropileno e com T3 e T4 ligados ao radiotraçador (^{125}I) com atividade específica de 5 Uci/ μg . As curvas padrão foram realizadas com T3 e com T4 em soro de rato livre de iodotironinas (soro zero) nas concentrações de 25 a 1000 ng/dl e 1 a 50 $\mu\text{g}/\text{dl}$, respectivamente. Todo o procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fornecedor. Os resultados foram expressos ng/dl para o T3 e em $\mu\text{g}/\text{dl}$ para o T4.

Os níveis séricos de corticosterona são analisados através de Kit de RIE específico para ratos e camundongos (MP Biomedicals, LLC, E.U.A.). Todo o procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fornecedor constantes nos kits. Os resultados foram expressos em ng/ml para a corticosterona.

Em todos os radioimunoensaios as amostras foram dosadas em duplicata e a detecção da radioatividade foi realizada em um cintilador de fase sólida Wizard (1470 Wallac Wizard *tm automatic gamma counter*).

4.3.5 Determinação da atividade das iodotironina desiodases:

4.3.5.1 Determinação da atividade da iodotironina desiodase tipo I

A atividade da D1 foi avaliada na tireóide e no fígado. A atividade da D1 foi determinada pelos métodos previamente publicados (BERRY *et al.*, 1991). As amostras de fígado foram pesadas em balança digital (*Precision Advanced*) e 25 mg do tecido foi adicionado a 1 ml de solução tampão sucrose-DTT (0,25 M sucrose e 10 mM DTT), assim como a glândula tireóide, em que à uma glândula foi adicionado a mesma solução. Os tecidos foram homogeneizados, em gelo, utilizando-se o Ultra-turrax T25 (Ika-Labortechnik). Os homogeneizados foram armazenados a -70°C até o dia do ensaio. Alíquotas de 20 μl foram estocadas separadamente a -20°C para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). As amostras foram solubilizadas com NaOH 2,5 N pelo menos 30 minutos antes da dosagem (sempre em duplicata) e a albumina bovina sérica (BSA- Sigma, MO, EUA) foi utilizada para a construção de uma curva padrão.

O traçador radioativo foi purificado em virtude das desiodações espontâneas das iodotironinas marcadas, mesmo na ausência da enzima. Para a purificação, foi utilizada uma coluna de 2 ml de Sephadex L20 (*Amersham Biosciences*) (4 ml de H₂O/g de gel seco) para se obter somente o rT3 radioativo presente na solução, com atividade específica de 1210 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ (44,8 MBq/ μg) (*Perkinelmer Life Sciences, Inc., Boston, MA*). Uma alíquota de 70 μl do rT3 marcado foi diluída em 12 ml de H₂O destilada e aplicada à coluna, seguindo uma lavagem com 6 ml de água destilada. Desprezou-se os eluatos contendo radioiodeto e o rT3 marcado foi eluído com 4,5 ml de etanol 70%. O eluato de etanol 70% contendo a iodotironina foi colhido em nove tubos de vidro, de onde foram retirados 5 μl para contagem da radiação gama no contador Wizard (1470 Wallac Wizard *tm automatic gamma counter*).

Os tubos com mais de 5000 cpm/5 µl foram reunidos e guardados a 4°C ao abrigo da luz, até o dia seguinte, quando era realizado o ensaio.

A atividade da D1 foi determinada em tampão PE (100 mM de fosfato de sódio, 1 mM EDTA, pH 6,9) contendo ditioneitol (DTT) 10 mM (cofator da enzima), rT3 frio 1 µM, volume de homogeneizado tecidual calculado para conter 30 µg de proteína por fígado e tireóide, sendo que a reação foi iniciada pela adição de 50 µl do rT3- ¹²⁵I (50000 cpm). Durante 60 minutos, os tubos foram incubados a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho de gelo. Em seguida foram acrescentados 200 µl de soro fetal bovino (Cultilab, BR) gelado e 100 µl de ácido tri-cloro acético (TCA) 50% para a precipitação das proteínas. Os tubos foram agitados vigorosamente no vortex durante 2 minutos e centrifugados (10000 rpm por 3 minutos, microcentrífuga). Finalmente, 360 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos de contagem para medir a radioatividade no contador gama. A atividade da enzima foi expressa em pmoles de rT3/ min. mg de ptn.

4.3.5.2 Determinação da atividade da iodotironina desiodase tipo II

Estudamos a atividade da D2 na hipófise e no tecido adiposo marrom (BAT), tecidos onde a atividade da D2 já foram previamente documentadas (FORTUNATO *et al.*, 2006), bem como no coração, onde a expressão D2 tem sido raramente descrita. Em suma, uma glândula pituitária, 40 µg de ventrículo esquerdo e 25 mg de BAT foram pesadas em balança digital (*Precision Advanced*) e posteriormente foram homogeneizados em solução tampão 0,1 M de fosfato de sódio, contendo de 1 mM de EDTA, 0,25 M de sacarose e 10 mM ditioneitol (pH 6,9), em gelo, utilizando-se o Ultra-turrax T25 (Ika-Labortechnik). Os homogenatos foram armazenados a - 70°C até o dia do ensaio. Alíquotas de 20 µl foram estocadas separadamente a - 20°C para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). As amostras foram solubilizadas com NaOH 2,5 N pelo menos 30 minutos antes da dosagem (sempre em duplicata) e a albumina bovina sérica (*BSA- Sigma, MO, EUA*) foi utilizada para a construção de uma curva padrão.

Homogenatos (amostras de 50 µg de proteína para a hipófise, 150 µg para BAT e coração) foram incubadas em duplicata, 2 h para a hipófise, 3 h para BAT e coração, a 37°C, com 1 mM [¹²⁵I] T4 (Perkin Elmer-Vida e Analytical Sciences), 1 mM PTU, e de 20 nM de ditioneitol (USB) em 100 mM de solução tampão de fosfato de potássio contendo 1 mM EDTA (pH 6,9) em uma reação com volume de 300 µl, conforme descrito anteriormente (BERRY *et al.*, 1991, FORTUNATO *et al.*, 2006). A reação foi interrompida num banho de gelo, com a adição de 200 µl soro fetal bovino (Cultilab, BR) e 100 µl ácido tricloroacético (50%, v / v), seguido por vigorosa agitação (Vórtex). As amostras serão centrifugadas a 10.000 R.P.M. por 3 min e o sobrenadante foi coletado para a medição do ¹²⁵I liberado durante a reação de desiodação. Então, 360 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos de contagem para medir a radioatividade no contador gama. A atividade da D2 foi relacionada com a concentração de proteína no homogeneizado, e foi expressa como femtomoles de T4 desiodado / min · mg de proteína.

4.3.6 Anatomopatologia

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados através da decapitação e as adrenais e os testículos de todos os intrusos foram dissecados, limpos e pesados. Através deste e do peso corpóreo final (peso corpóreo obtido no dia da eutanásia), foi calculado o índice adrenal e testicular, com o intuito de avaliar a influência do estresse no aparecimento de hipertrofia adrenal (por atuação no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal), ou ainda atrofia

testicular (por influencia no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal). O cálculo foi feito normalizando-se o peso dos órgãos (dividindo o peso do órgão pelo peso corporal) permitindo assim a comparação entre os resultados.

$$\text{Índice dos órgãos} = \frac{\text{Peso do órgão (mg)}}{\text{Peso Corporal (g)}}$$

4.4 Protocolos Experimentais

4.4.1 Protocolo experimental da primeira etapa:

Protocolo de estresse de curto prazo, com derrota social durante 7 dias.

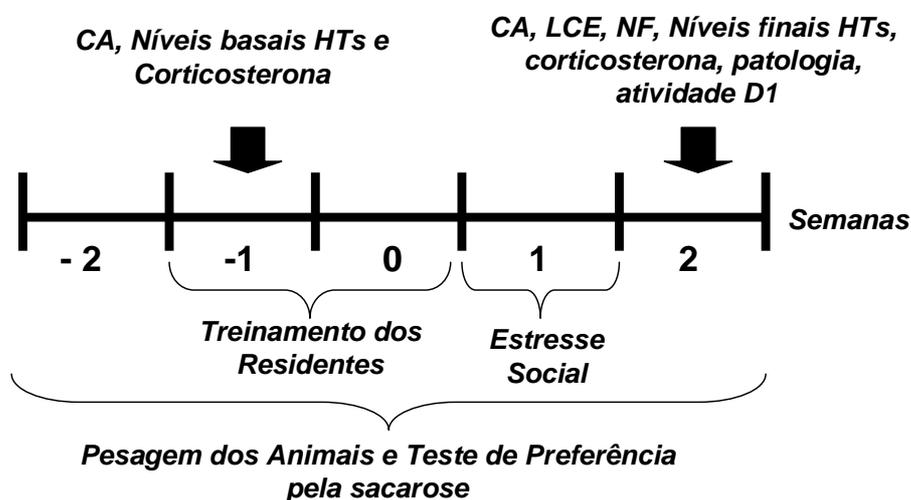


Figura 6: Protocolo que foi realizado na primeira etapa do experimento. Duas semanas antes do conflito social (semana -1 e 0) os ratos residentes foram treinados para o conflito social com os ratos *sparrings*. Concomitantemente, os ratos intrusos foram submetidos a testes comportamentais (valores basais de CA e PPS) e coleta de sangue para dosagens hormonais (HT e corticosterona). Na semana 1 foi procedido o estresse social, diariamente, durante 7 dias consecutivos, entre residentes e intrusos. Na semana 2 foram feitos os testes comportamentais (CA, LCE, NF) as dosagens finais (ao final de uma semana de estresse) de HT e corticosterona e a coleta de tecidos para avaliação da atividade da D1 e para patologia. A pesagem dos animais e o teste da PPS foram realizados semanalmente no decorrer do experimento.

4.4.2 Protocolo experimental da segunda etapa:

Protocolo de estresse de longo prazo e seriado. Foi procedida a derrota social durante oito semanas e testes comportamentais e dosagens hormonais na semana 4 (após três semanas de estresse) e na semana 9 (após oito semanas de estresse).

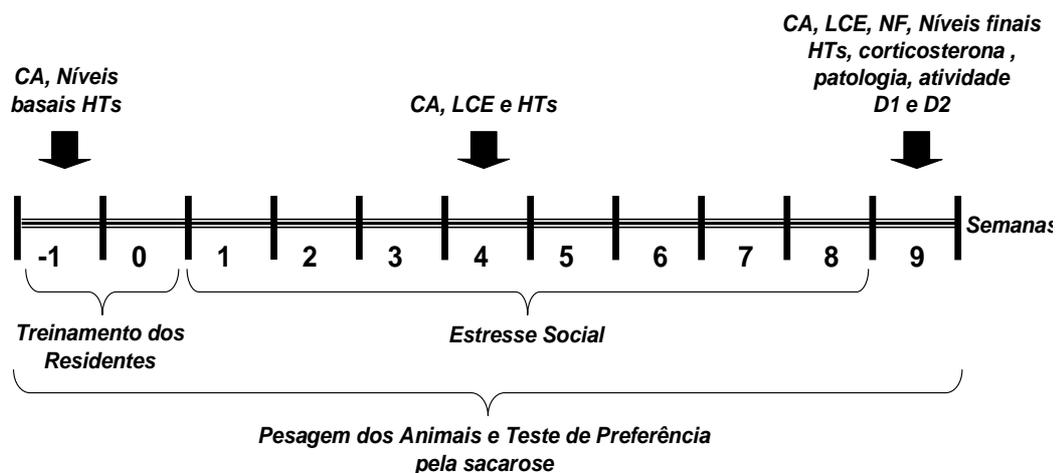


Figura 7: Protocolo que foi realizado na segunda etapa do experimento. Duas semanas antes do conflito social (semana -1 e 0) os ratos residentes foram treinados para o conflito social com os ratos *sparrings*. Concomitantemente, os ratos intrusos foram submetidos a testes comportamentais (valores basais de CA e PPS) e coleta de sangue para dosagens hormonais (HT e corticosterona). Da semana 1 até a semana 8, foi procedido o estresse social, diariamente, entre residentes e intrusos. Na semana 4 e 9 foram feitos testes comportamentais (sendo CA e LCE na semana 4 e CA, LCE e NF na semana 9) e coleta de sangue para dosagem hormonal (HT e corticosterona). Após os testes comportamentais na semana 9 foi feita a eutanásia e coleta de sangue para avaliação hormonal (HT e corticosterona) e também a coleta de tecidos para avaliação da atividade da D1 e D2 e para a patologia. A pesagem dos animais e o teste da PPS foram realizados semanalmente no decorrer do experimento.

4.4.3 Protocolo experimental da terceira etapa:

Estresse social realizado durante três semanas e concomitante administração, por via oral, através da gavagem, de cloridrato de fluoxetina.

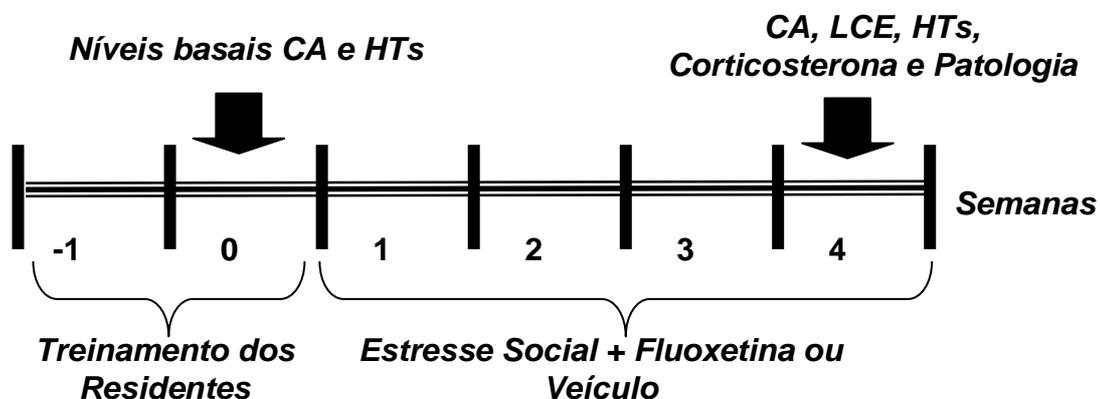


Figura 8: Protocolo que foi realizado na terceira etapa do experimento. Duas semanas antes do conflito social (semana -1 e 0) os ratos residentes foram treinados para o conflito social com os ratos *sparrings*. Concomitantemente, os ratos intrusos foram submetidos a testes comportamentais (valores basais de CA) e coleta de sangue para dosagens hormonais (HT e corticosterona). Da semana 1 até a semana 3 foi procedido o estresse social, diariamente, entre residentes e intrusos. Na semana 4 foram feitos testes comportamentais (sendo CA e LCE). Após os testes comportamentais foi feita a eutanásia e coleta de sangue para avaliação hormonal (HT e corticosterona) e também a coleta de tecidos para avaliação patológica.

4.5 Análise Estatística

A análise estatística foi utilizada para a comparação dos resultados apresentados pelos grupos experimentais. No caso de comparação entre dois valores obtidos do mesmo grupo em tempos diferentes, por exemplo, níveis plasmáticos de corticosterona antes *vs.* depois do estresse, foi utilizado o teste t de *Student* para grupos pareados. Quando a análise envolver mais de dois tempos, por exemplo, ganho de peso dos grupos estressado *versus* controle em diferentes tempos, a análise de variância será a de eleição, seguida pela determinação da significância das diferenças entre os grupos, pelo teste de Bonferroni. Em todos os testes, o grau mínimo de significância considerado foi de 95 % ($p < 0.05$) ou 99 % ($p < 0.01$) e os cálculos foram realizados no computador, utilizando para tanto, o programa *GraphPad Prism Software* (San Diego, Califórnia, USA, versão 4.0). Todos os valores serão representados como média \pm s.e.m (erro padrão da média).

5 RESULTADOS

5.1 Resultados Gerais:

5.1.1 Ganho de peso

A figura 9 mostra que os animais estressados, a partir da terceira semana de experimento, tiveram um ganho de peso significativamente menor ($140,2 \pm 6,692$ versus $117,4 \pm 5,250$ %, sendo grupo controle versus grupo estressado, respectivamente) estendendo a diferença significativa até a semana 9 ($159,7 \pm 7,045$ versus $138,0 \pm 3,222$ %, sendo grupo controle versus grupo estressado, respectivamente).

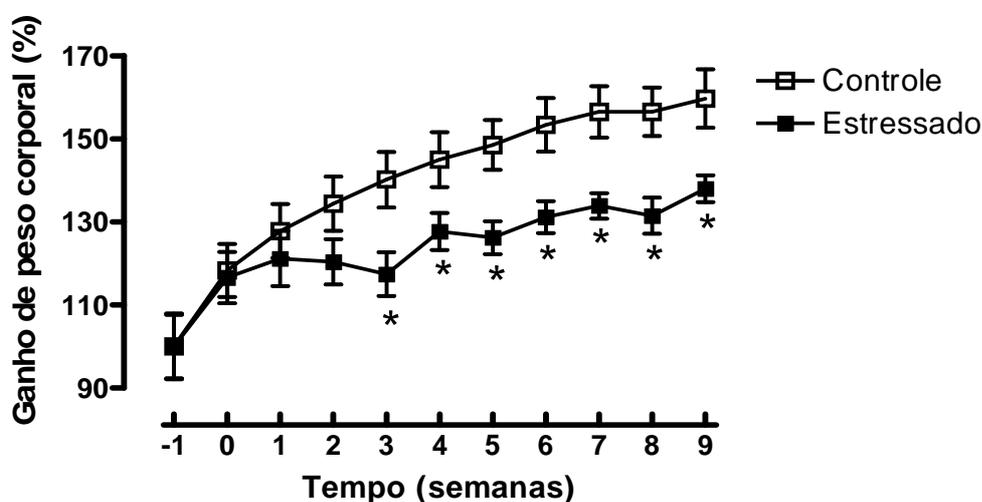


Figura 9: Evolução de peso dos grupos controle e estressado. Os valores negativos referem-se a medidas basais, obtidas antes do início do protocolo. O grupo estressado ganha significativamente (*) menos peso em relação ao grupo controle, desde a semana 3 até a semana 9 do experimento. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle ($n = 26$) e estressado ($n = 26$). Utilizou-se o teste Anova e $P < 0,05$.

5.1.2 Teste de preferência pela sacarose (PPS)

Como pode ser observado na figura 10, nos animais estressados a preferência por solução de sacarose foi significativamente menor nas semanas 3 e 9 ($80,27 \pm 6,91$ versus $32,12 \pm 24,26$ %, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 3 e $84,70 \pm 8,26$ versus $50,63 \pm 16,25$ %, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 9).

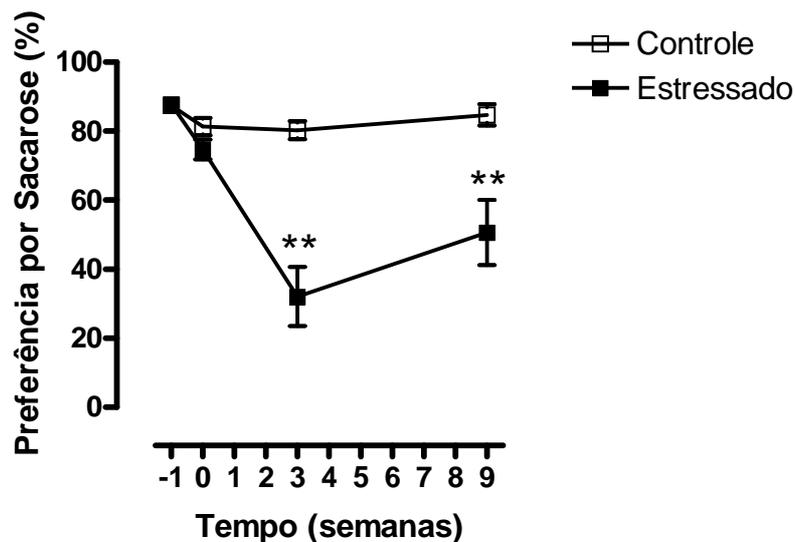


Figura 10: Preferência por sacarose ao longo de todo o experimento. Na semana 3 e na 9 os animais estressados ingeriram significativamente (**), menos a solução de sacarose 0,8% em relação ao controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 26) e estressado (n = 26). Utilizou-se o teste Anova e $P < 0,05$, sendo ** $P < 0,01$.

5.2 Primeira Etapa: Animais Estressados Durante Uma Semana

5.2.1 Testes comportamentais

5.2.1.1 Teste do campo aberto

5.2.1.1.1 Quadrados percorridos

A atividade locomotora foi avaliada utilizando como parâmetro o número de quadrados percorridos pelos animais. A figura 11 mostra que após uma semana de estresse social o grupo estressado não diferiu significativamente do grupo controle, quanto ao número de quadrados percorridos, durante os 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto ($105,5 \pm 10,87$ versus $116,2 \pm 10,40$ quadrados percorridos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 0 (basal) e $86,60 \pm 11,53$ versus $95,20 \pm 10,87$ quadrados percorridos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2).

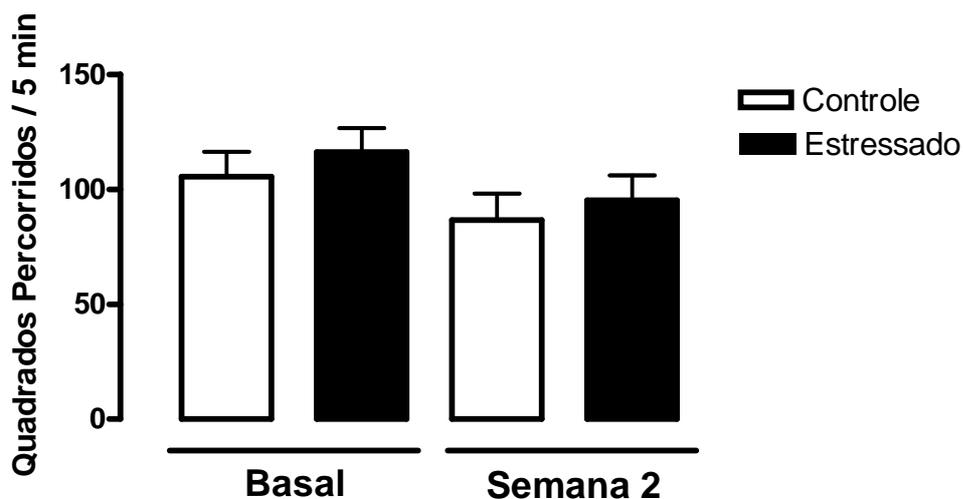


Figura 11: Número de quadrados percorridos pelos animais dos grupos estressado e controle durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os grupos na semana 2. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.2.1.1.2 Número de *groomings*

Para avaliar o grau de ansiedade após as seções de conflito social, foi contabilizado o número de *groomings* efetuados pelos animais. Após uma semana de estresse social o grupo estressado realizou um número significativamente maior de atividades de *grooming*, em relação ao grupo controle, durante 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto ($1,60 \pm 0,48$ versus $1,30 \pm 0,30$ *groomings*, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 0 e $0,50 \pm 0,23$ versus $2,10 \pm 0,46$ *groomings*, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2), como pode ser observado na figura 12.

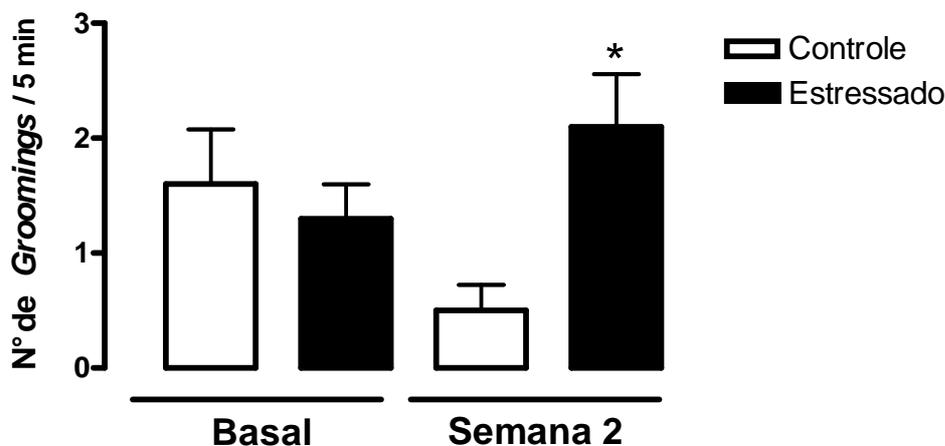


Figura 12: Número de *groomings* realizados pelos animais durante 5 minutos. O grupo estressado diferiu significativamente (*) em relação ao grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.2.1.1.3 Tempo de *grooming*

Também como um parâmetro para avaliação do grau de ansiedade foi cronometrado o tempo despendido pelos animais na realização do *grooming*. O grupo estressado realizou a atividade de *grooming* durante tempo significativamente maior em relação ao grupo controle, durante os 5 minutos de teste no campo aberto. ($3,90 \pm 1,27$ versus $4,0 \pm 1,12$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 0 e $4,1 \pm 2,4$ versus $17,0 \pm 3,42$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2), como pode ser observado na figura 13.

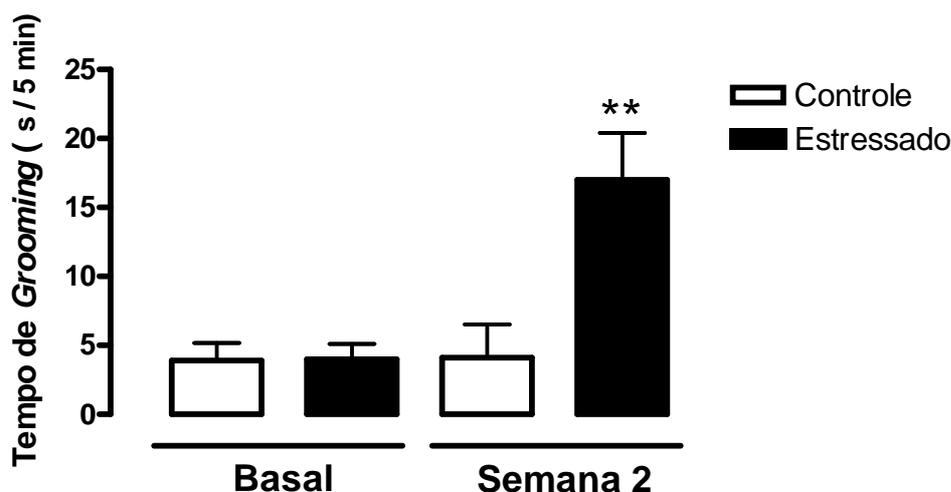


Figura 13: Tempo de *grooming* em segundos realizado pelos animais durante 5 minutos. O grupo estressado diferiu significativamente (**) em relação ao grupo controle, apresentando maior tempo de realização de *grooming*. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni*, sendo ** P < 0,01.

5.2.1.1.4 Número de *rearings*

Mais um parâmetro para avaliação da atividade exploratória é o número de *rearings* (exploração vertical) realizados pelos animais. A figura 14 mostra que após uma semana de derrota social o grupo estressado não diferiu significativamente do grupo controle, quanto ao número de atividades de *rearings*, durante os 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto, ($15,5 \pm 2,1$ versus $21,20 \pm 2,45$ *rearings*, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2).

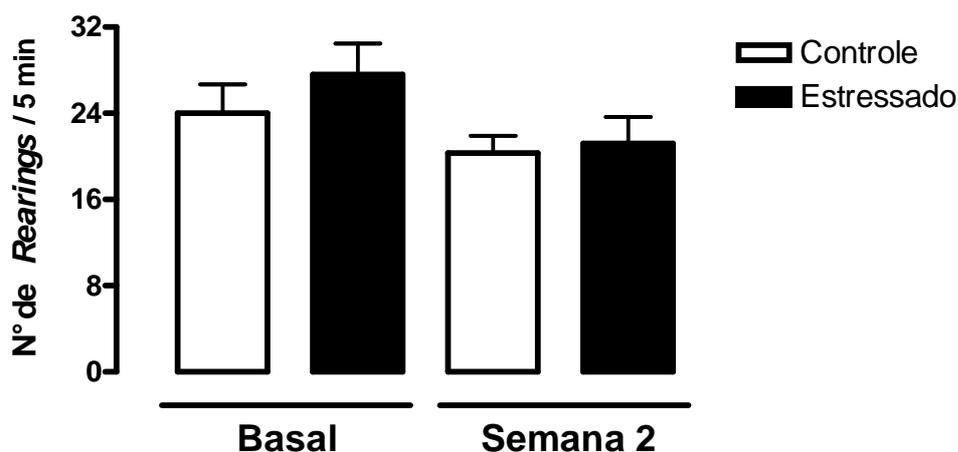


Figura 14: Número de *rearings* realizados pelos animais durante 5 minutos. O grupo estressado não diferiu significativamente em relação ao grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle ($n = 10$) e estressado ($n = 10$). Utilizou-se o teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.2.1.1.5 Tempo de inatividade

O tempo de inatividade pode ser também relacionado à atividade exploratória. A figura 15 mostra que após uma semana de derrota social o grupo estressado não diferiu significativamente do grupo controle, quanto ao tempo de inatividade, durante os 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto, ($2,1 \pm 0,81$ versus $1,1 \pm 0,64$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 0 e $4,0 \pm 0,66$ versus $2,3 \pm 0,6$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2).

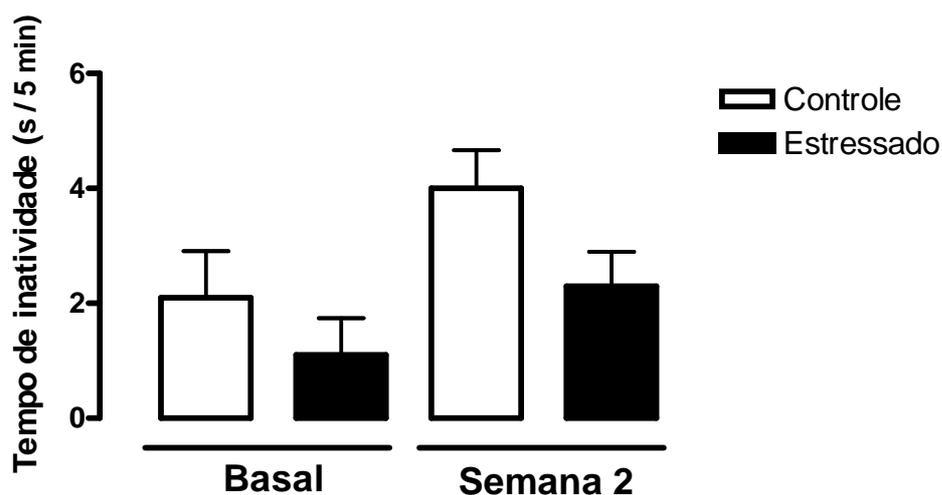


Figura 15: Tempo de inatividade dos animais em segundos durante 5 minutos. O grupo estressado não diferiu significativamente em relação ao grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle ($n = 10$) e estressado ($n = 10$). Utilizou-se o teste ANOVA one-way seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.2.1.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

5.2.1.2.1 Tempo gasto nos braços abertos

Assim como no item anterior, o tempo gasto pelos animais nos braços abertos do LCE também pode ser utilizado como um parâmetro para avaliação da ansiedade. Na figura 16 pode-se visualizar que, após uma semana de conflito social, os animais do grupo estressado não diferem significativamente quanto ao tempo gasto nos braços abertos, durante 5 minutos, em relação ao grupo controle. ($26,30 \pm 13,11$ versus $44,50 \pm 11,11$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2).

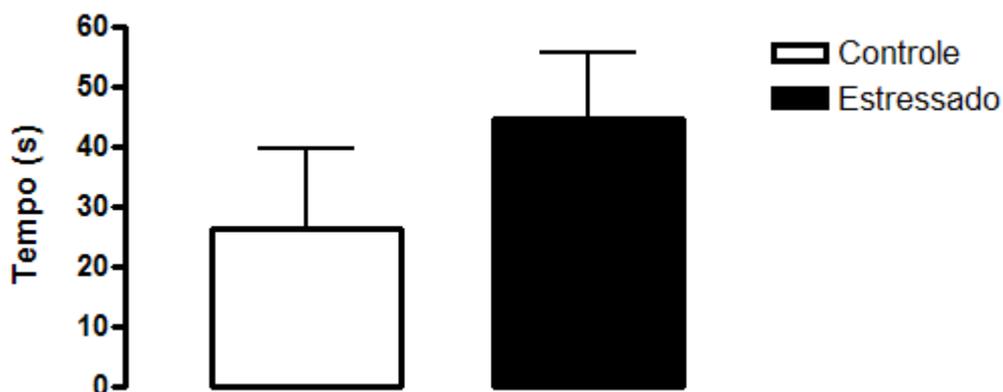


Figura 16: Tempo despendido em segundos nos braços abertos do LCE durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os grupos estressado e controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

5.2.1.2.3 Número de entradas nos braços fechados

O número de entradas nos braços fechados do LCE pode ser utilizado como medida para atividade exploratória dos animais. Na figura 17 pode-se visualizar que os animais do grupo estressado entram significativamente mais vezes nos braços fechados, durante 5 minutos, em relação ao grupo controle, após uma semana de estresse social. ($5,30 \pm 1,10$ versus $9,40 \pm 0,91$ entradas nos braços fechados, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2).

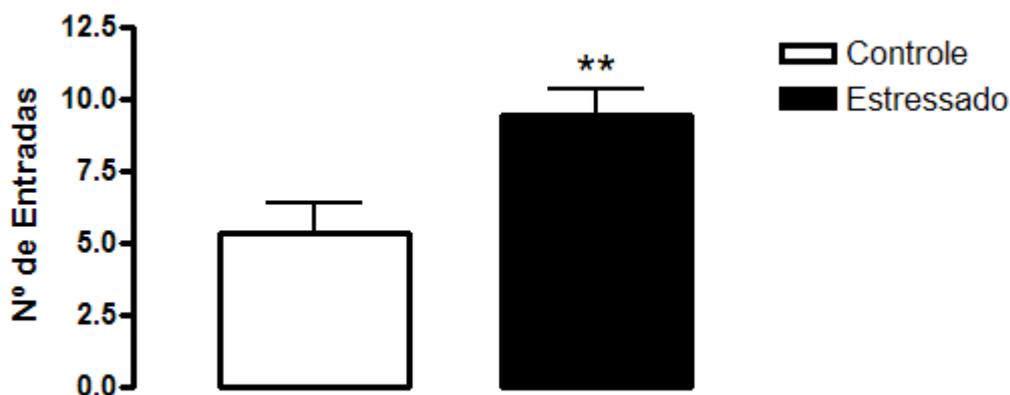


Figura 17: O número de entradas nos braços fechados do LCE durante 5 minutos. O grupo estressado entrou significativamente (**) mais vezes nos braços fechados em relação ao grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$, sendo $**P < 0,01$.

5.2.1.2.4 SAP

O número de SAP pode ser utilizado como medida para atividade exploratória dos animais. Na figura 18 pode-se visualizar que os animais do grupo estressado realizam significativamente menos SAP, durante 5 minutos, em relação ao grupo controle, após uma semana de estresse social. ($5,0 \pm 1,7$ versus $2,0 \pm 0,85$ SAP, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2).

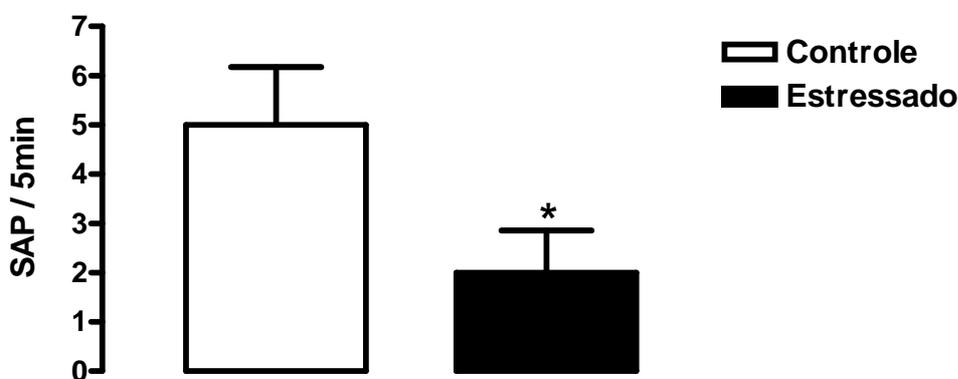


Figura 18: O número de SAPs realizados durante 5 minutos. O grupo estressado realizou significativamente (*) menos SAPs em relação ao grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

5.2.1.3 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado pode ser usado para quantificar o nível de motivação dos animais para escapar de situações adversas. Foi cronometrado o tempo de imobilidade dos animais, durante 5 minutos que foram submetidos ao nado forçado. Como pode ser observado na figura 19, após uma semana de estresse social os animais estressados não diferiram significativamente do grupo controle neste parâmetro. ($82,90 \pm 13,98$ versus $98,4 \pm 17,35$, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2).

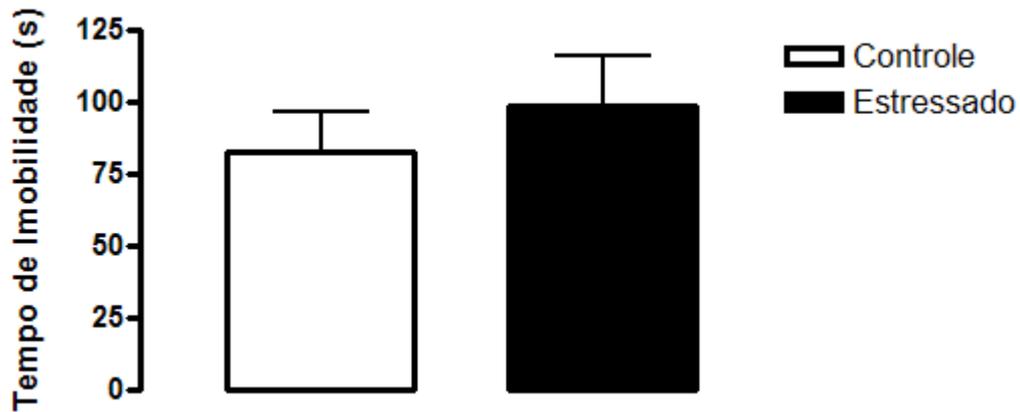


Figura 19: Tempo de imobilidade em segundos no teste do nado forçado durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os grupos estressado e controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

5.2.2 Níveis séricos de T4 e T3 (dosagem por RIE)

Após uma semana de estresse social, tanto os níveis séricos de T4 como de T3 encontravam-se significativamente reduzidos em relação ao grupo controle. Em relação ao T4 ($10,20 \pm 1,46$ versus $4,75 \pm 0,72$ $\mu\text{g/dL}$, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2) e em relação ao T3 ($89,78 \pm 6,42$ versus $44,89 \pm 2,87$ ng/dL), sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2) na figura 20.

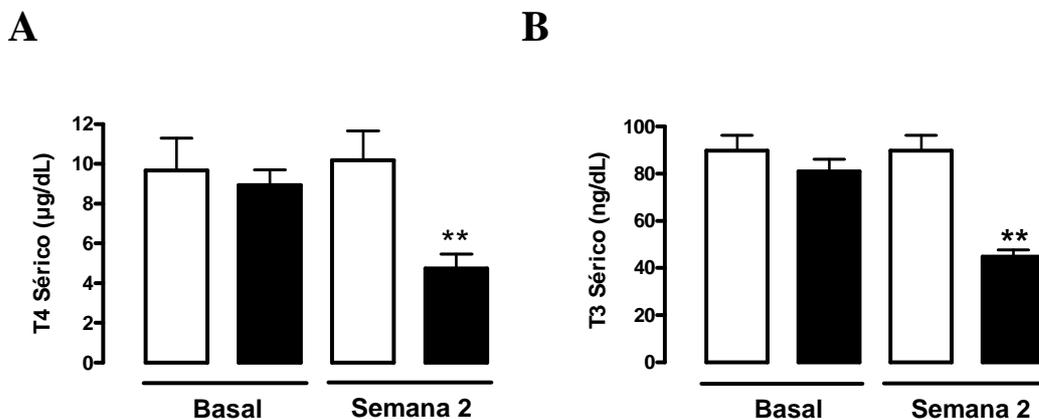


Figura 20: (A) Nível sérico de T4 ($\mu\text{g/dL}$) basal (antes do estresse social) e na semana 2 (após uma semana de estresse social). Houve redução significativa dos níveis de T4 no grupo estressado em comparação ao grupo controle após o conflito social. (B) Nível sérico de T3 (ng/dL) nos período basal e na semana 2. Houve redução significativa dos níveis de T3 no grupo estressado em comparação ao grupo controle após o conflito social. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$, sendo (** $P < 0,01$).

5.2.3 Atividade da desiodase Tipo I (D1)

A atividade da D1 na tireóide e no fígado dos ratos estressados foi significativamente menor quando comparada ao grupo controle após uma semana de estresse social. No fígado ($81,65 \pm 5,21$ versus $56,14 \pm 8,77$ pmoles rT3/min.mg.ptn, sendo grupo controle versus grupo estressado na semana 2) e na tireóide $92,78 \pm 15,42$ versus $58,77 \pm 4,74$ pmoles rT3/min.mg.ptn, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 2) como pode ser visualizado na figura 21.

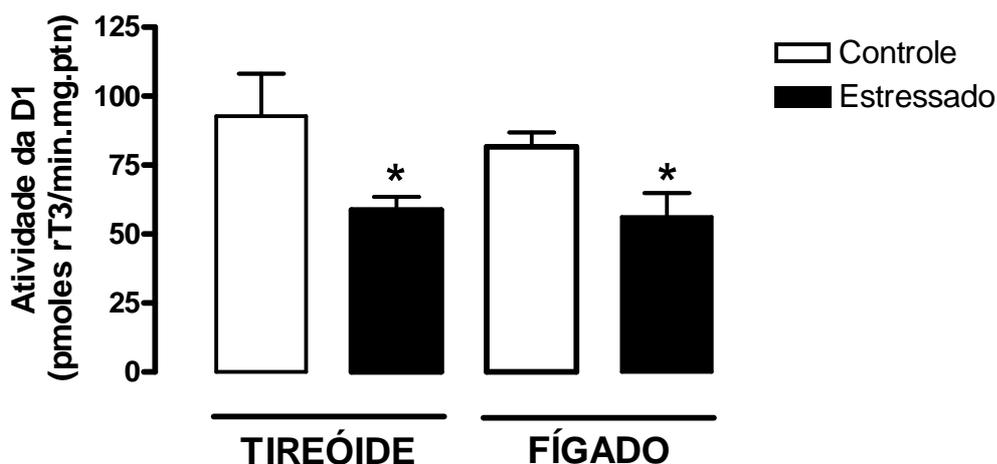


Figura 21: Atividade da D1 (pmoles rT3/min.mg.ptn) na tireóide e no fígado na semana 2 (após uma semana de estresse social). Houve redução significativa da atividade da D1 tanto no fígado como na tireóide dos ratos estressados quando comparados ao grupo controle após o estresse social. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

5.2.4 Anatomopatologia

A anatomopatologia após uma semana de estresse social está representada a seguir na tabela 1. Não houve alterações significativas entre os parâmetros avaliados na semana 2. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

Tabela 1. Peso corporal e índices adrenal, testicular dos animais dos grupos controle e estressado após 1 semana de estresse social.

	Controle	Estressado
Peso corporal (g)	339.1 ± 10.13	336.1 ± 3.48
Índice Adrenal (mg/g)	0.2051 ± 0.007	0.1852 ± 0.010
Índice Testicular (mg/g)	9.734 ± 0.207	9.740 ± 0.160

5.3 Segunda Etapa: Estudo Seriado dos Animais Estressados Durante Três e Oito Semanas

5.3.1 Testes comportamentais

5.3.1.1 Teste do campo aberto

5.3.1.1.1 Quadrados percorridos

A figura 22 mostra que após três e oito semanas de estresse social o grupo estressado apresentou diminuição significativa quanto ao número de quadrados percorridos quando comparado ao grupo controle, durante os 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto ($146,3 \pm 3,12$ versus $153,6 \pm 5,33$ quadrados percorridos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 0 (basal), $127,3 \pm 24,25$ versus $64,75 \pm 10,92$ quadrados percorridos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 4 e $155,2 \pm 14,32$ versus $97,0 \pm 14,54$ quadrados percorridos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 9).

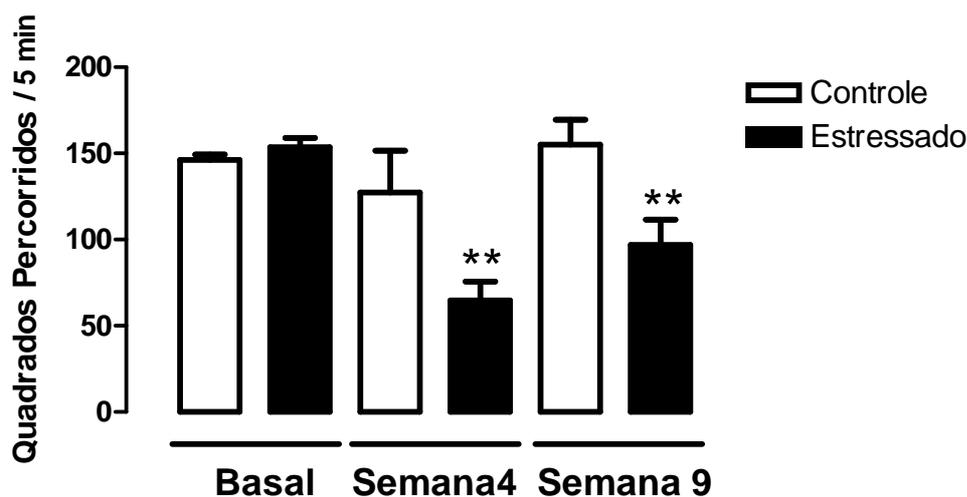


Figura 22: Número de quadrados percorridos pelos animais dos grupos estressado e controle antes do estresse social (basal), na semana 4 e na semana 9 após o estresse social, durante 5 minutos. Os animais do grupo estressado, tanto na semana 4 como na semana 9, percorreram significativamente (*) menos quadrados do que os animais do grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.3.1.1.2 Número de *groomings*

Após três e oito semanas de estresse social o grupo estressado não diferiu significativamente do grupo controle quanto ao número de atividades de *grooming*, durante 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto ($0,83 \pm 0,47$ versus $1,0 \pm 0,46$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 0, $1,875 \pm 0,69$ versus $1,00 \pm 0,38$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado, na semana 4 e $1,67 \pm 0,80$ versus $1,375 \pm 0,38$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 9), como pode ser observado na figura 23.

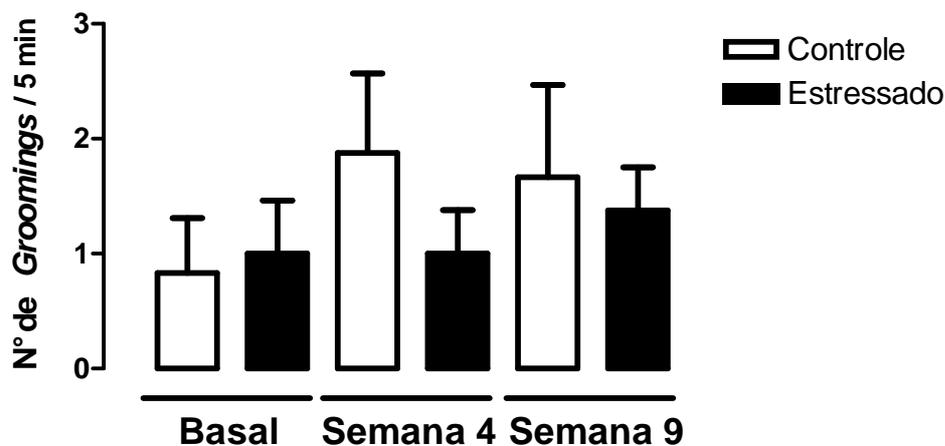


Figura 23: Número de *groomings* realizados pelos animais dos grupos estressado e controle antes do estresse social (basal), na semana 4 e na semana 9 após o estresse social, durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os grupos estressado e controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle ($n = 16$) e estressado ($n = 16$). Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.3.1.1.3 Tempo de *grooming*

Foi cronometrado o tempo despendido pelos animais na realização do *grooming*. Após três e oito semanas de estresse social o grupo estressado não diferiu significativamente do grupo controle quanto ao tempo de *grooming*, durante 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto ($4,0 \pm 3,04$ versus $0,75 \pm 0,25$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 0, $2,87 \pm 1,44$ versus $5,62 \pm 2,97$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 4 e $3,5 \pm 1,76$ versus $8,25 \pm 2,99$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado, na semana 9), como pode ser observado na figura 24.

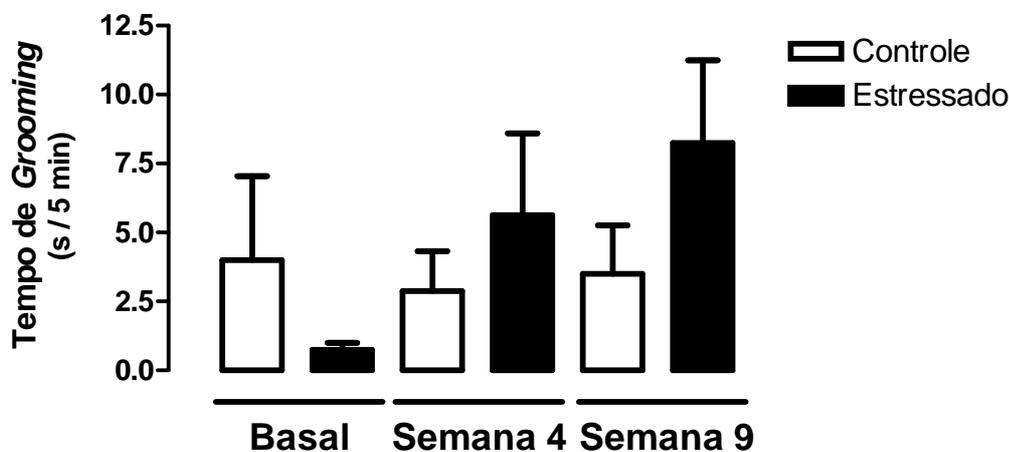


Figura 24: Tempo de *grooming* em segundos realizado pelos animais dos grupos estressado e controle antes do estresse social (basal), na semana 4 e na semana 9 após o estresse social, durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os grupos estressado e controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.3.1.1.4 Número de *rearings*

Foi contabilizado o número de *rearings* realizados pelos animais antes do estresse (basal) e após quatro e oito semanas de estresse social. A figura 25 mostra que grupo estressado realizou significativamente menos atividades de *rearing* em relação ao grupo controle após 3 semanas de estresse, durante os 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto, ($41,50 \pm 5,18$ versus $44,13 \pm 4,16$ *rearings*, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 0, $37,13 \pm 3,72$ versus $22,88 \pm 3,78$ *rearings*, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 4) e não houve diferença entre os grupos após 8 semanas de estresse ($36,50 \pm 5,08$ versus $28,38 \pm 6,89$ *rearings*, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 9).

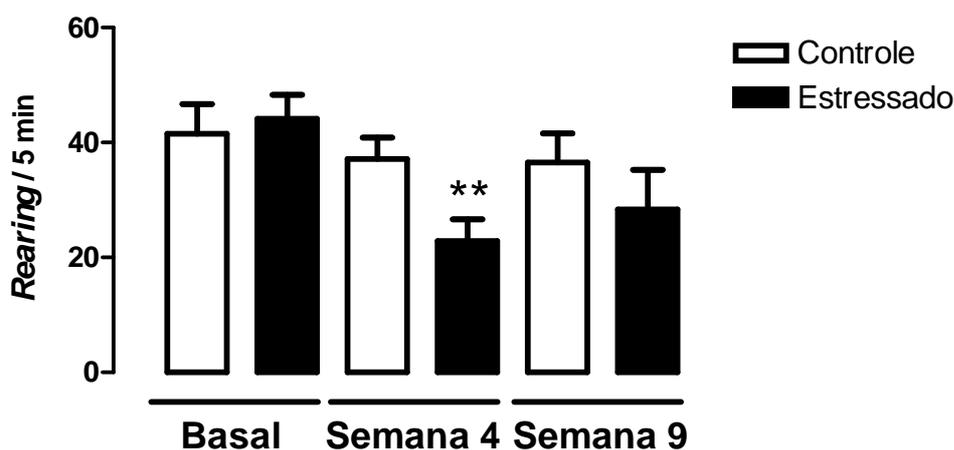


Figura 25: Número de *rearings* realizados pelos animais dos grupos estressado e controle antes do estresse social (basal), na semana 4 e na semana 9 após o estresse social, durante 5 minutos. Após 3 semanas de estresse o grupo estressado realizou menos em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos após 8 semanas de estresse. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.3.1.1.5 Tempo de inatividade

A figura 26 mostra que após três e oito semanas de estresse social o grupo estressado diferiu significativamente do grupo controle quanto ao tempo de inatividade, durante 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto ($3,50 \pm 2,43$ versus $2,75 \pm 1,72$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 0, $15,50 \pm 6,64$ versus $48,50 \pm 17,66$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 4 e $2,83 \pm 1,01$ versus $10,38 \pm 3,62$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 9).

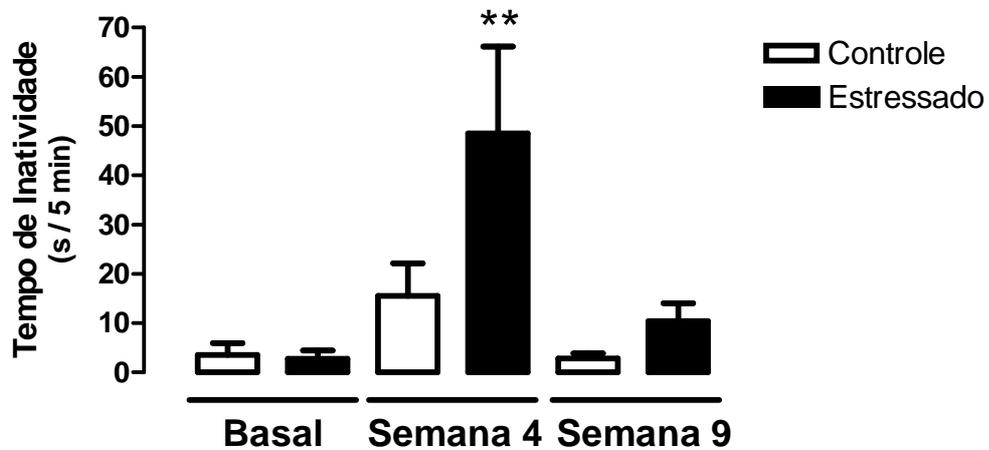


Figura 26: Tempo em segundos de inatividade dos animais dos grupos estressado e controle antes do estresse social (basal), na semana 4 e na semana 9 após o estresse social, durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os grupos estressado e controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle ($n = 16$) e estressado ($n = 16$). Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$, sendo ** $P < 0,01$.

5.3.1.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

5.3.1.2.1 Tempo gasto nos braços fechados

Na figura 27 pode-se visualizar que os animais do grupo estressado na semana 8 gastam significativamente mais tempo nos braços fechados em comparação ao grupo controle ($152,5 \pm 14,63$ versus $213,40 \pm 21,41$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 9).

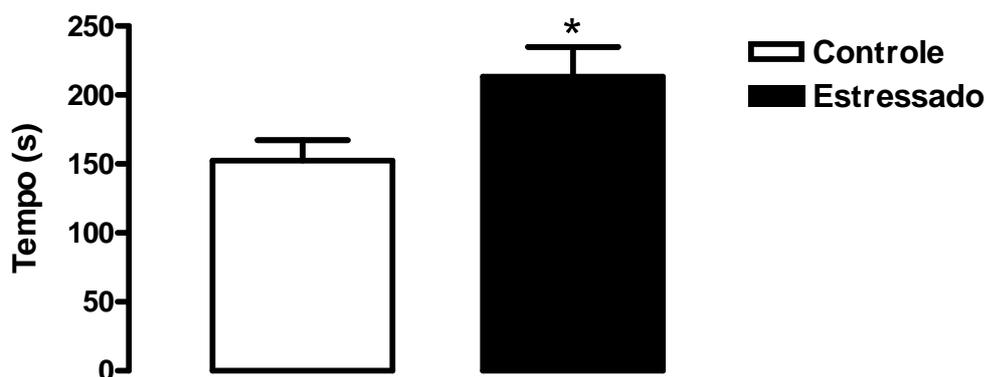


Figura 27: Tempo em segundos despendido nos braços fechados do LCE durante 5 minutos, pelos animais dos grupos estressado e controle. Na semana 9 o grupo estressado permaneceu

significativamente (*) mais tempo nos braços fechados em relação ao grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

5.3.1.2.2 Tempo gasto nos braços abertos

Na figura 28 pode-se visualizar que, após oito semanas de conflito social, os animais do grupo estressado diferem significativamente quanto ao tempo gasto nos braços abertos, durante 5 minutos, em relação ao grupo controle ($64,88 \pm 6,9$ versus $22,83 \pm 13,19$ segundos, sendo grupo controle *versus* grupo estressado respectivamente, na semana 9).

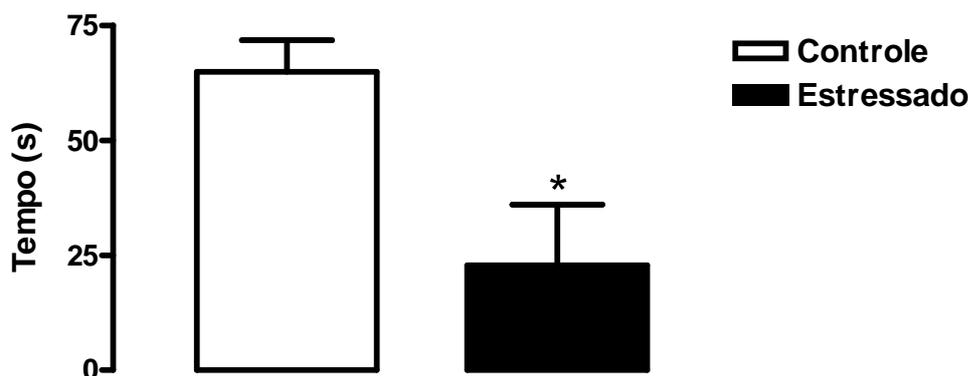


Figura 28: Tempo despendido em segundos nos braços abertos do LCE, durante 5 minutos, pelos animais dos grupos estressado e controle. Após 8 semanas de estresse social, o grupo estressado permaneceu menos tempo nos braços abertos em relação ao grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

5.3.1.2.3 Número de entradas nos braços fechados

Na figura 29 pode-se visualizar que após oito semanas de conflito social, os animais do grupo estressado não diferem significativamente quanto ao número de entradas nos braços fechados, durante 5 minutos, em relação ao grupo controle ($9,0 \pm 0,77$ versus $7,5 \pm 1,32$ entradas nos braços fechados, sendo grupo controle *versus* grupo estressado respectivamente, na semana 9).

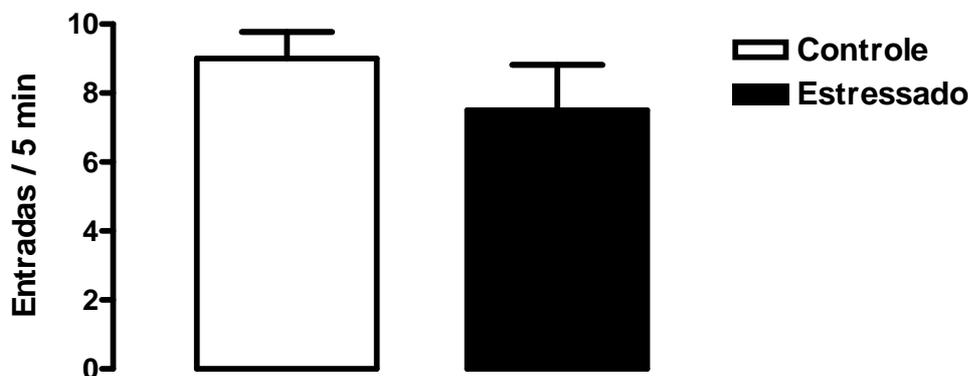


Figura 29: O número de entradas nos braços fechados do LCE, durante 5 minutos, dos animais dos grupos estressado e controle. Após 8 semanas de estresse não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

5.3.1.2.4 SAP

Na figura 30 pode-se visualizar que os animais do grupo estressado realizam significativamente mais SAP, durante 5 minutos, em relação ao grupo controle, após uma semana de estresse social. (5.0 ± 1.17 versus 2.0 ± 0.85 SAP, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 9).

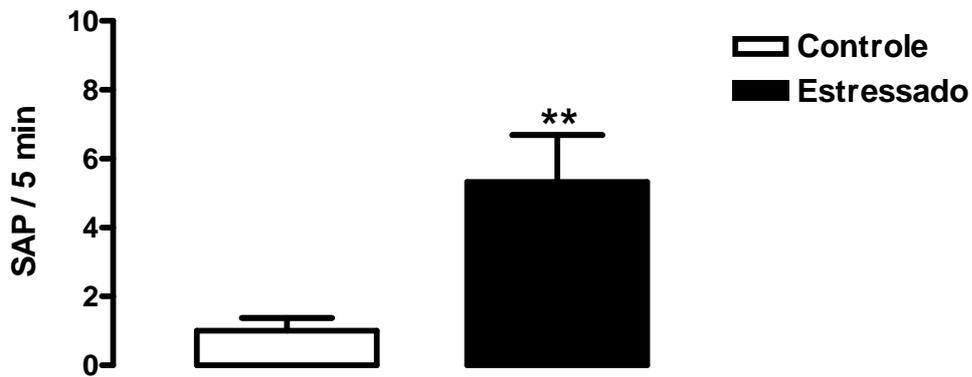


Figura 30: O número de SAP realizados durante 5 minutos. O grupo estressado realizou significativamente mais SAP em relação ao grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 10) e estressado (n = 10). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$, sendo ** $P < 0,01$.

5.3.1.3 Teste do nado forçado

A figura 31 mostra o tempo de imobilidade, em segundos, dos animais dos grupos estressado e controle submetidos ao teste do nado forçado, durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os grupos na semana 9 ($139,6 \pm 20,96$ versus $179,0 \pm 15,55$, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente).

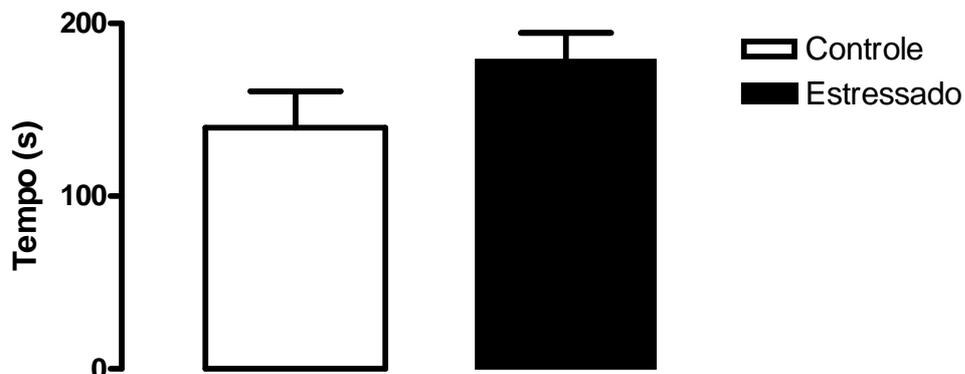


Figura 31: Tempo de imobilidade em segundos no teste do nado forçado durante 5 minutos, dos animais do grupo estressado e controle. Não houve diferença significativa entre os grupos estressado e controle na semana 9. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

5.3.2 Níveis séricos de T4 e T3 (dosagem por RIE) na semana 4

Após quatro semanas de estresse social, tanto os níveis séricos de T4 como os de T3 encontravam-se significativamente reduzidos em relação ao grupo controle. Em relação ao T4 ($5,566 \pm 0,7859$ versus $2,896 \pm 0,2082$, sendo grupo controle versus grupo estressado, respectivamente) e em relação ao T3 ($89,78 \pm 6,423$ versus $44,89 \pm 2,870$, sendo grupo controle versus grupo estressado, respectivamente), como pode ser visto na figura 32.

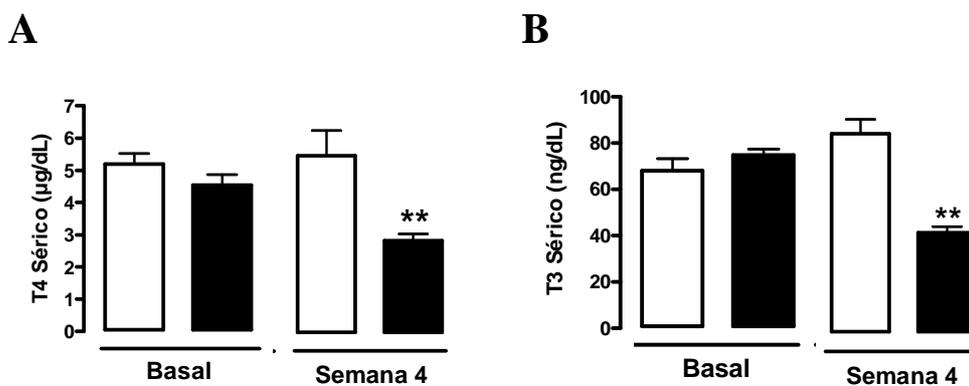


Figura 32: (A) Nível sérico de T4 (µg/dL) basal (antes do estresse social) e na semana 4. Houve redução significativa (**) dos níveis de T4 no grupo estressado em comparação ao grupo controle após o conflito social. (B) Nível sérico de T3 (ng/dL) nos período basal e na semana 4. Houve redução significativa (**) dos níveis de T3 no grupo estressado em comparação ao grupo controle após o conflito social. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$, sendo ** $P < 0,01$.

5.3.3 Níveis séricos de T4 e T3 (dosagem por RIE) na semana 9

Após oito semanas de estresse social, tanto os níveis séricos de T4 como os de T3 dos animais estressados não diferiram significativamente do grupo controle. Em relação ao T4 ($5,566 \pm 0,7859$ versus $2,896 \pm 0,2082$, sendo grupo controle versus grupo estressado, respectivamente) e em relação ao T3 ($89,78 \pm 6,423$ versus $44,89 \pm 2,870$, sendo grupo controle versus grupo estressado), como pode ser visto na figura 33.

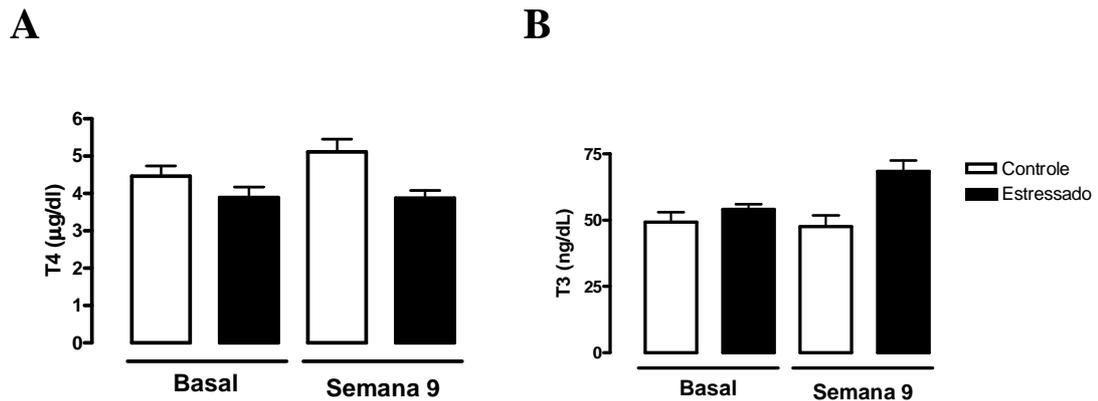


Figura 33: (A) Nível sérico de T4 ($\mu\text{g/dL}$) basal (antes do estresse social) e na semana 8. Sem diferenças significativas entre os grupos estressado e controle. (B) Nível sérico de T3 (ng/dL) nos período basal e na semana 8. Sem diferenças significativas entre os grupos estressado e controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle ($n = 16$) e estressado ($n = 16$). Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.3.4 Níveis séricos de TSH (dosagem por RIE) na semana 9

Quanto ao nível sérico de TSH não houve diferença significativa entre os grupos estressado e controle após oito semanas de estresse social ($5,56 \pm 0,78$ *versus* $2,89 \pm 0,20$ ng/dL , sendo grupo controle *versus* grupo estressado, respectivamente), como pode ser visto na figura 34.

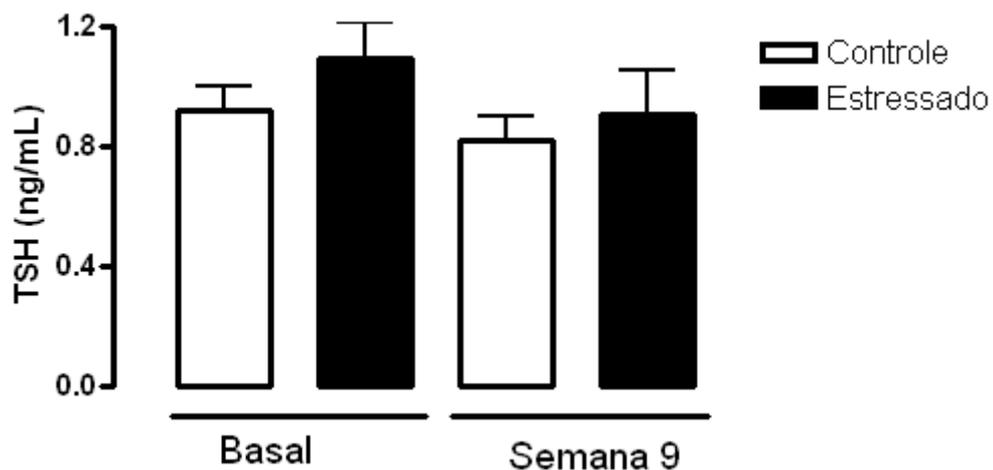


Figura 34: Nível sérico TSH (ng/dL) basal (antes do estresse social) e na semana 8. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e estresse. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle ($n = 16$) e estressado ($n = 16$). Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.3.5 Níveis séricos de Corticosterona (dosagem por RIE) na semana 9

Os níveis séricos de corticosterona dos ratos estressados aumentaram significativamente em comparação ao grupo controle, após oito semanas de estresse social ($324,5 \pm 22,77$ versus $456,1 \pm 31,71$ ng/dL, sendo grupo controle versus grupo estressado), como pode ser visto na figura 35.

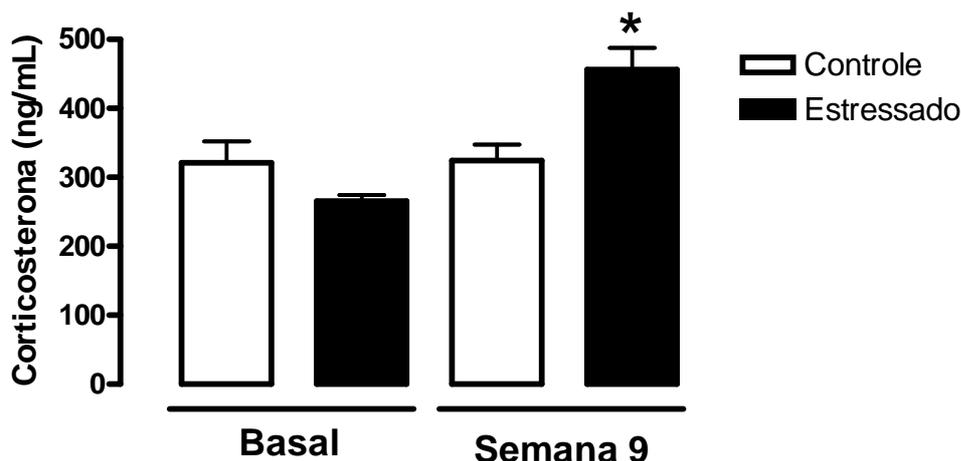


Figura 35: Nível sérico de Corticosterona (ng/dL) basal (antes do estresse social) e na semana 8. O grupo estressado apresentou aumento significativo (*) dos níveis séricos de corticosterona em relação ao grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.3.6 Atividade da desidase Tipo I (D1)

A atividade da D1 na tireóide dos ratos estressados foi significativamente menor em comparação aos ratos do grupo controle após oito semanas de estresse social, como pode ser visto na figura 36 ($63,10 \pm 11,37$ versus $119,2 \pm 18,65$ pmoles rT3/min.mg PTN, sendo grupo controle versus grupo estressado, respectivamente).

Quanto a hipófise e o fígado, a atividade da D1 não diferiu significativamente entre os grupos controle e estressado, na semana nove.

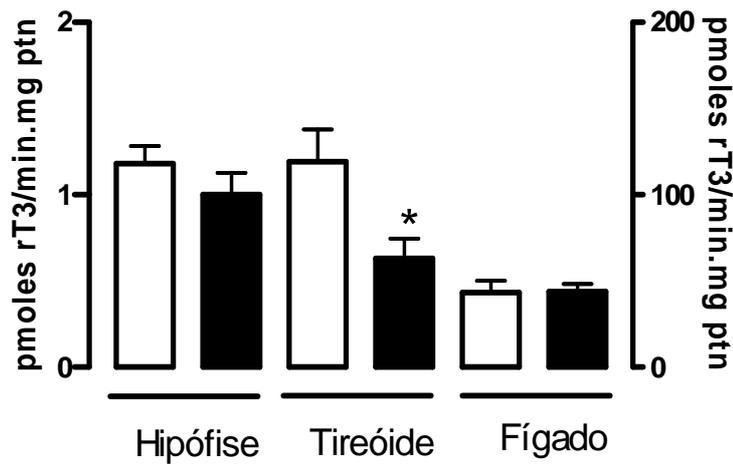


Figura 36: Atividade da D1 (pmoles rT3/min.mg.ptn) na hipófise, tireóide e no fígado na semana 9 (após uma semana de estresse social). Houve redução significativa da atividade da D1 na tireóide dos ratos estressados quando comparados ao grupo controle após o estresse social. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

5.3.7 Atividade da desidase Tipo II (D2)

A atividade da D2 no BAT dos ratos estressados foi significativamente maior em comparação aos ratos do grupo controle após oito semanas de estresse social, como pode ser visto na figura 37 ($63,10 \pm 11,37$ versus $119,2 \pm 18,65$ fmoles T4/min.mg ptn, sendo grupo controle *versus* grupo estressado).

Quanto a hipófise e o coração, a atividade da D2 não diferiu significativamente entre os grupos controle e estressado, após oito semanas de estresse.

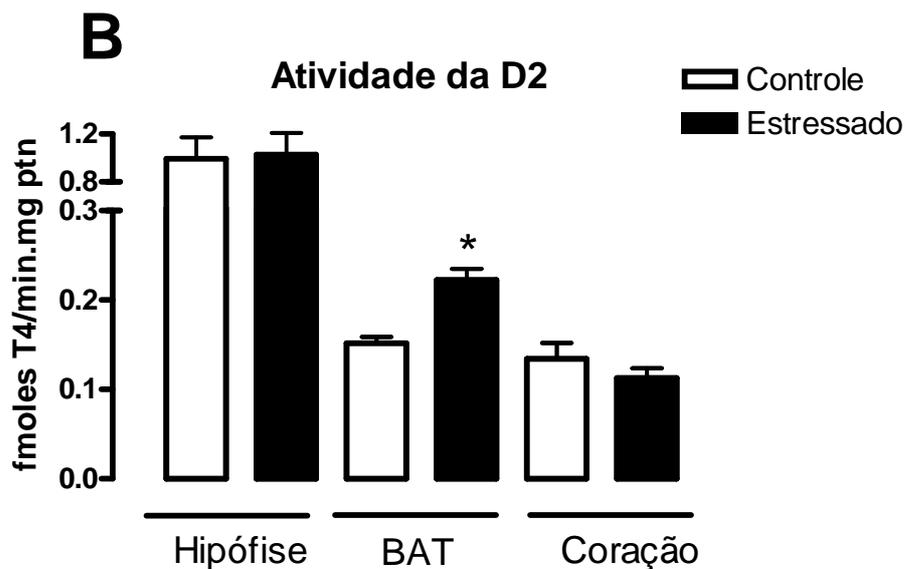


Figura 37: Atividade da D2 (fmole T4/min.mg.ptn) na hipófise, BAT e coração na semana 9 (após oito semanas de estresse social). Houve aumento significativo da atividade da D2 no BAT dos ratos estressados quando comparados ao grupo controle após o estresse social e não foram observadas diferenças na atividade da D2 na hipófise e no coração. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$.

5.3.8 Anatopatologia

Anatomopatologia após oito semanas de estresse social. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. dos grupos controle (n = 16) e estressado (n = 16). Utilizou-se o teste *t de student* e $P < 0,05$, conforme mostrado na tabela 2, os animais do grupo estressado apresentaram aumento significativo no índice adrenal ($0,1129 \pm 0,01$ versus $0,1532 \pm 0,007$, sendo grupo controle versus grupo estressado na semana nove). O índice testicular não foi alterado após 9 semanas de estresse social. No entanto, a análise estatística sugere uma tendência à diminuição no peso dos testículos no grupo estressado comparado ao grupo controle ($P = 0,07$).

Tabela 2. Peso corporal e índices adrenal, testicular dos animais dos grupos controle e estressado após 8 semanas de estresse social

	Controle	Estressado
Peso corporal (g)	397.1 ± 17.52	$343.1 \pm 8.01^*$
Índice Adrenal (mg/g)	0.1129 ± 0.01	$0.1532 \pm 0.007^*$
Índice Testicular (mg/g)	9.338 ± 0.39	8.129 ± 0.44

5.4 Terceira Etapa: Animais Estressados Por Três Semanas Tratados Com Fluoxetina

5.4.1 Testes Comportamentais

5.4.1.1 Teste do campo aberto (CA)

5.4.1.1.1 Quadrados percorridos

A figura 38 mostra que após três semanas de estresse, o grupo estressado percorre menos quadrados quando comparado ao grupo estressado tratado com fluoxetina, durante os 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto ($64,75 \pm 10,92$ versus $143,3 \pm 16,20$ quadrados percorridos, sendo grupo estressado versus grupo estressado tratado com fluoxetina respectivamente, na semana 4).

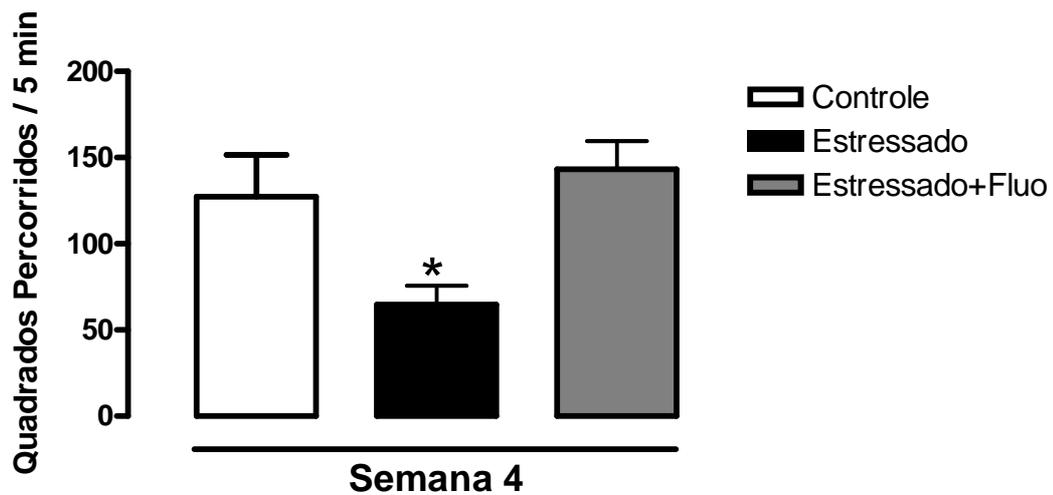


Figura 38: Número de quadrados percorridos pelos animais dos grupos controle (n = 8), estressado (n = 8) e estressado tratado com fluoxetina (n = 8) na semana 4. Os animais do grupo estressado percorreram significativamente menos quadrados quando comparados ao grupo estressado tratado com fluoxetina. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.4.1.1.2 Número de *groomings*

Após três semanas de estresse social não houve diferença entre os grupos controle, estressado e estressado tratado com fluoxetina quanto ao número de atividades de *grooming*, durante os 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto ($1,87 \pm 0,69$ versus $1,0 \pm 0,37$ versus $1,87 \pm 0,66$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado versus grupo estressado tratado com fluoxetina respectivamente, na semana 4), como pode ser observado na figura 39.

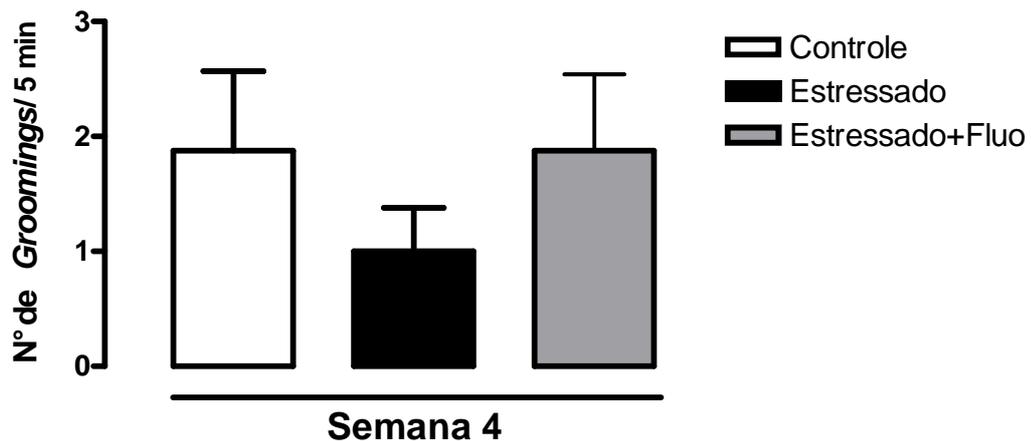


Figura 39: Número de *groomings* realizados pelos animais dos grupos controle (n = 8), estressado (n = 8) e estressado tratado com fluoxetina (n = 8) na semana 4, após o estresse social, durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.4.1.1.3 Tempo de *grooming*

Após três semanas de estresse social os grupos controle, estressado e estressado tratado com fluoxetina não apresentaram diferenças significativas quanto ao tempo de *grooming*, durante 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto ($2,87 \pm 1,44$ versus $5,62 \pm 2,97$ versus $7,5 \pm 3,17$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado versus, grupo estressado tratado com fluoxetina respectivamente, na semana 4), como pode ser observado na figura 40.

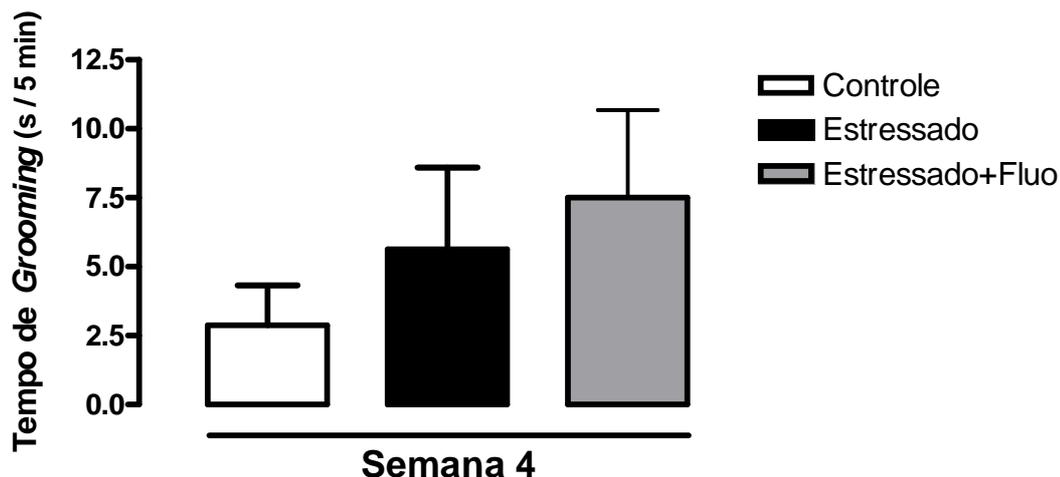


Figura 40: Tempo de *grooming* em segundos realizado pelos animais dos grupos controle (n = 8), estressado (n = 8) e estressado tratado com fluoxetina (n = 8) na semana 4, durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados representam os valores médios ± S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.4.1.1.4 Número de *rearings*

Foi contabilizado o número de *rearings* realizados pelos animais após três semanas de estresse social. A figura 41 mostra que grupo estressado realizou significativamente menos atividades de *rearing* em relação ao grupo estressado tratado com fluoxetina, durante os 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto, ($8,37 \pm 3,13$ versus $28,25 \pm 2,08$ *rearings*, sendo grupo estressado versus grupo estressado tratado com fluoxetina respectivamente, na semana 4).

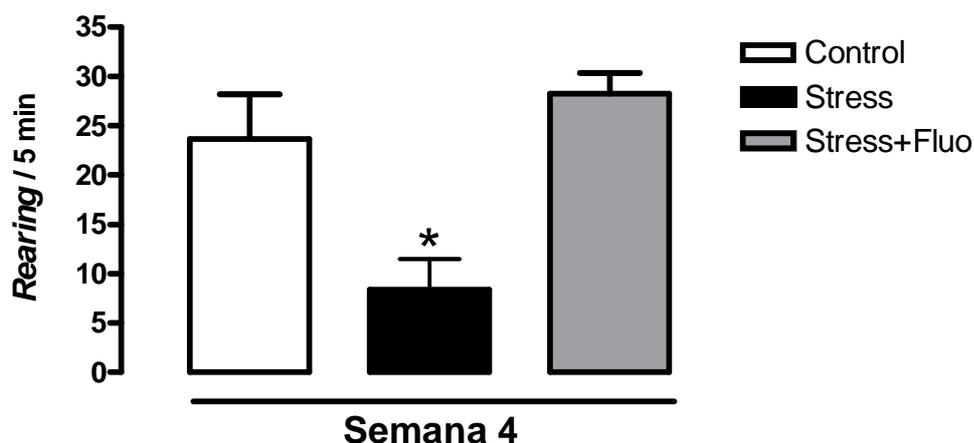


Figura 41: Número de *rearings* realizados pelos animais dos grupos controle (n = 8), estressado (n = 8) e estressado tratado com fluoxetina (n = 8), na semana 4, após o estresse social, durante 5 minutos. Após 3 semanas de estresse o grupo estressado realizou menos atividades de *rearing* em relação ao grupo estressado tratado com fluoxetina. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.4.1.1.5 Tempo de inatividade

A figura 42 mostra que após três semanas de estresse social o grupo estressado apresentou tempo de imobilidade significativamente maior quando comparado ao grupo estressado tratado com fluoxetina, durante 5 minutos em que foram expostos ao teste do campo aberto ($48,50 \pm 17,66$ versus $4,75 \pm 3,37$ segundos, sendo grupo estressado versus grupo estressado tratado com fluoxetina respectivamente, na semana 4).

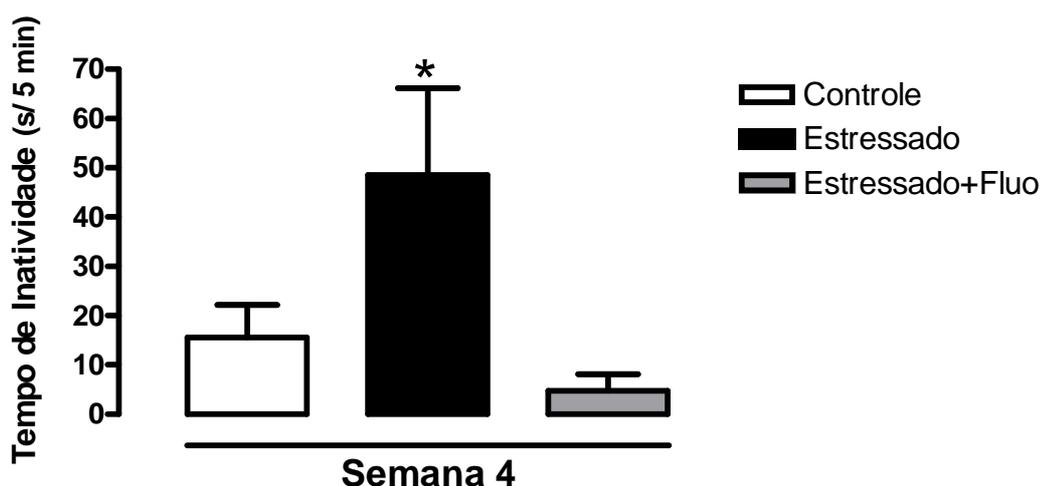


Figura 42: Tempo em segundos de inatividade dos animais dos grupos controle (n = 8), estressado (n = 8) e estressado tratado com fluoxetina (n = 8) na semana 4, durante 5 minutos. O grupo estressado permaneceu mais tempo imóvel em relação ao grupo estressado tratado com fluoxetina. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.4.1.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

5.4.1.2.1 Tempo gasto nos braços abertos

Na figura 43 pode-se visualizar que, após três semanas de conflito social, os animais do grupo estressado diferem significativamente quanto ao tempo gasto nos braços abertos, durante 5 minutos, em relação ao grupo controle ($26,88 \pm 4,78$ versus $9,11 \pm 3,57$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado na semana 4), assim como houve também diferença significativa entre os animais do grupo controle e do grupo estressado tratado com fluoxetina ($26,88 \pm 4,78$ versus $7,50 \pm 3,85$ segundos, sendo grupo controle versus grupo estressado tratado com fluoxetina respectivamente, na semana 4).

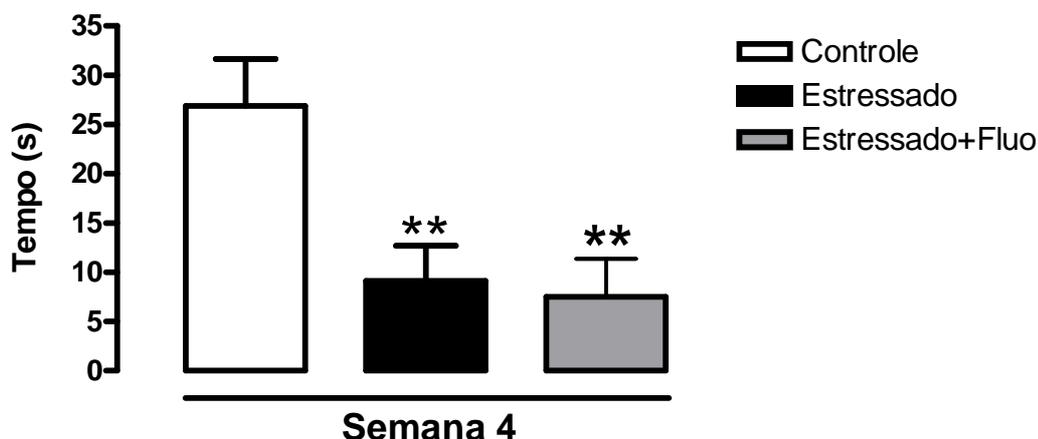


Figura 43: Tempo despendido em segundos nos braços abertos do LCE, durante 5 minutos, pelos animais dos grupos controle (n = 8), estressado (n = 8), estressado tratado com fluoxetina (n = 8). Após três semanas de estresse social, o grupo estressado permaneceu menos tempo nos braços abertos em relação ao grupo controle assim como o grupo estressado tratado com fluoxetina permaneceu menos tempo nos braços abertos comparado ao grupo controle. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$, sendo $** P < 0,01$.

5.4.1.2.2 Número de entradas nos braços fechados

Na figura 44 pode-se visualizar que após três semanas de conflito social, os animais do grupo estressado entraram significativamente menos vezes nos braços fechados quando comparados ao grupo estressado tratado com fluoxetina, durante 5 minutos ($4,0 \pm 1,34$ versus $9,75 \pm 0,70$ entradas nos braços fechados, sendo grupo estressado versus grupo estressado tratado com fluoxetina respectivamente, na semana 4).

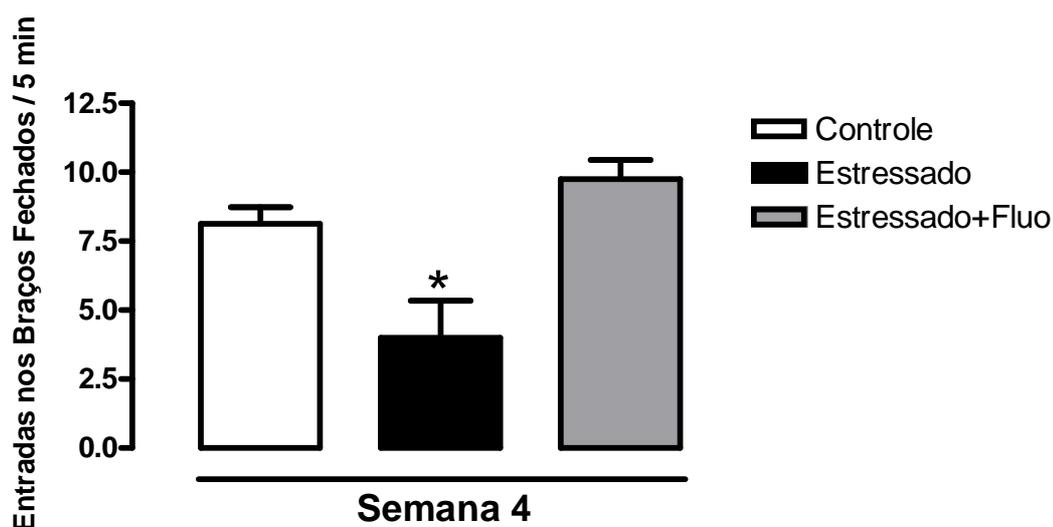


Figura 44: O número de entradas nos braços fechados do LCE, durante 5 minutos, dos animais dos grupos controle (n = 8), estressado (n = 8) e estressado tratado com fluoxetina (n = 8). Após três semanas de conflito social o grupo estressado entrou significativamente menos vezes nos braços fechados em relação ao grupo estressado tratado com fluoxetina. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.4.1.2.3 SAP

Na figura 45 pode-se visualizar que os animais do grupo estressado realizam significativamente mais SAP, durante 5 minutos, em relação ao grupo estressado tratado com fluoxetina, após três semanas de estresse social. ($5,0 \pm 1,17$ versus $2,0 \pm 0,85$ SAP, sendo grupo controle *versus* grupo estressado respectivamente, na semana 4).

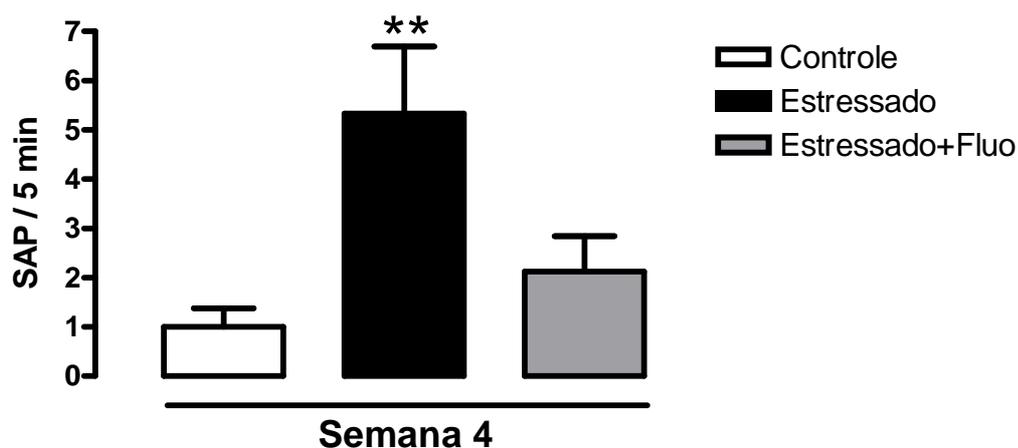


Figura 45: O número de SAPs realizados durante 5 minutos pelos animais dos grupos controle (n = 8), estressado (n = 8) e estressado tratado com fluoxetina (n = 8). O grupo estressado realizou significativamente mais SAP em relação ao grupo estressado tratado com fluoxetina. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$, sendo ** $P < 0,01$.

5.4.1.3 Teste do nado forçado

A figura 46 mostra o tempo de imobilidade, em segundos, dos animais dos grupos controle, estressado e estressado tratado com fluoxetina, submetidos ao teste do nado forçado, durante 5 minutos. Não houve diferença significativa entre os grupos ($181,1 \pm 36,17$ versus $210,3 \pm 23,49$ versus $152,0 \pm 24,33$, sendo grupo controle versus grupo estressado versus grupo estressado tratado com fluoxetina, na semana 4).

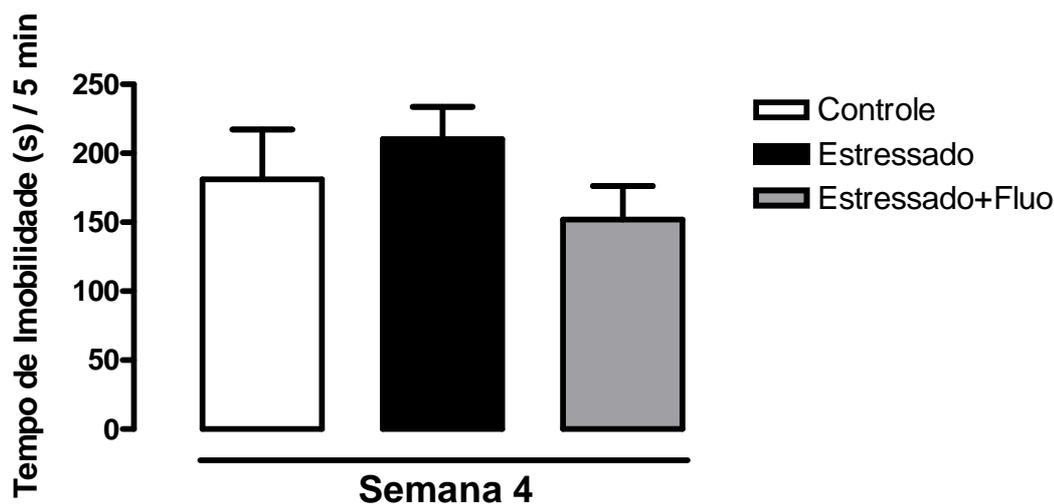


Figura 46: Tempo de imobilidade em segundos no teste do nado forçado durante 5 minutos, dos animais dos grupos controle (n = 8), estressado (n = 8) e estressado tratado com fluoxetina (n = 8). Não houve diferença significativa entre os grupos na semana 4. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$.

5.4.2 Níveis séricos de T4 (dosagem por RIE)

Após três semanas de estresse social, os níveis séricos de T4 do grupo estressado encontravam-se significativamente diminuídos em relação ao grupo controle ($5,86 \pm 0,66$ versus $2,89 \pm 0,21$ $\mu\text{g/dL}$, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 4) na figura 47.

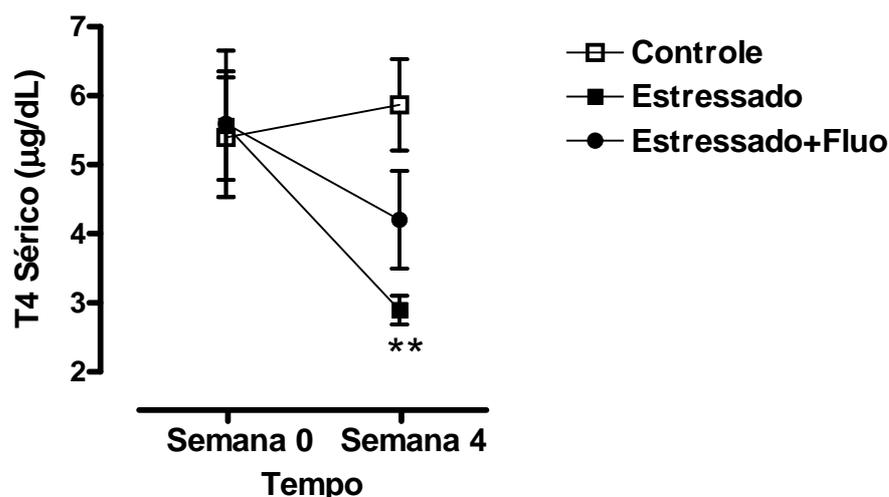


Figura 47: Nível sérico de T4 ($\mu\text{g/dL}$) dos animais dos grupos controle ($n = 8$), estressado ($n = 8$) e estressado tratado com fluoxetina ($n = 8$) basal (antes do estresse social) e na semana 4 (após três semanas de estresse social). Houve redução significativa dos níveis de T4 no grupo estressado em comparação ao grupo controle após o conflito social. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$, sendo (** $P < 0,01$).

5.4.2 Níveis séricos de T3 (dosagem por RIE)

Após três semanas de estresse social, os níveis séricos de T3 do grupo estressado encontravam-se significativamente diminuídos em relação ao grupo controle ($80,95 \pm 5,22$ versus $44,89 \pm 2,87$ ng/dL, sendo grupo controle versus grupo estressado respectivamente, na semana 4), bem como os níveis séricos de T3 do grupo estressado tratado com fluoxetina, o qual se encontrava significativamente reduzido em relação ao grupo controle ($80,95 \pm 5,22$ versus $51,47 \pm 0,67$ ng/dL, sendo grupo controle versus grupo estressado tratado com fluoxetina respectivamente, na semana 4) na figura 48.

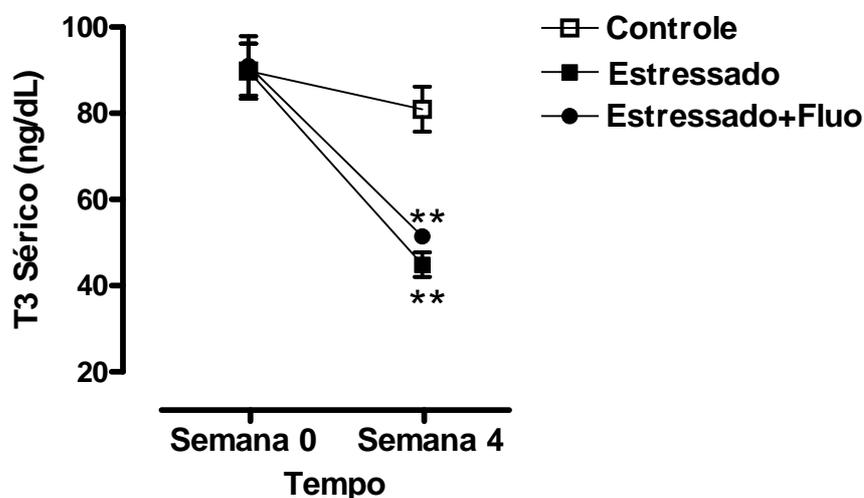


Figura 48: Nível sérico de T3 (ng/dL) dos animais dos grupos controle (n = 8), estressado (n = 8) e estressado tratado com fluoxetina (n = 8) basal (antes do estresse social) e na semana 4 (após três semanas de estresse social). Houve redução significativa dos níveis de T4 no grupo estressado em comparação ao grupo controle após o conflito social. Os dados representam os valores médios \pm S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA *one-way* seguido do *post test Bonferroni* e $P < 0,05$, sendo ** $P < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

O estresse em nosso modelo, utilizando o conflito social como estímulo estressor, foi confirmado pelos resultados obtidos nos testes comportamentais, pelos níveis séricos de corticosterona, bem como pelo exame *post mortem*, ou seja, pelo aumento no índice adrenal.

A metodologia de estudo aqui empregada, com a utilização da avaliação seriada (diferentes tempos de exposição) do estresse social, ou seja, um estudo longitudinal foi fundamental para esclarecer as divergências descritas na literatura quanto às alterações dos níveis séricos dos HT frente ao estresse. As alterações referentes aos HT mencionadas anteriormente por outros grupos, relatam resultados conflitantes, possivelmente explicados pelas diferenças na programação de cada protocolo utilizado, como por exemplo o tempo de exposição ao agente estressor, bem como pelo tipo de estresse empregado.

Enquanto a maioria dos modelos usados na investigação do estresse é baseada em poderosos fatores de estresse físico, o nosso modelo de derrota social, já foi considerado o modelo mais relevante para reproduzir situações que se assemelham às situações que os seres humanos são submetidos no cotidiano (BJORKQVIST, 2001; RYGULA *et al.*, 2005). Portanto, usando o conflito social entre os membros da mesma espécie como gerador de estresse existe uma vantagem evidente sobre os modelos animais que necessitam de estímulos físicos aversivos, tais como choques elétricos nas patas, privação de água ou alimento e exposição ao frio.

Assim, para melhor compreender a complexa interação bidirecional entre tireóide e distúrbios psiquiátricos, buscamos um modelo fidedigno de estresse, como por exemplo, o paradigma de derrota social. Os dois paradigmas (exposição curta e prolongada ao estresse) utilizados aqui foram decisivos para esclarecer os dados controversos na literatura sobre a resposta da tireóide em modelos de estresse, pois enquanto alguns grupos descreveram redução (HOHTARI, 1997; BAUMGARTNER *et al.*, 1988; OPSTAD, 1994), um outro sugeriu aumento (OPSTAD *et al.*, 1994) ou mesmo a indiferença (BAUMGARTNER *et al.*, 1988) para os valores séricos de T3 após o estresse. Nossos dados sugerem que estes resultados conflitantes na literatura podem ser explicados, pelo menos em parte, por diferenças nos protocolos, como o tempo de exposição ao estresse, além, é claro, o tipo de estressor empregado.

Embora não tenha sido o objetivo principal deste estudo, foi constatada redução significativa quanto ao ganho de peso dos animais do grupo estressado comparado ao grupo controle a partir da terceira semana de estresse social, sendo estendida essa diferença significativa até a semana nove, ou seja, no momento da eutanásia. Sendo assim algumas considerações em relação a este parâmetro podem ser discutidas.

A corticosterona apresenta efeito catabólico, principalmente no tecido muscular e, além disso, atua de forma indireta, estimulando a liberação de leptina, a qual atua estimulando a saciedade e o gasto energético, favorecendo dessa forma a redução no ganho de massa corpórea.

O cortisol apresenta efeito metabólico, pois estimula a glicogenólise pelo fígado além de reduzir moderadamente a utilização de glicose por quase todas as células do organismo. Este hormônio também provoca o catabolismo de proteínas nas células extra-hepáticas, principalmente nas células musculares, direcionando os aminoácidos para o fígado onde ocorre a síntese protéica. O cortisol ainda atua na mobilização de gordura do tecido adiposo, aumentando a lipólise, com liberação de glicerol e ácidos graxos livres, os quais após oxidação são enviados pra o fígado (GUYTON & HALL, 2002).

O tecido adiposo já foi considerado apenas um depósito de energia, mas atualmente sabe-se que os adipócitos são influenciados por ação de hormônios como a insulina, o cortisol e as catecolaminas plasmáticas e que respondem a este estímulo secretando algumas substâncias como a leptina, que participa da regulação de processos como a regulação do balanço energético (RIBEIRO FILHO *et al.*, 2006).

Como no estresse ocorre aumento dos níveis de cortisol conseqüentemente ocorre aumento dos níveis de leptina liberada pelos adipócitos, O hormônio leptina que é produzido principalmente no tecido adiposo branco é secretado para a corrente sanguínea, onde é transportada por proteínas até o órgão alvo, o encéfalo, onde tem a função de informar ao mesmo que os estoques de energia em forma de gordura estão satisfatórios (NEGRÃO & LICINIO, 2000).

A leptina plasmática atravessa a barreira hemato-encefálica por meio do transporte ativo ou via líquido cefálico-raquidiano, age nos receptores das regiões lateral e medial do hipotálamo onde sinalizam o estado de saciedade e aumenta o gasto energético (LEWANDOWSKI, 2006).

A exposição continuada a um estímulo estressor e a ativação prolongada do eixo HPA elevam os níveis de glicocorticóides e induzem à mudança no metabolismo em direção a um estado catabólico generalizado, envolvendo gliconeogênese e degradação protéica em diversos tecidos, como músculo, osso e pele, levando a redução da massa magra (KYROU & TSIGOS, 2007). Em adição aos seus efeitos catabólicos diretos, os glicocorticóides também interferem no eixo do crescimento levando à supressão da secreção do hormônio do crescimento e inibição da somatostatina C em seus tecidos-alvo (BURGUERA *et al.*, 1990; KACSOH *et al.*, 1990).

Em contrapartida, enquanto que o aumento na ingestão alimentar e na massa corporal são as respostas mais comuns ao estresse em seres humanos, em ratos a resposta é oposta. Curiosamente, em hamsters ocorre aumento da ingestão alimentar e da massa corpórea devido ao estresse induzido pelo confronto social (FOSTER *et al.*, 2005).

A escolha dos testes comportamentais neste estudo (teste de preferência pela sacarose (PPS), campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE) e nado forçado (NF)), foram determinados pela revisão de diversos artigos relacionados ao tema, os quais relatam que o estresse social pode provocar em ratos, alterações comportamentais semelhantes a comportamentos relacionados com a depressão observada em humanos (KOOLHAAS *et al.*, 1990; VON FRIJTAG *et al.*, 2002).

Assim como neste experimento, outro grupo já demonstrou que após exposições prolongadas (2 a 4 semanas) a situações ou eventos estressantes imprevisíveis, os animais podem apresentar decréscimo na preferência por soluções adocicadas ou diminuição da auto-estimulação de áreas de recompensa no sistema nervoso central, o que se correlaciona com a anedonia (diminuição ou ausência da capacidade de sentir prazer) apresentada por pacientes deprimidos (WILLNER, 1997). Este fato pode explicar os resultados obtidos na terceira e na nona semana de experimento, em que os animais estressados apresentaram consumo de solução de sacarose 0,8% significativamente menor quando comparados ao grupo controle.

Tal modelo guarda uma grande similaridade com a depressão clínica uma vez que o episódio depressivo de pacientes frequentemente é precedido de um evento estressante (WILLNER, 2005). Entretanto o modelo guarda algumas limitações de reprodutibilidade, especialmente no que se refere à adaptação do animal aos eventos estressantes, isto é, a variabilidade individual (PAYKEL, 2003). E este pode ser o motivo pelo qual a anedonia não foi observada continuamente em todo o experimento, e somente na terceira e nona semanas após o início do conflito social da segunda etapa.

O teste do Campo Aberto é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural de um animal em um ambiente novo é explorá-lo, apesar do

estresse e do conflito provocado por este ambiente novo (MONTGOMERY, 1958). No teste do campo aberto, seis parâmetros foram avaliados: 1: o número total de quadrados percorridos; 2: o número total de *rearings* e 3: o tempo de imobilidade que avaliam a atividade exploratória do animal; 4: o número de *groomings*; 5: o tempo de *grooming*; 6: SAP os quais podem ser utilizados para avaliar o grau de sedação ou ansiedade (ARCHER, 1973). Desta forma a locomoção, *rearing*, *grooming* em roedores, observados no campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências dos eventos da vida (MONTGOMERY, 1958; REX *et al.*, 1996).

Observa-se baixa atividade motora (reduzida quantidade de quadrados percorridos ou cruzados) frequentemente indica uma reação de medo do animal. Ratos com medo evitam ficar sobre as patas traseiras (*rearing*). Os ratos apresentam tal comportamento de medo quando introduzidos num campo aberto desconhecido. Este comportamento irá diminuir à medida que o animal se familiarize com a caixa (CRUZ, 1997), desta forma não é recomendada exposições sucessivas ao campo aberto.

Na semana quatro e nove os animais do grupo estressado percorreram menos quadrados em relação ao grupo controle. Na semana quatro os animais estressados permaneceram mais tempo imóveis em relação ao grupo controle. Estes resultados indicam redução significativa da atividade locomotora, podendo assim caracterizar perda de interesse em buscar situações novas e estimulantes, denotando então um déficit na motivação (WILLNER *et al.*, 1991).

Em alguns estudos o *rearing*, tem sido focalizado como um aspecto de comportamento exploratório (JOHANSSON e AHLENIUS, 1989). Em nosso estudo não houve diferença significativa quanto ao número de *rearings* entre os animais dos grupos estressado e controle após uma e oito semanas de estresse social, no entanto após três semanas de conflito social, ou seja na semana quatro, foi observado que o grupo estressado realizou significativamente menos atividades de *rearing* em relação ao grupo controle, indicando redução da atividade exploratória do grupo estressado, podendo assim caracterizar déficit motivacional (WILLNER *et al.*, 1991).

Segundo MacFarland e Reeder, (1974), quase todos os animais gastam significante parte do tempo no comportamento de *grooming* e o aumento deste pode ser observado em roedores apreensivos (ARCHER, 1973), e em um grande número de estudos, pesquisadores observaram que drogas ansiolíticas reduzem o *grooming* no campo aberto (BARROS *et al.*, 1994; MOODY, *et al.*, 1993).

Após uma semana de conflito social os animais do grupo estressado apresentaram aumento tanto do número de *groomings*, quanto no tempo gasto para a realização do mesmo em relação ao grupo controle. Na semana quatro e nove não foram observadas alterações significativas entre os grupos quanto à estes parâmetros. Desta forma, após uma semana de estresse social os animais estressados apresentaram um comportamento sugestivo de ansiedade.

No teste do campo aberto da primeira etapa, os animais estressados não mostraram sinais comportamentais claros de estresse, pois não foram observadas alterações na frequência da exploração horizontal (*rearing*) e vertical (quadrados percorridos), bem como no tempo de imobilidade em relação ao controle. Em contrapartida, a frequência e tempo de *grooming* foram aumentados no grupo estresse em relação ao controle. Resultados opostos foram observados na segunda etapa, ou seja, com exposição mais prolongada ao agente estressor. No teste do campo aberto realizado na semana quatro os animais do grupo estressado mostraram sinais comportamentais claros de estresse, como a redução da exploração horizontal (*rearing*) e vertical (quadrados percorridos), bem como aumento do tempo de imobilidade, comparado ao grupo controle. Com exceção dos quadrados percorridos, os outros parâmetros (*rearing* e tempo de imobilidade) não diferiram significativamente entre os grupos controle e estressado.

Não foram observadas diferenças quanto à frequência e o tempo de *grooming* do grupo estressado em relação ao grupo controle.

Nisto, nós demonstramos que o estresse social, durante uma semana induziu a pequenas mudanças no comportamento de ratos estressados. Em contrapartida, os animais expostos a um período maior ao estresse social apresentavam sinais claros de déficits motivacionais, sugerindo que as alterações comportamentais mais significativas, ocorreram, principalmente, três semanas após o início do estímulo estressante e é atenuada depois de oito semanas de estresse em nosso modelo. Pode-se depreender que a redução da atividade exploratória, em nosso modelo, ocorre somente na semana quatro, sendo normalizada na nona semana.

O Teste do LCE é considerado um instrumento bastante útil e válido para medir ansiedade, investigando aspectos comportamentais (PELLOW *et al.*, 1985).

A ansiedade pode ser caracterizada como a antecipação emocional de uma situação aversiva, de difícil controle e de provável ocorrência. Medo, no entanto, pode ser definido como uma reação a uma situação perigosa real e bem definida e é visto por vários autores como entidade independente da ansiedade. Ainda assim, por vezes pode ser difícil uma separação entre as duas (RAMOS *et al.*, 1997).

Alguns modelos animais de ansiedade evocam, pela simples exposição do animal a um novo ambiente ou estímulo, comportamentos de medo ou defensivos, análogos a manifestações ansiosas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Por exemplo, animais expostos ao labirinto em cruz elevado apresentam um comportamento denominado de avaliação de risco (*risk assessment*), o que pode ser relacionado à hipervigilância, apresentada por indivíduos ansiosos (BLANCHARD, 2001). A avaliação de risco representa uma antecipação de um perigo potencial, sendo um comportamento defensivo de grande valor adaptativo; ainda assim, indivíduos ansiosos parecem mais frequentemente tentar antecipar tal ameaça no intuito de lidar melhor com isto, o que acaba por trazer prejuízos para os mesmos. SAP (*Stretch Attend Posture*) pode ser interpretado em termos de "avaliação de risco", ou seja, comportamentos exibidos em situações potencialmente ameaçadoras, cuja função é realizar uma estratégia comportamental (RODGERS *et al.*, 1999).

Pode-se considerar que a inclusão de medidas de avaliação de risco, principalmente, SAP no teste do LCE são valiosos para identificar os parâmetros relacionados ao estado emocional dos animais após o estresse. O SAP geralmente é visto como uma medida de ansiedade (COLE & RODGERS, 1994; ANSELONI & BRANDÃO, 1997).

Considera-se a porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados um índice fidedigno de ansiedade: quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos e o inverso é verdade. O número de entradas nos braços fechados também pode ser correlacionado positivamente com a atividade exploratória dos animais (HANDLEY & MITHANI, 1984).

Na semana dois, os animais estressados por uma semana, apresentaram maior número de entradas nos braços fechados e menor número de SAP nos braços fechados, em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao tempo gasto nos braços abertos após uma semana de estresse.

Conforme descrito no teste do CA, alguns parâmetros comportamentais da primeira etapa apresentaram resultados completamente opostos em relação à segunda etapa. As entradas nos braços fechados foram reduzidas e a frequência de SAP nos braços fechados foi maior nos animais estressados em relação ao controle. O percentual de tempo gasto nos braços abertos foi significativamente reduzido em animais estressados em relação ao controle.

Associado a este fato constatou-se também que no teste do campo aberto estes mesmos animais apresentaram uma diminuição no tempo e na frequência de *grooming*, denotando desta forma um comportamento referente à ansiedade.

A ansiedade já foi relatada como um dos sintomas no hipotireoidismo em humanos (MAZZAFERRI, 1980). Além disso, já foi descrito também que o hipotireoidismo subclínico tem como sintomas mais freqüentes desânimo, depressão e ansiedade (SURKS, 1996).

Frequentemente observa-se que pacientes com depressão podem apresentar alterações tireoidianas, sendo a mais comum o hipotireoidismo, que pode ocorrer em formas subsindrômicas em até 17% dos pacientes com transtornos do humor (COLE *et al.*, 2002).

A secreção do TSH é rigidamente controlada por retroalimentação negativa exercida pelos HT. A secreção do TSH obedece a um ritmo circadiano, além de apresentar pequenos picos de secreção a cada 80 a 180 minutos, provavelmente devidos a descargas hipotalâmicas de TRH. Em humanos submetidos a estresse agudo foi observada elevação do TSH, sendo que esta resposta não foi afetada pelo fato do agente estressor ser homotípico, ou seja, o mesmo estímulo ao longo do experimento (SCHEDLOWSKI *et al.*, 1992). Em nosso modelo, após oito semanas de estresse social, não foram observadas alterações significativas quanto aos níveis séricos de TSH.

Desta forma foi demonstrado que o estresse social, durante uma semana só induz à pequenas mudanças no comportamento de ratos estressados. Por outro, ratos estressados por períodos maiores apresentavam sinais de déficits motivacionais, o que sugere que o estresse pode desencadear alterações comportamentais semelhantes à depressão, e que isto ocorre, principalmente, quatro semanas após o início do estresse e é atenuada subsequentemente, na nona semana neste modelo.

Em nosso estudo após as seções de estresse foi constatado que após uma e três semanas de conflito social, os animais apresentavam concentrações de T3 e T4 séricos significativamente menores em relação a seus grupos controles, ou seja, estavam hipotireóides, no entanto o protocolo prorrogado revelou que esta condição pode ocorrer de uma forma passageira uma vez que os hormônios tireoidianos se encontravam reduzidos na quarta semana, mas retornaram para os níveis normais na nona semana. Curiosamente, o perfil de hipotireoidismo foi compatível com as mudanças mais importantes no parâmetro comportamental, os quais foram observados paralelamente às mudanças nos níveis de hormônios tireoidianos. Considerando o estado de hipotireoidismo, sem sinais claros de estresse, como os sintomas nos testes comportamentais, observados após uma semana de conflito social, no protocolo de curto prazo, pode-se especular que a diminuição dos HT poderia provocar perturbações no comportamento de ratos estressados.

Outra questão não resolvida na literatura é sobre o metabolismo da tiróide durante modelos de estresse. Além disso, o estudo da atividade das iodotironinas desidases no estresse social crônico é escasso até o momento. Nossos dados mostraram menor atividade da D1 na tiróide e no fígado. Com base em outros dados de nosso laboratório, acredita-se que a atividade da D1 reduzida é principalmente, consequência do que a causa do hipotireoidismo em modelos de estresse, uma vez que o T3 é um importante modulador desta selenoproteína. Na verdade, quando os animais se tornaram eutiróides (na semana nove), a atividade D1 foi normalizada no fígado.

Até o momento não há dados experimentais que expliquem a redução da atividade da D1 na tiróide quando os hormônios da tiróide já haviam se normalizado após 8 semanas de estresse. Mas o aumento dos níveis de corticosterona observado em ambos os protocolos não deve ser descartado para explicar este resultado. A disfunção da tiróide, devido à supressão do eixo hipotálamo-hipófise-tiróide (HHT) também não poderia ser descartada para explicar a baixa atividade da D1 na tiróide, pois a inibição do eixo HHT já foi descrita em vários modelos de estresse (CIZZA *et al.*, 1996, 1995; FEKETE *et al.*, 2000).

Contudo, uma das limitações mais importantes em nosso estudo foi a falta da dosagem sérica do TSH, principalmente na semana quatro, na segunda etapa. Sem dúvida, níveis reduzidos de TSH, já descrito em modelos de estresse (CIZZA *et al.*, 1996; FEKETE *et al.*, 2000) poderia explicar principalmente o hipotireoidismo em nosso modelo. No entanto, o principal objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos dos HT e associá-lo com o estresse através de parâmetros comportamentais, à curto e longo prazo (um estudo seriado), e não necessariamente uma busca de possíveis explicações para o hipotireoidismo.

Outro aspecto interessante deste estudo foi a normalização dos níveis séricos dos HT nove semanas após o início do estímulo estressante. Provavelmente, este efeito é mediado pelo aumento da atividade da D2 no tecido adiposo marrom (BAT). A contribuição da D2 para a manutenção dos níveis séricos de T3 já foi descrita em humanos (MAIA *et al.*, 2005).

Novamente, o estudo realizado através da dosagem sérica de TRH / TSH no soro seria útil para investigação quanto à participação do eixo hipotálamo-hipófise quanto à normalização do T4. No entanto, este por si só não explicaria a restauração do T3 e o aumento da atividade da D2. O BAT pode ser realmente o local mais importante para a produção de T3 plasmático neste modelo.

Em consonância, já foi descrito que a atividade da D2 elevada no BAT é capaz de normalizar os níveis séricos de T3 em outro modelo de estresse, induzido por uma doença grave, infarto do miocárdio em ratos (Dados ainda não publicados).

Em nosso modelo de estresse, a atividade da D2 no BAT pode estar aumentada devido ao sistema nervoso simpático (ativação SNS) (SGOIFO *et al.*, 1996; SGOIFO *et al.*, 1999; GRIPPO *et al.*, 2002; GRIPPO *et al.*, 2003) uma vez que a atividade da D2 no BAT é estimulada pelo SNS (CARVALHO *et al.*, 1991; SILVA E LARSEN, 1983; CETTOUR-ROSE *et al.*, 2002). No entanto, o estímulo mais importante para o aumento da atividade da D2 no BAT após 8 semanas de estresse, pode ter sido o hipotireoidismo observado nas fases anteriores do estresse social (semanas dois e quatro). A condição de hipotireoidismo reduz o nível intracelular de T3 (devido ao seu fluxo reduzido do plasma devido à diminuição dos níveis intracelulares de T4, o principal substrato para D2) (BIANCO & KIM 2006). Além disso, o aumento nos níveis séricos de corticosterona em ratos estressados também poderia contribuir para um reforço na atividade D2.

Os corticosteróides suprimem o eixo tireoidiano, provavelmente pela ação direta na secreção do hormônio tireoestimulante (TSH). Apesar de alguns estudos que sustentam um efeito inibitório dos glicocorticóides sobre ativação de T4 à T3 (KAKUCKSA *et al.*, 1995; BIANCO *et al.*, 2002), também existem evidências *in vitro* que sugerem que os glicocorticóides podem estimular o eixo HHT através do estímulo para produção de TSH (LUO *et al.*, 1995) ou diretamente na expressão D2 (KIM *et al.*, 1998) e em sua atividade (COURTIN *et al.*, 1989).

O agente estressor (o conflito social) tem a capacidade de ativar o eixo Hipotálamo-Hipofisário, após este estímulo a hipófise secreta o hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) que estimula as glândulas supra-renais a secretarem adrenalina, noradrenalina e cortisol (SOARES e ALVES, 2006).

A corticosterona é o principal glicocorticóide secretado pelo córtex adrenal de camundongos e ratos. Existe um ritmo circadiano de liberação de corticosterona tanto para ratos quanto camundongos, com altas concentrações observadas entre 16:00 e 22:00 horas em ambiente normal de laboratório. Dosagens de corticosterona são índices úteis para respostas gerais e neuroendócrinas ao estresse em experimentos envolvendo ratos e camundongos (ROSA, 2003).

O conflito social diário, durante uma, três e oito semanas, atuando como estímulo estressor, foi capaz de ativar o eixo HHA, levando, então à liberação de corticosterona pelas glândulas adrenais.

Assim os resultados obtidos na dosagem sérica de corticosterona, após oito semanas de estresse em que o grupo estressado apresenta concentração sérica significativamente maior de corticosterona, em relação ao grupo controle, podem ser justificados.

Um aspecto interessante no nosso modelo é o aumento persistente dos níveis séricos de corticosterona 8 semanas após o início dos experimentos e também aproximadamente 48 horas após o término do experimento (na semana 9, no dia da eutanásia). A exposição repetida ou prolongada ao estresse leve e homotípico (o mesmo estressor) tende a produzir habituação das respostas da corticosterona, em contraposição ao estresse de uma maior sensibilização e intensidade (NATELSON *et al.*, 1998; PITMAN *et al.*, 1988). No entanto, a habituação ou sensibilização parece ser mais complexa e depende do tempo entre os estímulos estressores, o número de exposições, a intensidade de estresse, dentre outros fatores (SERVATIUS *et al.*, 1994). Corroborando os nossos achados, já foi descrito que o aumento persistente nos níveis de corticosterona plasmática foi aparente após muitos dias (até nove dias, dependendo do tipo de estímulo estressor) após exposição única ou repetida a estímulos estressores moderados ou leves e inescapáveis, como o choque na cauda (OTTENWELLER *et al.*, 1994; SERVATIUS *et al.*, 1994).

Até o momento não existem estudos sobre a atividade das desidases no estresse social. Mais de 10 anos se passaram desde que Baumgartner *et al.*, em 1998 mostrou que um leve e muito breve estresse, pode induzir aumento significativo nas concentrações de T3, especialmente no cérebro, mas não no fígado ou sangue. Estes resultados foram atribuídos exclusivamente à alta atividade da D2 cerebral, enquanto as atividades de D1 e D3 não se alteraram em relação ao grupo controle. O estresse induzido pela exposição ao frio tem sido conhecido por aumentar a atividade D2 no BAT (SILVA & LARSEN, 1986), bem como no hipotálamo e adrenal (ANGUIANO *et al.*, 1995), e o estresse prolongado, durante nove a quatorze dias, induzido pela privação do sono, levou ao aumento da atividade da D2 no BAT e na hipófise em ratos (BALZANO *et al.*, 1990).

Baseado no fato de que muitos estímulos estressantes ativam transmissão noradrenérgica e serotoninérgica (CHAOULOFF *et al.*, 1993; KAWAHARA *et al.*, 1993), a atividade no cérebro da D2 também podem ser sensibilizada no nosso modelo de estresse. Futuros estudos para avaliar a atividade cerebral da D2 serão importantes para investigar o papel desta como a principal via de ativação do T3 no SNC no modelo de estresse social.

Finalmente, o maior peso (índice) das adrenais e os níveis de corticosterona sérica elevados sugerem uma persistente poderosa ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Outro dado interessante observado no nosso modelo foi a tendência ($P < 0,07$) à redução do índice testicular. Isto pode ser explicado pela supressão do eixo de Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG) por ação da corticosterona, ocasionada pelo estresse. Na verdade, estes dados são consistentes com outros anteriores que mostram uma supressão da secreção de testosterona em diferentes modelos de estresse (SERVATIUS *et al.*, 2001; COLLU *et al.*, 1984; BIDZINSKA *et al.*, 1993).

Por último, o estudo do estresse associado ao tratamento com a fluoxetina foi essencial para compreender melhor a associação entre o estresse social e as alterações no sistema serotoninérgico e da atividade do eixo HPT. Aqui nós demonstramos, pela primeira vez, que a abordagem farmacológica para aumentar a transmissão serotoninérgica foi capaz de evitar hipotiroxinemia e a maioria das alterações comportamentais induzidas pelo estresse social como a redução da atividade locomotora (representada pela redução do número de quadrados percorridos e aumento do tempo de imobilidade) e a redução da atividade exploratória (representada pela frequência de *rearings*) observadas no teste do CA, bem como a frequência de SAP nos braços fechados, observados no teste do LCE. O SAP foi valioso para a identificação da natureza do estado emocional dos animais e é geralmente visto como uma medida de ansiedade. Além disso, também foi proposto que o SAP seja um comportamento

característico exibido em situações potencialmente ameaçadoras (comportamento de avaliação de risco), conforme descrito anteriormente (RODGERS *et al.*, 1999). Os dados apresentados são consistentes com uma relação positiva entre corticosterona plasmática e avaliação de riscos em ratos e camundongos expostos ao labirinto em cruz (RODGERS *et al.*, 1999). Curiosamente, apesar da normalização de alguns parâmetros comportamentais e da tiroxina sérica, os ratos estressados tratados com fluoxetina apresentaram redução persistente quanto ao percentual de tempo gasto nos braços abertos e dos níveis séricos de T3.

Dados de estudos com animais demonstraram que o T3 tem propriedades semelhantes à de inibidores seletivos da recaptção de serotonina, em que induz aumento de níveis extracelulares de serotonina e por subsensibilidade dos receptores 5-HT1A e 5-HT1B, que controlam a ativação para liberação de serotonina pelas células serotoninérgicas através do processo de *feedback* negativo (LIFSCHYTZ *et al.*, 2004). Kulikov *et al.*, (1997) mostraram que o hipotireoidismo experimental, induzida pela remoção da glândula tireóide, levou ao aumento significativo de 90% no tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Este aumento foi impedido pela administração crônica de altas (200 mg / kg), mas não baixas doses (15 mg / kg), de T4. Da mesma forma, aumento de 60% no tempo de imobilidade também foi observada em ratos normais submetidos a uma dieta livre de iodo durante 2 semanas para produzir hipotireoidismo leve. Sob o ponto de vista clínico, o hormônio da tireóide T3 é usado na clínica, tanto para aumentar como acelerar as ações dos antidepressivos em pacientes deprimidos. Assim, pode-se compreender a incapacidade da fluoxetina em neutralizar totalmente as alterações comportamentais observadas após o estresse em nosso modelo. Os ratos estressados tratados com fluoxetina apresentaram níveis séricos reduzidos de T3. Em conclusão, este trabalho acrescenta novos conceitos sobre economia hormônio da tireóide em condições de estresse crônico social.

Considerando os dados em conjunto obtidos na primeira e segunda etapas, pode-se deprender que a redução dos níveis séricos dos HT precedem as alterações comportamentais que denotam ao estresse no modelo de derrota social. Os níveis de T4 e T3 permanecem reduzidos até o momento em que as alterações comportamentais se tornam evidentes (após três semanas de estresse, ou seja, na semana quatro). A partir deste momento ocorre a normalização dos níveis séricos dos HT, curiosamente paralela à recuperação da maioria dos parâmetros comportamentais (semana nove). Desta forma, nossos resultados sugerem que a redução dos HT podem, possivelmente, contribuir para desencadear as alterações comportamentais. Os dados obtidos sugerem a participação central dos HT no desencadeamento das alterações comportamentais induzidas pelo estresse social.

Em função dos resultados obtidos na primeira e segunda etapas, estabeleceu-se um terceiro protocolo que teve como objetivo principal a avaliação do papel da transmissão serotoninérgica nas alterações comportamentais, assim, este protocolo foi realizado com três semanas de estresse, sendo os testes realizados na semana 4, já que foi neste tempo de exposição ao estresse que as alterações comportamentais foram mais evidentes, de acordo com a segunda etapa aqui procedida.

Como pôde-se observar, o tratamento com um inibidor da recaptção de serotonina, impediu algumas das alterações comportamentais, principalmente aquelas referentes à motivação e impediu também a redução dos níveis de tiroxina. Curiosamente os níveis de T3 e algumas alterações comportamentais (referentes à ansiedade) não foram alteradas, permanecendo reduzidos nos animais tratados com fluoxetina. Portanto é possível especular que a não reversão completa das alterações comportamentais, observadas após o estresse, podem ser atribuídas aos níveis de T3, os quais permaneceram reduzidos após o tratamento com a fluoxetina.

Em suma, não apenas alterações das vias serotoninérgicas centrais, mas também, mudanças no metabolismo hormonal da tiróide podem ser implicadas nas alterações comportamentais, induzidas em nosso modelo pelo estresse social em ratos.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir:

1. O conflito social pode ser referido como um estímulo capaz de gerar a condição de estresse, sendo esta confirmada pelos resultados obtidos nos testes comportamentais ao longo das etapas do experimento, bem como pelos níveis séricos de corticosterona e pelo exame *post mortem*.
2. Foi evidenciado ao longo do experimento, em todas as etapas, que os animais do grupo estressado ganharam significativamente menos peso do que os animais do grupo controle. Deste fato pode-se entender que o estresse social pode comprometer o ganho de peso corporal.
3. A diminuição pela preferência por solução de sacarose pelos animais estressados pode indicar dessensibilização do mecanismo de recompensa do cérebro, homóloga à anedonia.
4. O estresse social, durante uma semana (primeira etapa), só induz a pequenas alterações comportamentais, enquanto que os ratos estressados por períodos maiores (segunda etapa) apresentavam sinais de déficits motivacionais, o que indica que o estresse pode desencadear alterações comportamentais semelhantes à depressão, e que isto ocorre, principalmente, quatro semanas após o início do estresse sendo atenuada subsequentemente, na nona semana neste modelo.
5. Após as seções de estresse foi constatado que após uma e três semanas de conflito social, os animais estressados apresentavam concentrações de T3 e T4 séricos reduzidas e posteriormente, na nona semana os níveis séricos de T3 e T4 eram restabelecidos, possivelmente pelo aumento da atividade da D2 no BAT.
6. O estresse social durante uma semana é capaz de reduzir a expressão da desidrodase tipo I no fígado e na tireóide, e após oito semanas reduz a expressão da D1 somente na tireóide. As causas possíveis são o aumento dos níveis de corticosterona e a disfunção da tireóide, devido à supressão do eixo HHT.
7. Após 8 semanas de conflito social foi constatado aumento na atividade da D2 no BAT, provavelmente por conta da própria condição hipotireóide, constatada na etapa anterior, ou até mesmo pela ativação do SNS.
8. O perfil de hipotireoidismo foi compatível com as mudanças mais importantes no parâmetro comportamental, os quais foram observados paralelamente às mudanças nos níveis de hormônios tireoidianos. Então pode-se pensar em uma correlação entre a redução dos níveis de HT e alterações comportamentais em ratos estressados.
9. O tratamento com fluoxetina, impediu algumas das alterações comportamentais, principalmente aquelas referentes à motivação e impediu também a redução dos níveis de tiroxina. Curiosamente os níveis de T3 e algumas alterações comportamentais

(referentes à ansiedade) não foram alteradas, permanecendo reduzidos nos animais tratados com fluoxetina.

10. Possivelmente a não reversão completa das alterações comportamentais após o tratamento com fluoxetina, observadas após o estresse, podem ser atribuídas aos níveis de T3, os quais permaneceram reduzidos após o tratamento com a fluoxetina.
11. Não somente as alterações das vias serotoninérgicas centrais, mas também, mudanças nos níveis séricos dos HT podem ser relacionados às alterações comportamentais, induzidas em nosso modelo pelo estresse social em ratos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUIANO, B., QUINTANAR, A., LUNA, M., NAVARRO, L., DEL ANGEL, A. R., PACHECO, P., AND VALVERDE-R.C., Neuroendocrine regulation of adrenal gland and hypothalamus 5' deiodinase activity.II. Effects of splanchnicotomy and hypophysectomy. **Endocrinology**. v.136, p. 3346-3352, 1995.

ANSELONI, V.C.Z., BRANDÃO, M.L., Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze.Behav. **Pharmacology**. v.8, p. 533-540.1997.

ARCHER, J. – Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior** v. 21, n.2, p. 205-35. 1973.

AXELROD, J.; REISINE, T.D. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**. v.224, n.4648, p.452-9. 1984.

BALZANO, S., BERGMANN, B. M., GILLILAND, M. A., SILVA, J. E., RECHTSCHAFFEN, A., AND REFETOFF, A.,. Effect of total sleep deprivation on 5 ' -deiodinase activity of rat brown adipose tissue. **Endocrinology** v.127, p. 882-890, 1990.

BARROS, H.M.T. et al. The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in the open field. **Pharmacology e Toxicology**. v. 74, p. 339-344. 1994.

BAUNGARTNER A, GRAF KJ, KURTEN I. The dexamethasone suppression test in depression in schizophrenia, and during emotional stress. **Biological Psychiatry**; v. 20, p.675-9. 1988.

BERRY, M.J., KIEFFER, J.D., LARSEN, P.R., Evidence that cysteine, not selenocysteine, is in the catalytic site of type II iodothyronine deiodinase. **Endocrinology**;v. 129, p.550-2. 1991.

BIANCO AC, SALVATORE D, GEREBEN B, BERRY MJ AND LARSEN PR. Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronineseleno-deiodinases. **Endocrinology**. v. 23, p.38-89. 2002.

BIANCO AC & KIM BW. Deiodinases: Implications of the local control of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**. 116: 2571-2579. 2006.

BIDZINSKA, B., PETRAGLIA, F., ANGIIONI, S., GENAZZANI, A.D., CRISCUOLO, M., FICARRA, G., GALLINELLI, A., TRENTINI, G.P., GENAZZANI, A.R., Effect of different chronic intermittent stressors and acetyl-l-carnitine on hypothalamic beta-endorphin and GnRH and on plasma testosterone levels in male rats. **Neuroendocrinology**. ; v.57, p. 985-90. 1993.

BJORKQVIST K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiology Behavior**. v.73, p. 435-42. 2001.

BLANCHARD, CAROLINE, D.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, ROBERT J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.25, p. 205- 218. 2001.

BLECHA, F. **Imune System response to stress**. In: Moberg, G.P. and Mench, J.A. (eds) The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare. Cabi publishing, 2000. 111-112.

BLIER P. The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. **Eur Neuropsychopharmacology**; v.13, p.57-66. 2003.

BOERE, V. Environmental Enrichment for Neotropical Primates in Captivity. **Ciência Rural**, Santa Maria; v.31, p.543-551. 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

BRADY K.T., ANTON R.F. The thyroid axis and desipramine treatment in depression. **Biological Psychiatry** v.25, p.703-9. 1999.

BRANDÃO ML, LACHAT JJ. **Noções básicas de neuroanatomia**. In: Brandão ML, organizador. Psicofisiologia. São Paulo: Atheneu, 1995. p.1-17.

BURGUERA, B., MURUAIS, C., PENALVA, A., DIEGUEZ, C., CASANUEVA, F. Dual and selective action of glucocorticoids upon basal and stimulated growth hormone release in man. **Neuroendocrinology**, v.51, p.51-8, 1990.

CARVALHO, S.D., KIMURA, E.T., BIANCO, A.C., AND SILVA, J.E. Central role of brown adipose tissue thyroxine 5'-deiodinase on thyroid hormone-dependent thermogenic response to cold. **Endocrinology** v.128, p. 2149-2159. 1991.

CETTOUR-ROSE, P., BURGER, A.G., MEIER, C.A., VISSER, T.J., ROHNER-JEANRENAUD, F. Nov. Central stimulatory effect of leptin on T3 production is mediated by brown adipose tissue type II deiodinase. **American Journal of Physiology Endocrinology**. n.283, v.5, p.980-7. 2002.

CHAOULOFF, F.. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. **Brain Research**. Rev. 18, 1-32. 1993.

CHROUSOS, G.P. Stressors, Stress and Neuroendocrine Integration of the Adaptive Response: 1997 Hans Selye Memorial Lecture. **Ann. NY Acad. Sci.** n.851, p.311-335.1998.

CIZZA, G., BRADY, L., ESCPALES, M., BLACKMAN, M., GOLD, P., CHROUSUS, G. Age and gender influence basal and stress-modulated hypothalamic-pituitary-thyroidal function in Fisher 344/N rats. **Neuroendocrinology**; v.64, p. 440–448. 1996.

COLE, J.C., RODGERS, R.J. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. **Psychopharmacology** n.114, p. 288–296. 1994.

COLE, D.P.; THASE, M.E.; MALLINGER, A.G. et al. - Slower Treatment Response in Bipolar Depression Predicted by Lower Pretreatment Thyroid Function. **American Journal Psychiatry**.v.159,p.116-21.2002.

COLLU, R., W. GIBB ET AL.Effects of stress on the gonadal function. **Journal Endocrinology Investigation**. n.5, p. 529-37. 1984.

COURTIN, F., CHANTOUX, F., GAVARET, J.M., TORU-DELBAUFFE, D., JACQUEMIN, C., PIERRE, M. Induction of type II 5'-deiodinase activity in cultured rat astroglial cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: dependence on glucocorticoids. **Endocrinology**. n.125, v.3, p.1277-81. 1989.

COURVOISIER, H; MOISAN, M.P; SARRIEAU, A; HENDLEY, E.D; MORMÈDE, P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. **Brain Research**, v. 743, n. 1-2, p. 77-85, 1996.

CREMASCHI, G.A., GORELIK, G., KLECHA, A.J., LYSIONEK, A.E., GENARO, A.M. Chronic stress influences the immune system through the thyroid axis, **Life Science**. n.67; p.3171-3179. 2000.

CRUZ, ANTÔNIO PEDRO DE MELLO; JÚNIOR, HÉLIO ZAGROSSI; GRAEFF, FREDERICO GUILHERME; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. **Modelos Animais de Ansiedade: Implicações Para a Seleção de Drogas Ansiolíticos**. Psicologia: Teoria e Pesquisa. Vol.13 n3. Set-Dez 1997. pp269-278.

DEAKIN JFW, GRAEFF FG. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacology**. v.5, p.305-15. 1991.

DOUGLAS, C.R. Fisiopatologia do stress. In: **Fisiologia aplicada à prática odontológica**. 1ª edição, São Paulo, Pancast Editora, 1988, vol. 2, p. 1121.

EDWARDS JC. **Drug choice in depression**. Selective serotonin reuptake inhibitors or tricyclic antidepressants. **CNS Drugs**. 1995. p.141-59.

ELSASSER, T.H.; KLASSING, K.C.; FILIPOV, N. and THOMPSON, F. **The metabolic consequences of stress: targets for stress and priorities of nutrient use**. In: Morberg, G.P. and Mench, J.A. (eds) *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing. 2000. 77-110.

FEKETE, C., LEGRADI, G., MIHALY, E., HUANG, Q.H., TATRO, J., RAND, W., EMERSON, C., LECHAN, R., 2000. Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. **Journal Neuroscience**; v.20, p.1550-1558. 2000.

FLUGGE G. Dynamics of central nervous 5-HT_{1A} receptors under psychosocial stress. **Journal of Neuroscience**. n.15, v.11, p.7132-40. 1995.

FORTUNATO, R.S., MARASSI, M.P., CHAVES, E.A., NASCIMENTO, J.H., ROSENTHAL, D., CARVALHO, D.P. Chronic administration of anabolic androgenic steroid alters murine thyroid function. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** ; n. 38, v.2, p. 256-61. 2006.

FOSTER, M.T., SOLOMON, M.B., HUHMANN, K.L., BARTNESS, T.J., 2006 May. Social defeat increases food intake, body mass, and adiposity in Syrian hamsters. **American Journal Physiology Regulation Integration and Comparative Physiology**; n.290, v.5, p.1284-93. 2005.

FRANCI, CR. Estresse: Processos adaptativos e não adaptativos. In **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Elias LLK, Castro M. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2005. p.210-223.

FUCHS E & FLUGGE G. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** v.73,p. 247-58. 2002.

GEREBEN B, ZEÖLD A, DENTICE M, SALVATORE D, BIANCO AC. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. **Cellular and Molecular Life Sciences.** n.65, v.4, p.570-90. 2007.

GRIPPO, A.J., MOFFITT, J.A., JOHNSON, A.K., 2002. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. **American Journal Physiology Regulation Integration and Comparative Physiology**; n.282, p.1333-1341. 2002.

GRIPPO, A.J., BELTZ, T.G., JOHNSON, A.K., 2003. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. **Physiology Behavior.** n.78, p.703-710. 2003.

GUIMARÃES FS. **Medicamentos antidepressivos e estabilizadores do humor**. In: Graeff FG e Guimarães FS. Fundamentos de psicofarmacologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p. 93-122.

GUYTON, Arthur C., HALL, John E..**Tratado de Fisiologia Médica**.10ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 2002. p. 312-318.

HANDLEY, S. L. AND S. MITHANI. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.** n.327, v.1. p.1-5. 1984.

HERMAN, J.P., CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo -pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences.** n. 20, p.78 – 84. 1997.

HOHTARI, H., PAKARINEN, A., KAUPPILA, A.: Serum concentrations of thyrotropin, thyroxine, trimethoxythyronine and thyroxine binding globulin in female endurance runners and joggers. **Acta Endocrinologica.** n. 114, p.41-46. 1997.

HUETHER G, DOERING S, RUGER U, RUTHER E, SCHUSSLER G. The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. **Psychiatry Reserch**. n.87, p.83-95. 1999.

JOFFE R.T., SINGER W. The effect of tricyclic antidepressants on basal thyroid hormone levels in depressed patients. **Pharmacopsychiatry**. n.23, p.67-9. 1990.

JOHANSSON, C., AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mediation of exploratory locomotor activity (LMA) refers to the movement from place to place. In psychopharmacology, locomotor activity of lab animals is often monitored to assess the behavioural effects of these drugs. in the rat. **Journal. Psychopharmacology**. n.3, p.32-35. 1989.

KACSOH, B., MEYERS, J.S., CROWLEY, W.R., GROSVENOR, C.E. Maternal modulation of growth hormone secretion in the neonatal rat: involvement of mother-infant interactions. **Journal Endocrinology**., v.40, p.224-33, 1990.

KAKUCKSA, I., QI, Y., LECHAN, R. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. **Endocrinology**; 136: 2795–2802. 1995.

KAWAHARA, H., YOSHIDA, M., YOKOO, H., NISHI, M., AND TANAKA, M. Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. **Neuro.vci. Len**. n.162, p.81-84. 1993.

KENDLER KS, KESSLER RC, WALTERS EE, MACLEAN C, NELAE MC, HESTH AC, EAVES LJ. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. **American Journal of Psychiatry**. n.152, v.6, p.833-42. 1995.

KENNETT GA, DOURISH CT, CURZON G. Antidepressant-like action of 5-HT_{1A} agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. **European Journal of Pharmacology**. n.134, p.265-74. 1987.

KIM, S.W., HARNEY, J.W., AND LARSEN, P.R. Studies of the hormonal regulation of type II 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. **Endocrinology** n.139, p.4895-4905. 1998.

KOOB, G.F. Corticotrophin-releasing factor, norepinephrine and stress. **Biological Psychiatry**, New York, v. 46, n. 9, p. 1167-1180, 1999.

KOOLHAAS, J.M., KORTE, S.M., De BOER, S.F., VAN DER VEGT, B.J., VAN REENEN, C.G., De JONG, I.C., RUIS, M.A., BLOKHUIS, H.J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience Biobehavior**., Oxford, v. 23, n. 7, p. 925-935, 1990.

KOOLHAAS JM, DE BOER SF, et al. Social stress in rats and mice. **Acta physiologica scandinavica Supplement**; n.640, p.69-72. 1997

KULIKOV, A., TORRESANI, J., JEANNINGROS, R., 1997. Experimental hypothyroidism increases immobility in rats in the forced swim paradigm. **Neuroscience Letters**. n.234, p.111– 114. 1997.

KYROU, I., TSIGOS, C. Stress mechanisms and metabolic complications. **Horm Metab Res.**, v.39, p.430-8, 2007.

LEWANDOWSKI, MAIELE BERTOLDO. Leptina: mecanismos de ação na obesidade. Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, RS: 2006. Disponível em: <<http://www.nutricaoativa.com.br/arquivos/monografia6.pdf>> Acesso em: 04 março 2009.

LIFSCHYTZ T, GUR E, LERER B, NEWMAN ME 2004. Effects of triiodothyronine and fluoxetine on 5-HT1A and 5-HT1B autoreceptor activity in rat brain: regional differences. **Journal Neuroscience Methods**. n. 140, p.133-9.

LOPES, CLAUDIA S; EDUARDO FAERSTEIN; DÓRA CHOR Eventos de vida produtores de estresse e transtornos mentais comuns: resultados do Estudo Pró-Saúde, 2003.

LUO, L.G., BRUHN, T., JACKSON, I. Glucocorticoids stimulate thyrotropin-releasing hormone gene expression in cultured hypothalamic neurons. **Endocrinology**; v.136, p. 4945-4950. 1995.

MACFARLAND, C., & W. G. REEDER. Cleaning symbiosis involving Galapagos tortoises and two species of Darwin's finches. **Z. Tierpsychol**. n.34, p.464-483. 1974.

MAIA AL, KIM BW, HUANG SA, HARNEY JW AND LARSEN PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *Journal of Clinical Investigation*. n.115, p.2524–2533. 2005.

MATTO, V; ALLIKMETS, L. Acute and chronic citalopram treatment differently modulates rat exploratory behavior in the exploration box test: no evidence for increased anxiety or changes in the [3H]raclopride binding. **Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 59-69. 1999.

MAZZAFERRI, E. L. A Tireóide. In: **Mazzaferrri, E. L. Endocrinologia**, 1980. 604p.

MELLO, CARLA THICIANE VASCONCELOS. Estudo dos Efeitos Farmacológicos de (O-METIL)-N-2,6-diidroxibenzil tiramina (Riparina III) de *Aniba Riparina* (Nees) Mez (Lauraceae) em Modelos Comportamentais de Ansiedade e Depressão em Camundongos. 2006. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós graduação em farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Ceará.

MCEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. **The New England Journal of Medicine**. v.33, p.171-179, 1998.

MICZEK KA. A new test for aggression in rats without aversive stimulation: Differential effects of d-amphetamine and cocaine. **Psychopharmacology**. n.60: p.253-259.1979.

MIKICS, E; BARSY, B; BARSVÁRI, B; HALLER, J. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 2, p. 152-62, 2005.

MOBERG G.P. Suffering from stress: An approach for evaluating the welfare of an animal, In: Sandoe P. & Hurnik T. (Eds), **Proceedings of Welfare of Domestic Animals Concepts, Theories and Methods of Measurement**. Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science. 1996. p.46-49.

MONTGOMERY, K. C. The elevated plus-maze. **Pharmacol methodology Ethology and psychopharmacology** s.1, v. 53, p. 334-342, 1958.

MOODY, T.W., MERALI, Z., CRAWLEY, J.N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.90, p.281-290. 1993.

NATELSON, B.H., OTTENWELLER, J.E., COOK, J.A., PITMAN, D.L., MCCARTY R, TAPP, W.N. Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. **Physiology Behavior**.; v.43, p.41–6. 1998.

NEGRÃO, ANDRÉ B, LICINIO, JULIO. Leptina: o Diálogo entre Adipócitos e Neurônios. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia. São Paulo, junho. 2000. Disponível em: <http://www.rgnutri.com.br/sap/tr-cientificos/leptina.php>. Acesso em: 03 março 2009.

NUNES MT. Hormônios Tiroideanos: Mecanismos de ação e importância biológica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia** . v.47 n° 6. 2003.

NUNES MT. O Hipotálamo Endócrino. In: Margarida de Mello Ayres. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.p. 930-51.

OPSTAD, P.K., 1994: Circadian rhythm of hormones is extinguished during prolonged physical stress, sleep and energy deficiency in young men., **European Journal of Endocrinology**. v.131, p.56-66. 1994.

O'SHEA B. Antidepressants: user and attitudes among consultant psychiatrists. **Br J Psychosocial Medicine**. v.8, p.167-70. 1991.

OTTENWELLER, J.E., SERVATIUS, R.J., NATELSON, B.H., 1994 Feb. Repeated stress persistently elevates morning, but not evening, plasma corticosterone levels in male rats. **Physiology Behavior**. v.55, p.337-40. 1994.

PACÁK e PALKOVITS M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress – related disorders. **Endocrine Reviews**. v.22, p.502-48. 2001.

PAVÓN, J. **Estrés y trabajo**. Universidade de Congresso. 2004.

PAYKEL ES : Life events and affective disorders. **Acta Psychiatrica Scandinavica**. v.418, p.61-66. 2003.

PEETERS BWMM, BROEKKAMP CLE. Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. n. 49, p.417-27. 1994.

PELLOW & COL. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal Neuroscience Methods**. n.14, v.3, p.149-67. 1985.

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**. n.43, p.47-55. 1988.

PORSOLT, R.D; LE PICHON, M; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, 1977.

POST RM. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **American Journal Psychiatry** ;n.149, v.8, p.999-1010. 1992.

PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. **The European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

PUGLISI-ALLEGRA S, KEMPF E, et al. Repeated stressful experiences differently affect brain dopamine receptor subtypes. **Life Sciences**. n.48, p.1263-8. 1991.

RAMOS A, BERTON O, MORMEDE P, CHAOULOFF F. **Behavioural Brain Research**, 85: 57-69, 1997.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. AND MOORE, P. K. **Farmacologia**. São Paulo: Elsevier Editora, 2003.

REX. A.; SONDERN, U.; VOIGT, J.P.; FRANCK, S.; FINK, H. Strain differences in fear-motivated behavior of rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 107-111, 1996.

RIBEIRO FILHO, Fernando F. et al . Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação.**Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabologia**, São Paulo, v. 50, n. 2, 2006.

RIVER, C.; RIVIEST, S. Effect of stress on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Revista Brasileira de Biologia Reprodutiva**.v.45, p.523-532, 1991.

RODGERS, R.J., COLE, J.C. An ethological analysis of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro16-6028) in the murine elevated plus-maze. **Behavior Pharmacology**. v.4, p.573-580. 1993.

RODGERS, R.J., HALLER, J., HOLMES, A., HALASZ, J., WALTON, T.J., BRAIN, P.F., 1999. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology Behavior**. v.68, p. 47-53. 1996.

- RODGERS, R.J., HALLER, J., HOLMES, A., HALASZ, J., WALTON, T.J., BRAIN, P.F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology Behavior**. v.68, p. 47–53. 1999.
- RUSSELL JA, DOUGLAS AJ, BRUNTON PJ. Reduced hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: central opioid inhibition and noradrenergic mechanisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1148, p.428-38. 2008.
- RYGULA R, ABUMARIA N, FLUGGE G, FUCHS E, RUTHER E, HAVEMANN-REINECKE U. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. **Behavior Brain Research**. n.162, p.127–34. 2005.
- RYGULA R, ABUMARIA N, FLUGGE G, HIEMKE C, FUCHS E, RÜTHER E, HAVEMANN-REINECKE U. Citalopram counteracts depressive-like symptoms evoked by chronic social stress in rats. **Behavior Pharmacology**. n.17, p. 19-29, 2006.
- ROSA, JP. **Endocrinologia do estresse e importância no bem estar animal**. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias pelo mestrado, no primeiro semestre de 2003.
- SARGENT PA, KJAER KH, BENCH CJ, RABINER EA, MESSA C, MEYER J, GUN RN, GRASBY PM, COWEN P. Brain serotonin1A receptor binding measured by positron emission topography with. **Archives of General Psychiatry**. v.57, p.17480. 2000.
- SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **Journal Clinical of Endocrinology**, v.6, p.117-130. 1946.
- SELYE, H. Stress and disease. **Scienc**e, n.122, p.625-631. 1955.
- SELYE, H. Homeostasis and heterostasis. **Perspectives in Biology and Medicine**, v.16, p.1-5. 1973.
- SCHEDLOWSKI M, WIECHERT D, WAGNER TOF, TEWES U. Acute psychological stress increases plasma levels of cortisol, prolactin, and TSH. **Life Science**. 50:1201–1205. 1992.
- SERVATIUS, R.J., OTTENWELLER, J.E., BERGEN, M.T., SOLDAN, S., NATELSON, B.H., 1994 Feb. Persistent stress-induced sensitization of adrenocortical and startle responses. **Physiology Behavior**.n.55, v.2, p.337-40. 1994.
- SERVATIUS, R.J., BRENNAN, F.X., MOLDOW, R., POGACH, L., NATELSON, B.H., OTTENWELLER, J.E., 2001 Mar. Persistent hormonal effects of stress are not due to reduced food intake or exposure to stressed rats. **Endocrine**. n.14, v.2, p.181-7. 2001.
- SGOIFO, A., S. F. DE BOER, J. HALLER, J. M. KOOLHAAS. Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression. **Physiology Behavior**. v.60, p. 1403–1407. 1996.
- SGOIFO, A., J. KOOLHAAS, et al. Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. **Neuroscience Biobehavior Review**. v.23, p.915-923. 1999.

SILBERMAN, D.M., WALD, M., GENARO, A.M. Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response: Participation of serum thyroid hormones and corticosterone. **International Immunopharmacology**. v.2, p.487–497. 2002.

SILVA JE, LARSEN PR. Comparison of iodothyronine 5'-deiodinase and other thyroid-hormone-dependent enzyme activities in the cerebral cortex of hypothyroid neonatal rat. Evidence for adaptation to hypothyroidism. Traduzido do: ingles **The Journal of Clinical Investigation**. n.70, v.5, p.1110-23. 1982.

SILVA J. E. AND LARSEN P. R., Regulation of thyroid hormone expression at the prereceptor and receptor levels, in **Thyroid Hormone Metabolism** (Hennemann G., ed), 1986. p. 441—503. Marcel Dekker, New York.

SILVA, J.E., AND LARSEN, P.R. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. **Nature**. n.305, p. 712-713. 1983.

SOARES, ANTÓNIO JOSÉ DE ALMEIDA E ALVES, MARIA DA GRAÇA PEREIRA. Cortisol como variável em psicologia da saúde. *Psicologia Saúde & Doenças*, 2006, vol.7, no.2, < <http://www.scielo.oces.mctes.pt/scielo.php>>. Acesso em 03 de março de 2009.

STARKMAN MN, GEBARSKI SS, BERENT S, SCHTEINGART DE. Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. **Biology Psychiatry**. v.32, n.9, p.756-65. 1992.

SURKS MI, OCAMPO E. Subclinical thyroid disease. **American Journal of Medicine**. n.100, v.2, p.217-23. 1996.

UEBELACKER LA, KEITNER GB, RYAN CE, MILLER IW. Characterizing the long-term course of individuals with major depressive disorder. **The Journal of Nervous and Mental Disease**. v.192, p. 65-68. 2004.

VAN RIEDEL E, MEIJER OC, STEEBERGEN PJ, JOELS M. Chronic unpredictable stress causes attenuation of serotonin responses in cornu ammonis 1 pyramidal neurons. **Neuroscience**. v.120, p.649-58. 2003.

VISSER TJ, KAPLAN MM, LEONARD JL, LARSEN PR. Evidence for two pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism. **Journal Clinical Investigation**. n.71, v.4, p.992-1002. 1983.

VON FRIJTAG, J. C., R. VAN DEN BOS, SPRUIJT, B.M. Imipramine restores the long-term impairment of appetitive behavior in socially stressed rats. **Psychopharmacology**. n.162, v.3, p. 232-8. 2002.

WILDER RL. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. **Annual Review of Immunology**. v.13, p.307–338. 1995.

WILLNER P, SAMPSON D, PAPP M, PHILLIPS G, MUSCAT R. **Animals models of anhedonia**. In: Anxiety, Depression, and Mania. Animal Models of Psychiatric Disorders, edited by Soubrié P. Basel, Switzerland: Karger 1991, p. 71-99.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**. v.134, p.319–329. 1997.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**. n.52, v.2, p.90-110. 2005.

WHO - World Health Organization. Women and mental health.2000. Disponível em: URL: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs248/en/>>. Acesso em 30 mar. 2006.

WHO – World Health Organization: Depression, 2003a . Disponível em URL: <http://www.who.int/health_topics/depression/en> . Acesso em 30 mar. 2006.

WHO - World Health Organization: Global Health: today's challenges, 2003b. Disponível em: URL: <<http://www.who.int/whr/2003/chapterI/en/>>. Acesso em 30 mar. 2006.

WOOD, A. J. J. Drug therapy: fluoxetine. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.20, p.1354-1361, 1994.