**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

THIAGO MOIRINHO REIS E SILVA

**Efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunes do estresse de contenção
em camundongos de alta e baixa imobilidade selecionados pelo teste de
suspensão da cauda.**

**São Paulo
2018**

Thiago Moirinho Reis e Silva

**Efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunes do estresse de contenção
em camundongos de fenótipo depressivo selecionados pelo teste de
suspensão da cauda.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Neurociência e Comportamento

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi

São Paulo

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Reis-Silva, Thiago Moirinho.

Efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunes do estresse de
contenção em camundongos de alta e baixa imobilidade selecionados
pelo teste de suspensão da cauda / Thiago Moirinho Reis-Silva;
orientadora Maria Martha Bernardi. -- São Paulo, 2018.

126 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia,
Universidade de São Paulo, 2018.

1. Estresse. 2. Teste de Suspensão da Cauda. 3.
Neuroimunomodulação. 4. Neurotransmissores. 5. Resiliência. I.
Bernardi, Maria Martha, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: REIS-SILVA, Thiago Moirinho

Título: Efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunes do estresse de contenção em camundongos de alta e baixa imobilidade selecionados pelo teste de suspensão da cauda.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Neurociência e Comportamento

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Esta tese foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Demanda Social) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq processo número 142264/2014-8), por meio de bolsa de doutorado concedida ao programa de Pós-Graduação em Neurociência e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Em meados de 2006, durante minha graduação em Psicologia, eu conheci a prof^a. Dr^a. Maria Martha Bernardi. Desde essa época eu me aproximei de seu trabalho, começamos a conversar e, a partir de 2007, ela se tornou minha orientadora. Entre as muitas conversas que tivemos ao longo desse tempo, desde as corriqueiras, munidas de café e cigarro, até aquelas sobre projetos e ciência em si, há uma frase em especial que me marcou: “ao subirmos uma escada Thiaguinho, é necessário dar um passo de cada vez”, tinha ela o costume de me dizer. Por diversas vezes recorri esta frase para me organizar nos afazeres da vida científica e, muitas vezes, na vida pessoal também.

Recentemente eu dei um dos passos mais difíceis, se não o mais difícil até agora. Em meados de 2016 eu fui diagnosticado com um linfoma. A típica notícia que faz as pernas tremerem e o folego faltar. Comigo não foi diferente, e da noite para o dia eu vi quase todas as minhas atividades diárias serem paralisadas, salvo algumas que tentei manter como uma medida de manter minha própria sanidade.

Esse momento, por mais difícil que tenha sido, também contribuiu para ver quem são aqueles que nos apoiam incondicionalmente e a importância disso. Se eu consegui, como me foi confidenciado depois por amigos próximos, ter lidado bem com tudo o que aconteceu, eu acredito que isso só foi possível porque tive pessoas incríveis do meu lado. Hoje eu estou curado e gostaria de agradecer todas as pessoas que me apoiaram naquele momento (e ainda me apoiam) com seu suporte e amizade e que, de alguma maneira, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização desse trabalho.

Eu gostaria de agradecer todos os meus amigos da pós-graduação, pessoas que já estão há alguns anos na minha vida e que sempre me ajudaram, não somente com a pesquisa, direta ou indiretamente, mas também sempre sendo pessoas com quem pude contar em momentos difíceis. Gostaria de agradecer a Thaisa Meira Sandini, Natalia Moreira, Daniel Gimenes, Paula Lima, Atílio Calefi, Luana Carvalho, Daniel Cohn, Wanderley Quintero.

Gostaria de agradecer a todos os professores que de alguma forma me ajudaram, Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes e Helenice de Souza Spinosa. Um agradecimento especial ao prof. Dr. João Palermo-Neto, primeiro professor a me receber no grupo de pesquisa em neuroimunomodulação e ao Prof. Dr. Luciano

Freitas Felício, por sempre confiar em minhas habilidades e estabelecendo importantes colaborações. Aos professores e grandes amigos Frederico Azevedo Costa-Pinto e Jean Pierre, por diversas tardes étlicas discutindo-se ciência e munidas de alto e bom som.

Gostaria de agradecer a todos os funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, principalmente a Nicolle Queiroz, Vagner Gonçalves, Herculano Pereira e Magaly por todo auxílio, seja ele no laboratório ou na realização de experimentos, e um agradecimento especial a Luciana Bandini por todo cuidado com os animais enquanto estiveram no biotério.

Gostaria de agradecer a toda minha família, meu pai Ademir, minha mãe Cristina e meu irmão Lucas por todo o suporte durante a realização da minha tese como todo apoio que recebi durante o tratamento do linfoma. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Gostaria de agradecer a toda Família Relvas, em especial a Luiz Fernando Relvas que sempre me ajudou disponibilizando informações sobre meu estado de saúde como também os remédios que me auxiliaram durante todo o tratamento.

Gostaria de agradecer a minha namorada, Carolina Relvas. Sem o seu apoio, sem seu incentivo e sem o seu companheirismo nada disso seria possível. Você esteve comigo durante todo esse processo, sempre com um sorriso. E eu sei o quanto foi difícil para você. Tudo o que você fez e faz ainda hoje só faz meu amor e minha admiração crescer. Não importa o que o futuro nos reserva, você sempre terá o meu respeito e carinho incondicional.

Gostaria de agradecer meus amigos da clínica, principalmente a Livia Lemos Zanin pela constante parceria e amizade.

Gostaria de agradecer por fim, a minha orientadora prof^a. Dr^a. Maria Martha Bernardi, que sempre me apoiou e instigou meu interesse pela pesquisa e a ciência. Seu auxilio durante a tese, não somente através de nossas discussões, mas também nos momentos em que não pude estar presente. Todos esses momentos foram fundamentais no desenvolvimento desse trabalho. Tudo o que aprendi com você até hoje me faz todo dia um melhor profissional e uma melhor pessoa. Saiba que estimo muita nossa amizade e acredito que nossas colaborações ainda irão gerar muitos frutos.

“This is Major Tom to Ground Control
I'm stepping through the door
And I'm floating in a most peculiar way
And the stars look very different today”

David Bowie

RESUMO

REIS-SILVA, T. M. **Efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunes do estresse de contenção em camundongos de alta e baixa imobilidade selecionados pelo teste de suspensão da cauda.** [Behavioral, neurochemical and immune effects of restraint stress in mice of high and low immobility selected by the tail suspension test]. 2018. 126 F. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, 2018.

O estresse destaca-se como um importante fator de risco para o desenvolvimento de diferentes doenças. Reconhecido atualmente como uma epidemia global pela Organização Mundial da Saúde e afetando mais de 90% da população mundial, o estresse apresenta grande associação, em particular, com os transtornos mentais. Dentre esses, a depressão se sobressai afetando sozinha cerca de 350 milhões de pessoas em todo mundo. Poucas experiências talvez sejam tão comuns entre os organismos quanto a exposição a eventos estressantes. Alguns tipos de estresses emocionais, como a tristeza, e outros no qual o organismo é afetado por períodos prolongados, tem demonstrado serem capazes de promover disfunções imunes e distúrbios comportamentais que podem ser compreendidos através do campo interdisciplinar de estudo da neuroimunomodulação, uma vez que podem desencadear respostas específicas no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que, por conseguinte, podem modular diferentes efeitos fisiológicos decorrentes da exposição ao estresse. Dentre esses efeitos, é possível destacar a capacidade de resiliência e / ou resistência ao estresse, que podem conferir uma capacidade diferenciada de recuperação, como também aumento na susceptibilidade a doenças. Considerando os aspectos distintos do estresse e os diferentes estados patológicos a ele associados, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunes do estresse de contenção de duas horas em camundongos, selecionados para um perfil distinto de reatividade ao estresse inescapável pelo teste de suspensão da cauda. Para isso, camundongos machos de alta e baixa imobilidade foram previamente selecionados e submetidos diferentes testes pré e pós exposição ao estresse de contenção de duas horas: (i) análise dos comportamentos tipo-depressivos e ansiosos, (ii) análise dos neurotransmissores no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo e, (iii) análise de citocinas pró-

inflamatórias no córtex pré-frontal e hipotálamo. Nossos resultados mostraram que animais de alta e baixa imobilidade apresentam comportamentos diferentes antes e após a exposição ao estresse, além de apresentar um comportamento de *grooming* distinto após o estresse de contenção. A exposição ao estresse também promoveu alterações entre as concentrações serotoninérgicas, dopaminérgicas e noradrenérgicas entre animais de alta e baixa imobilidade, tanto no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo. Além disso, o perfil imune também se revelou alterado entre esses animais, principalmente em TNF- α no hipotálamo, revelando uma ativação dos sistemas relacionados ao estresse. Considerando o conjunto dos dados apresentados, nossos resultados sugerem uma ativação diferenciada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal entre camundongos de alta e baixa imobilidade e, ainda, que os animais de baixa imobilidade apresentam um perfil de resiliência ao estresse de contenção, tendo animais de alta imobilidade o perfil oposto.

Palavras chave: Estresse, Teste de Suspensão da Cauda, Neuroimunomodulação, Neurotransmissores, Resiliência.

ABSTRACT

REIS-SILVA, T. M. **Behavioral, neurochemical and immune effects of restraint stress in mice of high and low immobility selected by the tail suspension test.**

[Efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunes do estresse de contenção em camundongos de alta e baixa imobilidade selecionados pelo teste de suspensão da cauda]. 2018. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, 2018.

Stress stands out as an important risk factor for the development of different diseases. Currently recognized as a global epidemic by the World Health Organization and affecting more than 90% of the world population, stress can be strongly associated with mental disorders. Among these, depression can be highlight affecting alone about 350 million people worldwide. Few types of emotional stresses, such as sadness, and others which the organism is affected for long periods, have demonstrated to be capable of promoting immune dysfunctions and behavioral disorders. These changes can be understood through the interdisciplinary field of study of the neuroimmunomodulation, since it can trigger specific responses in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, which, therefore, could modulate different physiological effects resulting from the exposure to stress. Among these effects, it is possible to highlight the capacity of resilience and / or resistance to stress, which can confer a differentiated capacity of recovery, as well as increase in the susceptibility to diseases. Considering the distinct aspects of stress and the different pathological conditions associated, this study aimed to evaluate the behavioral, neurochemical and immune effects of two-hour of restraint stress in mice selected for a different profile of stress reactivity to the inescapable stress of the tail suspension test. For this, male mice of high and low immobility were previously selected and submitted to different tests before and after exposure to a two-hour restraint stress protocol for the analysis of: (i) the depressive and anxiety-like behaviors; (ii) concentrations of neurotransmitters in the prefrontal cortex, hypothalamus and midbrain; (iii) expression of proinflammatory cytokines in the prefrontal cortex and hypothalamus. Our results showed that animals of high and low immobility presented different behavioral profiles before and after exposure to stress and presented a distinct *grooming* behavior after the restraint stress. Exposure to stress also promoted

changes between the serotonergic, dopaminergic and noradrenergic concentrations between animals of high and low immobility in the prefrontal cortex, hypothalamus and midbrain. In addition, the immune profile revealed to be altered among these animals, especially in TNF- α in the hypothalamus, showing an activation of stress-related systems. Considering the set of data presented, our results suggest a differentiated activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis between mice of high and low immobility and, also, that the animals of low immobility present a resilience profile to the restraint stress, having high immobility animals the opposite profile.

Keywords: Stress, Tail Suspension Test, Neuroimmunomodulation, Neurotransmitters, Citokynes, Resilience.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Dependências do biotério experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.	37
Figura 2 -	Teste de suspensão da cauda utilizado na seleção dos comportamentos de alta e baixa imobilidade.....	38
Figura 3 -	Microfone e demais equipamentos utilizados para o teste de vocalização ultrassônica.....	39
Figura 4 -	Aparato experimental do teste de campo aberto utilizado na avaliação da atividade geral.....	40
Figura 5 -	Aparato experimental do teste da caixa claro/escuro utilizado na avaliação do comportamento tipo-ansioso.	41
Figura 6 -	Descrição ilustrativa do <i>splash test</i> e ambientes no qual o teste foi realizado.....	42
Figura 7 -	Estrutura do teste de preferência a sacarose no qual é dada a livre escolha entre água e sacarose 2% aos roedores.	43
Figura 8 -	Aparato experimental utilizado para o estresse de contenção..	44
Figura 9 -	Placa de ELISA utilizada nas análises da corticosterona sérica.....	45
Figura 10 -	Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado nas análises dos neurotransmissores.	47
Figura 11 -	Aparelho de RT-PCR utilizado nas análises das citocinas.	48
Figura 12 -	Cronologia e delineamento experimental dos procedimentos realizados.	49
Figura 13 -	Tempo total (A), frequência de paradas (B) e latência para imobilidade (C) de camundongos machos de baixa e alta imobilidade selecionados pelo teste de suspensão da cauda. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de Student monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A BI n=47, AI n=41; B BI n=47, AI n=45; C BI n=43, AI n=37).....	51
Figura 14 -	Tempo total (A), tempo mínimo (B), tempo máximo (C) e frequência de vocalizações (D); tempo total (E), tempo mínimo (F) e tempo máximo de silêncio (G) registrados durante o teste de vocalização ultrassônica realizado durante a seleção comportamental pelo teste de suspensão da cauda. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de Student monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A BI n=18, AI n=23; B BI n=21, AI n=24; C BI n=17, AI n=14; D BI n=19, AI n=23; E BI n=18, AI n=23; F BI n=17, AI n=18; G BI n=23, AI n=25).	53
Figura 15 -	Parâmetros de distância percorrida (A), velocidade média (B), transição entre zonas (C), tempo e frequência na zona central	

(D, E), tempo e frequência na zona periférica (F, G), tempo e frequência de movimentação (H, I) e tempo e frequência de paradas (J, K) de camundongos machos de comportamento de baixa e alta imobilidade na arena de campo aberto nos períodos pré e pós estresse de contenção. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. ANOVA de duas vias. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A BI pré e pós $n=11$, AI pré $n=11$ e pós $n=12$; B BI pré e pós $n=11$, AI pré $n=11$ e pós $n=12$; C BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; D BI e AI pré e pós $n=11$; E BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; F BI e AI pré e pós $n=11$; G BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; H BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; I BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; J BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; K BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$).56

- Figura 16 - Número de cruzamentos (A), latência para o primeiro cruzamento (B), tempo na arena clara (C) e o tempo na arena escura (D) de camundongos machos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados na caixa claro/escuro nos períodos pré e pós estresse de contenção. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. ANOVA de duas vias. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (Fig. 7A BI pré $n=11$ e pós $n=12$, AI pré e pós $n=13$; B BI pré e pós $n=11$, AI pré $n=13$ e pós $n=12$; C BI pré $n=12$ e pós $n=11$, AI pré e pós $n=13$; D BI pré e pós $n=12$, AI pré e pós $n=13$).58

- Figura 17 - Tempo total (A), latência (B) e frequência (C) de *grooming* na caixa moradia e tempo total (D), latência (E) e frequência (F) de *grooming* no ambiente novo (gaiola) de camundongos machos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados no *splash test* nos períodos pré e pós estresse de contenção de duas horas. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. ANOVA de duas vias; Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (Fig. 16A BI pré $n=11$ e pós $n=10$, AI pré $n=11$ e pós $n=12$; B BI pré e pós $n=11$, AI pré $n=11$ e pós $n=12$; C BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; D BI pré $n=12$ e pós $n=11$, AI pré $n=13$ e pós $n=12$; E BI pré $n=10$ e pós $n=12$, AI pré e pós $n=13$; F BI pré $n=12$ e pós $n=11$, AI pré e pós $n=13$).61

- Figura 18 - Percentual de consumo de água e sacarose de camundongos machos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados pré e pós estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. ANOVA de duas vias. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (BI água e sacarose pré $n = 23$ e pós $n=9$, AI água e sacarose pré $n=25$ e pós $n=9$).62

- Figura 19 - Corticosterona sérica coletada em diferentes momentos no primeiro e terceiro dia de estresse de contenção de duas horas. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste *t* de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$. Os animais de comportamento

	BI e AI foram divididos em três grupos de forma a minimizar o estresse da coleta de sangue.	63
Figura 20 -	Concentração de serotonina, metabolito e taxa de renovação (<i>turnover</i>) no córtex pré-frontal de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de <i>Student</i> monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B e C sem estresse n=8; A e C após estresse n=16, B após estresse BI n=12 e AI n=15; A, B e C 1h após estresse BI n=7 e AI n=9).	64
Figura 21 -	Concentração de serotonina, metabolito e taxa de renovação (<i>turnover</i>) no hipotálamo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de <i>Student</i> monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B e C sem estresse n=8; A, B e C após estresse BI n=12 e AI n=15; A, B e C 1h após estresse BI n=6 e AI n=8).	66
Figura 22 -	Concentração de serotonina, metabolito e taxa de renovação (<i>turnover</i>) no mesencéfalo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de <i>Student</i> monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B e C sem estresse n=8; A, B e C após estresse BI n=16 e AI n=15; A, B e C 1h após estresse BI n=7 e AI n=9).	67
Figura 23 -	Concentração de dopamina, metabólitos e taxa de renovação (<i>turnover</i>) no córtex pré-frontal de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de <i>Student</i> monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B, C, D e E sem estresse n=8; B, C, D e E após estresse n=16, A após estresse BI n=14 e AI n=15; B, C, D e E 1h após estresse BI n=7 e AI n=9, A 1h após estresse BI n=6 e AI n=8).	69
Figura 24 -	Concentração de dopamina, metabólitos e taxa de renovação (<i>turnover</i>) no hipotálamo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de <i>Student</i> monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B, C, D e E sem estresse n=8; A, B, C, D e E após estresse BI	

	n=12 e AI n=15; A, B, C, D e E 1h após estresse BI n=6 e AI n=8).	70
Figura 25 -	Concentração de dopamina, metabólitos e taxa de renovação (<i>turnover</i>) no mesencéfalo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste <i>t</i> de <i>Student</i> monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B, C, D e E sem estresse n=8; A, B, C e E após estresse BI n=16 e AI n=15, D após estresse n=15; A, B, C, D e E 1h após estresse BI n=7 e AI n=9).	72
Figura 26 -	Concentração de dopamina, v e taxa de renovação (<i>turnover</i>) no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste <i>t</i> de <i>Student</i> monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B e C sem estresse n=8; A após estresse n=16, B após estresse BI n=12 e AI n=15, C após estresse BI n=16 e AI n=15; A e C 1h após estresse BI n=7 e AI n=9, D 1h após estresse BI n=6 e AI n=8).	73
Figura 27 -	Expressão relativa de IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α no córtex pré-frontal de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse e após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste <i>t</i> de <i>Student</i> monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A sem estresse BI n=6 e AI n=3, B sem estresse n=3, C sem estresse BI=7 e AI n=5, D sem estresse BI n=6 e AI n=4; A após estresse n=4, B sem estresse n=3, C sem estresse n=5, D sem estresse BI n=5 e AI n=3).	75
Figura 28 -	Expressão relativa de IL- β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α no hipotálamo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse e após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste <i>t</i> de <i>Student</i> monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A sem estresse BI n=5 e AI n=3, B sem estresse BI n=4 e AI n=3, C sem estresse BI=7 e AI n=4, D sem estresse BI n=7 e AI n=5, E sem estresse BI n=7 e AI n=5, F sem estresse BI n=4 e AI n=5; A após estresse n=3, B após estresse BI n=5 e AI n=3, C após estresse BI=3 e AI n=4, D após estresse n=4, E após estresse BI n=4 e AI n=5, F após estresse BI n=3 e AI n=5).	76
Figura 29 -	Projeção correlacional nos eixos F1 e F2 dos comportamentos de baixa e alta imobilidade referentes aos neurotransmissores e o córtex pré-frontal avaliados no teste	

de suspensão da cauda e analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....81

Figura 30 - **Projeção correlacional nos eixos F1 e F2 dos comportamentos de baixa e alta imobilidade referentes aos neurotransmissores e o hipotálamo avaliados no teste de suspensão da cauda e analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....86**

Figura 31 - **Projeção correlacional dos eixos F1 e F2 dos comportamentos de alta e baixa imobilidade referentes aos neurotransmissores e o mesencéfalo avaliados no teste de suspensão da cauda e analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....91**

Figura 32 - **Projeção correlacional dos eixos F1 e F2 dos comportamentos de alta e baixa imobilidade referentes a expressão relativa das citocinas e o córtex pré-frontal avaliados no teste de suspensão da cauda e analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....95**

Figura 33 - **Projeção correlacional dos eixos F1 e F2 dos comportamentos de alta e baixa imobilidade referentes a expressão relativa das citocinas e o hipotálamo avaliados no teste de suspensão da cauda e analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias. .99**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos <i>turnovers</i> no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....	78
Tabela 2 -	Valores do <i>eigenvalue</i> , percentual de variabilidade e percentual acumulativo da análise de componente principal dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos <i>turnovers</i> no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.	79
Tabela 3 -	Percentual de contribuição dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a expressão de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos <i>turnovers</i> no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias. .	80
Tabela 4 -	Percentual de contribuição dos comportamentos de baixa e alta imobilidade no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.	80
Tabela 5 -	Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos <i>turnovers</i> no hipotálamo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....	83
Tabela 6 -	Valores do <i>eigenvalue</i> , percentual de variabilidade e percentual acumulativo da análise de componente principal dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos <i>turnovers</i> no hipotálamo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....	84

Tabela 7 -	Percentual de contribuição dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos <i>turnovers</i> no hipotálamo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias. .84
Tabela 8 -	Percentual de contribuição dos comportamentos de baixa e alta imobilidade no hipotálamo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.85
Tabela 9 -	Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos <i>turnovers</i> no mesencéfalo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....88
Tabela 10 -	Valores do eigenvalue, percentual de variabilidade e percentual acumulativo da análise de componente principal dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos <i>turnovers</i> no mesencéfalo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....89
Tabela 11 -	Percentual de contribuição dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos <i>turnovers</i> no mesencéfalo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias. .89
Tabela 12 -	Percentual de contribuição dos comportamentos de baixa e alta imobilidade no mesencéfalo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.90
Tabela 13 -	Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a expressão relativas das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....92

Tabela 14 -	Valores do <i>eigenvalue</i>, percentual de variabilidade e percentual acumulativo da análise de componente principal dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) e a expressão relativa das citocinas IL-1β IL-6, IL-12 e TNF-α no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.	93
Tabela 15 -	Percentual de contribuição dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) e a expressão relativa das citocinas IL-1β, IL-6, IL-12 e TNF-α no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias. .	93
Tabela 16 -	Percentual de contribuição dos comportamentos de baixa e alta imobilidade no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.	94
Tabela 17 -	Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a expressão relativas das citocinas IL-1β, IL-2, IL-6, IL-12, IFN-γ e TNF-α no hipotálamo de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....	96
Tabela 18 -	Valores do <i>eigenvalue</i>, percentual de variabilidade e percentual acumulativo da análise de componente principal dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) e a expressão relativa das citocinas IL-1β, IL-2, IL-6, IL-12, IFN-γ e TNF-α no hipotálamo de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.	97
Tabela 19 -	Percentual de contribuição dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) e a expressão relativa das citocinas IL-1β, IL-2, IL-6, IL-12, IFN-γ e TNF-a no hipotálamo de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias. .	97
Tabela 20 -	Percentual de contribuição dos comportamentos de baixa e alta imobilidade no hipotálamo de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.....	98

LISTA DE SIGLAS

AI	alta imobilidade
ACP	análise de componente principal
BI	baixa imobilidade
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CCE	caixa claro/escuro
CPF	córtex pré-frontal
DA	dopamina
DOPAC	ácido 4,4-diidroxifenilacético
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
HHa	hipotálamo-hipófise-adrenal
HVA	ácido homovanílico
IL-1 β	interleucina 1 β
IL-6	interleucina 6
NA	noradrenalina
OMS	Organização Mundial da Saúde
SNAS	sistema nervoso autônomo simpático
SNC	sistema nervoso central
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TPS	teste de preferência a sacarose
TSC	teste de suspensão da cauda
UNIP	Universidade Paulista
5HIAA	ácido 5-hidroxiindol, 3-acético
5HT	serotonina

SUMÁRIO

1	JUSTIFICATIVA.....	23
2	INTRODUÇÃO	24
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	As bases biológicas do estresse	25
3.2	O estresse e a neuroimunomodulação.....	31
4	OBJETIVOS	35
4.1	Objetivo geral.....	35
4.2	Objetivos específicos.....	35
5	Material e métodos	36
5.1	Animais	36
5.2	Testes comportamentais	37
5.2.1	Teste de suspensão da cauda	37
5.2.2	Teste de vocalização ultrassônica.....	38
5.2.3	Teste de campo aberto.....	39
5.2.4	Teste da caixa claro/escuro.....	40
5.2.5	<i>Splash test</i>	41
5.2.6	Teste de preferência a sacarose	42
5.2.7	Teste de estresse por contenção	44
5.3	Avaliações hormonais, neuroquímicas e imunes.....	45
5.3.1	Quantificação dos níveis séricos de corticosterona.....	45
5.3.2	Quantificação dos níveis encefálicos de monoaminas e metabólitos (dopamina, noradrenalina e serotonina) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	46
5.3.3	Avaliação das citocinas por PCR em tempo real.....	47
5.4	Delineamento experimental e formação dos grupos	48
5.5	Análise estatística	49
6	RESULTADOS.....	51
6.1	Resultados comportamentais	51
6.1.1	Seleção do comportamento pelo teste de suspensão da cauda	51
6.1.2	Avaliação da vocalização ultrassônica	51
6.1.3	Avaliação da atividade geral em campo aberto	53
6.1.4	Avaliação do comportamento tipo-ansioso na caixa claro/escuro	57
6.1.5	Avaliação da expressão de <i>grooming</i> no <i>splash test</i>	59
6.1.6	Avaliação da preferência entre sacarose e água	61

6.2	Resultados hormonais, neuroquímicos e imunes.....	62
6.2.1	Concentração dos níveis séricos de corticosterona no primeiro e terceiro dia pré e pós estresse de contenção de duas horas	62
6.2.2	Concentração dos níveis de serotonina, de seu metabólito e turnover no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo de camundongos avaliados antes, depois e uma hora depois do estresse de contenção de duas horas durante três dias	63
6.2.3	Níveis de dopamina, metabólitos e <i>turnover</i> no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo de camundongos avaliados antes, depois e uma hora depois do estresse de contenção de duas horas durante três dias.....	68
6.2.4	Concentração dos níveis de noradrenalina no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo de camundongos avaliados antes, depois e uma hora depois do estresse de contenção de duas horas durante três dias.....	72
6.2.5	Concentração dos níveis de citocinas no córtex pré-frontal e hipotálamo de camundongos avaliados antes e depois do estresse por contenção de duas horas durante três dias	74
6.3	Análise de correlação por componente principal entre parâmetros comportamentais de imobilidade, neurotransmissores e citocinas no encéfalo	77
6.3.1	Análise de componente principal entre comportamento e neurotransmissores no córtex pré-frontal	77
6.3.2	Análise de componente principal entre comportamento e neurotransmissores no hipotálamo.....	81
6.3.3	Análise de componente principal entre comportamento e neurotransmissores no mesencéfalo.....	86
6.3.4	Análise de componente principal entre comportamento e a expressão relativa de citocinas no córtex pré-frontal	91
6.3.5	Análise de componente principal entre comportamento a expressão relativa de citocinas no hipotálamo.....	95
7	DISCUSSÃO	100
8	CONCLUSÕES	110
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
10	ANEXOS	124
10.1	Certificado de aprovação da comissão de ética no uso de animais	124

1 JUSTIFICATIVA

Como observado por Reis-Silva e colaboradores (2016) em trabalhos anteriores, é possível selecionar em camundongos submetidos ao teste de suspensão da cauda (TSC), características comportamentais de alta e baixa imobilidade. Essa característica, além de ser distribuída de forma distinta entre a população de camundongos foi associada anteriormente ao comportamento depressivo, devido a natureza desse teste. Além disso, verificou-se que a característica de alta e baixa imobilidade também é transmitida entre diferentes gerações, revelando um componente genético associado a esse comportamento. O TSC é conhecido como um teste de estresse inescapável e muito utilizado como *screening* para drogas antidepressivas. Devido a esse aspecto, o comportamento de alta e baixa imobilidade comumente foi relacionado ao comportamento depressivo. Entretanto, foi verificado que essa característica pode estar envolvida não somente ao espectro da depressão, mas ser também uma característica desenvolvida frente ao estresse inescapável do TSC. Sabe-se que o estresse possui ampla relação com a depressão, mas também está implicado em quase todos os processos psicopatológicos. Assim, considerando a relação do estresse na etiologia de diferentes transtornos mentais, o estudo das características de alta e baixa imobilidade selecionadas pelo TSC podem ser um importante instrumento no estudo das bases comportamentais e neurobiológicas de diferentes psicopatologias, bem como auxiliar no entendimento de como o estresse interfere ou não nos diferentes possíveis quadros. Uma das possíveis relações do estresse com diferentes psicopatologias é a capacidade de resiliência ou resistência que um organismo pode apresentar após ser exposto ao estresse. Tais características também são de interesse de trabalho, uma vez que podem interferir com o desenvolvimento de diferentes transtornos. Dessa forma, buscou-se com a realização desse projeto, verificar a relação entre o estresse de contenção repetido de 3 dias e o fenótipo de alta (AI) e baixa imobilidade (BI), selecionado pelo TSC, na tentativa de compreender melhor os aspectos comportamentais, neuroquímicos e imunes correlatos a esses parâmetros.

2 INTRODUÇÃO

Desde sua introdução na biologia experimental por Hans Selye (1998) na década de 30, o estresse tem sido amplamente estudado e destaca-se hoje como um importante fator de risco no desenvolvimento de diversas doenças. Diferentes pesquisas buscam ilustrar o impacto do estresse no organismo, desde as que demonstram suas respostas comportamentais àquelas que estudam suas bases neurobiológicas (MCEWEN, 2007)(LUCAS et al., 2007).

Associações importantes entre o estresse do dia-a-dia e o desenvolvimento de estados patológicos foram estabelecidos ao longo do tempo. Entre esses, destacam-se alguns distúrbios neurodegenerativos como a Doença de Alzheimer (JEONG et al., 2006) e Doença de Parkinson (MACHT; HAUPT; ELLGRING, 2005), distúrbios sistêmicos da saúde como doenças cardiovasculares (BLACK; GARBUTT, 2002) e diabetes (COHEN et al., 2010), doenças inflamatórias (ELENKOV; CHROUSOS, 2002) e distúrbios de ordem psiquiátrica, como transtornos ansiosos e, principalmente, os transtornos de ordem depressiva (MAES et al., 2012).

É possível definir estresse de diferentes formas, tal como uma resposta a diferentes tipos de estímulo bem como um processo dinâmico que reflete tanto os aspectos externos, internos e sua devida interação. Contudo, parece ser um consenso de que o estresse hoje é um estado adquirido frente a um estímulo (BUTLER, 1993).

Em 2008 o estresse foi reconhecido pela Organização Mundial da Saúde como uma epidemia global, afetando mais de 90% da população mundial. Contudo, apesar do estresse ser essencial para uma resposta adequada aos estímulos do ambiente, décadas de estudo sugerem que alguns tipos de estresses emocionais, como a tristeza (COHEN; JANICKI-DEVERTS; MILLER, 2007) e perturbações pelas quais o indivíduo é afetado por longos períodos, são capazes de promover disfunções imunes e distúrbios comportamentais (DEAK et al., 2015).

Durante a vida, sabe-se cada indivíduo experimentará eventos estressantes e/ou será exposto a algum tipo de trauma. Neste sentido e devido ao amplo espectro do que pode ser considerado como um estímulo estressor, talvez poucas experiências sejam tão comuns entre as pessoas e outros organismos quanto à exposição a eventos estressantes (WU et al., 2013).

Atualmente, estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas apresentem algum tipo de quadro relacionado a depressão e que mais de 700 milhões pessoas em todo mundo sofram com algum tipo de doença mental (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). A associação entre estresse e doença mental (CATTANEO; RIVA, 2016), revela a importância do estudo de suas bases neurobiológicas e como essas se relacionam com a depressão e outras diferentes psicopatologias, contribuindo para um melhor entendimento de seus desdobramentos no organismo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 As bases biológicas do estresse

A compreensão de grande parte das bases biológicas do estresse é possível devido a diferentes modelos animais que buscam o estudo de doenças diversas. Destacam-se entre esses modelos aqueles que têm como fim o estudo das psicopatologias. Esses modelos buscam mimetizar parâmetros seletos de alguns transtornos mentais, permitindo um estudo aprofundado tanto em aspectos sintomatológicos, tal como o comportamento doente, observado comportamentos tipo-depressivos, bem como permite o trabalho nas diferentes respostas frente a um estímulo, tal como a resposta de resiliência, que pode se apresentar após a exposição do animal à estímulos estressores. Assim, de acordo com McKinney (1984) p.77

“os modelos animais representam preparações experimentais desenvolvidas em uma espécie com o propósito de estudar os fenômenos que ocorrem em outra espécie. No caso dos modelos de psicopatologia humana, buscam-se desenvolver síndromes nos animais que de certo modo se assemelhem àquelas apresentadas pelos humanos, com o fim de estudar aspectos seletos da psicopatologia humana”.

Atualmente, é possível induzir diferentes condições psicopatológicas em animais de laboratório através do uso do estresse. Contudo, a principal limitação desses modelos é a sua incapacidade de refletir totalmente os mecanismos envolvidos na condição humana em si. Como resultado, as bases biológicas desses transtornos em animais pode ser diferente daquela observada em seres humanos, e drogas que tratam os primeiros podem não ser adequadas para tratar este último. Entretanto, embora muitos modelos não sejam válidos para mimetizar sintomas humanos, eles podem ser considerados adequados enquanto servirem de preditivo na identificação de comportamentos e de novas drogas e tratamentos (NESTLER; GOULD; MANJI, 2002).

Sabe-se hoje que o sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) desempenham papel central nos efeitos fisiológicos decorrentes da exposição ao estresse. Apesar disso, há ainda uma

ampla discussão a respeito de seu real papel em transtornos de ordem ansiosa e depressiva (ALVES; PALERMO-NETO, 2007; CATTANEO; RIVA, 2016). De acordo com Palma e colaboradores (2007), a comunicação prejudicada entre esses sistemas é uma das responsáveis por conferir maior suscetibilidade à infecções, bem como aumentar a probabilidade de desenvolvimento de doenças psiquiátricas.

Esses sistemas são fundamentais não somente na resposta ao estresse, mas na resposta adaptativa frente a ameaças tanto fisiológicas (hipoglicemia, hemorragia, lesão, infecção, etc.), como psicológicas (exposição predatória, dominância social, etc) (DEAK et al., 2015; ALVES; PALERMO-NETO, 2007). Destacam-se como exemplos pertinentes dessa resposta o aumento da frequência cardíaca e bronco-respiratórias mediadas pelo SNAS (resposta de luta ou fuga) (BRACHA, 2004; TANK; WONG, 2015), bem como alterações comportamentais, que envolvem aspectos do comportamento doentio (ALVES; PALERMO-NETO, 2007; CATTANEO; RIVA, 2016) que estão relacionadas à ativação do eixo HPA (KELLER et al., 2017) e à vigilância de células imunes (SOUNG; KIM, 2015).

Diferente do SNAS, cuja resposta se inicia imediatamente frente a um estímulo (via liberação de noradrenalina em diversos sistemas corporais), o eixo HHA apresenta maior tempo de resposta em virtude dos componentes neuroendócrinos. Através da liberação de hormônios glicocorticoides na circulação, tal como o cortisol, que auxilia a redistribuição de recursos energéticos como a gliconeogênese hepática, o eixo HHA regula o tempo da resposta inicial ao estresse. Entretanto, apesar dessa resposta proporcionar benefício imediato, pode ser potencialmente prejudicial se prolongada (RADLEY et al., 2011; ELENKOV; CHROUSOS, 2002; MORENO-SMITH; LUTGENDORF; SOOD, 2010; MCEWEN, 2007).

O sistema imunológico também é profundamente impactado por experiências estressantes, podendo o estresse agudo e crônico proporcionar respostas imunológicas muitas vezes distintas (DHABHAR et al., 1995). A modulação neuroendócrina da imunidade pode ser benéfica ou prejudicial dependendo do tipo de estímulo, ou seja, de sua natureza, do tempo e da intensidade (ANISMAN, 2009; DANTZER et al., 2008). Assim, é possível observar, a depender do tipo de estímulo, pessoas que sofrem intervalos repetidos de eventos menores e diários que se acumulam em períodos crônicos, bem como pessoas cujas experiências

estressantes surgem sob forma de ameaças severas que, embora temporariamente breves, podem induzir mudanças ao longo da vida do indivíduo. Logo, a intensidade com que o estresse é vivenciado pode induzir a ativação de processos neuroimunes e de diferentes aspectos da imunidade periférica, afetando a capacidade de defesa, prejudicando a recuperação e, por fim, aumentando a susceptibilidade a doença (DEAK et al., 2015).

Condições de estresse crônico, por exemplo, podem manter o organismo em um estado de constante excitação, desencadeando efeitos prejudiciais sobre os mecanismos de *feedback* ao estresse, bem como no funcionamento de diferentes órgãos (MORENO-SMITH et al., 2010). Mais ainda, disfunções imunes e distúrbios comportamentais foram associados à exposição crônica ou repetida ao estresse, como também a níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias circulantes, como a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Essas, por sua vez, estão associados a distúrbios de humor, como a ansiedade e a depressão (MILLER, 2008; DEAK et al., 2015).

O estresse crônico ainda pode proporcionar respostas adaptativas de longo prazo, tais como adaptações neuroplásticas, dentre as quais se destacam as mudanças na regulação de diferentes genes (COOK; WELLMAN, 2004). Contudo, embora muitos mecanismos plásticos sejam adaptativos, promovendo, por exemplo, habituação do eixo HHA e susceptibilidade reduzida à neurotoxicidade do glutamato (MCEWEN, 2001), esses também podem promover maior sensibilidade a novos/diferentes estímulos estressores, tornando os sistemas de estresse hiper ou mesmo hiporreativos (RADLEY et al., 2011).

A sensibilidade alterada ao estresse também pode estar relacionada a aspectos comportamentais. Dhabhar e colaboradores (2012) observaram que camundongos com maior tempo de permanência nos braços fechados no labirinto em cruz elevado, assim como maior permanência na área escura (fenótipo mais ansioso) do teste caixa claro/escuro (CCE), apresentam números mais reduzidos de células T auxiliaadoras / citotóxicas e números mais elevados de células T reguladoras / supressoras. Esses animais apresentam ainda aumento na progressão de tumores como os de carcinomas de pele quando comparados a camundongos de perfis menos ansiosos. Ainda, em outro estudo desenvolvido por Thaker e colaboradores (2006), verificou-se que o estresse crônico induzido por períodos

diários de imobilização resulta em níveis mais elevados de catecolaminas intratecduais, levando o desenvolvimento de alguns tipos de câncer a um padrão de doença mais invasivo.

Estudos em modelos animais e em seres humanos, bem como pesquisas de neuroimagem apontam para o envolvimento de um conjunto de estruturas e circuitos cerebrais específicos relacionados a geração de respostas emocionais, cognitivas e comportamentais frente a estressores. Áreas encefálicas como a amígdala, a insula, o hipotálamo, o hipocampo, o córtex pré-frontal (CPF) medial e o córtex cingulado anterior demonstraram desempenhar um papel importante nesse neuro-circuito (DEDOVIC; D'AGUIAR; PRUESSNER, 2009; VAN DER WERFF et al., 2013).

Dessa forma, os estudos que avaliam o impacto do estresse sobre a função imune e a susceptibilidade a infecção (DEAK et al., 1999) apontam que entendimento na comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune é fundamental para se entender os mecanismos das doenças associadas ao estresse (MAIER; WATKINS; MAIER, 1998).

Além da comunicação entre esses sistemas, mecanismos neurobiológicos associados a reatividade e resiliência do organismo também podem ser determinantes na resposta ao estresse, e apresentam grande relevância científica e social. No entanto, embora o estresse possa influenciar o desenvolvimento de diferentes transtornos psiquiátricos e, que muitos indivíduos apresentem sintomas de sofrimento psicológico em algum momento de suas vidas, apenas uma minoria desenvolverá algum tipo de transtorno (VAN DER WERFF et al., 2013). Nesse cenário, é possível questionar quais são os elementos responsáveis, tal como os aspectos de reatividade e resiliência associados ao organismo que podem ou não influenciar o surgimento desses transtornos.

Ser resistente ao estresse indica maior tolerância aos estímulos estressores, ou seja, maior capacidade em manter o sistema em um funcionamento adequado após o estímulo de estresse; resiliência, no entanto, indica que o organismo apresenta uma recuperação melhor após a exposição ao estímulo estressor. Em outras palavras, o organismo retorna mais rapidamente ao estado de equilíbrio. Contudo, é importante ressaltar que ambas as características não são concomitantes. Ser resiliente a um estímulo estressor não implica que este mesmo organismo seja também resistente. Dessa maneira, compreender os mecanismos

associados a resposta de resiliência e resistência frente a um estímulo é fundamental para um melhor entendimento das bases neurobiológicas associadas à resposta cerebral ao estresse e diferentes doenças (FLESHNER et al., 2011).

Além dos aspectos bidirecionais entre SNC e sistema imune, sabe-se que a susceptibilidade ou não a doenças, assim como a resistência e resiliência, podem envolver componentes genéticos importantes na resposta frente ao estresse (HYMAN, 2000). Recentemente, Mitchell e colaboradores (2014) observaram que crianças que vivem em ambientes de desvantagem social apresentavam encurtamento de telômeros (estrutura responsável por manter a estabilidade do material genético) em relação àquelas que se desenvolveram em ambientes mais enriquecidos, demonstrando uma importante interação entre gene e ambiente.

Diversos genes já foram associados aos sistemas modulados pelo estresse. Os genes FKBP5 e CRHR1, por exemplo, influenciam a atividade de hormônios envolvidos na resposta do eixo HHA frente ao estresse. Os genes BDNF, NPY e OXTR atuam principalmente no hipocampo e amígdala, e estão relacionados a resposta frente ao estresse em períodos precoces do desenvolvimento (WU et al., 2013; FURMAN; CHEN; GOTLIB, 2011; NIITSU et al., 2017). Há ainda genes associados ao funcionamento do sistema noradrenérgico e do SNAS, tais como os genes COMT e o MAOA, responsáveis pela regulação da resposta na neurotransmissão de adrenalina e noradrenalina (NIKULINA; WIDOM; BRZUSTOWICZ, 2012; HETTEMA et al., 2008).

Além disso, as catecolaminas também desempenham um papel fundamental na regulação de processos emocionais e podem ser influenciadas diretamente pelo estresse. Maior liberação de noradrenalina pelo *locus coeruleus*, durante processos de estresse, a locais como amígdala, CPF e hipocampo, podem resultar na inibição do CPF e favorecer respostas instintivas sobre pensamentos mais elaborados (RUTTEN et al., 2013). Contudo, esses sistemas ainda podem se tornar menos responsivos ao estresse ambiental, levando a distúrbios comportamentais de ordem ansiosa (FEDER; NESTLER; CHARNEY, 2009).

A associação entre esses diferentes sistemas, bem como sua respectiva relação com o estresse levaram a criação do campo interdisciplinar de pesquisa da Psiconeuroimunologia ou, como também conhecida, a Neuroimunomodulação, pelo psicólogo Robert Ader e imunologista Nicholas Cohen. Essa disciplina surgiu com o

objetivo de se entender as interações entre as funções neurais e endócrinas, além dos processos imunes e comportamentais que se manifestam em diferentes organismos (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

3.2 O estresse e a neuroimunomodulação

A prática clínica tanto da psiquiatria como da psicologia consiste em compreender e trabalhar na resolução de um conjunto específico de problemas que, devido a sua ampla heterogeneidade, alguns autores acreditam que sua melhor categorização seja somente como "problemas do viver" (BORSBOOM; CRAMER, 2013; HYLAND, 2011). No entanto, a terminologia científica tomou um caminho distinto desde seus primórdios, sendo hoje comum falar de pessoas que sofrem de transtornos mentais. A concepção de transtorno mental, por conseguinte, levou os problemas encontrados no âmbito das clínicas psiquiátrica e psicológica serem categorizadas como sintomas, o que por sua vez, sugeriria a concepção de doença (BORSBOOM, 2017; BORSBOOM; CRAMER, 2013).

Dessa forma, torna-se relevante diferenciar transtorno mental de doença, uma vez que o termo "doença" implica uma etiologia elaborada, pelo qual sintomas surgem de uma via patogênica comum, enquanto o termo "transtorno mental" refere-se a uma constelação sindrômica de sintomas que interagem empiricamente por razões, muitas vezes, desconhecidas (BORSBOOM, 2017).

É nesse sentido, que trabalhos recentes têm apresentado a hipótese de que não seria possível encontrar mecanismos centrais específicos como efeitos de uma causa comum para os transtornos mentais porque, possivelmente, tais mecanismos não existiriam. Nesse sentido, muitos sintomas psiquiátricos têm sido discutidos como responsáveis um pelo outro, ou seja, seriam causadores um do outro (CRAMER et al., 2010). Assim, considerando o amplo aspecto multifatorial dos transtornos mentais, que podem incluir desde de uma relação a estressores no nível ambiental, como também fatores genéticos, desequilíbrios bioquímicos ou, ainda, uma combinação de todas essas vias (CATTANEO; RIVA, 2016), estudos que busquem uma visão mais integrativa para sua compreensão podem ser de grande contribuição.

Devido à grande associação entre estresse e transtornos mentais, diferentes pesquisas vêm empregando a visão interdisciplinar da neuroimunomodulação que, desde a publicação do trabalho "*a syndrome produced by diverse noxious agents*", por Hans Selye (1998), busca demonstrar os efeitos das interações neuroimunes

sob diferentes condições de estresse em aspectos da saúde e da doença (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

A neuroimunomodulação, dessa forma, ocupa-se em compreender os diferentes efeitos decorrentes da exposição ao estresse, assim como suas respectivas consequências na função cerebral, imunológica e comportamental. A comunicação entre muitos sistemas que, embora aparentemente distintos, como os sistemas imune, nervoso central e endócrino, são fundamentais não somente para a homeostase do organismo, como estão diretamente implicadas na patogênese de várias doenças auto-imunes e inflamatórias (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010; DENES; MIYAN, 2014).

Dentre os muitos transtornos que podem se beneficiar da visão interdisciplinar da neuroimunomodulação, é possível citar a depressão como um dos exemplos mais importantes. O transtorno depressivo vem sendo estudado nos últimos 50 anos sob a ótica da hipótese monoaminérgica, baseada no conceito da deficiência das aminas biogênicas, sendo as catecolaminas e a indolamina serotonina (5HT), as principais causadoras do estado depressivo (BAHLS, 2005).

Essa hipótese teve como base diferentes observações ao longo dos anos, como a de Schildkraut (1965), que demonstrou o papel da diminuição da NA cerebral, assim como a de Lapin e Oxenkrug (1969), que demonstraram o papel da 5HT. Os desdobramentos dessas hipóteses são ainda reforçados pelo conhecimento acerca das ações dos primeiros antidepressivos (tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase), que contribuem com uma melhor disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica (BAHLS, 2005; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).

Sob a perspectiva neuroimune a depressão seria um fenômeno psiconeuroimunológico, o que envolve as interações entre comportamento e funções neurais, endócrinas e imunes (ADER, 2001). Assim já se demonstrou que a depressão possui relações com alterações no sistema imune (KRONFOL et al., 1983; MAES, 1995; WEST; MAES, 1999; NUNES et al., 2002) e que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias também estão relacionadas as alterações observadas em quadros de depressão (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).

As citocinas, são um grupo diversificado de proteínas regulatórias de baixo peso molecular produzidas por células imunocompetentes, tais como linfócitos e macrófagos (DOCKRELL, 1993; SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005; MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008). Embora desempenhem a função de combater diferentes patógenos e atuar no sistema imune de forma a reconhecer partículas invasoras e em respostas adaptativas (AVITSUR; POLLAK; YIRMIYA, 1997; ADEREM; ULEVITCH, 2000), elas atuam na mediação do estresse através da ativação do eixo HHA.

Ainda, acredita-se que as citocinas também sejam capazes de afetar períodos gestacionais. É sugerido que essas moléculas sejam produzidas pelo próprio feto, seja a partir de algumas citocinas que atravessaram a barreira placentária, seja por outro meio de sinalização, como as próprias alterações no eixo HHA (URAKUBO et al., 2001). De fato, a hiperatividade do eixo HHA presente em casos de depressão maior é, de acordo com Heim e colaboradores (2008), um dos achados mais proeminentes da Psiconeuroendocrinologia.

Assim, por via multifatoriais, o SNC pode contribuir para uma modulação da resposta imune via ativação do eixo HHA, que sob a influência de estímulos estressantes variados pode produzir glicocorticoides, substância com a capacidade de interferir com diversos tipos de citocinas (ALVES; PALERMO-NETO, 2007). Dessa forma, é sugerido que as citocinas desempenhem um papel fundamental como mediadores da fisiopatologia da depressão, podendo prejudicar o funcionamento do eixo HHA, contribuindo para com sua hiperatividade e interferindo negativamente em seu *feedback* (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005).

A resposta natural do eixo HHA se inicia a partir de neurônios do núcleo paraventricular hipotalâmico, que secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina vasopressina (AVP) no sistema hipofisário. Por sua vez, CRH e AVP estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) em receptores específicos na membrana de proteínas G em corticótrofos pituitários. Por fim, a glândula adrenal secreta glucocorticóides em resposta à ACTH. Os glucocorticóides afetariam, por sua vez diferentes tipos de citocinas, além de receptores específicos no cérebro e tecidos periféricos, desencadeando as alterações metabólicas, imunes e comportamentais necessárias para lidar com o estresse (GONCHAROVA, 2013).

Pesquisas demonstram a capacidade das citocinas em influenciar a neurotransmissão, bem como no metabolismo de NA, DA e 5HT. (MUSSELMAN et al., 2001). A ligação entre as citocinas e a neurotransmissão é considerada como a possível causa dos sintomas depressivos (WILSON; WARISE, 2008).

Nesse contexto, o estresse se revela como o grande modulador da imunidade e diversas evidências apontam que as consequências neuroimunes do estresse podem variar conforme sua natureza, intensidade e duração, demonstrando um papel central na progressão, bem como na resposta de resistência ou resiliência a diferentes estados patológicos atuantes no organismo (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunes do estresse de contenção em camundongos machos de alta e baixa imobilidade selecionados pelo teste de suspensão da cauda.

4.2 Objetivos específicos

- Seleção dos fenótipos de alta e baixa imobilidade (reatividade) em camundongos machos da linhagem *Swiss* através do teste de suspensão da cauda;
- Vocalização ultrassônica de camundongos machos de fenótipos de alta e baixa imobilidade (reatividade).

Avaliar os efeitos pré e pós estresse de contenção repetido de duas horas durante três dias em camundongos machos de fenótipos de alta e baixa imobilidade (reatividade) selecionados pelo teste de suspensão da cauda nos seguintes parâmetros:

- Comportamentos de motivação e anedonia pelo *splash test*;
- Comportamentos de motivação e anedonia pelo teste de preferência a sacarose;
- Comportamentos referentes à atividade geral no teste de campo aberto;
- Comportamento tipo ansioso avaliados na caixa claro/escuro;
- As possíveis alterações nos níveis de corticosterona sérica;
- Concentração dos níveis de 5HT, DA e NA, bem como seus respectivos metabólitos e *turnovers* no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo;
- Concentração dos níveis das citocinas interleucina 1 β , 2, 6 e 12, interferon γ e fator de necrose tumoral α na resposta imune no córtex pré-frontal e hipotálamo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado de maneira interdisciplinar, contando com a colaboração de diferentes laboratórios. Assim, parte dos experimentos foram realizados nas dependências do biotério, no laboratório de farmacologia e laboratório de neurobiologia dos comportamentos reprodutivos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), bem como nas dependências dos laboratórios da Universidade Paulista (UNIP) – Campus Indianópolis.

5.1 Animais

Foram solicitados ao todo 150 camundongos machos (*mus musculus*) adultos da linhagem Swiss, entre 6 a 8 semanas de idade. Os experimentos desse trabalho foram realizados em quatro etapas em diferentes momentos, conforme a disponibilidade dos laboratórios e pessoas envolvidas em sua realização. Todos os animais utilizados seguiram as normas e procedimentos éticos estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP, protocolo número 3925110614 (anexo 1).

Antes da realização dos experimentos, os animais foram alojados por um período mínimo de 10 dias, em gaiolas de polipropileno (28 x 17 x 12cm) em número máximo de 5 animais por gaiola para adaptação às condições do biotério experimental, conforme ilustrado pela figura 1. Estas gaiolas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26°C) e umidade (55 a 65%) foram mantidas por meio de aparelhos de ar condicionado central com ventilação, exaustão e luminosidade controladas, obedecendo-se a um ciclo claro/escuro de 12 horas, com início da fase clara as 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores NUTRILABOR GUABIR® (Nuvilab, Quimtia, Paraná, Brazil). Ração e água foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todo o tempo, exceto durante o período de realização dos experimentos. Todas as medidas foram tomadas para minimizar o sofrimento dos animais.

Figura 1 - Dependências do biotério experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.2 Testes comportamentais

5.2.1 Teste de suspensão da cauda

O TSC foi baseado no protocolo descrito inicialmente por Steru et al. (1985) e posteriormente por Castagné et al. (2011). Brevemente, os camundongos foram suspensos por meio de fitas adesivas fixadas a 1 cm do final da cauda e gentilmente posicionados em um suporte de madeira localizado a 100 cm do solo. O tempo que o animal permaneceu imóvel, juntamente com a frequência e latência para a primeira imobilidade foram registrados durante 6 minutos por meio de uma câmera de vídeo posicionada em frente ao aparato experimental. Note-se que esse teste foi realizado em todas os animais desse trabalho previamente a qualquer outro teste comportamental. O objetivo do TSC foi selecionar a característica fenotípica AI e BI. Após essa avaliação, os animais foram submetidos aos diferentes testes descritos a seguir. A figura 2 ilustra o aparato experimental empregado neste experimento.

Figura 2 - Aparato empregado para o teste de suspensão da cauda utilizado na seleção dos comportamentos de alta e baixa imobilidade.

5.2.2 Teste de vocalização ultrassônica

O teste de vocalização ultrassônica foi realizado durante as sessões de estresse inescapável do TSC. Brevemente, as vocalizações foram gravadas durante um período de 6 minutos através de um microfone ultrassônico (modelo D940, Pettersson Elektronik AB®, Uppsala, Sweden) ajustado para uma escala centrada em 22 kHz e posicionado a 5 centímetros dos animais. Os parâmetros avaliados foram a frequência e o tempo total, mínimo e máximo de vocalizações, assim como a frequência e o tempo total, mínimo e máximo de silêncio (KIRSTEN et al., 2012). A figura 3 ilustra o microfone de gravação de vocalização e a sala de gravação.

Figura 3 - Microfone e demais equipamentos utilizados para o teste de vocalização ultrassônica.

5.2.3 Teste de campo aberto

O teste de campo aberto é uma ferramenta padrão para a medida do comportamento exploratório e ansiedade em roedores (ARCHER, 1973). O campo aberto consiste em uma arena redonda com 40 cm diâmetro e paredes laterais de 50 cm. O animal foi introduzido no centro da arena e o comportamento registrado por uma câmera de vídeo montada sobre um tripé adjacente ao campo. As sessões duraram 5 minutos. Posteriormente, os vídeos foram analisados pelo programa de análises comportamentais Ethovision® (Ethovision; Noldus Information Technology, Leesburg, VA), no qual os parâmetros de distância percorrida, velocidade média, frequência e tempo de parada foram obtidos. Todos os testes foram conduzidos sob luz de intensidade média e, similar ao *Splash Test* (ST) e TPS, os animais foram avaliados pré e pós estresse de contenção de 2 dias. O aparato empregado no teste de campo aberto é ilustrado pela figura 4, abaixo.

Figura 4 - Aparato experimental do teste de campo aberto utilizado na avaliação da atividade geral.

5.2.4 Teste da caixa claro/escuro

A CCE foi utilizada para avaliar o comportamento tipo-ansioso dos animais (KULESSKAYA; VOIKAR, 2014). Esse teste consiste de uma arena de acrílico (A x L x C: 205 x 275 x 455 mm) com dois compartimentos: um escuro pequeno (A x L x C: 200 x 265 x 175mm) e um claro grande (A x L x C: 200 x 265 x 260mm). Esses compartimentos são divididos por uma porta pela qual os roedores podem atravessar. A arena clara funciona nesse teste como um estímulo ansiogênico. Dessa forma, espera-se um conflito entre a motivação de explorar um ambiente novo e evitar o compartimento claro, tido como aversivo e também iluminado por uma fonte de luz (Lumilux®, 22W, 1200lm). Brevemente, os animais foram colocados individualmente no compartimento claro, com a cabeça voltada em direção à parede, permitindo que explorassem o aparato durante 5 minutos. Durante esse período, os parâmetros de latência para o animal entrar no compartimento escuro, o tempo e o número de passagem em ambos compartimentos e o número total de cruzamento foi registrado por uma câmera de vídeo montada sobre um tripé

adjacente ao campo. Posteriormente, os vídeos foram analisados pelo programa de análises comportamentais Ethovision® (Ethovision; Noldus Information Technology, Leesburg, VA). Para se evitar interferências olfatórias, o aparato era higienizado com solução de álcool a 5%. Assim como nos testes anteriormente descritos, os animais foram avaliados pré e pós dois dias de estresse de contenção de 2 horas. A CCE é ilustrada pela figura 5.

Figura 5 - Aparato experimental do teste da caixa claro/escuro utilizado na avaliação do comportamento tipo-ansioso.

5.2.5 *Splash test*

O *splash test* é empregado em testes pré-clínicos para avaliar a anedonia de animais (DUNLOP; NEMEROFF, 2007), através da expressão do *grooming* (auto-limpeza). A avaliação do *splash test* ocorreu em dois ambientes (figura 4) e dois momentos distintos. O primeiro ambiente consistiu em uma análise na própria caixa moradia dos roedores. Já na segunda, os animais foram avaliados em uma caixa de vidro transparente. A utilização desses ambientes teve como objetivo avaliar as possíveis diferenças no comportamento frente a estímulos ambientais distintos. Com relação aos momentos de avaliação, os animais foram observados pré e pós o

estresse de contenção de dois dias durante o período de 2 horas. Em ambas as situações os animais foram observados individualmente e receberam uma borrifada de solução de sacarose 10% sobre o revestimento dorsal. Devido a viscosidade da solução de sacarose e a atratividade do roedor a solução, o comportamento de *grooming* (a autolimpeza dos animais) é incitado. Após a aplicação da solução de sacarose, os parâmetros de latência, tempo total e a frequência do *grooming* foram avaliados por 5 minutos. Tais parâmetros são considerados como um índice de comportamento de autocuidado e motivacional do roedor (TAKATSU-COLEMAN et al., 2013)(FREITAS et al., 2013).

Figura 6 - Descrição ilustrativa do *splash test* e ambientes no qual o teste foi realizado.

5.2.6 Teste de preferência a sacarose

O teste de preferência a sacarose (TPS) foi adaptado a partir dos trabalhos de (TAKATSU-COLEMAN et al., 2013) e representa também um teste de anedonia empregado na avaliação pré-clínica de comportamentos tipo-depressivo, no qual animais com comportamentos tipo depressivo, não apresentam preferência pela solução de sacarose(TAKATSU-COLEMAN et al., 2013). Brevemente, foi dado aos

camundongos a livre escolha entre uma garrafa de água e uma garrafa de solução de sacarose 2%. Similar ao *splash test*, esse teste foi realizado em dois momentos distintos, sendo em um primeiro momento um treino de 3 dias pré estresse de contenção. A cada 12 horas as garrafas foram além de pesadas, alternadas quanto ao lado de disposição. Posteriormente, os animais foram reavaliados no TPS após o terceiro dia de estresse de contenção durante uma hora. O consumo de água e de solução de sacarose foi calculado para cada animal individualmente, com base no volume de fluido remanescente em cada frasco. A preferência a sacarose foi calculada como a porcentagem de solução de sacarose consumida dividido pela quantidade total de líquido consumido. A estrutura do teste pode ser observada na figura 7, abaixo.

Figura 7 - Estrutura do teste de preferência a sacarose no qual é dada a livre escolha entre água e sacarose 2% aos roedores.

5.2.7 Teste de estresse por contenção

O aparato de restrição individual de movimentos consiste em uma placa de acrílico (50 cm de comprimento x 29 cm de largura) onde permanecem fixos um número variado de tubos plásticos (3 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento). Os tubos foram preparados de forma a apresentar duas extremidades fechadas, mas com orifícios que permitem a ventilação e a passagem da cauda do animal (figura 8). Os animais foram submetidos ao estresse agudo em uma única sessão com duração de duas horas durante três dias. Conforme descrito por diferentes autores, esse tempo é capaz de promover uma ativação do eixo HPA, provocando o aumento dos níveis circulantes de corticosterona (LUCAS et al., 2007)(GAGLIANO et al., 2008), além de produzir alterações imunes (THAKER et al., 2006).

Figura 8 - Aparato experimental utilizado para o estresse de contenção.

5.3 Avaliações hormonais, neuroquímicas e imunes

5.3.1 Quantificação dos níveis séricos de corticosterona

A dosagem dos níveis séricos de corticosterona foi realizada por ELISA através de kits comerciais (Arbor Assay, MI, USA). De forma a minimizar o estresse da coleta, os animais dos grupos de alta e baixa imobilidade foram subdivididos em três grupos e tiveram seu sangue coletado em dois momentos distintos: (i) antes, após e 1 hora após o primeiro dia de estresse e, (ii) antes, após e 1 hora após o terceiro dia de estresse de contenção. O sangue foi recolhido em tubos de plástico e centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos. Por fim, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para análise posterior. A placa de ELISA é ilustrada pela figura 9, abaixo.

Figura 9 - Placa de ELISA utilizada nas análises da corticosterona sérica.

5.3.2 Quantificação dos níveis encefálicos de monoaminas e metabólitos (dopamina, noradrenalina e serotonina) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para a realização das dosagens neuroquímicas os camundongos foram submetidos à eutanásia por decapitação. O encéfalo foi retirado do crânio e lavado em solução de cloreto de sódio 0,9% gelada (4° C), sendo, em seguida, dissecado sobre placa de gelo. As amostras encefálicas de interesse (hipotálamo, córtex pré-frontal e mesencéfalo) foram colocadas separadamente em criotubos e estocados em freezer (-80°C). Todo o procedimento foi realizado no período máximo de 3 minutos. Os níveis das monoaminas, dopamina, seus metabólitos, ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC), serotonina e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA), e noradrenalina foram dosadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector eletroquímico. Posteriormente foram calculadas as relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5HT como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA e 5HT, respectivamente. O HPLC usado da análise dos neurotransmissores encontra-se ilustrado abaixo pela figura 10.

Figura 10 - Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado nas análises dos neurotransmissores.

5.3.3 Avaliação das citocinas por PCR em tempo real

As estruturas do hipotálamo, hipocampo e córtex pré-frontal foram coletadas após eutanásia por decapitação e armazenadas em criotubos mantidos em freezer a -80°C para processamento posterior conforme descrito por Sathyanesan e colaboradores (2017). O RNA total foi extraído separadamente das amostras de cérebro usando o kit RNAqueous (Ambion, Waltham, MA) e quantificado usando o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo, Waltham, MA). Com o uso do kit comercial (High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit, Thermo Fisher), foi realizada a reação de RT-PCR para confecção de cDNAs. O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi utilizado para avaliar a expressão dos genes de citocinas nas amostras processadas de cDNA. As reações de qPCR foram preparadas em um volume total de 20 μl , utilizando-se kit SYBR Green (Qiagen, Germantown, MD). Os *primers* das citocinas pró inflamatórias IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, INF- γ e TNF- α foram sintetizados pela Life Technologies. Todas as amostras foram amplificadas em um aparelho de PCR

tempo real - LightCycler, sendo avaliadas em software 3.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). O aparelho de PCR usado da análise das citocinas encontra-se ilustrado abaixo pela figura 11.

Figura 11 - Aparelho de RT-PCR utilizado nas análises das citocinas.

5.4 Delineamento experimental e formação dos grupos

Esse trabalho consistiu na avaliação dos parâmetros comportamentais, neuroquímicos e imunes de camundongos de alta e baixa imobilidade. Para tanto, os camundongos foram submetidos ao estresse inescapável do TSC e após constatação dos tempos de imobilidade dos mesmos, foram divididos nos fenótipos de alta e baixa imobilidade. Concomitante à seleção do comportamento, a vocalização ultrassônica dos animais foi gravada por um microfone com escala centrada em 22 kHz.

Após a seleção do comportamento pelo TSC e antes da realização do estresse por contenção, a preferência por sacarose foi avaliada durante 3 dias. Após esses registros, os animais foram observados quanto a atividade geral, comportamento tipo-ansioso e o *grooming*. Com os parâmetros comportamentais

avaliados sem a presença de estímulos estressores, iniciou-se o protocolo de 3 dias de estresse de contenção de 2 horas.

O sangue foi coletado no primeiro e terceiro dia de estresse para quantificação da corticosterona sérica. Essa coleta foi feita antes, imediatamente depois e uma hora depois do estresse por contenção. No segundo dia após o estresse, a atividade geral, o comportamento tipo-ansioso e o *grooming* foram reavaliados. No terceiro dia, após o estresse, os animais foram submetidos a eutanásia para coleta de estruturas cerebrais e análise dos níveis de neurotransmissores. Parte dos animais foi submetida a eutanásia 1 hora após a realização do estresse, tendo nesse momento tanto o sangue quanto as estruturas cerebrais coletadas para análise. O delineamento experimental do trabalho é descrito na figura 12.

Figura 12 - Cronologia e delineamento experimental dos procedimentos realizados.

5.5 Análise estatística

Para os experimentos com 4 variáveis foi realizada uma ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Sidak, conforme sugerido pelo programa estatístico. Experimentos no qual 2 variáveis foram apresentadas, foi utilizado o teste t de *Student*. Esses procedimentos foram testados para possíveis *outliers* através do método de ROUT. As análises de ANOVA e teste t de *Student* foram realizadas

através do programa de análise estatística *GraphPad Prism 6* (San Diego, Califórnia). Foi realizada uma análise de correlação entre os parâmetros de imobilidade selecionados pelo TSC, os neurotransmissores no CPF, hipotálamo e mesencéfalo, e os diferentes momentos de análise de estresse (antes, depois e 1 hora depois de três dias de estresse de contenção de 2 horas). Essas correlações foram realizadas a partir de uma matriz de correlação de Pearson, apresentando os valores significantes do r de Pearson, assim como através de uma análise de componente principal (ACP), que ilustra a contribuição de cada um dos parâmetros analisados na variância total observada. Para a ACP foram calculados os valores dos *eigenvalues* (valor que reflete a qualidade da projeção da ACP), o percentual de variabilidade (valor de cada eixo da ACP) e o percentual acumulativo (a soma dos valores de cada eixo). A probabilidade de $p \leq 0,05$ foi considerada capaz revelar diferenças estatísticas significantes.

6 RESULTADOS

6.1 Resultados comportamentais

6.1.1 Seleção do comportamento pelo teste de suspensão da cauda

A figura 13 ilustra os resultados do tempo de imobilidade, o número total de paradas e a latência para a primeira imobilidade durante o teste. Animais que apresentavam imobilidade abaixo de 49 segundos foram selecionados para o fenótipo BI e aqueles com imobilidade superior a 60 segundos para o fenótipo AI.

Em relação ao tempo de imobilidade, representado pela figura 13A, o teste *t* de *Student* não pareado apresentou diferenças significantes entre os grupos BI ($37,72 \pm 1,342$; $n=47$) e AI ($78,48 \pm 2,491$; $n=41$; $p < 0.0001$). Diferenças significantes também foram observadas quanto ao número de paradas (fig. 13B), tendo animais BI ($666,1 \pm 19,54$; $n=47$) menor frequência em relação aos AI ($932,1 \pm 19,09$; $n=45$; $p < 0.0001$). Por fim, quanto a latência para primeira imobilidade (fig. 13C), animais BI ($0,7263 \pm 0,09911$; $n=43$) maior tempo em relação aos AI ($0,2624 \pm 0,03691$; $n=37$; $p < 0.0001$).

Figura 13 - Tempo total (A), frequência de paradas (B) e latência para imobilidade (C) de camundongos machos de baixa e alta imobilidade selecionados pelo teste de suspensão da cauda. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste *t* de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A BI $n=47$, AI $n=41$; B BI $n=47$, AI $n=45$; C BI $n=43$, AI $n=37$).

6.1.2 Avaliação da vocalização ultrassônica

A figura 14 ilustra o tempo total, mínimo, máximo e a frequência de vocalizações, assim como o tempo total, mínimo e máximo de períodos de silêncio durante o teste de vocalização ultrassônica realizado concomitantemente com a seleção do comportamento de BI e AI no TSC.

De acordo com o teste *t* de *Student* não pareado, constatou-se que animais de fenótipo BI ($1,905 \pm 0,2945$; $n=18$) apresentam menor tempo total de vocalizações (fig. 14A) em relação aos AI ($5,218 \pm 0,8594$; $n=23$; $p = 0.0011$). Animais BI também apresentam menor frequência ($28,58 \pm 4,211$; $n=19$) de vocalizações (fig. 14D) em relação aos AI ($50,52 \pm 6,734$; $n=23$; $p = 0.0061$). Quanto ao tempo total de silêncio (fig. 14E), animais BI apresentam maior tempo total ($358,1 \pm 0,2945$; $n=18$) em relação ao AI ($354,8 \pm 0,8594$; $n=23$; $p = 0.0011$) e também maior tempo mínimo (fig. 14F; $0,07271 \pm 0,009221$; $n=17$) em relação aos animais AI ($0,0455 \pm 0,0009877$; $n=18$; $p = 0,0024$).

Figura 14 - Tempo total (A), tempo mínimo (B), tempo máximo (C) e frequência de vocalizações (D); tempo total (E), tempo mínimo (F) e tempo máximo de silêncio (G) registrados durante o teste de vocalização ultrassônica realizado durante a seleção comportamental pelo teste de suspensão da cauda. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A BI n=18, AI n=23; B BI n=21, AI n=24; C BI n=17, AI n=14; D BI n=19, AI n=23; E BI n=18, AI n=23; F BI n=17, AI n=18; G BI n=23, AI n=25).

6.1.3 Avaliação da atividade geral em campo aberto

A figura 15 ilustra a atividade geral em campo aberto de camundongos machos de fenótipo BI e AI quanto aos parâmetros de distância percorrida, velocidade média, transição entre as zonas da arena, tempo e frequência na zona central e periférica, tempo e frequência de movimentação, assim como o tempo e frequência de paradas nos períodos pré e pós estresse de contenção.

Quanto aos resultados da distância percorrida, ilustrada pela figura 15A, a ANOVA de duas vias revelou diferenças significantes quanto ao período de exposição ao estresse contenção [$F(1, 41) = 7,299$; $p = 0,01$], não havendo diferenças entre os fenótipos BI e AI [$F(1, 41) = 0,4382$; $p = 0,5117$] ou interação

entre os parâmetros [$F(1, 41) = 0,0006$; $p = 0,9793$]. Quanto à velocidade média, ilustrada pela fig. 15B, a ANOVA de duas vias revelou novamente diferenças significantes entre período de exposição ao estresse de contenção [$F(1, 41) = 6,23$; $p = 0,0167$], não havendo diferenças quanto aos grupos BI e AI [$F(1, 41) = 0,7004$; $p = 0,4075$] ou interação entre os fatores [$F(1, 41) = 0,038$; $p = 0,8457$].

Quanto à frequência de transição entre as zonas da arena, representada pela figura 15C, a ANOVA revelou diferenças significantes entre os momentos de exposição ao estresse [$F(1, 42) = 10,64$; $p = 0,002$], não havendo diferenças entre os grupos BI e AI [$F(1, 42) = 2,262$; $p = 0,9962$] ou interações entre os fatores [$F(1, 42) = 0,4729$; $p = 0,4954$]. O teste *post hoc* Sidak revelou que camundongos BI apresentam menor frequência de transição após a exposição ao estresse ($p < 0,05$). Quanto ao tempo de permanência na zona central da arena, ilustrado pela figura 15D, a ANOVA revelou diferenças significantes entre os momentos de exposição ao estresse [$F(1, 40) = 7,996$; $p = 0,007$], não havendo diferenças entre os grupos BI e AI [$F(1, 40) = 1,932$; $p = 0,1722$] ou interações entre os fatores [$F(1, 40) = 0,179$; $p = 0,6737$]. O teste *post hoc* Sidak revelou que camundongos BI apresentaram maior tempo de permanência na zona central da arena no período pré estresse em relação a camundongos AI no período pós estresse ($p < 0,05$).

Quanto à frequência de entrada na zona central da arena, ilustrada pela figura 15E, a ANOVA revelou diferenças significantes entre os momentos de exposição ao estresse [$F(1, 42) = 10,82$; $p = 0,002$], não havendo diferenças entre os grupos BI e AI [$F(1, 42) = 0,0002$; $p = 0,9884$] ou interações entre os fatores [$F(1, 42) = 0,4158$; $p = 0,5226$].

Quanto ao tempo de permanência na zona periférica da arena, ilustrado pela figura 15F, a ANOVA revelou diferenças significantes entre os momentos de exposição ao estresse [$F(1, 40) = 7,131$; $p = 0,01$], não havendo diferenças entre os grupos BI e AI [$F(1, 40) = 2,334$; $p = 0,1345$] ou interações entre os fatores [$F(1, 40) = 0,082$; $p = 0,7754$]. O teste *post hoc* Sidak revelou que camundongos BI apresentaram menor tempo de permanência na zona periférica da arena no período pré estresse em relação a camundongos AI no período pós estresse ($p < 0,05$).

Quanto à frequência de entrada na zona periférica da arena, ilustrada pela figura 15G, a ANOVA revelou diferenças significantes entre os momentos de exposição ao estresse [$F(1, 42) = 8,573$; $p = 0,005$], não havendo diferenças entre

os grupos BI e AI [$F(1, 42) = 7,194$; $p = 0,9979$] ou interações entre os fatores [$F(1, 42) = 0,6148$; $p = 0,4374$].

O tempo de movimentação (fig. 15H), avaliado pela ANOVA de duas vias, também se mostrou alterado entre os períodos de estresse [$F(1, 42) = 27,62$; $p < 0,0001$]. Não foram observadas, contudo diferenças entre os grupos BI e AI [$F(1, 42) = 0,1365$; $p = 0,7136$] ou interações entre os fatores [$F(1, 42) = 0,061$; $p = 0,8048$]. O teste *post hoc* Sidak revelou diminuição no tempo de movimentação de camundongos BI no período pós estresse em relação ao período pré estresse ($p < 0,01$). Esse mesmo padrão de resposta também foi observado em camundongos AI ($p < 0,01$). Também foram observadas diferenças, embora não biologicamente significantes, entre animais BI pré estresse e AI pós estresse, assim como entre BI pós e AI pré estresse ($p < 0,01$).

Quanto a frequência de movimentação (fig. 15I), a ANOVA de duas vias revelou diferenças entre os períodos de estresse [$F(1, 42) = 22,45$; $p < 0,0001$]. Não foram observadas diferenças entre os grupos BI e AI [$F(1, 42) = 2,048$; $p = 0,1599$] ou interações entre os fatores [$F(1, 42) = 3,168$; $p = 0,0823$]. O teste *post hoc* Sidak revelou aumento na frequência de movimentação entre camundongos AI no período pós em relação ao pré estresse ($p < 0,001$) e entre animais BI pré e AI pós estresse ($p < 0,001$).

A ANOVA de duas vias revelou diferenças no tempo de parada (fig. 15K) entre os períodos de estresse [$F(1, 42) = 27,64$; $p < 0,0001$], sem diferenças entre os grupos BI e AI [$F(1, 42) = 0,1295$; $p = 0,7208$] ou interações entre os fatores [$F(1, 42) = 0,056$; $p = 0,8132$]. O teste *post hoc* Sidak revelou aumento na frequência de movimentação entre camundongos AI no período pós em relação ao pré estresse ($p < 0,01$) e aumento entre animais BI no período pós em relação ao pré estresse ($p < 0,01$). Também foi observada diferença entre animais BI pré e AI pós estresse ($p < 0,01$) e BI pós e AI pré ($p < 0,01$).

Por fim, quanto frequência de parada na arena (fig. 15J), a ANOVA de duas vias revelou diferenças entre os períodos de estresse [$F(1, 42) = 22,52$; $p < 0,0001$], sem diferenças entre os grupos BI e AI [$F(1, 42) = 2,017$; $p = 0,1629$] ou interações entre os fatores [$F(1, 42) = 3,165$; $p = 0,0824$]. O teste *post hoc* Sidak revelou aumento na frequência de movimentação entre camundongos AI no período pós em

relação ao pré estresse ($p < 0,001$) e aumento entre AI pós e BI pré estresse ($p < 0,001$).

Figura 15 - Parâmetros de distância percorrida (A), velocidade média (B), transição entre zonas (C), tempo e frequência na zona central (D, E), tempo e frequência na zona periférica (F, G), tempo e frequência de movimentação (H, I) e tempo e frequência de paradas (J, K) de camundongos machos de comportamento de baixa e alta imobilidade na arena de campo aberto nos períodos pré e pós estresse de contenção. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. ANOVA de duas vias. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A BI pré e pós $n=11$, AI pré $n=11$ e pós $n=12$; B BI pré e pós $n=11$, AI pré $n=11$ e pós $n=12$; C BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; D BI e AI pré e pós $n=11$; E BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; F BI e AI pré e pós $n=11$; G BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; H BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; I BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; J BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$; K BI pré e pós $n=11$, AI pré e pós $n=12$).

6.1.4 Avaliação do comportamento tipo-ansioso na caixa claro/escuro

A figura 16 ilustra o número de cruzamentos, a latência para o primeiro cruzamento, o tempo no compartimento claro e escuro de camundongos machos avaliados na CCE nos períodos pré e pós estresse de contenção.

Quanto a frequência de transição entre as zonas clara e escura ilustrada pela figura 16A, a ANOVA de duas vias revelou diferenças significantes entre o período pré e pós estresse [$F(1, 45) = 34,89$; $p < 0,0001$], não havendo diferenças quanto aos grupos BI e AI [$F(1, 45) = 1,505$; $p = 0,2262$] ou interação entre os fatores [$F(1, 45) = 0,14$; $p = 0,7100$]. O teste *post hoc* Sidak revelou diminuição na frequência de transição entre camundongos BI pós estresse em relação aos camundongos BI pré estresse ($p < 0,01$), diminuição na frequência de transição em camundongos AI pós estresse em relação a AI pré estresse ($p < 0,001$), além de diferenças não biologicamente significantes entre BI pré e AI pós estresse ($p < 0,05$) e BI pós e AI pré estresse ($p < 0,0001$).

Quanto a latência para primeira transição entre as zonas clara e escura ilustrada pela figura 16B, a ANOVA de duas vias revelou diferenças significantes entre o período pré e pós estresse [$F(1, 43) = 53,95$; $p < 0,0001$], não havendo diferenças quanto aos grupos BI e AI [$F(1, 43) = 0,104$; $p = 0,7487$] ou interação entre os fatores [$F(1, 43) = 0,9931$; $p = 0,3246$]. Assim como no parâmetro anterior, o teste *post hoc* Sidak revelou diminuição no tempo de latência para primeira transição em camundongos BI pós estresse em relação a BI pré estresse ($p < 0,001$), diminuição na latência de transição em camundongos AI pós estresse em relação a AI pré estresse ($p < 0,0001$), além de diferenças não biologicamente significantes entre BI pré e AI pós estresse ($p < 0,0001$) e BI pós e AI pré estresse ($p < 0,0001$).

Quanto ao tempo de permanência na zona clara, ilustrada pela figura 16C, a ANOVA de duas vias revelou diferenças significantes entre o período pré e pós estresse [$F(1, 45) = 47,45$; $p < 0,0001$], não havendo diferenças quanto aos grupos BI e AI [$F(1, 45) = 2,244$; $p = 0,1411$] ou interação entre os fatores [$F(1, 45) = 0,002$; $p = 0,9619$]. O teste *post hoc* Sidak revelou diminuição no tempo de permanência na zona clara em camundongos BI pós estresse em relação a BI pré estresse ($p < 0,001$), diminuição também entre camundongos AI pós estresse em

relação a AI pré estresse ($p < 0,0001$), além de diferenças significantes entre BI pré e AI pós estresse ($p < 0,01$) e BI pós e AI pré estresse ($p < 0,0001$).

Por fim, quanto ao tempo de permanência na zona escura (fig. 16D), a ANOVA de duas vias que revelou diferenças significantes entre o período pré e pós estresse [F (1, 46) = 39,12; $p < 0,0001$], não havendo diferenças quanto aos grupos BI e AI [F (1, 46) = 1,163; $p = 0,2864$] ou interação entre os fatores [F (1, 46) = 0,1646; $p = 0,6868$]. O teste *post hoc* Sidak revelou um padrão de resposta invertido quanto a zona clara, sendo o tempo de permanência na zona escura maior em camundongos BI pós estresse em relação a BI pré estresse ($p < 0,01$), aumento também entre camundongos AI pós estresse em relação a AI pré estresse ($p < 0,001$), além de diferenças entre BI pré e AI pós estresse ($p < 0,01$) e BI pós e AI pré estresse ($p < 0,0001$).

Figura 16 - Número de cruzamentos (A), latência para o primeiro cruzamento (B), tempo na arena clara (C) e o tempo na arena escura (D) de camundongos machos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados na caixa claro/escuro nos períodos pré e pós estresse de contenção. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. ANOVA de duas vias. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (Fig. 7A BI pré n=11 e pós n=12, AI pré e pós n=13; B BI pré e pós n=11, AI pré n=13 e pós n=12; C BI pré n=12 e pós n=11, AI pré e pós n=13; D BI pré e pós n=12, AI pré e pós n=13).

6.1.5 Avaliação da expressão de *grooming* no *splash test*

A figura 17 ilustra a frequência, a latência e o tempo total de *grooming* realizado por camundongos machos no período pré e pós estresse de contenção de duas horas em dois ambientes distintos: um ambiente novo (gaiola), e na própria caixa moradia.

Quanto aos resultados do *grooming* analisados na caixa moradia, referente ao tempo total, ilustrada pela figura 17F, a ANOVA de duas vias revelou interação entre os momentos de estresse e o fenótipo de BI e AI [$F(1, 40) = 9,612$; $p = 0,0035$]. Foi observado diferenças entre o período pré e pós estresse [$F(1, 40) = 87,93$; $p < 0,0001$], sem diferenças entre os grupos BI e AI [$F(1, 406) = 5,833$; $p = 0,4495$]. O teste *post hoc* Sidak revelou aumento no tempo de *grooming* em camundongos BI pós estresse em relação a BI pré estresse ($p < 0,0001$), aumento também entre camundongos AI pós estresse em relação a AI pré estresse ($p < 0,001$). Contudo, diferente dos outros testes de comportamento, observou-se um efeito do estresse sobre os fenótipos, tendo camundongos AI apresentado menor tempo de *grooming* após o estresse em relação ao BI ($p < 0,05$).

Quanto a latência, representado pela figura 17E, ANOVA revelou interação entre os períodos de estresse e os fenótipos BI e AI [$F(1, 41) = 4,329$; $p = 0,0437$], além de diferenças entre o período pré e pós estresse [$F(1, 41) = 39,80$; $p < 0,0001$]. Não foram observadas diferenças entre os grupos BI e AI [$F(1, 41) = 1,653$; $p = 0,2058$]. O teste *post hoc* Sidak revelou diminuição na latência para o *grooming* em camundongos com BI pós estresse em relação a BI pré estresse ($p < 0,0001$), diminuição entre camundongos AI pós estresse em relação a AI pré estresse ($p < 0,05$).

Quanto a frequência de *grooming* na caixa moradia, a ANOVA de duas vias revelou diferenças significantes (fig. 17D) entre o período pré e pós estresse [$F(1, 42) = 54,29$; $p < 0,0001$] e entre os fenótipos BI e AI [$F(1, 42) = 4,189$; $p = 0,0471$]. Não houve interações entre esses fatores [$F(1, 42) = 0,5230$; $p = 0,4736$]. O teste *post hoc* Sidak revelou aumento na frequência de *grooming* em camundongos BI pós estresse em relação a BI pré estresse ($p < 0,001$), aumento também entre camundongos AI pós estresse em relação a AI pré estresse ($p < 0,0001$) e

diferenças significantes entre BI pré e AI pós estresse ($p < 0,0001$) e BI pós e AI pré estresse ($p < 0,01$).

Referente aos resultados de *grooming* no ambiente novo (fig. 17A), a ANOVA de duas vias revelou diferenças quanto ao tempo total entre o período pré e pós estresse [$F(1, 44) = 64,46$; $p < 0,0001$] e entre os grupos BI e AI [$F(1, 44) = 4,993$; $p = 0,0306$], não havendo interações entre os fatores [$F(1, 44) = 3,176$; $p = 0,0816$]. O teste *post hoc* Sidak revelou um aumento no tempo de *grooming* em camundongos BI pós estresse em relação a BI pré estresse ($p < 0,001$), aumento entre camundongos AI pós estresse em relação a AI pré estresse ($p < 0,001$). Também observado um efeito do estresse sobre os fenótipos, tendo camundongos AI apresentado maior tempo de *grooming* após o estresse em relação ao BI ($p < 0,05$).

Quanto a latência de *grooming*, ilustrada pela figura 17B, a ANOVA de duas vias revelou diferenças somente entre o período pré e pós estresse [$F(1, 44) = 7,014$; $p = 0,0112$], não havendo diferenças entre os fenótipos BI e AI [$F(1, 44) = 0,002$; $p = 0,9601$] ou interação entre os fatores [$F(1, 44) = 0,011$; $p = 0,9153$].

A frequência de *grooming* no ambiente novo (fig. 17F), diferente dos parâmetros observados anteriormente, revelou interação entre os fenótipos e o período de estresse [$F(1, 45) = 4,143$; $p = 0,0477$], entre os fenótipos BI e AI [$F(1, 45) = 8,568$; $p = 0,0053$] e diferenças entre os períodos de estresse [$F(1, 45) = 71,96$; $p < 0,0001$]. O teste *post hoc* Sidak revelou aumento na frequência de *grooming* em camundongos BI pós estresse em relação a BI pré estresse ($p < 0,001$), aumento entre camundongos AI pós estresse em relação a AI pré estresse ($p < 0,0001$). O efeito do estresse sobre o fenótipo foi mais uma vez presente, tendo camundongos AI apresentado maior frequência de *grooming* após o estresse em relação ao BI ($p < 0,01$).

Figura 17 - Tempo total (A), latência (B) e frequência (C) de *grooming* na caixa moradia e tempo total (D), latência (E) e frequência (F) de *grooming* no ambiente novo (gaiola) de camundongos machos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados no *splash test* nos períodos pré e pós estresse de contenção de duas horas. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. ANOVA de duas vias. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (Fig. 16A BI pré n=11 e pós n=10, AI pré n=11 e pós n=12; B BI pré e pós n=11, AI pré n=11 e pós n=12; C BI pré e pós n=11, AI pré e pós n=12; D BI pré n=12 e pós n=11, AI pré n=13 e pós n=12; E BI pré n=10 e pós n=12, AI pré e pós n=13; F BI pré n=12 e pós n=11, AI pré e pós n=13).

6.1.6 Avaliação da preferência entre sacarose e água

A figura 18 ilustra as diferenças no percentual de consumo entre água e sacarose durante os períodos pré e pós estresse de contenção de duas horas durante três dias.

A ANOVA de duas vias revelou diferenças significantes somente quanto ao período de estresse [$F(3, 122) = 151,3$; $p = 0,0001$]. Não foram observadas diferenças quanto aos fenótipos BI e AI [$F(1, 122) = 2,570$; $p = 0,111$] ou interações

entre esses fatores [$F(3, 122) = 1,655$; $p = 0,1803$]. O teste *post hoc* Sidak revelou que o consumo de água e sacarose nos animais BI pós estresse foi maior que os BI pré estresse ($p < 0,0001$). Esse resultado se repetiu nos animais AI tanto para o consumo de água quanto para o de sacarose ($p < 0,0001$). Além disso, também se observou um efeito pós estresse sobre o consumo de água e sacarose em animais AI, tendo esse menor consumo de sacarose em relação a água ($p < 0,01$). Tal efeito não ocorreu nos animais de fenótipo BI.

Figura 18 - Percentual de consumo de água e sacarose de camundongos machos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados pré e pós estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. ANOVA de suas vias. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (BI água e sacarose pré $n = 23$ e pós $n=9$, AI água e sacarose pré $n=25$ e pós $n=9$).

6.2 Resultados hormonais, neuroquímicos e imunes

6.2.1 Concentração dos níveis séricos de corticosterona no primeiro e terceiro dia pré e pós estresse de contenção de duas horas

A figura 19 ilustra as concentrações de corticosterona sérica dos camundongos de comportamento BI e AI selecionados pelo TSC. Os camundongos de ambos os grupos foram subdivididos em três grupos de tal forma que cada grupo

tivesse o sangue coletado somente uma vez no dia. Essa subdivisão foi realizada de forma a minimizar o estresse da coleta de sangue. O teste t de *Student* não pareado revelou que camundongos AI ($96,97 \pm 10,38$; $n=9$) apresentaram maior concentração de corticosterona na coleta do primeiro dia, 1 hora após o estresse em relação a camundongos BI ($52,08 \pm 10,09$; $n=7$; $p=0,008$). No terceiro dia de coleta, os camundongos de fenótipo AI (antes: $137,4 \pm 36,61$ $n=8$; depois: $280,7 \pm 23,61$ $n=8$; 1 hora depois: $46,85 \pm 4,417$ $n=7$) apresentaram maior concentração de corticosterona em todos os momentos de análise em relação aos camundongos BI (antes: $27,43 \pm 6,817$ $n=8$, $p=0,019$; depois: $211,5 \pm 21,37$ $n=8$, $p=0,047$; 1 hora depois: $28,84 \pm 2,557$ $n=6$, $p=0,006$).

Figura 19 - Corticosterona sérica coletada em diferentes momentos no primeiro e terceiro dia de estresse de contenção de duas horas. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$. Os animais de comportamento BI e AI foram divididos em três grupos de forma a minimizar o estresse da coleta de sangue.

6.2.2 Concentração dos níveis de serotonina, de seu metabólito e turnover no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo de camundongos avaliados antes, depois e uma hora depois do estresse de contenção de duas horas durante três dias

A figura 20 ilustra os níveis de serotonina, de seu metabólito e *turnover* no córtex pré-frontal de camundongos avaliados sem a presença do estresse,

imediatamente após o estresse e uma hora após o estresse por contenção de duas horas por 3 dias. Quanto a 5HT, não foram observadas diferenças entre os comportamentos sem o estresse, contudo, após o estresse, camundongos AI ($605,5 \pm 61,95$, $n=8$) apresentaram menor concentração de 5HT em relação aos BI ($772,1 \pm 171,2$, $n=8$, $p = 0,1923$). Não foram observadas diferenças nesses parâmetros uma hora após o estresse. O mesmo padrão de respostas entre os fenótipos foi observado quanto ao metabolito 5HIAA (fig. 20B), tendo novamente animais AI ($576,8 \pm 44,08$, $n=16$) menor concentração após o estresse em relação aos BI ($812,6 \pm 28,47$, $n=16$, $p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças quanto ao *turnover* serotoninérgico no córtex pré-frontal.

Figura 20 - Concentração de serotonina, metabolito e taxa de renovação (*turnover*) no córtex pré-frontal de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B e C sem estresse $n=8$; A e C após estresse $n=16$, B após estresse BI $n=12$ e AI $n=15$; A, B e C 1h após estresse BI $n=7$ e AI $n=9$).

A figura 21 ilustra os níveis de serotonina, de seu metabólito e *turnover* no hipotálamo de camundongos avaliados sem a presença do estresse, imediatamente após o estresse e uma hora após o estresse por contenção de duas horas por 3 dias. Quanto a 5HT, foram observadas diferenças após o estresse, tendo camundongos AI ($1679 \pm 72,65$ n=15) menor concentração de 5HT em relação aos BI ($2435 \pm 136,3$ n=12, $p < 0,0001$). Essas diferenças também foram observadas uma hora após o estresse nos camundongos AI ($1450 \pm 199,6$ n=8) em relação aos BI ($2258 \pm 47,52$ n=6, $p = 0,0023$). Não foram observadas diferenças sem a presença do estresse.

Quanto ao metabólito 5HIAA (fig. 21B), foi observado o mesmo padrão de respostas obtido no CPF entre os fenótipos, tendo animais AI ($1108 \pm 60,87$ n=15) menor concentração após o estresse em relação aos BI ($1433 \pm 66,09$ n=12, $p = 0,0007$). O *turnover* serotoninérgico no hipotálamo também se revelou alterado após o estresse, tendo camundongos AI ($0,6581 \pm 0,01943$ n=15) maior taxa de renovação que os BI ($0,5718 \pm 0,02848$ n=12, $p = 0,008$).

Figura 21 - Concentração de serotonina, metabolito e taxa de renovação (*turnover*) no hipotálamo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B e C sem estresse n=8; A, B e C após estresse BI n=12 e AI n=15; A, B e C 1h após estresse BI n=6 e AI n=8).

A figura 22 ilustra a os níveis de serotonina, de seu metabólito e *turnover* no mesencéfalo de camundongos avaliados sem a presença do estresse, imediatamente após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por 3 dias. Quanto a 5HT (fig. 22A), foram observadas diferenças após o estresse, tendo camundongos AI ($2716 \pm 67,97$ n=15) menor concentração de 5HT em relação aos BI ($4986 \pm 117,8$ n=16, $p < 0,0001$). Essas diferenças também foram observadas uma hora após o estresse nos camundongos AI ($2475 \pm 40,09$ n=9) em relação aos BI ($4165 \pm 581,1$ n=7, $p = 0,0135$). Não foram observadas diferenças sem a presença do estresse.

Quanto ao metabólito 5HIAA (fig. 22B), foi observado o mesmo padrão de respostas obtido no CPF e hipotálamo entre os fenótipos, tendo animais AI ($1965 \pm 41,75$ n=15) menor concentração após o estresse em relação aos BI ($2372 \pm 87,68$ n=16, $p = 0,0002$). O *turnover* serotoninérgico no mesencéfalo também se revelou alterado após o estresse, tendo camundongos AI ($0,7257 \pm 0,01253$ n=15) maior taxa de renovação que os BI ($0,4743 \pm 0,01235$ n=16, $p < 0,0001$), bem como uma hora após o estresse, tendo novamente camundongos AI ($0,5829 \pm 0,03930$ n=9) maior taxa de renovação que os BI ($0,3313 \pm 0,03040$ n=7, $p = 0,0001$)

Figura 22 - Concentração de serotonina, metabólito e taxa de renovação (*turnover*) no mesencéfalo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B e C sem estresse n=8; A, B e C após estresse BI n=16 e AI n=15; A, B e C 1h após estresse BI n=7 e AI n=9).

6.2.3 Níveis de dopamina, metabólitos e *turnover* no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo de camundongos avaliados antes, depois e uma hora depois do estresse de contenção de duas horas durante três dias

A figura 23 ilustra os níveis de DA, de seus metabólitos e *turnover* no CPF de camundongos avaliados sem a presença do estresse, imediatamente após o estresse e uma hora após o estresse por contenção de duas horas por 3 dias. Foi observada diferença nos níveis da DA somente 1 hora após o estresse (fig. 23A), tendo camundongos AI ($27,00 \pm 5,288$ n=8) apresentado maior concentração em relação aos BI ($12,67 \pm 2,848$ n=6, $p = 0,0186$). Não foram observadas diferenças quanto ao metabólito DOPAC (fig. 23B) em nenhum momento de observação, contudo, a taxa de renovação de DOPAC/DA (fig. 23C) se revelou alterada após o estresse, tendo camundongos AI ($0,2485 \pm 0,04840$ n=16) menor *turnover* em relação aos BI ($0,6048 \pm 0,08966$ n=16, $p = 0,001$) e, uma hora após o estresse, com camundongos AI ($0,3649 \pm 0,1115$ n=9) apresentando menor *turnover* em relação aos BI ($0,7669 \pm 0,1684$ n=7, $p = 0,0289$). Não foram observadas diferenças sem a presença do estresse.

Quanto ao metabólito HVA (fig. 23D), foi observada menor concentração nos animais AI ($101,6 \pm 6,636$ n=16) após o estresse em relação aos BI ($155,8 \pm 5,721$ n=16, $p < 0,0001$), não havendo diferença uma hora após o estresse ou sem a presença de estresse. O *turnover* de HVA/DA (fig. 23E) também se revelou alterado após o estresse, tendo camundongos AI ($3,969 \pm 0,7694$ n=16) menor taxa de renovação que os BI ($7,591 \pm 1,291$ n=16, $p = 0,0111$), bem como uma hora após o estresse, tendo novamente camundongos AI ($4,656 \pm 0,9174$ n=9) menor taxa de renovação que os BI ($9,488 \pm 2,275$ n=7, $p = 0,0423$). Não foram observadas diferenças sem a presença do estresse.

Figura 23 - Concentração de dopamina, metabólitos e taxa de renovação (*turnover*) no córtex pré-frontal de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. no teste t de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B, C, D e E sem estresse n=8; B, C, D e E após estresse n=16, A após estresse BI n=14 e AI n=15; B, C, D e E 1h após estresse BI n=7 e AI n=9, A 1h após estresse BI n=6 e AI n=8).

A figura 24 ilustra os níveis de DA, de seus metabólitos e *turnover* no hipotálamo de camundongos avaliados sem a presença do estresse, imediatamente após o estresse e uma hora após o estresse por contenção de duas horas por 3 dias. Foi observada diferença nos níveis de DA somente sem a presença do estresse, tendo os camundongos AI ($313,9 \pm 29,35$ n=8) menor concentração em relação aos BI ($405,2 \pm 39,48$ n=8, $p = 0,0432$). Não foram observadas diferenças quanto ao metabólito DOPAC em nenhum momento de observação, contudo, a taxa

de renovação de DOPAC/DA se revelou alterada sem o estresse, tendo camundongos AI ($0,3750 \pm 0,04910$ n=8) maior *turnover* em relação aos BI ($0,2210 \pm 0,02667$ N=8, $p = 0,007$). Não foram observadas diferenças após o estresse ou uma hora depois.

Quanto ao metabólito HVA, foi observada menor concentração nos animais AI ($205,0 \pm 17,04$ n=15) após o estresse em relação aos BI ($319,6 \pm 17,86$ n=12, $p < 0,0001$), não havendo diferença uma hora após o estresse ou sem a presença de estresse. O *turnover* de HVA/DA também se revelou alterado após o estresse, tendo camundongos AI ($0,6925 \pm 0,07056$ n=15) menor taxa de renovação que os BI ($0,9978 \pm 0,07624$ n=12, $p = 0,0036$). Não foram observadas diferenças sem a presença do estresse ou uma hora após o estresse quanto a taxa de renovação de HVA.

Figura 24 - Concentração de dopamina, metabólitos e taxa de renovação (*turnover*) no hipotálamo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B, C, D e E sem estresse n=8; A, B, C, D e E após estresse BI n=12 e AI n=15; A, B, C, D e E 1h após estresse BI n=6 e AI n=8).

A figura 25 ilustra os níveis de DA no mesencéfalo de camundongos avaliados sem a presença do estresse, imediatamente após o estresse e uma hora após o estresse por contenção de duas horas por 3 dias. Foi observada diferença nos níveis de DA após o estresse, com camundongos AI ($350,4 \pm 16,34$ n=15) menor concentração em relação aos BI ($418,8 \pm 20,45$ n=16, $p = 0,0074$) e, uma hora após o estresse, novamente nos camundongos AI ($336,9 \pm 11,50$ n=9) apresentando menor concentração de DA em relação aos BI ($430,7 \pm 13,16$ n=7, $p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças quanto ao metabólito DOPAC em nenhum momento de observação, contudo, a taxa de renovação de DOPAC/DA se revelou alterada após o estresse, com camundongos AI ($0,2050 \pm 0,009728$ n=15) apresentando maior *turnover* em relação aos BI ($0,1646 \pm 0,005884$ n=16, $p = 0,0006$) e, uma hora após o estresse, com camundongos AI ($0,1634 \pm 0,005009$ n=9) apresentando maior *turnover* em relação aos BI ($0,1394 \pm 0,003205$ n=7, $p = 0,0010$). Não foram observadas diferenças sem a presença do estresse.

Quanto ao metabólito HVA, foi observada menor concentração nos animais AI ($109,3 \pm 7,689$ n=15) após o estresse em relação aos BI ($170,0 \pm 8,357$ n=15, $p < 0,0001$), bem como menor concentração de HVA nos animais AI ($78,00 \pm 5,121$ n=9) 1 hora após o estresse em relação aos BI ($102,1 \pm 7,330$ n=7, $p < 0,0073$). Não houve diferenças sem a presença de estresse e não foram observadas diferenças quanto ao *turnover* de HVA/DA.

Figura 25 - Concentração de dopamina, metabólitos e taxa de renovação (*turnover*) no mesencéfalo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B, C, D e E sem estresse n=8; A, B, C e E após estresse BI n=16 e AI n=15, D após estresse n=15; A, B, C, D e E 1h após estresse BI n=7 e AI n=9).

6.2.4 Concentração dos níveis de noradrenalina no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo de camundongos avaliados antes, depois e uma hora depois do estresse de contenção de duas horas durante três dias

A figura 26 ilustra os níveis de noradrenalina no CPF, hipotálamo e mesencéfalo de camundongos avaliados sem a presença do estresse, imediatamente após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por 3 dias. Quanto ao CPF, foi observado diferença de NA após o estresse, em camundongos AI ($148,3 \pm 9,180$ n=16) apresentando menor concentração em relação aos BI ($325,8 \pm 13,32$ N=16, $p < 0,0001$). Quanto ao hipotálamo, o mesmo

padrão foi observado, tendo camundongos AI ($1306 \pm 43,98$ $n=15$) menor concentração de NA em relação aos BI ($1575 \pm 52,35$ $n=12$, $p = 0,0003$). No mesencéfalo, foi observada diferenças após o estresse, novamente com camundongos AI ($1104 \pm 49,89$ $n=15$) apresentando menor concentração de NA em relação aos BI ($1568 \pm 65,36$ $n=16$, $p < 0,0001$) e, por fim, também foi observado diferenças uma hora após o estresse, com camundongos AI ($1086 \pm 35,43$ $n=9$) apresentando menor concentração em relação aos BI ($1638 \pm 47,06$ $n=7$, $p < 0,0001$).

Figura 26 - Concentração de dopamina, metabólitos e taxa de renovação (*turnover*) no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse, após o estresse e uma hora após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste *t* de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A, B e C sem estresse $n=8$; A após estresse $n=16$, B após estresse BI $n=12$ e AI $n=15$, C após estresse BI $n=16$ e AI $n=15$; A e C 1h após estresse BI $n=7$ e AI $n=9$, D 1h após estresse BI $n=6$ e AI $n=8$).

6.2.5 Concentração dos níveis de citocinas no córtex pré-frontal e hipotálamo de camundongos avaliados antes e depois do estresse por contenção de duas horas durante três dias

A figura 27 ilustra a expressão relativa das interleucinas (IL) 1 β , 6, 12 e de fator de necrose tumoral (TNF) α no CPF de camundongos avaliados sem a presença do estresse e imediatamente após o estresse de contenção de duas horas por 3 dias. Quanto a expressão relativa de IL-1 β , é possível observar através da análise monocaudal do teste t de *Student* que camundongos AI ($0,00198 \pm 0,0001155$ n=3) sem estresse apresentam menor expressão em relação aos BI ($0,005553 \pm 0,0009551$ n=6, p=0,0065). Esse padrão se repete após o estresse, tendo camundongos AI ($0,000735 \pm 1,936e-005$ n=4) menor expressão em relação aos BI ($0,02692 \pm 0,006189$ n=4, p=0,0121). Quanto a expressão de IL-6, é possível observar diferenças significantes somente após o estresse, tendo camundongos AI ($0,004163 \pm 0,001297$ n=3) menor expressão em relação ao BI ($0,04490 \pm 0,008161$ n=3, p=0,0175). A expressão de TNF- α também se revelou alterada após o estresse, tendo os animais do grupo AI ($0,3530 \pm 0,2034$ n=3) menor expressão que os BI ($2,178 \pm 0,6238$ n=5, p=0,037). Não foram observadas diferenças quanto a expressão de IL-12.

Figura 27 - Expressão relativa de IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α no córtex pré-frontal de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse e após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A sem estresse BI n=6 e AI n=3, B sem estresse n=3, C sem estresse BI=7 e AI n=5, D sem estresse BI n=6 e AI n=4; A após estresse n=4, B sem estresse n=3, C sem estresse n=5, D sem estresse BI n=5 e AI n=3).

A figura 28 ilustra a expressão relativa das interleucinas (IL) 1 β , 2, 6, 12 e de Interferon (IFN) γ e fator de necrose tumoral (TNF) α no hipotálamo de camundongos avaliados sem a presença do estresse e imediatamente após o estresse de contenção de duas horas por 3 dias. Não foram observadas diferenças sem a presença do estresse em nenhuma das citocinas analisadas, contudo, quanto a expressão relativa de IL-1 β , foi possível observar através da análise monocaudal do teste t de *Student* que camundongos AI ($0,01166 \pm 0,001216$ n=3) após a exposição ao estresse apresentavam menor expressão em relação aos BI ($0,3450 \pm 0,1134$ n=3, $p=0,0494$). Também foi observada diferença após o estresse na expressão de IFN- γ , tendo camundongos AI ($0,3916 \pm 0,09528$ n=5) menor expressão comparado aos do grupo BI ($3,728 \pm 0,9713$ n=4, $p=0,203$). A expressão

de TNF- α também se revelou alterada, contudo, diferente dos resultados anteriores, camundongos AI ($0,9612 \pm 0,4273$ n=5) apresentaram maior expressão da citocina após a exposição ao estresse em relação ao BI ($0,00452 \pm 4,619e-005$ n=3, $p=0,044$). Não foram observadas diferenças nas citocinas IL-2, IL-6 e IL-12.

Figura 28 – Expressão relativa de IL- β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α no hipotálamo de camundongos de comportamento de baixa e alta imobilidade avaliados sem estresse e após o estresse de contenção de duas horas por três dias. Os resultados são expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste t de *Student* monocaudal não pareado. Considera-se significativo quando $p \leq 0,05$ (A sem estresse BI n=5 e AI n=3, B sem estresse BI n=4 e AI n=3, C sem estresse BI=7 e AI n=4, D sem estresse BI n=7 e AI n=5, E sem estresse BI n=7 e AI n=5, F sem estresse BI n=4 e AI n=5; A após estresse n=3, B após estresse BI n=5 e AI n=3, C após estresse BI=3 e AI n=4, D após estresse n=4, E após estresse BI n=4 e AI n=5, F após estresse BI n=3 e AI n=5).

6.3 Análise de correlação por componente principal entre parâmetros comportamentais de imobilidade, neurotransmissores e citocinas no encéfalo

6.3.1 Análise de componente principal entre comportamento e neurotransmissores no córtex pré-frontal

Antes da análise por componentes principais (ACP), foi realizada uma matriz de correlação de Pearson, de forma a ilustrar as correlações significantes entre neurotransmissores do CPF e parâmetros comportamentais de imobilidade avaliados pelo TSC. Assim, é possível observar na tabela 1 correlações positivas entre latência e DA ($p=0,007$), latência e DOPAC ($p=0,027$), frequência e tempo ($p<0,0001$), 5HT e 5HIAA ($p<0,0001$), 5HT e HVA ($p<0,0001$), 5HT e *turnover* de HVA ($p=0,002$), 5HT e NA ($p<0,0001$), 5HIAA e *turnover* serotoninérgico ($p=0,01$), 5HIAA e HVA ($p<0,0001$), 5HIAA e NA ($p<0,0001$), HVA e seu respectivo *turnover* ($p<0,0001$) e HVA e NA ($p<0,0001$). Além dessas correlações, também é possível observar correlações negativas entre frequência e o *turnover* de DOPAC ($p=0,02$), tempo e 5HT ($p=0,01$), 5HT e *turnover* serotoninérgico ($p=0,004$), 5HT e DOPAC ($p=0,008$), 5HT e *turnover* de DOPAC ($p=0,014$), 5HIAA e DOPAC ($p=0,03$), 5HIAA e *turnover* de DOPAC ($p=0,02$), *turnover* serotoninérgico e de HVA ($p=0,01$), DA e *turnover* de HVA ($p=0,0001$), DOPAC e HVA ($p<0,0001$), DOPAC e *turnover* de HVA ($p=0,0003$), DOPAC e NA ($p=0,03$) e entre *turnover* de DOPAC e HVA ($p=0,0003$).

Após a matriz de correlação de Pearson, foram realizadas as primeiras análises da ACP. Essa análise teve como foco os parâmetros comportamentais de imobilidade avaliados pelo TSC, a neurotransmissão do CPF e os diferentes momentos de avaliação do estresse (antes, depois e 1 hora depois de três dias de estresse de contenção de 2 horas). Ela teve por objetivo identificar quais são os componentes que possuíam maior variância dentro da matriz de dados. Nesse caso, os resultados apresentados nos eixos F1 e F2 da tabela 2 explicam 49,2% da variância total observada. Para essa ACP, foram analisados os *eigenvalues* (valor que reflete a qualidade da projeção da ACP), o percentual de variabilidade (valor de cada eixo) e o percentual acumulativo (a soma dos eixos). Assim, conforme descrito na tabela 2, o eixo F1 da ACP apresentou um *eigenvalue* de 3,86 representando 32,2% da variância total observada. Em seguida, temos o eixo F2 com o eixo F2 com um

eigenvalue de 2,03 representando 16,9% da variância total.

Tabela 1 - Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos *turnovers* no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Variáveis	Lat	Fre	Tem	5HT	5HIAA	5HT / 5HIAA	DA	DOPAC	DA / DOPAC	HVA	DA / HVA	NA
Lat	1	-0,169	-0,163	0,025	-0,013	-0,099	0,333	0,277	-0,075	-0,005	0,061	0,079
Fre	-0,169	1	0,618	-0,147	-0,070	0,115	-0,005	-0,229	-0,276	0,138	-0,144	-0,184
Tem	-0,163	0,618	1	-0,304	-0,218	0,097	-0,017	0,002	-0,119	-0,111	-0,231	-0,269
5HT	0,025	-0,147	-0,304	1	0,726	-0,359	-0,137	-0,328	-0,305	0,695	0,372	0,746
5HIAA	-0,013	-0,070	-0,218	0,726	1	0,322	0,013	-0,265	-0,290	0,618	0,168	0,612
5HT / 5HIAA	-0,099	0,115	0,097	-0,359	0,322	1	0,172	0,093	0,132	-0,161	-0,296	-0,206
DA	0,333	-0,005	-0,017	-0,137	0,013	0,172	1	0,594	-0,168	-0,154	-0,450	-0,200
DOPAC	0,277	-0,229	0,002	-0,328	-0,265	0,093	0,594	1	0,210	-0,565	-0,436	-0,268
DA / DOPAC	-0,075	-0,276	-0,119	-0,305	-0,290	0,132	-0,168	0,210	1	-0,437	-0,038	-0,239
HVA	-0,005	0,138	-0,111	0,695	0,618	-0,161	-0,154	-0,565	-0,437	1	0,518	0,618
DA / HVA	0,061	-0,144	-0,231	0,372	0,168	-0,296	-0,450	-0,436	-0,038	0,518	1	0,318
NA	0,079	-0,184	-0,269	0,746	0,612	-0,206	-0,200	-0,268	-0,239	0,618	0,318	1

Valores em negrito são diferentes de 0 com nível de significância de 0,05 (Lat – latência, fre – frequência, tem – tempo, 5HT – serotonina, 5HIAA - ácido 5-hidroindol 3-acético, DA – dopamina, DOPAC - ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA - ácido homovanílico, NA - noradrenalina)

Também foram analisados os respectivos percentuais de contribuição de cada uma das variáveis analisadas (tabela 3), bem como dos comportamentos nos diferentes momentos de estresse (tabela 4) nos eixos F1 e F2. É possível notar na tabela 3 que os neurotransmissores 5HT (19,8%), 5HIAA (12,8%), DOPAC (9,6%), HVA (19,5%), *turnover* de HVA (9,6%) e NA (16,6%) possuem uma maior participação na variância total observada no eixo F1. No eixo F2, os parâmetros comportamentais de latência (13,8%), frequência (30%) e tempo total de imobilidade (24%), além do metabólito DOPAC (14,6%) possuem uma participação mais marcante.

Tabela 2 - Valores do *eigenvalue*, percentual de variabilidade e percentual acumulativo da análise de componente principal dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos *turnovers* no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Variáveis	F1	F2
<i>Eigenvalue</i>	3,869	2,037
Variabilidade (%)	32,240	16,973
Acumulativo (%)	32,240	49,213

É possível notar na tabela 4 que os parâmetros de baixa imobilidade sem estresse (24,9%), alta imobilidade sem estresse (21,4%) e baixa imobilidade após estresse (41,7%) apresentam maior participação na variabilidade do que os parâmetros de alta imobilidade após estresse (4,5%), baixa imobilidade 1h após estresse (6,7%) e alta imobilidade 1h após estresse (0,5%) no eixo F1. No eixo F2, os parâmetros de baixa imobilidade sem estresse (37,3%), alta imobilidade após estresse (28,7%) e alta imobilidade 1h após estresse (14,6%) apresentam maior participação na variabilidade do que os parâmetros alta imobilidade sem estresse (6,8%), baixa imobilidade após estresse (8,1%) e baixa imobilidade 1h após estresse (4,1%).

Tabela 3 - Percentual de contribuição dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a expressão de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos *turnovers* no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Eixos	Parâmetros											
	Lat	Fre	Tem	5HT	5HIAA	5HT / 5HIAA	DA	DOPAC	DA / DOPAC	HVA	DA / HVA	NA
F1	0,010	0,227	2,563	19,862	12,852	1,925	3,308	9,612	3,832	19,500	9,697	16,612
F2	13,865	30,069	24,043	1,699	0,742	0,406	8,816	14,698	2,218	1,269	0,044	2,130

Lat – latência, fre – frequência, tem – tempo, 5HT – serotonina, 5HIAA – ácido 5-hidroindol 3-acético, DA – dopamina, DOPAC – ácido 4,4-dihidroxifenilacético, HVA – ácido homovanílico, NA – noradrenalina

Tabela 4 - Percentual de contribuição dos comportamentos de baixa e alta imobilidade no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Eixos	Parâmetros					
	Baixa imobilidade sem estresse	Alta imobilidade sem estresse	Baixa imobilidade após estresse	Alta imobilidade após estresse	Baixa imobilidade 1h após estresse	Alta imobilidade 1h após estresse
F1	24,953	21,479	41,719	4,554	6,716	0,576
F2	37,382	6,897	8,150	28,722	4,199	14,646

Por fim, foi realizada a distribuição gráfica (fig. 28) dos componentes principais 1 e 2 (eixos F1 e F2) de todos os elementos analisados no CPF de forma a ilustrar os parâmetros de imobilidade, neuroquímicos e de estresse em seus diferentes momentos. Esse resultado faz parte de uma análise exploratória na qual é possível observar diferentes *clusters* em que os comportamentos em seus diferentes momentos de estresse se localizam e como os diferentes parâmetros observados se correlacionam. Assim, é possível observar inicialmente uma distribuição distinta entre baixa imobilidade após estresse e alta imobilidade após estresse. Ainda, vemos que o metabólito HVA e respectivo *turnover*, assim como 5HT, 5HIAA e NA possuem grande correlação com o comportamento de baixa imobilidade após estresse. Esses mesmos neurotransmissores também se correlacionam com os animais de baixa imobilidade avaliados 1 hora após o estresse. Por outro lado, vemos os parâmetros comportamentais de tempo e frequência se correlacionando

de forma mais marcante aos animais de alta imobilidade após estresse e alta imobilidade avaliados 1 hora após o estresse. Os animais de baixa e alta imobilidade sem estresse, diferente dos outros parâmetros, está distribuído de forma mais heterogênea nos eixos F1 e F2. Animais de alta imobilidade sem estresse se correlacionam mais com o *turnover* serotoninérgico, enquanto os animais de baixa imobilidade sem estresse com a expressão dopaminérgica, tendo DA, DOPAC e respectivo *turnover* uma maior correlação.

Figura 29 - Projeção correlacional nos eixos F1 e F2 dos comportamentos de baixa e alta imobilidade referentes aos neurotransmissores e o córtex pré-frontal avaliados no teste de suspensão da cauda e analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

6.3.2 Análise de componente principal entre comportamento e neurotransmissores no hipotálamo

Como no CPF, também foi realizada inicialmente uma matriz de correlação de Pearson, de forma a ilustrar as correlações significantes entre os parâmetros de imobilidade e a neurotransmissão no hipotálamo. É possível observar na tabela 5

correlações positivas entre frequência e tempo ($p < 0,0001$), 5HT e 5HIAA ($p < 0,0001$), 5HT e HVA ($p < 0,0001$), 5HT e *turnover* de HVA ($p < 0,0001$), 5HT e NA ($p < 0,0001$), 5HIAA e HVA ($p < 0,0001$), 5HIAA e *turnover* de HVA ($p < 0,0001$), 5HIAA e NA ($p < 0,0001$), DOPAC e seu respectivo *turnover* ($p < 0,0001$) e HVA e seu respectivo *turnover* ($p < 0,0001$), HVA e NA ($p < 0,0001$) e *turnover* de HVA e NA ($p < 0,0001$). Foram observadas correlações negativas entre 5HT e *turnover* serotoninérgico ($p < 0,0001$), 5HT e DOPAC ($p = 0,001$), 5HT e *turnover* de DOPAC ($p = 0,003$), 5HIAA e DOPAC ($p = 0,003$), 5HIAA e *turnover* de DOPAC ($p = 0,003$), DA e *turnover* de HVA ($p = 0,002$), DOPAC e HVA ($p < 0,0001$), DOPAC e *turnover* de HVA ($p < 0,0001$), DOPAC e NA ($p < 0,0001$), *turnover* de DOPAC e HVA ($p < 0,0001$), *turnover* de DOPAC e *turnover* HVA ($p = 0,0001$) e *turnover* de DOPAC e NA ($p < 0,0001$).

Após a matriz de correlação de Pearson, foram calculados os componentes principais considerando os parâmetros comportamentais de imobilidade, a neurotransmissão no hipotálamo e os diferentes momentos de análise do estresse (antes, depois e 1 hora depois da exposição a três dias de estresse de contenção por 2 horas). Conforme descrito na tabela 6, a análise dos eixos F1 e F2 da ACP explicam 56,5% da variância total observada, tendo o eixo F1 da ACP um *eigenvalue* de 4,892 representando 40,7% da variância total observada. Em seguida, temos o eixo F2 com um *eigenvalue* de 1,897 representando 15,8% da variância total.

Os respectivos percentuais de contribuição de cada uma das variáveis analisadas no hipotálamo nos eixos F1 e F2 são apresentados na tabela 7 e a dos comportamentos nos diferentes momentos de estresse na tabela 8. Primeiramente, é possível notar na tabela 7 que os neurotransmissores 5HT (14,6%), 5HIAA (13,18%), DOPAC (11,7%), *turnover* de DOPAC (10,2%), HVA (16,9%), *turnover* de HVA (14,6%) e NA (15,9%) possuem maior participação na variância total observada no eixo F1. No eixo F2, os parâmetros comportamentais de frequência (36,1%) e tempo (28,5%) possuem maior participação. Em seguida temos a latência com 7% e o *turnover* serotoninérgico com 8,8%.

Tabela 5 - Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos *turnovers* no hipotálamo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Variáveis	LATEN	FREQ	TEMP	5HT	5HIAA	5HT / 5HIAA	DA	DOPAC	DA / DOPAC	HVA	DA / HVA	NA
LATEN	1	-0,164	-0,135	-0,003	-0,094	-0,135	-0,163	0,150	0,188	-0,130	-0,061	-0,125
FREQ	-0,164	1	0,615	-0,130	-0,017	0,130	-0,255	-0,122	-0,070	0,008	0,077	0,065
TEMP	-0,135	0,615	1	-0,254	-0,164	0,071	-0,050	0,023	0,064	-0,172	-0,160	-0,127
5HT	-0,003	-0,130	-0,254	1	0,829	-0,509	-0,088	-0,443	-0,391	0,715	0,601	0,778
5HIAA	-0,094	-0,017	-0,164	0,829	1	-0,203	-0,004	-0,391	-0,391	0,716	0,593	0,685
5HT / 5HIAA	-0,135	0,130	0,071	-0,509	-0,203	1	0,079	0,108	0,032	0,024	0,104	-0,236
DA	-0,163	-0,255	-0,050	-0,088	-0,004	0,079	1	0,249	-0,065	-0,129	-0,399	-0,020
DOPAC	0,150	-0,122	0,023	-0,443	-0,391	0,108	0,249	1	0,911	-0,587	-0,572	-0,565
DA / DOPAC	0,188	-0,070	0,064	-0,391	-0,391	0,032	-0,065	0,911	1	-0,535	-0,474	-0,565
HVA	-0,130	0,008	-0,172	0,715	0,716	0,024	-0,129	-0,587	-0,535	1	0,913	0,787
DA / HVA	-0,061	0,077	-0,160	0,601	0,593	0,104	-0,399	-0,572	-0,474	0,913	1	0,700
NA	-0,125	0,065	-0,127	0,778	0,685	-0,236	-0,020	-0,565	-0,565	0,787	0,700	1

Valores em negrito são diferentes de 0 com nível de significância de 0,05 (Lat – latência, fre – frequência, tem – tempo, 5HT – serotonina, 5HIAA - ácido 5-hidroindol 3-acético, DA – dopamina, DOPAC - ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA - ácido homovanílico, NA – noradrenalina

Tabela 6 - Valores do *eigenvalue*, percentual de variabilidade e percentual acumulativo da análise de componente principal dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos *turnovers* no hipotálamo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

	F1	F2
<i>Eigenvalue</i>	4,892	1,897
Variabilidade (%)	40,764	15,807
Acumulativo (%)	40,764	56,571

Na tabela 8, é possível notar os parâmetros de baixa imobilidade sem estresse (21,8%), alta imobilidade sem estresse (34,5%) e baixa imobilidade após estresse (14,8%) apresentam maior participação na variabilidade do que os parâmetros de alta imobilidade após estresse (5,2%), baixa imobilidade 1h após estresse (8,5%) e alta imobilidade 1h após estresse (1,8%) no eixo F1. No eixo F2, os parâmetros de baixa imobilidade sem estresse (21,8%), baixa imobilidade após estresse (14,8%) alta imobilidade após estresse (19,1%) e alta imobilidade 1h após estresse (29,8%) apresentam maior participação na variabilidade do que os parâmetros alta imobilidade sem estresse (6,8%) e baixa imobilidade 1h após estresse (7,4%).

Tabela 7 - Percentual de contribuição dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos *turnovers* no hipotálamo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Eixos	Parâmetros											
	Lat	Fre	Tem	5HT	5HIAA	5HT / 5HIAA	DA	DOPAC	DA / DOPAC	HVA	DA / HVA	NA
F1	0,370	0,005	0,844	14,650	13,153	0,874	0,625	11,702	10,251	16,920	14,628	15,976
F2	7,025	36,177	28,567	5,516	1,370	8,814	4,036	4,508	2,758	0,092	1,118	0,021

Lat – latência, fre – frequência, tem – tempo, 5HT – serotonina, 5HIAA - ácido 5-hidroindol 3-acético, DA – dopamina, DOPAC - ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA - ácido homovanílico, NA – noradrenalina

Tabela 8 - Percentual de contribuição dos comportamentos de baixa e alta imobilidade no hipotálamo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Parâmetros						
Eixos	Baixa imobilidade sem estresse	Alta imobilidade sem estresse	Baixa imobilidade após estresse	Alta imobilidade após estresse	Baixa imobilidade 1h após estresse	Alta imobilidade 1h após estresse
F1	21,87192	34,56757	14,85312	5,220594	8,536901	1,893647
F2	21,87192	6,848804	14,85312	19,11234	7,451252	29,86256

Foi realizada por fim a distribuição gráfica (fig. 29) dos componentes principais 1 e 2 (eixos F1 e F2) de todos os elementos analisados no hipotálamo de forma a ilustrar os parâmetros de imobilidade, neuroquímicos e de estresse em seus diferentes momentos. É possível observar que os comportamentos de baixa imobilidade após e 1 hora após o estresse possuem uma distribuição semelhante na ACP com forte correlação com os neurotransmissores HVA e respectivo *turnover*, NA, 5HT e 5HIAA. Os animais de alta imobilidade após e 1 hora após a exposição ao estresse possuem uma distribuição semelhante, embora os animais avaliados 1 hora após o estresse estejam distribuídos de forma mais heterogênea e se correlacionam com o *turnover* serotoninérgico e os parâmetros comportamentais de tempo e frequência. Os animais de alta imobilidade após o estresse correlacionam-se mais marcadamente com o parâmetro de frequência. Os animais não expostos ao estresse apresentam uma distribuição oposto no eixo F2 da ACP e apresentam correlação com a atividade dopaminérgica.

Figura 30 - Projeção correlacional nos eixos F1 e F2 dos comportamentos de baixa e alta imobilidade referentes aos neurotransmissores e o hipotálamo avaliados no teste de suspensão da cauda e analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

6.3.3 Análise de componente principal entre comportamento e neurotransmissores no mesencéfalo

A última estrutura analisada foi o mesencéfalo e as mesmas diretrizes adotadas na análise do CPF e hipotálamo foram adotadas. Assim, é possível observar inicialmente na matriz de correlação de Pearson (tabela 9) correlações positivas entre frequência e tempo ($p < 0,0001$), 5HT e 5HIAA ($p < 0,0001$), 5HT e DA ($p < 0,0001$), 5HT e HVA ($p < 0,0001$), 5HT e *turnover* de HVA ($p < 0,0001$), 5HT e NA ($p < 0,0001$), 5HIAA e DA ($p < 0,0001$), 5HIAA e HVA ($p < 0,0001$), 5HIAA e *turnover* de HVA ($p < 0,0001$), 5HIAA e NA ($p < 0,0001$), *turnover* serotoninérgico e DOPAC ($p < 0,0001$), *turnover* serotoninérgico e *turnover* de DOPAC ($p < 0,0001$), DA e HVA ($p < 0,0001$), DA e *turnover* de HVA ($p = 0,006$), DA e NA ($p < 0,0001$), DOPAC e seu respectivo *turnover* ($p < 0,0001$), HVA e seu respectivo *turnover* ($p < 0,0001$), HVA e

NA ($p < 0,0001$), e *turnover* de HVA e NA ($p < 0,0001$). Também é possível observar correlações tempo e 5HT ($p = 0,003$), tempo e DA ($p = 0,03$), tempo e NA ($p = 0,01$), 5HT e *turnover* serotoninérgico ($p < 0,0001$), 5HT e DOPAC ($p < 0,0001$), 5HT e *turnover* de DOPAC ($p < 0,0001$), *turnover* serotoninérgico e DA ($p < 0,0001$), *turnover* serotoninérgico e HVA ($p < 0,0001$), *turnover* serotoninérgico e *turnover* de HVA ($p = 0,01$), *turnover* serotoninérgico e NA ($p < 0,0001$), DA e DOPAC ($p = 0,005$), DA e *turnover* de DOPAC ($p < 0,0001$), DOPAC e HVA ($p = 0,002$), DOPAC e *turnover* de HVA ($p = 0,007$), DOPAC e NA ($p < 0,0001$), *turnover* de DOPAC e HVA ($p < 0,0001$), *turnover* de DOPAC e *turnover* de HVA ($p = 0,002$) e *turnover* de DOPAC e NA ($p < 0,0001$).

Após a matriz de correlação, foi calculada a ACP considerando os parâmetros comportamentais de imobilidade, a neurotransmissão no mesencéfalo e os diferentes momentos de avaliação do estresse. Foram analisados os *eigenvalues* (tabela 10), o percentual de variabilidade e o percentual acumulativo. Assim, conforme descrito na tabela 10, o eixo F1 e F2 explicam 66,9% da variância total observada, tendo o eixo F1 da ACP um *eigenvalue* de 6,132, representando 51,1% da variância total. Em seguida, temos o eixo F2 com um *eigenvalue* de 1,90 representando 15,8% da variância total.

Os respectivos percentuais de contribuição de cada uma das variáveis analisadas (tabela 11) e dos comportamentos nos diferentes momentos de estresse (tabela 12) nos eixos F1 e F2 também são apresentados. É possível notar na tabela 11 que os neurotransmissores 5HT (14,1%) e NA (14%) apresentam maior participação nos resultados que os demais parâmetros, embora 5HIAA (9,9%), *turnover* serotoninérgico (11,3%) DA (9,9%), DOPAC (8,2%), *turnover* de DOPAC (11,4%), HVA (12,1%) e *turnover* de HVA (7,4%) também tenham apresentado participação na variância total observada no eixo F1. No eixo F2, os parâmetros comportamentais de latência (9,6%), frequência (38%) e tempo total de imobilidade (32%) contribuem com a maior parte da variação observada.

Tabela 9 - Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos *turnovers* no mesencéfalo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Variáveis	LAT	FRE	TEM	5HT	5HIAA	5HT / 5HIAA	DA	DOPAC	DA / DOPAC	HVA	DA / HVA	NA
LAT	1	-0,169	-0,159	0,085	0,037	0,017	-0,157	0,111	0,165	-0,032	0,066	0,068
FRE	-0,169	1	0,620	-0,157	0,004	-0,008	-0,031	-0,203	-0,212	0,010	0,122	-0,083
TEM	-0,159	0,620	1	-0,368	-0,186	0,232	-0,264	0,022	0,058	-0,170	0,025	-0,322
5HT	0,085	-0,157	-0,368	1	0,809	-0,765	0,717	-0,553	-0,678	0,797	0,586	0,864
5HIAA	0,037	0,004	-0,186	0,809	1	-0,363	0,549	-0,377	-0,490	0,827	0,730	0,637
5HT / 5HIAA	0,017	-0,008	0,232	-0,765	-0,363	1	-0,666	0,771	0,858	-0,525	-0,299	-0,842
DA	-0,157	-0,031	-0,264	0,717	0,549	-0,666	1	-0,348	-0,612	0,694	0,345	0,751
DOPAC	0,111	-0,203	0,022	-0,553	-0,377	0,771	-0,348	1	0,943	-0,386	-0,336	-0,619
DA / DOPAC	0,165	-0,212	0,058	-0,678	-0,490	0,858	-0,612	0,943	1	-0,537	-0,383	-0,740
HVA	-0,032	0,010	-0,170	0,797	0,827	-0,525	0,694	-0,386	-0,537	1	0,885	0,744
DA / HVA	0,066	0,122	0,025	0,586	0,730	-0,299	0,345	-0,336	-0,383	0,885	1	0,557
NA	0,068	-0,083	-0,322	0,864	0,637	-0,842	0,751	-0,619	-0,740	0,744	0,557	1

Valores em negrito são diferentes de 0 com nível de significância de 0,05 (Lat – latência, fre – frequência, tem – tempo, 5HT – serotonina, 5HIAA - ácido 5-hidroindol 3-acético, DA – dopamina, DOPAC - ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA - ácido homovanílico, NA – noradrenalina)

Tabela 10 - Valores do eigenvalue, percentual de variabilidade e percentual acumulativo da análise de componente principal dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos turnovers no mesencéfalo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Variáveis	F1	F2
Eigenvalue	6,132	1,900
Variabilidade (%)	51,104	15,832
Acumulativo (%)	51,104	66,936

Na tabela 12, é possível notar os parâmetros de baixa imobilidade sem estresse (26%), alta imobilidade sem estresse (30,3%) e baixa imobilidade após estresse (35,3%) apresentam maior participação na variabilidade do que os parâmetros de alta imobilidade após estresse (1,8%), baixa imobilidade 1h após estresse (6,2%) e alta imobilidade 1h após estresse (0,1%) no eixo F1. No eixo F2, os parâmetros de baixa imobilidade sem estresse (28,2%), alta imobilidade após estresse (22,9%) e alta imobilidade 1h após estresse (21,3%) apresentam maior participação na variabilidade do que os parâmetros de alta imobilidade sem estresse (9,4%), baixa imobilidade após estresse (11,7%) e baixa imobilidade 1h após estresse (6,1%).

Tabela 11 - Percentual de contribuição dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a concentração de neurotransmissores, metabólitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) e respectivos *turnovers* no mesencéfalo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Eixos	Parâmetros											
	Lat	Fre	Tem	5HT	5HIAA	5HT / 5HIAA	DA	DOPAC	DA / DOPAC	HVA	DA / HVA	NA
F1	0,010	0,000	1,170	14,118	9,964	11,362	9,987	8,298	11,494	12,140	7,447	14,009
F2	9,638	38,202	32,666	2,277	0,620	0,450	0,301	8,171	6,700	0,242	0,140	0,592

Lat – latência, fre – frequência, tem – tempo, 5HT – serotonina, 5HIAA - ácido 5-hidroindol 3-acético, DA – dopamina, DOPAC - ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA - ácido homovanílico, NA – noradrenalina

Tabela 12 - Percentual de contribuição dos comportamentos de baixa e alta imobilidade no mesencéfalo de camundongos analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Parâmetros						
Eixos	Baixa imobilidade sem estresse	Alta imobilidade sem estresse	Baixa imobilidade após estresse	Alta imobilidade após estresse	Baixa imobilidade 1h após estresse	Alta imobilidade 1h após estresse
F1	26,033	30,320	35,324	1,802	6,298	0,18719
F2	28,29385	9,491552	11,71965	22,90935	6,193795	21,3918

A figura 30 ilustra a distribuição gráfica dos componentes principais 1 e 2 (eixos F1 e F2) de todos os elementos analisados no mesencéfalo. É possível observar, semelhante ao CPF e hipotálamo, que os comportamentos de baixa imobilidade após e 1 hora após o estresse possuem uma distribuição semelhante na ACP e possuem forte correlação com os neurotransmissores HVA e respectivo *turnover*, NA, 5HT e 5HIAA. Com relação aos demais neurotransmissores é possível observar uma forte correlação com a DA. Os animais de alta imobilidade após e 1 hora após a exposição ao estresse possuem uma distribuição semelhante e ambos estão correlacionados com os parâmetros de imobilidade de tempo e frequência. Os animais não expostos ao estresse apresentam, novamente, uma distribuição mais heterogenia e possuem uma distribuição oposta no eixo F2 da ACP. Além disso, apresentam correlação com a atividade dopaminérgica (DOPAC e respectivo *turnover*) e com o *turnover* serotoninérgico.

Figura 31 - Projeção correlacional dos eixos F1 e F2 dos comportamentos de alta e baixa imobilidade referentes aos neurotransmissores e o mesencéfalo avaliados no teste de suspensão da cauda e analisados antes, depois e 1h depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

6.3.4 Análise de componente principal entre comportamento e a expressão relativa de citocinas no córtex pré-frontal

Como anteriormente realizado com as análises entre neurotransmissores e comportamento de imobilidade, foi realizada antes da ACP uma matriz de correlação de Pearson, de forma a ilustrar as correlações significantes entre citocinas do CPF e parâmetros comportamentais de imobilidade avaliados pelo TSC. Assim, é possível observar na tabela 1 correlações positivas entre latência e IL-12 ($p=0,016$), frequência e tempo ($p=0,0001$), IL-1b e IL-12 ($p=0,006$), IL-1b e TNF- α ($p<0,0001$) e IL-12 e TNF- α ($p=0,008$). Também foram observadas correlações negativas entre frequência e IL-6 ($p=0,012$), tempo e IL-1b ($p=0,011$) e entre tempo e IL-6 ($p=0,037$).

Tabela 13 - Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a expressão relativas das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Variáveis	Lat	Fre	Tem	IL-1 β	IL-6	IL-12	TNF- α
Lat	1	-0,237	-0,241	0,245	0,193	0,498	0,375
Fre	-0,237	1	0,719	-0,200	-0,517	-0,053	-0,107
Tem	-0,241	0,719	1	-0,518	-0,437	-0,299	-0,398
IL-1β	0,245	-0,200	-0,518	1	0,083	0,556	0,836
IL-6	0,193	-0,517	-0,437	0,083	1	-0,022	-0,045
IL-12	0,498	-0,053	-0,299	0,556	-0,022	1	0,542
TNF-α	0,375	-0,107	-0,398	0,836	-0,045	0,542	1

Valores em negrito são diferentes de 0 com nível de significância de 0,05 (Lat – latência, fre – frequência, tem – tempo, IL-1 β –interleucina 1 β , IL-6 – interleucina 6, IL-12 – interleucina 12, TNF- α – fator de necrose tumoral α)

Após a matriz de correlação de Pearson, foram realizados as primeiras análises da ACP. Essa análise teve como foco os parâmetros comportamentais de imobilidade avaliados pelo TSC, a expressão relativa das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α no CPF e os diferentes momentos de avaliação do estresse (antes e após três dias de estresse de contenção de 2 horas). Conforme descrito anteriormente, esta análise tem como objetivo identificar quais componentes possuem maior variância dentro da matriz de dados. A tabela 14 expressa os resultados dos eixos F1 e F2, responsáveis por explicar 69% da variância total observada. Para essa ACP, foram analisados os *eigenvalues* (valor que reflete a qualidade da projeção da ACP), o percentual de variabilidade (valor de cada eixo) e o percentual acumulativo (a soma dos eixos). Assim, conforme descrito na tabela 14, o eixo F1 da ACP apresenta um *eigenvalue* de 3,094 e representa 44,2% da variância total observada. Em seguida, temos o eixo F2 com um *eigenvalue* de 1,736 representando 24,8% da variância total.

Tabela 14 - Valores do *eigenvalue*, percentual de variabilidade e percentual acumulativo da análise de componente principal dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) e a expressão relativa das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

	F1	F2
<i>Eigenvalue</i>	3,094	1,736
Variabilidade (%)	44,203	24,801
Acumulativo (%)	44,203	69,004

Os percentuais de contribuição das variáveis analisadas (tabela 15) e dos comportamentos nos diferentes momentos de estresse (tabela 16) nos eixos F1 e F2 também foram analisados. É possível observar na tabela 15 que a citocina IL-1 β (121,4%), IL-12 (14,7%) e TNF- α (19,2%), além dos comportamentos de tempo (19,5%) possuem uma maior participação na variância total observada no eixo F1. No eixo F2, os parâmetros comportamentais de frequência (28,5%) e a citocina IL-6 (30,3%) possuem maior participação.

Tabela 15 - Percentual de contribuição dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) e a expressão relativa das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Eixos	Lat	Fre	Tem	IL-1β	IL-6	IL-12	TNF-α
F1	10,848	9,982	19,522	21,442	4,217	14,734	19,255
F2	0,511	28,571	10,345	6,165	30,343	11,696	12,369
<i>(Lat – latência, fre – frequência, tem – tempo, IL-1β – interleucina 1β, IL-6 – interleucina 6, IL-12 – interleucina 12, TNF-α – fator de necrose tumoral α)</i>							

Na tabela 16, é possível notar os parâmetros de baixa imobilidade após estresse (55,3%) e alta imobilidade após estresse (20,2%) apresentam maior participação na variabilidade do que os parâmetros baixa imobilidade sem estresse (9,9%) e alta imobilidade sem estresse (14,4%) no eixo F1. No eixo F2, os parâmetros de baixa imobilidade sem estresse (62,7%) e baixa imobilidade após estresse (24,5%) apresentam maior participação na variabilidade do que os parâmetros de alta imobilidade sem estresse (6,6%) e alta imobilidade após estresse (5,9%).

Tabela 16 - Percentual de contribuição dos comportamentos de baixa e alta imobilidade no córtex pré-frontal de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Eixos	Baixa imobilidade sem estresse	Alta imobilidade sem estresse	Baixa imobilidade após estresse	Alta imobilidade após estresse
F1	9,910	14,495	55,363	20,232
F2	62,798	6,627	24,577	5,998

A figura 31 expressa a distribuição gráfica dos componentes principais 1 e 2 (eixos F1 e F2) de todos os elementos analisados no CPF (parâmetros de imobilidade, citocinêrgicos e de estresse em seus diferentes momentos). Esse resultado faz parte de uma análise exploratória na qual é possível observar diferentes *clusters*, no qual os comportamentos em seus diferentes momentos de estresse se localizam e como os diferentes parâmetros observados estão associados. Assim, é possível observar inicialmente uma distribuição distinta entre o perfil de alta imobilidade sem e com a presença de estresse. Esses perfis estão correlacionados com os parâmetros comportamentais de tempo e frequência. Os parâmetros de baixa imobilidade sem e com a presença de estresse estão distribuídos de forma oposta no eixo F2. Os animais de baixa imobilidade estressados apresentam uma correlação com as citocinas IL-1b IL-12 e TNF- α analisadas no CPF, além do parâmetro de latência. A interleucina IL-6 correlaciona-se exclusivamente com os animais de baixa imobilidade não estressados. Ainda, é possível observar que a distribuição do perfil de alta e baixa imobilidade é bem distinto e distribuído de maneira oposta no eixo F1. Enquanto animais de alta imobilidade estão distribuídos de forma homogênea na distribuição gráfica, os animais de baixa imobilidade encontram-se mais espalhados pelos eixos.

Figura 32 - Projeção correlacional dos eixos F1 e F2 dos comportamentos de alta e baixa imobilidade referentes à expressão relativa das citocinas e o córtex pré-frontal avaliados no teste de suspensão da cauda e analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

6.3.5 Análise de componente principal entre comportamento a expressão relativa de citocinas no hipotálamo

Inicialmente, com a matriz de correlação de Pearson entre a expressão relativa de citocinas do hipotálamo e os parâmetros comportamentais de imobilidade avaliados pelo TSC, foi possível observar na tabela 17 correlações positivas entre frequência e tempo ($p=0,0002$), frequência e TNF- α ($p=0,035$), tempo e TNF- α ($p=0,002$), IL-1 β b e IL-2 ($p<0,0001$), IL-1 β b e IL-12 ($p<0,0001$), IL-1 β b e IFN- γ ($p<0,0001$), IL-2 e IL-6 ($p=0,022$), IL-2 e IL-12 ($p<0,0001$), IL-2 e IFN- γ ($p<0,0001$), IL-6 e IL-12 ($p=0,03$), IL-6 e IFN- γ ($p=0,018$), IL-12 e IFN- γ ($p<0,0001$). Foi observada uma correlação negativa somente entre tempo e I IFN- γ ($p=0,05$).

Tabela 17 - Matriz de correlação de Pearson entre os parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) avaliados pelo teste de suspensão da cauda e a expressão relativas das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α no hipotálamo de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Variáveis	Lat	Fre	Tem	IL-1 β	IL-2	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α
Lat	1	-0,227	-0,211	0,302	-0,042	-0,128	0,111	0,110	-0,157
Fre	-0,227	1	0,723	-0,075	-0,113	0,209	-0,057	-0,137	0,462
Tem	-0,211	0,723	1	-0,390	-0,314	0,115	-0,294	-0,433	0,638
IL-1β	0,302	-0,075	-0,390	1	0,750	0,371	0,881	0,855	-0,417
IL-2	-0,042	-0,113	-0,314	0,750	1	0,497	0,883	0,802	-0,317
IL-6	-0,128	0,209	0,115	0,371	0,497	1	0,475	0,509	0,159
IL-12	0,111	-0,057	-0,294	0,881	0,883	0,475	1	0,873	-0,328
IFN-γ	0,110	-0,137	-0,433	0,855	0,802	0,509	0,873	1	-0,360
TNF-α	-0,157	0,462	0,638	-0,417	-0,317	0,159	-0,328	-0,360	1

Valores em negrito são diferentes de 0 com nível de significância de 0,05 (Lat – latência, fre – frequência, tem – tempo, IL-1 β – interleucina 1 β , IL-2 – interleucina 2, IL-6 – interleucina 6, IL-12 – interleucina 12, IFN- γ – interferon γ , TNF- α – fator de necrose tumoral α)

Após a matriz de correlação de Pearson, foram realizadas as primeiras análises da ACP. Essa análise teve como foco os parâmetros comportamentais de imobilidade avaliados pelo TSC, a expressão relativa das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α no hipotálamo e os diferentes momentos de avaliação do estresse (antes e após três dias de estresse de contenção de 2 horas). A tabela 18 expressa os resultados dos eixos F1 e F2, responsáveis por explicar 71,2% da variância total observada. Para essa ACP, foram analisados os *eigenvalues* (valor que reflete a qualidade da projeção da ACP), o percentual de variabilidade (valor de cada eixo) e o percentual acumulativo (a soma dos eixos). Assim, conforme descrito na tabela 18, o eixo F1 da ACP apresenta um *eigenvalue* de 4,245 e representa 47,1% da variância total observada. Em seguida, temos o eixo F2 com um *eigenvalue* de 2,172 representando 24,132% da variância total.

Tabela 18 - Valores do *eigenvalue*, percentual de variabilidade e percentual acumulativo da análise de componente principal dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) e a expressão relativa das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α no hipotálamo de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

	F1	F2
<i>Eigenvalue</i>	4,245	2,172
Variabilidade (%)	47,163	24,132
Acumulativo (%)	47,163	71,295

A tabela 19 ilustra os percentuais de contribuição das variáveis analisadas. Assim, é possível observar na tabela que a citocina IL-1 β (19,5%), IL-2 (17,9%), IL-12 (19,87%) e IFN- γ (19,2%) possuem maior participação na variância total observada no eixo F1. No eixo F2, os parâmetros comportamentais de frequência (28%) e tempo (22,1%) e as citocina IL-6 (19,5%) e TNF- α (15,8%) possuem maior participação.

Tabela 19 - Percentual de contribuição dos parâmetros comportamentais de imobilidade (tempo, frequência e latência) e a expressão relativa das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α no hipotálamo de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Eixos	Lat	Fre	Tem	IL-1b	IL-2	IL-6	IL-12	IFN- γ	TNF- α
F1	0,969	2,070	7,680	19,545	17,997	4,653	19,880	20,315	6,892
F2	6,138	28,082	22,184	0,574	3,061	19,596	3,149	1,396	15,820

(Lat – latência, fre – frequência, tem – tempo, IL-1 β –interleucina 1 β , IL-2 – interleucina 2, IL-6 – interleucina 6, IL-12 – interleucina 12, IFN- γ – interferon γ , TNF- α – fator de necrose tumoral α)

A tabela 20 ilustra os percentuais de contribuição dos comportamentos nos diferentes momentos de estresse. É possível observar que o parâmetro de baixa imobilidade após estresse (74,8%) possui uma participação mais elevada na variância total observada que os demais parâmetros (baixa imobilidade sem estresse: 1,9%, alta imobilidade sem estresse: 9,5%, alta imobilidade após estresse: 13,6%) no eixo F1. No eixo F2, os parâmetros de baixa imobilidade sem estresse (44,1%) e alta imobilidade após estresse (33,3%) apresentam maior participação na

variabilidade do que os parâmetros de alta imobilidade sem estresse (7,9%) e baixa imobilidade após estresse (14,3%).

Tabela 20 - Percentual de contribuição dos comportamentos de baixa e alta imobilidade no hipotálamo de camundongos analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias.

Eixos	Baixa imobilidade sem estresse	Alta imobilidade sem estresse	Baixa imobilidade após estresse	Alta imobilidade após estresse
F1	1,992	9,583	74,820	13,605
F2	44,353	7,903	14,368	33,376

A figura 32 expressa a distribuição gráfica dos componentes principais 1 e 2 (eixos F1 e F2) de todos os elementos analisados no hipotálamo (parâmetros de imobilidade, citocinêrgicos e de estresse em seus diferentes momentos). A análise exploratória desses parâmetros revela diferentes *clusters* onde os comportamentos, em seus diferentes momentos de estresse, localizam-se e como os diferentes parâmetros observados estão correlacionados. É possível observar uma distribuição distinta oposta entre os perfis de alta e baixa imobilidade sem estresse no eixo F2. Os comportamentos de alta imobilidade com e sem a presença do estresse apresentam uma correlação com os parâmetros de tempo, frequência e TNF- α . Os animais de baixa imobilidade estressados apresentam uma correlação com as demais citocinas, como IL-12, IL-2, IL-1 β e IFN- γ . É possível notar que a distribuição dos eixos F1 e F2 do hipotálamo encontram-se mais dispersos no gráfico em relação ao CPF.

Figura 33 - Projeção correlacional dos eixos F1 e F2 dos comportamentos de alta e baixa imobilidade referentes à expressão relativa das citocinas e o hipotálamo avaliados no teste de suspensão da cauda e analisados antes e depois do estresse de contenção de duas horas pelo período de 3 dias. (título da figura errada)

7 DISCUSSÃO

Atualmente, a maioria das pessoas é exposta a diferentes tipos de estresse no dia-a-dia que podem ou não levar ao surgimento de estados patológicos diversos (SOUTHWICK et al., 2014). Sabe-se que experiências traumáticas, bem como a longa exposição ao estresse, conforme também descrito pela Organização Mundial da Saúde, podem influenciar drasticamente a saúde mental e resultar em condições como transtorno de estresse pós-traumático (KARAM et al., 2014), comportamentos depressivos (SOUTHWICK; VYTHILINGAM; CHARNEY, 2005) e ansiosos (CHARNEY, 2003).

No caso dos comportamentos depressivos, há um leque amplo e variado de ferramentas que permitem seu estudo em modelos animais. Nesse trabalho, por exemplo, foi utilizado o TSC, que é comumente empregado na avaliação de efeitos de drogas antidepressivas (STERU et al., 1985; FUJISHIRO et al., 2001; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). No entanto, no presente estudo, o TSC foi utilizado, primariamente, como uma medida de seleção da característica comportamental de BI e AI, a fim de verificar a relação do estresse com os comportamentos de alta e baixa imobilidade. Os primeiros resultados do TSC demonstraram não somente a possibilidade da seleção dos fenótipos BI e AI através do tempo de imobilidade, mas também uma clara distinção quanto à frequência de paradas (maior em animais AI em relação ao BI) e a latência para primeira imobilidade (menor em animais AI em relação ao BI) durante o teste, conforme observado anteriormente (REIS-SILVA et al., 2016).

A partir desses resultados, buscou-se investigar a hipótese de que um estresse ambiental, tal como o estresse de contenção aplicado nesse trabalho, poderia ou não desencadear efeitos distintos nos comportamentos de BI e AI, uma vez que esses também poderiam ser compreendidos como perfis de reatividade distintos ao estresse inescapável mimetizado pelo TSC. Estresses inescapáveis como o choque na cauda e o nado forçado já foram descritos como capazes de produzir uma resposta mais heterogênea do que estresses controlados. Dessa forma, esses testes, através do estresse, seriam capazes de desencadear uma distribuição bimodal de comportamentos de vulnerabilidade e resiliência (DRUGAN et al., 2014; DRUGAN et al., 1989).

De forma a contemplar como o estresse poderia ou não afetar os comportamentos de BI e AI, mas também no intuito de se distinguir essas respostas daquelas observadas comumente no comportamento depressivo, também se utilizou os protocolos TPS e ST, ferramentas que permitem avaliar parâmetros relacionados a anedonia e, conseqüentemente, ao comportamento tipo-depressivo. Esses testes foram realizados em dois momentos distintos, sem a presença de estresse e após o estresse de contenção.

Os resultados do TPS demonstraram que animais de comportamento BI apresentavam maior consumo de água e sacarose após o estresse. Esse resultado também ocorre em camundongos de comportamento AI. Contudo, observa-se somente em camundongos AI um possível efeito do estresse, sendo esse um consumo estatisticamente menor de sacarose em relação ao consumo de água. Nesse sentido, é possível dizer que o valor reforçador da sacarose para animais de comportamento AI tenha diminuído após o estresse. Esse efeito não ocorreu em animais BI. Assim, é possível dizer que animais AI estariam mais sensibilizados aos efeitos do estresse do que animais BI, concordando com a hipótese inicial de que esses comportamentos estejam relacionados a um estilo de *coping* diferente. É possível definir coping como um conjunto de características comportamentais de um organismo que sejam adaptadas a diferentes situações do ambiente impostas através do tempo. Em outras palavras, é um fenômeno biológico fundamental frente a adaptação ao estresse (COPPENS; DE BOER; KOOLHAAS, 2010). Assim, é possível, através dos resultados apresentados, enquadrar os animais como apresentando uma resposta de resiliência e não resiliência ao estresse de contenção de duas horas por três dias.

Outro dado que corrobora essa hipótese é o aumento significativo em tempo e frequência de vocalizações de animais AI em relação a BI, durante a exposição dos animais ao estresse inescapável do TSC. De acordo com Litvin et. al (2007), a frequência de 22-kHz escolhida para avaliar as vocalizações dos roedores é normalmente emitida em antecipação e em resposta a estímulos aversivos e estressores inescapáveis. Segundo a autora, essas vocalizações ainda podem surgir em antecipações a ameaças em potencial. Assim, é possível dizer que os comportamentos BI e AI dos roedores em resposta ao estresse inescapável do TSC

poderiam ser entendidas como um tipo diferente de *coping* ou controle frente ao estresse.

Além dessa, outra explicação compatível com os resultados observados na vocalização ultrassônica seria a “tônica” do nível de estresse. Em outras palavras, que o comportamento de vocalização seria dependente do tipo e do nível de estresse no qual o roedor é submetido (WEINER et al., 2016). Dessa forma, os resultados dos camundongos de comportamento BI que permaneceram mais tempo em silêncio do que os AI, além de ter um tempo mínimo de silêncio maior, indicaria que as características de vocalização observadas não foram produzidas pelo teste de suspensão da cauda, mas sim já inerentes a esses animais de AI. Esse dado pode induzir que a forma como a experiência de estresse foi vivenciada é distinta entre os animais, tanto nos níveis comportamentais, como nos níveis cerebrais.

Além do TPS, também foi realizado o *splash test*, que é comumente empregado para medir aspectos da depressão, como a anedonia. Em estudos pré-clínicos, a diminuição do tempo gasto no comportamento de *grooming*, promovido pela pulverização de uma solução de sacarose no dorso dos animais é considerado um comportamento de hipossensibilidade ao prazer (SONG; LEONARD, 2005; YALCIN; AKSU; BELZUNG, 2005). Os resultados relacionados aos tempos e frequências do *grooming*, poderiam ser relacionados a comportamentos tipo-depressivos (DUCOTTET; BELZUNG, 2005). No entanto, quando considerado os resultados do TPS, é possível compreender os resultados referentes aos comportamentos BI e AI no *splash test* como, também, um perfil associado a reatividade ao estresse e, nesse sentido, mais próximo de um estilo de coping do que necessariamente relacionado ao comportamento tipo depressivo. Logo, é possível considerar essas respostas como adaptativas frente ao estresse (SADLER; BAILEY, 2016) e, por conseguinte, esses camundongos BI teriam apresentado um perfil resiliente e camundongos AI um perfil oposto.

Semelhante ao TPS, o *splash test* foi realizado sem a presença do estresse e após dois dias de estresse de contenção e, ainda, em dois ambientes distintos: em uma gaiola nova, não familiarizada pelos roedores e na própria caixa moradia. Essa divisão foi realizada devido a diferenças de respostas apresentadas por roedores quanto a ambientes inicialmente exploradas e locais novos. Quanto aos resultados na gaiola, bem como da caixa moradia sem a presença do estresse, não foram

observadas diferenças em ambos os fenótipos BI e AI. Contudo, foram observadas diferenças entre os tempos pré e pós-estresse. No caso, da aplicação do estresse observou-se aumento nas frequências e no tempo de *grooming* dos animais BI e AI em relação a camundongos não estressados de mesmo comportamento tanto no ambiente novo quanto na caixa moradia. Mais importante, um efeito do estresse foi observado na gaiola nova, na qual a frequência e o tempo de *grooming* foi maior em animais AI em relação aos BI após o estresse. Estes dados nos animais do grupo AI mostram maior tempo de episódios repetitivos para realizar esse comportamento. Estes resultados sugerem novamente que animais do grupo BI apresentam uma menor sensibilidade ao estresse enquanto que aqueles do grupo AI tem maior sensibilidade aos efeitos de estresse por contenção.

Na caixa moradia, o efeito do estresse foi observado novamente após o estresse, tendo animais AI apresentado menor tempo de *grooming* em comparação com os BI. Esses dados sugerem que o estresse da nova gaiola associada ao estresse de contenção aumentou não apenas a frequência de *grooming*, mas também o tempo. Assim, em ambas as situações, o grupo AI foi mais afetado pelo estresse de contenção do que o grupo BI, reforçando a proposta de que os camundongos AI apresentam uma resposta adaptativa baixa ao estresse e o grupo BI um perfil mais resiliente.

É possível entender as mudanças nas respostas de *grooming* na gaiola nova e caixa moradia como diferentes em sua natureza. Sabe-se que o *grooming* é aumentado tanto em situações estressantes (JOLLES; ROMPA-BARENDREGT; GISPEN, 1979) como naquelas que refletem conforto (KALUEFF, 2000). Neste trabalho, o *grooming* expresso na gaiola moradia e no ambiente novo revelou diferenças qualitativas. Ou seja, o tempo reduzido de *grooming* associado ao aumento da frequência na gaiola moradia do grupo AI pode ser resultado de um ambiente cujo nível de estímulo é baixo. O *grooming* evocado pelo estresse é etimologicamente diferente do *grooming* sem stress e caracterizado por perfis curtos, frequentes e rápidos (KALUEFF, 2000; MOYAHU; VALENCIA, 2002).

Resultados semelhantes foram observados no comportamento de *grooming* de ratos domésticos noruegueses (*Rattus norvegicus*) analisados em silêncio (condição de controle) e na presença de vocalizações de outros roedores (COHEN; PRICE, 1979). Após a exposição ao estímulo auditivo, observou-se aumento

significativo em relação aos níveis do grupo controle no tempo total de *grooming*, frequência de *grooming*, na porcentagem do tempo total atribuível ao *grooming* facial e o número de períodos em que ocorreu o *grooming*. Essas diferenças foram atribuídas a uma atividade deslocada induzida por mudanças ambientais. Assim, as diferenças entre o padrão de higiene nos grupos AI e BI em resposta à nova gaiola podem resultar de uma atividade deslocada. Interessante, o padrão de comportamento de higiene no grupo AI se assemelha a um comportamento estereotipado.

Estes resultados apontam que os fenótipos BI e AI selecionados pelo TSC, apresentam características compatíveis com perfis de resiliência ou não ao estresse e podem ser um importante instrumento não somente no entendimento de transtornos relacionados ao estresse como os próprios mecanismos da experiência em si. De acordo com Rutten e colaboradores (2013), ao se considerar a resposta comportamental de um organismo frente a diferentes estímulos, é necessário incluir uma ampla gama de fatores moleculares e celulares dinâmicos, bem como de mecanismos biológicos distintos que medeiam e modulam a forma como esse organismo vivencia as experiências. Tais mecanismos regulariam a sensibilidade e plasticidade do SNC e atuariam em vários níveis biológicos distintos, como por exemplo, na neurogênese, na mielinização de axônios e alterações ao número de espinhas dendríticas, alterações genéticas e epigenéticas, entre outros. Assim, pode-se imaginar que a interferência em qualquer um desses níveis pode resultar em diferentes impactos sobre a forma como o organismo irá responder ao estresse, ou seja, ele é dependente de uma série de fatores ambientais e genéticos durante a vida.

Além dos testes TPS e ST, também foi avaliado a atividade geral em CA e o comportamento tipo ansioso dos animais na CCE. Não foram observados efeitos distintos do estresse entre os animais de comportamento BI e AI. Em relação ao campo aberto, observou-se que camundongos AI apresentaram maiores diferenças pré e pós-estresse quando comparados aos BI. Assim, enquanto camundongos AI apresentam maior frequência de movimentação e parada no período pós-estresse, camundongos BI não apresentam qualquer diferença pré e pós estresse. Quanto aos tempos de movimentação e parada, ambos os comportamentos apresentam menor movimentação e maior tempo de parada no período pós-estresse.

Na CCE, verificou-se diferenças somente quanto ao período pré e pós-estresse, tendo camundongos BI e AI apresentado padrão semelhante de resposta com menor frequência de transição entre os compartimentos claro e escuro e menor latência para essa transição no período pós-estresse. Foi observado também menor tempo de permanência na zona clara e maior na escura sempre no período pós-estresse. Esses resultados apontam que, tanto nos parâmetros referentes a ansiedade quanto a atividade motora em campo aberto, apesar dos próprios testes implicarem algum tipo de estresse, estes não foram suficientes para evocar respostas distintas entre os animais BI e AI. É possível especular um envolvimento diferenciado do eixo HHA nos modelos comportamentos estudados e que o tipo de estímulo se revela fundamental na resposta investigada.

Com a finalidade de verificar como esses animais reagiriam ao estresse de contenção, o grau de estresse foi analisado por meio dos níveis da corticosterona sérica. Essa análise foi feita em três momentos diferentes: antes, imediatamente após e uma hora após o estresse de contenção, uma vez que estudos temporais de corticosterona após o estresse indicam níveis máximos desse hormônio entre 30 e 60 minutos após a exposição a um estressor (MARTÍ et al., 2001).

No primeiro dia de estresse, não foram observadas diferenças nos níveis de corticosterona entre os grupos BI e AI antes e imediatamente após o estresse; no entanto, uma hora após o estresse os níveis hormonais foram maiores nos animais AI em relação aos BI. Imediatamente após o estresse, a ausência de diferenças entre os grupos pode resultar de uma liberação maciça do hormônio em resposta à contenção. Assim, a recuperação dos níveis de corticosterona após o estresse de contenção levou mais tempo nos animais AI em comparação com os BI, sugerindo uma menor adaptação ao estresse do perfil AI.

Após três dias de estresse, em todos os momentos de avaliação, o grupo AI apresentou aumento nos níveis de corticosterona em relação aos BI, reforçando a hipótese de que animais AI apresentam uma adaptação reduzida ao estresse. Assim, pode-se verificar novamente que os camundongos AI foram mais sensíveis do que os BI ao estresse agudo e repetido, reforçando a concepção de um envolvimento diferenciado dos sistemas relacionados ao estresse de camundongos BI, com um perfil resiliente e aqueles do grupo AI, como não resilientes.

Além disso, também foram analisadas as atividades de neurotransmissores e seu possível papel nos comportamentos de resiliência e não resiliência ao estresse. A respeito do comportamento de *grooming*, sabe-se que o hipotálamo desempenha papel crítico no controle da autolimpeza. Existe uma área específica conhecida como "área de *grooming*" hipotalâmica, que consiste em partes do núcleo paraventricular hipotalâmico e da área hipotalâmica dorsal (ROELING et al., 1993). Além disso, o sistema hipotálamo-hipofisário já foi implicado na modulação do *grooming*, já que vários hormônios hipotalâmicos e hipofisários, incluindo os péptidos relacionados ao estresse, o hormônio liberador de corticotropina e o hormônio adrenocorticotrópico, são conhecidos por induzir *grooming* (DUNN; GREEN; ISAACSON, 1979; DUNN et al., 1987).

Além do hipotálamo, múltiplas regiões cerebrais, bem como vários agentes endógenos, podem controlar e regular os comportamentos estereotipados de *grooming*. Diferentes áreas cerebrais estão envolvidas com a modulação geral, coordenação, geração de padrões e sequências de limpeza. O comportamento de higienização também é modulado pelos circuitos límbicos, como a amígdala (KALUEFF; LAPORTE; BERGNER, 2010). A dopamina é um dos neurotransmissores mais importantes envolvido na modulação deste comportamento (SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). Os presentes resultados demonstraram redução da atividade do sistema dopaminérgico hipotalâmico nos animais AI antes do estresse, mas sem diferenças na atividade dopaminérgica do córtex pré-frontal em relação ao grupo BI. Observou-se também que o estresse de contenção repetido aumentou este comportamento dos camundongos AI na gaiola em comparação com o grupo BI e diminuiu a atividade dopaminérgica hipotalâmica. Além disso, no córtex pré-frontal, o estresse diminuiu a atividade do sistema dopaminérgico em animais AI em comparação com os BI, como observado pela menor taxa de renovação de DOPAC e HVA, além da diminuição de HVA após o estresse.

Esses resultados demonstram o envolvimento de múltiplos sistemas associados à resposta ao estresse atuando de forma distinta entre ambos os comportamentos estudados. Nesse sentido, esse trabalho pode contribuir, como uma porta de entrada, no estudo de mecanismos moleculares que demonstram apresentar um papel no desenvolvimento da resiliência bem como aqueles que se

associam aos distúrbios comportamentais relacionados ao estresse (RUTTEN et al., 2013).

Como observado, camundongos não estressados de ambos os fenótipos apresentaram poucas diferenças no comportamento de *grooming* e na neuroquímica central sem a presença do estresse, apesar do aumento da atividade dopaminérgica no mesencéfalo e no hipotálamo. No entanto, após o estresse de contenção repetido, o comportamento de *grooming* dos AI em comparação com os BI foi aumentado e uma diminuição da atividade dopaminérgica hipotalâmica foi observada. Resultados semelhantes foram obtidos quando o *grooming* repetitivo foi examinado em um modelo animal de autismo (KIRSTEN; BERNARDI, 2017). Portanto, o estresse de contenção foi crucial para revelar as diferenças entre os dois comportamentos selecionados pelo TSC.

A este respeito, o neocórtex está envolvido na modulação geral dos movimentos de *grooming*, enviando projeções excitatórias para o estriado e recebendo projeções excitatórias do tálamo e da amígdala (KALUEFF et al., 2015; OBESO; LANCIEGO, 2011). Assim, a diminuição na atividade dopaminérgica do córtex pré-frontal está de acordo com o comportamento de *grooming* aumentado no grupo AI em relação ao BI.

Várias evidências mostram que os neurônios da dopamina na área tegmental ventral, que se projeta para regiões límbicas, reagem a situações estressantes (THIERRY et al., 1976; TRAINOR, 2011), liberando dopamina ou aumentando a circulação da dopamina no núcleo accumbens. Esta rápida resposta à dopamina pode habituar-se quando o estresse de restrição é repetido diariamente. Além disso, uma onda de liberação de dopamina sempre ocorre imediatamente após camundongos serem removidos dos tubos de estresse de contenção (IMPERATO et al., 1992). Os presentes resultados mostrando aumento no *turnover* de dopamina/DOPAC mesolímbica em camundongos AI imediatamente e após uma hora de estresse também estão de acordo com o aumento do comportamento de *grooming* nos animais AI em relação aos BI. Assim, essas alterações dopaminérgicas não foram restritas a uma área do cérebro, mas ao hipotálamo, ao córtex pré-frontal e ao sistema mesolímbico.

Além das diferenças dopaminérgicas nas estruturas analisadas, também se verificou redução da atividade serotoninérgica no CPF, hipotálamo e sistema

mesolímbico. Importantes correlações entre diminuição de 5HT e seu precursor triptofano, bem como seu metabólito 5HIAA já foram feitas com os transtornos depressivos e ansiosos em experimentos com animais e estudos *post mortem* em seres humanos com depressão vítimas de suicídio. Essas análises revelaram mudanças em transportadores e receptores de 5HT no CPF (DAHLSTRÖM et al., 2000) e, como observado nos presentes resultados, aumento na taxa de renovação no mesencéfalo.

É possível relacionar a redução da atividade serotoninérgica aos resultados citocinérgicos, particularmente de TNF- α . Essa citocina apresenta importante participação no sistema imunológico e se relaciona com praticamente todos os circuitos patológicos relevantes ao comportamento depressivo (POSTAL; APPENZELLER, 2015). Sabe-se que TNF- α pode regular a atividade neuronal de transportadores de 5HT, além de estimular a indolamina 2, 3-dioxigenase (IDO) que, sequestrando triptofano, pode afetar a disponibilidade de 5HT (BERTHOLD-LOSLEBEN; HIMMERICH, 2008). Nesse sentido, o aumento observado na expressão relativa de TNF- α em animais AI após a exposição ao estresse pode estar relacionado às menores concentrações de 5HT tanto na região mesolímbica como no hipotálamo e CPF. Além disso, serotonina e respectivo metabólito 5HIAA, juntamente com o metabólito dopaminérgico HVA e NA são responsáveis em explicar 68,7% da variância total observada nos resultados do CPF.

A serotonina e seu metabólito também apresentaram grande participação nas diferenças observadas no hipotálamo (27,7%) e mesencéfalo (24%), embora essas estruturas também demonstrem participação elevada dos metabólitos dopaminérgicos, principalmente no hipotálamo, como DOPAC (11,7%) e seu *turnover* (10,2%) e HVA (16,9) e seu *turnover* (14,6%). Contudo, somente a região mesolímbica apresentou um envolvimento direto da DA (9,9%) na variância total observada.

Além do envolvimento dessas regiões, as alterações observadas em neurotransmissores, principalmente na 5HT, não necessariamente apontam para a presença de um comportamento tipo-depressivo associado, como geralmente é observado em casos de depressão, tal como a diminuição das concentrações serotoninérgicas. Contudo, esses dados demonstram que os sistemas associados às doenças mentais se encontram ativos e repercutindo no organismo. Como

descrito anteriormente, essas respostas podem estar diretamente relacionadas à natureza do estímulo. Nesse sentido, é possível especular que estresses mais prolongados ou mesmo diferentes dos que utilizados neste trabalho possam direcionar esse organismo a um espectro diferente, aproximando-se mais do que é observado em quadros de depressão ou mesmo outros transtornos.

Outro neurotransmissor particularmente relevante no desenvolvimento do comportamento depressivo é a noradrenalina e estudos recentes apontam para papéis específicos quanto à atuação desse neurotransmissor na fisiopatologia da depressão, tal como regulação cognitiva, motivação e intelecto (MORET; BRILEY, 2011). Estudos sobre pacientes em remissão de sintomas depressivos mostram que reduções drásticas de NA resultam no resurgimento desses sintomas. Entretanto, tais reduções de NA em pacientes controles saudáveis não levam ao surgimento de comportamentos depressivos (DELGADO; MORENO, 2000)(RUHÉ; MASON; SCHENE, 2007).

Os resultados da ACP também mostraram que a NA tem participação relevante na variância total observada em todas as estruturas analisadas. Curiosamente, sua maior participação é no CPF (16,6%), estrutura amplamente envolvida com o controle cognitivo associado a atividade noradrenérgica (EL MANSARI et al., 2010), seguido do hipotálamo (15,9%) e mesencéfalo (14%).

Também se observou uma forte correlação entre NA e comportamento de baixa imobilidade após estresse tanto no CPF, quanto no hipotálamo e mesencéfalo. Assim, é possível especular que o sistema noradrenérgico dos animais BI seria menos responsivo ao estresse de contenção do que daqueles dos animais AI. Desse modo, diferente dos animais AI que demonstraram expressar uma hipersensibilidade ou ativação crônica dos sistemas noradrenérgicos – relacionado, por sua vez, ao fenótipo de desamparo aprendido, animais BI, de maneira oposta, expressariam um comportamento de resiliência ao estresse (SOUTHWICK et al., 2012).

8 CONCLUSÕES

Foi possível concluir que os comportamentos de alta e baixa imobilidade selecionado pelo TSC apresentam um perfil compatível com não resiliente e resiliente ao estresse de contenção repetido de 2 horas, respectivamente. Essa conclusão difere de trabalhos conduzidos em nossos laboratórios, no qual os comportamentos selecionados pelo TSC foram pensados como comportamentos tipo-depressivos. Nossos resultados demonstram que os sistemas relacionados ao estresse, embora estejam ativados, os animais não se enquadram em um espectro de psicopatologia, mas sim, uma proto patologia. Nesse sentido, o que se revela determinante no desenvolvimento dos transtornos relacionados ao estresse seria a natureza do estímulo estressor.

Também concluímos que as respostas comportamentais analisadas, principalmente aquelas observadas no *grooming* e vocalização ultrassônica são dependentes do estresse e relacionadas com o comportamento estudado. Também concluímos que as concentrações de neurotransmissores no CPF, hipotálamo e mesencéfalo se mostraram dependentes aos comportamentos estudados e relacionados ao estresse, bem como a expressão relativa das citocinas avaliadas.

Acreditamos que esses resultados possam contribuir com uma maior compreensão desses parâmetros e permitir aprofundar o entendimento do que leva ou não organismos distintos a responder de forma resiliente ou com um transtorno psicopatológico a um mesmo evento de estresse.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADER, R. Psychoneuroimmunology. **Current Directions In Psychological Science**, v. 10, n. 3, p. 94–101, 2001.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782–7, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963608>>.
- ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. [Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 29, n. 4, p. 363–369, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17713698>>.
- ANISMAN, H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 34, n. 1, p. 4–20, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125209>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2612083>>.
- ARCHER, J. **Tests for emotionality in rats and mice: A review** **Animal Behaviour**, 1973. .
- AVITSUR, R.; POLLAK, Y.; YIRMIYA, R. Different receptor mechanisms mediate the effects of endotoxin and interleukin-1 on female sexual behavior. **Brain Research**, v. 773, n. 1–2, p. 149–161, 1997.
- BAHLS, S.-C. Depressão: uma breve revisão dos fundamentos biológicos e cognitivos. **Interação em Psicologia**, v. 3, p. 49–60, 2005. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/psicologia/article/view/7660>>.
- BERTHOLD-LOSLEBEN, M.; HIMMERICH, H. The TNF- α System: Functional Aspects in Depression, Narcolepsy and Psychopharmacology. **Current Neuropharmacology**, v. 6, n. 3, p. 193–202, 2008. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1570-159X&volume=6&issue=3&spage=193>>.
- BLACK, P. H.; GARBUTT, L. D. **Stress, inflammation and cardiovascular disease** **Journal of Psychosomatic Research**, 2002. .
- BORSBOOM, D. A network theory of mental disorders. **World Psychiatry**, v. 16, n. 1, p. 5–13, 2017.
- BORSBOOM, D.; CRAMER, A. O. J. Network Analysis: An Integrative Approach to

- the Structure of Psychopathology. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 9, n. 1, p. 91–121, 2013. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-clinpsy-050212-185608>>.
- BRACHA, H. S. Freeze, Flight, Fight, Fright, Faint: Adaptationist Perspectives on the Acute Stress Response Spectrum. **CNS Spectrums**, v. 9, n. 9, p. 679–685, 2004. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1092852900001954>.
- BUTLER, G. Definitions of stress. **Occasional paper (Royal College of General Practitioners)**, n. 61, p. 1–5, 1993.
- CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOLT, R. D. Rodent models of depression: Forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current Protocols in Neuroscience**, 2011.
- CATTANEO, A.; RIVA, M. A. **Stress-induced mechanisms in mental illness: A role for glucocorticoid signalling** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2016. .
- CHARNEY, D. S. **The psychobiology of resilience and vulnerability to anxiety disorders: Implications for prevention and treatment** *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2003. .
- COHEN, B. E.; PANGULURI, P.; NA, B.; WHOOLEY, M. A. Psychological risk factors and the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease: Findings from the Heart and Soul Study. **Psychiatry Research**, v. 175, n. 1–2, p. 133–137, 2010.
- COHEN, J. A.; PRICE, E. O. Grooming in the Norway rat: Displacement activity or “boundary-shift”? **Behavioral and Neural Biology**, v. 26, n. 2, p. 177–188, 1979.
- COHEN, S.; JANICKI-DEVERTS, D.; MILLER, G. E. Psychological stress and disease. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 14, p. 1685–1687, 2007. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.298.14.1685>>.
- COOK, S. C.; WELLMAN, C. L. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **Journal of Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 236–248, 2004.
- COPPENS, C. M.; DE BOER, S. F.; KOOLHAAS, J. M. Coping styles and behavioural flexibility: towards underlying mechanisms. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1560, p. 4021–4028, 2010. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2010.0217>>.

- COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune interactions in stress. In: *NeuroImmunoModulation*, 3, **Anais...**2010.
- CRAMER, A. O. J.; WALDORP, L. J.; VAN DER MAAS, H. L. J.; BORSBOOM, D. Comorbidity: A network perspective. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 33, n. 2–3, p. 137–150, 2010. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0140525X09991567>.
- CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 571–625, jan. 2005.
- DAHLSTRÖM, M.; AHONEN, a; EBELING, H.; TORNIAINEN, P.; HEIKKILÄ, J.; MOILANEN, I. Elevated hypothalamic/midbrain serotonin (monoamine) transporter availability in depressive drug-naïve children and adolescents. **Molecular psychiatry**, v. 5, p. 514–522, 2000.
- DANTZER, R.; O'CONNOR, J. C.; FREUND, G. G.; JOHNSON, R. W.; KELLEY, K. W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46–56, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn2297>>.
- DEAK, T.; NGUYEN, K. T.; FLESHNER, M.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Acute stress may facilitate recovery from a subcutaneous bacterial challenge. **NeuroImmunoModulation**, v. 6, n. 5, p. 344–354, 1999.
- DEAK, T.; QUINN, M.; CIDLOWSKI, J. A.; VICTORIA, N. C.; MURPHY, A. Z.; SHERIDAN, J. F. Neuroimmune mechanisms of stress: sex differences, developmental plasticity, and implications for pharmacotherapy of stress-related disease. **Stress**, v. 18, n. 4, p. 367–380, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10253890.2015.1053451>>.
- DEDOVIC, K.; D'AGUIAR, C.; PRUESSNER, J. C. What stress does to your brain: a review of neuroimaging studies. **Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie**, v. 54, n. 1, p. 6–15, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19175975>>.
- DELGADO, P. L.; MORENO, F. A. **Role of norepinephrine in depression** *Journal of Clinical Psychiatry*, 2000. .
- DENES, A.; MIYAN, J. A. Brain-immune interactions in health and disease. **Frontiers**

in **Neuroscience**, v. 8, n. DEC, 2014.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Effects of Stress on Immune Cell Distribution - Dynamics and Hormonal Mechanisms. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 10, p. 5511–5527, 1995.

DHABHAR, F. S.; SAUL, A. N.; HOLMES, T. H.; DAUGHERTY, C.; NERI, E.; TILLIE, J. M.; KUSEWITT, D.; OBERYSZYN, T. M. High-anxious individuals show increased chronic stress burden, decreased protective immunity, and increased cancer progression in a mouse model of squamous cell carcinoma. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e33069, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3338811&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DOCKRELL, H. M. The Cytokine Handbook. **Immunology**, v. 78, n. 2, p. 339, 1993.

DRUGAN, R. C.; SKOLNICK, P.; PAUL, S. M.; CRAWLEY, J. N. A pretest procedure reliably predicts performance in two animal models of inescapable stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 33, n. 3, p. 649–654, 1989.

DRUGAN, R. C.; WARNER, T. A.; PAPALLO, T. A.; CASTRACANE, L. L.; STAFFORD, N. P. Ultrasonic vocalizations during intermittent swim stress forecasts resilience in subsequent forced swim and spatial learning tests. **Behavioural Brain Research**, v. 259, p. 41–44, 2014.

DUCOTTET, C.; BELZUNG, C. Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: Evidence from inbred strains of mice. **Behavioural Brain Research**, v. 156, n. 1, p. 153–162, 2005.

DUNLOP, B. W.; NEMEROFF, C. B. **The role of dopamine in the pathophysiology of depression** *Archives of General Psychiatry*, 2007. .

DUNN, A. J.; BERRIDGE, C. W.; LAI, Y. I.; YACHABACH, T. L. CRF-induced excessive grooming behavior in rats and mice. **Peptides**, v. 8, n. 5, p. 841–844, 1987.

DUNN, A. J.; GREEN, E. J.; ISAACSON, R. L. Intracerebral adrenocorticotrophic hormone mediates novelty-induced grooming in the rat. **Science (New York, N.Y.)**, v. 203, n. 4377, p. 281–283, 1979.

EL MANSARI, M.; GUIARD, B. P.; CHERNOLOZ, O.; GHANBARI, R.; KATZ, N.; BLIER, P. **Relevance of norepinephrine-dopamine interactions in the treatment of major depressive disorder** *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 2010. .

- ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 966, n. 1, p. 290–303, 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04229.x>><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114286>>.
- FEDER, A.; NESTLER, E. J.; CHARNEY, D. S. Psychobiology and molecular genetics of resilience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 446–457, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn2649>>.
- FLESHNER, M.; MAIER, S. F.; LYONS, D. M.; RASKIND, M. a. The neurobiology of the stress-resistant brain. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 14, n. 5, p. 498–502, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3287388&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- FREITAS, A. E.; MACHADO, D. G.; BUDNI, J.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; LOPES, M. W.; DE SOUZA, L. F.; VERONEZI, P. O.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTI, M. G.; DAFRE, A. L.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like action of the bark ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in the olfactory bulbectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 3, p. 737–745, 2013.
- FUJISHIRO, J.; IMANISHI, T.; BABA, J.; KOSAKA, K. Comparison of noradrenergic and serotonergic antidepressants in reducing immobility time in the tail suspension test. **Japanese journal of pharmacology**, v. 85, n. 3, p. 327–30, 2001.
- FURMAN, D. J.; CHEN, M. C.; GOTLIB, I. H. Variant in oxytocin receptor gene is associated with amygdala volume. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 6, p. 891–897, 2011.
- GAGLIANO, H.; FUENTES, S.; NADAL, R.; ARMARIO, A. Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary-adrenal responses. **Behavioural Brain Research**, v. 187, n. 2, p. 239–245, 2008.
- GONCHAROVA, N. D. **Stress responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Age-related features of the vasopressinergic regulation** *Frontiers in Endocrinology*, 2013. .
- HEIM, C.; NEWPORT, D. J.; MLETZKO, T.; MILLER, A. H.; NEMEROFF, C. B. The

link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 6, p. 693–710, 2008.

HETTEMA, J. M.; AN, S. S.; BUKSZAR, J.; VAN DEN OORD, E. J. C. G.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S.; CHEN, X. Catechol-O-Methyltransferase Contributes to Genetic Susceptibility Shared Among Anxiety Spectrum Phenotypes. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 4, p. 302–310, 2008.

HYLAND, M. E. **The Origins of Health and Disease**. [s.l: s.n.]

HYMAN, S. E. The genetics of mental illness implications for practice. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 4, p. 455–463, 2000.

IMPERATO, A.; ANGELUCCI, L.; CASOLINI, P.; ZOCCHI, A.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Repeated stressful experiences differently affect limbic dopamine release during and following stress. **Brain Research**, v. 577, n. 2, p. 194–199, 1992.

JEONG, Y. H.; PARK, C. H.; YOO, J.; SHIN, K. Y.; AHN, S.-M.; KIM, H.-S.; LEE, S. H.; EMSON, P. C.; SUH, Y.-H. Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, p. 729–731, 2006.

JOLLES, J.; ROMPA-BARENDREGT, J.; GISPEN, W. H. Novelty and grooming behavior in the rat. **Behavioral and Neural Biology**, v. 25, n. 4, p. 563–572, 1979.

KALUEFF, A. Measuring grooming in stress and comfort. In: Proceedings of Measuring Behaviour, 3rd International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research., Nijmegen, The Netherlands. **Anais...** Nijmegen, The Netherlands: 3rd International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research, 2000.

KALUEFF, A.; LAPORTE, J. L.; BERGNER, C. **Neurobiology of Grooming Behavior**. [s.l.] Cambridge University Press, 2010.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; SONG, C.; BERRIDGE, K. C.; GRAYBIEL, A. M.; FENTRESS, J. C. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59, 2015.

KARAM, E. G.; FRIEDMAN, M. J.; HILL, E. D.; KESSLER, R. C.; MCLAUGHLIN, K. A.; PETUKHOVA, M.; SAMPSON, L.; SHAHLY, V.; ANGERMEYER, M. C.; BROMET, E. J.; DE GIROLAMO, G.; DE GRAAF, R.; DEMYTTENAERE, K.; FERRY,

- F.; FLORESCU, S. E.; HARO, J. M.; HE, Y.; KARAM, A. N.; KAWAKAMI, N.; KOVESS-MASFETY, V.; MEDINA-MORA, M. E.; BROWNE, M. A. O.; POSADA-VILLA, J. A.; SHALEV, A. Y.; STEIN, D. J.; VIANA, M. C.; ZARKOV, Z.; KOENEN, K. C. Cumulative traumas and risk thresholds: 12-month ptsd in the world mental health (WMH) surveys. **Depression and Anxiety**, v. 31, n. 2, p. 130–142, 2014.
- KELLER, J.; GOMEZ, R.; WILLIAMS, G.; LEMBKE, A.; LAZZERONI, L.; MURPHY, G. M.; SCHATZBERG, A. F. HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 4, p. 527–536, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/mp.2016.120>>.
- KIRSTEN, T. B.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. **Behavioural Brain Research**, v. 331, p. 25–29, 2017.
- KIRSTEN, T. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; CHAIBLE, L. M.; SILVA, A. C.; MARTINS, D. O.; BRITTO, L. R. G.; DAGLI, M. L. Z.; TORRÃO, A. S.; PALERMONETO, J.; BERNARDI, M. M. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, n. 10, p. 1903–1912, 2012.
- KRONFOL, Z.; SILVA, J.; GREDEN, J.; DEMBINSKI, S.; GARDNER, R.; CARROLL, B. Impaired lymphocyte function in depressive illness. **Life Sciences**, v. 33, n. 3, p. 241–247, 1983.
- KULESSKAYA, N.; VOIKAR, V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. **Physiology and Behavior**, v. 133, p. 30–38, 2014.
- LAPIN, I. P.; OXENKRUG, G. F. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. **The Lancet**, v. 293, n. 7586, p. 132–136, 1969.
- LITVIN, Y.; BLANCHARD, C. D.; BLANCHARD, R. J. Rat 22kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. **Behavioural Brain Research**, v. 182, n. 2, p. 166–172, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432806006528>>.
- LUCAS, L. R.; WANG, C. J.; MCCALL, T. J.; MCEWEN, B. S. Effects of

immobilization stress on neurochemical markers in the motivational system of the male rat. **Brain Research**, v. 1155, n. 1, p. 108–115, 2007.

MACHT, M.; HAUPT, C.; ELLGRING, H. The perceived function of eating is changed during examination stress: A field study. **Eating Behaviors**, v. 6, n. 2, p. 109–112, 2005.

MAES, M. **Evidence for an immune response in major depression: A review and hypothesis** *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 1995. .

MAES, M.; FIŠAR, Z.; MEDINA, M.; SCAPAGNINI, G.; NOWAK, G.; BERK, M. **New drug targets in depression: Inflammatory, cell-mediate immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. and new drug candidates-Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors** *Inflammopharmacology*, 2012. .

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R.; MAIER, F. Cytokines for Psychologists: Implications of Bidirectional Immune-to- Brain Communication for Understanding Behavior, Mood, and Cognition. **Psychological Review**, v. 105, n. 1, p. 83–107, 1998. Disponível em: <<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0033-295X.105.1.83>>.

MARQUES, A. H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. **Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders** *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2007. .

MARTÍ, O.; GARCÍA, A.; VALLÈS, A.; HARBUZ, M.; ARMARIO, A. Evidence that a single exposure to aversive stimuli triggers long-lasting effects in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis that consolidate with time. **Eur J Neurosci. Erratum in: Eur J Neurosci. 2004 ,20(4):1131**, v. 13(1):129-, n. 1, p. 129–136, 2001.

MCEWEN, B. S. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 933, p. 265–277, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000027>>.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 873–904, 2007.

MCKINNEY, W. T. Animal models of depression: an overview. **Psychiatric developments**, v. 2, n. 2, p. 77–96, 1984. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L14796039%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=02629283&id=doi:&a title=Animal+models+of+depression:+an+overview.&stitle=Psychiatr+Dev&title=Psyc>>

hiatric+developments&vo>.

MILLER, A. H. Inflammation Versus Glucocorticoids as Purveyors of Pathology During Stress: Have We Reached the Tipping Point? **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 4, p. 263–265, 2008.

MITCHELL, C.; HOBcraft, J.; MCLANAHAN, S. S.; SIEGEL, S. R.; BERG, A.; BROOKS-GUNN, J.; GARFINKEL, I.; NOTTERMAN, D. Social disadvantage, genetic sensitivity, and children's telomere length. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 16, p. 5944–5949, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1404293111>>.

MORENO-SMITH, M.; LUTGENDORF, S. K.; SOOD, A. K. Impact of stress on cancer metastasis. **Future oncology (London, England)**, v. 6, n. 12, p. 1863–81, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21142861>%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3037818>.

MORET, C.; BRILEY, M. The importance of norepinephrine in depression. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 7, n. SUPPL., p. 9–13, 2011.

MOYAH, A.; VALENCIA, J. Grooming and yawning trace adjustment to unfamiliar environments in laboratory Sprague-Dawley rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 116, n. 3, p. 263–269, 2002.

MUSSELMAN, D. L.; LAWSON, D. H.; GUMNICK, J. F.; MANATUNGA, A. K.; PENNA, S.; GOODKIN, R. S.; GREINER, K.; NEMEROFF, C. B.; MILLER, A. H. Paroxetine for the Prevention of Depression Induced by High-Dose Interferon Alfa. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 13, p. 961–966, 2001. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200103293441303>>.

NESTLER, E. J.; GOULD, E.; MANJI, H. Preclinical models: Status of basic research in depression. **Biological Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 503–528, 2002.

NIITSU, K.; HOUFEK, J. F.; BARRON, C. R.; STOLTENBERG, S. F.; KUPZYK, K. A.; RICE, M. J. A Concept Analysis of Resilience Integrating Genetics. **Issues in mental health nursing**, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01612840.2017.1350225>%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28766971>.

NIKULINA, V.; WIDOM, C. S.; BRZUSTOWICZ, L. M. **Child abuse and neglect, MAOA, and mental health outcomes: A prospective examination** **Biological**

Psychiatry, 2012. .

NUNES, S. O. V.; REICHE, E. M. V.; MORIMOTO, H. K.; MATSUO, T.; ITANO, E. N.; XAVIER, E. C. D.; YAMASHITA, C. M.; VIEIRA, V. R.; MENOLI, A. V.; SILVA, S. S.; COSTA, F. B.; REICHE, F. V.; SILVA, F. L. V.; KAMINAMI, M. S. Immune and hormonal activity in adults suffering from depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 581–587, 2002.

OBESO, J. A.; LANCIEGO, J. L. Past, Present, and Future of the Pathophysiological Model of the Basal Ganglia. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 5, 2011.

PALMA, B. D.; TIBA, P. A.; MACHADO, R. B.; TUFIK, S.; SUCHECKI, D. **Immune outcomes of sleep disorders: The hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a modulatory factor** *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2007. .

POSTAL, M.; APPENZELLER, S. **The importance of cytokines and autoantibodies in depression** *Autoimmunity Reviews*, 2015. .

RADLEY, J. J.; KABBAJ, M.; JACOBSON, L.; HEYDENDAEL, W.; YEHUDA, R.; HERMAN, J. P. Stress risk factors and stress-related pathology: neuroplasticity, epigenetics and endophenotypes. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 14, n. 5, p. 481–97, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21848436>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3641164>>.

REIS-SILVA, T. M.; COHN, D. W. H.; SANDINI, T. M.; UDO, M. S. B.; TEODOROV, E.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide exposure affects sexual dimorphism in different germ lines of mice with a depressive phenotype. **Life Sciences**, v. 149, p. 129–137, 2016.

ROELING, T. A. P.; VEENING, J. G.; PETERS, J. P. W.; VERMELIS, M. E. J.; NIEUWENHUYIS, R. Efferent connections of the hypothalamic “grooming area” in the rat. **Neuroscience**, v. 56, n. 1, p. 199–225, 1993.

RUHÉ, H. G.; MASON, N. S.; SCHENE, A. H. **Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: A meta-analysis of monoamine depletion studies** *Molecular Psychiatry*, 2007. .

RUTTEN, B. P. F.; HAMMELS, C.; GESCHWIND, N.; MENNE-LOTHMANN, C.; PISHVA, E.; SCHRUERS, K.; VAN DEN HOVE, D.; KENIS, G.; VAN OS, J.; WICHERS, M. **Resilience in mental health: Linking psychological and neurobiological perspectives** *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 2013. .

- SADLER, A. M.; BAILEY, S. J. Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. **Physiology and Behavior**, v. 167, p. 313–323, 2016.
- SATHYANESAN, M.; HAIAR, J. M.; WATT, M. J.; NEWTON, S. S. Restraint stress differentially regulates inflammation and glutamate receptor gene expression in the hippocampus of C57BL/6 and BALB/c mice. **Stress**, v. 20, n. 2, p. 197–204, 2017.
- SCHIEPERS, O. J. G.; WICHERS, M. C.; MAES, M. **Cytokines and major depression** *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2005. .
- SCHILDKRAUT, J. J. **The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence**. *The American journal of psychiatry*, 1965. .
- SELYE, H. A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, 1998.
- SONG, C.; LEONARD, B. E. **The olfactory bulbectomised rat as a model of depression** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2005. .
- SOUNG, N. K.; KIM, B. Y. Psychological stress and cancer. **Journal of Analytical Science and Technology**, 2015. Disponível em: <<https://search.proquest.com/docview/1811660276/53702CE9D31F43A0PQ/10?accountid=33171>>.
- SOUTHWICK, S. M.; BONANNO, G. A.; MASTEN, A. S.; PANTER-BRICK, C.; YEHUDA, R. Resilience definitions, theory, and challenges: Interdisciplinary perspectives. **European Journal of Psychotraumatology**, v. 5, 2014.
- SOUTHWICK, S. M.; LITZ, B. T.; CHARNEY, D.; MATTHEW, J. Resilience and mental health: Challenges across the lifespan. **Journal of nervous and mental diseases**, v. 200, n. 8, p. 734–734, 2012.
- SOUTHWICK, S. M.; VYTHILINGAM, M.; CHARNEY, D. S. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. **Annual review of clinical psychology**, v. 1, p. 255–91, 2005.
- SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological review**, v. 72, n. 3, p. 825–852, 1992.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p.

367–370, 1985.

TAKATSU-COLEMAN, A. L.; PATTI, C. L.; ZANIN, K. A.; ZAGER, A.; CARVALHO, R. C.; BORÇOI, A. R.; CECCON, L. M. B.; BERRO, L. F.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L.; FRUSSA-FILHO, R. Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: Mood-congruent memory in male mice? **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 38, n. 4, p. 259–268, 2013.

TANK, A. W.; WONG, D. L. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2015.

THAKER, P. H.; HAN, L. Y.; KAMAT, A. A.; AREVALO, J. M.; TAKAHASHI, R.; LU, C.; JENNINGS, N. B.; ARMAIZ-PENA, G.; BANKSON, J. A.; RAVOORI, M.; MERRITT, W. M.; LIN, Y. G.; MANGALA, L. S.; KIM, T. J.; COLEMAN, R. L.; LANDEN, C. N.; LI, Y.; FELIX, E.; SANGUINO, A. M.; NEWMAN, R. A.; LLOYD, M.; GERSHENSON, D. M.; KUNDRA, V.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; LUTGENDORF, S. K.; COLE, S. W.; SOOD, A. K. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. **Nature Medicine**, v. 12, n. 8, p. 939–944, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nm1447>>.

THIERRY, A. M.; TASSIN, J. P.; BLANC, G.; GLOWINSKI, J. Selective activation of the mesocortical DA system by stress. **Nature**, v. 263, n. 5574, p. 242–244, 1976.

TRAINOR, B. C. Stress responses and the mesolimbic dopamine system: social contexts and sex differences. **Hormones and behavior**, v. 60, n. 5, p. 457–469, 2011.

URAKUBO, A.; JARSKOG, L. F.; LIEBERMAN, J. A.; GILMORE, J. H. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. **Schizophrenia Research**, v. 47, n. 1, p. 27–36, 2001.

VAN DER WERFF, S. J. A.; VAN DEN BERG, S. M.; PANNEKOEK, J. N.; ELZINGA, B. M.; VAN DER WEE, N. J. A. Neuroimaging resilience to stress: a review. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2013.00039/abstract>>.

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Depression, antidepressants and immune system: A new look to an old problem. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, n. 5, p. 196–204, 2008. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/rpc/v35n5/a04v35n5.pdf%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed8&AN=2008590703%5Cnhttp://eleanor.lib.gla.ac.uk:4550/resserv?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:10.1590/S0101-60832008000500004&issn=0>>.

WEINER, B.; HERTZ, S.; PERETS, N.; LONDON, M. Social Ultrasonic Vocalization in Awake Head-Restrained Mouse. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, 2016. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2016.00236/full>>.

WEST, D.; MAES, M. **Major depression and activation of the inflammatory response system** *Ceska a Slovenska Psychiatrie*, 1999. .

WILSON, D. R.; WARISE, L. Cytokines and their role in depression. **Perspectives in Psychiatric Care**, v. 44, n. 4, p. 285–289, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mental Health Action Plan 2013-2020. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, p. 1–44, 2013. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/89966/1/9789241506021_eng.pdf?ua=1%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/89966/1/9789241506021_eng.pdf>.

WU, G.; FEDER, A.; COHEN, H.; KIM, J. J.; CALDERON, S.; CHARNEY, D. S.; MATHÉ, A. A. Understanding resilience. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, 2013. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2013.00010/abstract>>.

YALCIN, I.; AKSU, F.; BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **European Journal of Pharmacology**, v. 514, n. 2–3, p. 165–174, 2005.

10 ANEXOS

10.1 Certificado de aprovação da comissão de ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunes do estresse de contenção em camundongos de alta e baixa imobilidade selecionados pelo teste de suspensão da cauda.", protocolada sob o CEUA nº 3925110614, sob a responsabilidade de **Maria Martha Bernardi e equipe; Thiago Marinho Reis E Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 12/11/2014.

We certify that the proposal "Behavioral, neurochemical and immune effects of restraint stress in mice of high e low immobility time selected by the tail suspension test", utilizing 150 Heterogenics mice (150 males), protocol number CEUA 3925110614, under the responsibility of **Maria Martha Bernardi and team; Thiago Marinho Reis E Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/12/2014.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2014** a **06/2018** Área: **Neurociência E Comportamento**

Origem: **Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP**

Espécie: **Camundongos heterogênicos** sexo: **Machos** idade: **a** N: **150**

Linhagem: **Swiss** Peso: **a**

Resumo: Em minha dissertação de mestrado desenvolvi um modelo animal transgeracional de depressão após exposição materna ao lipopolissacarídeo (LPS) na gestação. O LPS é uma endotoxina bacteriana, frequentemente empregada em estudos com animais para ativar o sistema imune, levando a liberação de citocinas e, mimetizando assim, diversos aspectos ligados à inflamação. Nos resultados desse trabalho observamos que animais selecionados pelo teste de suspensão da cauda (TSC) e classificados como depressivos e não depressivos apresentaram mais descendentes com o mesmo comportamento nas três gerações estudadas, sendo esse um forte indicativo de componentes genéticos na transmissão do comportamento. Mais importante, nossos resultados sugeriram que esses comportamentos podem ser um fator determinante na resposta transgeracional à inflamação decorrente da administração da endotoxina no terço final da gestação. Assim, o presente projeto visa aprofundar esses achados utilizando o TSC para selecionar os comportamentos depressivo e não depressivo, com o objetivo de investigar em três gerações de camundongos machos, cuja geração parental receberá na gestação o LPS: (i) os efeitos transgeracionais da administração pré-natal do LPS sob o comportamento depressivo e não depressivo em outro modelo de depressão; (ii) as possíveis diferenças nos níveis plasmáticos de citocinas e corticosterona sérica e, (iii) as possíveis alterações em neurotransmissores amigdalares, hipotalâmicos, estriais e do córtex pré-frontal. Além disso, as gerações serão submetidas ao estresse de contenção, com a finalidade de revelar possíveis alterações decorrentes da exposição pré-natal ao LPS e, que por mecanismos compensatórios, não sejam revelados na idade adulta.

Local do experimento:

São Paulo, 18 de dezembro de 2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo