JOSÉ PEREIRA JUNIOR

**Estudo dos telômeros em tecido hipocampal de
camundongos submetidos a um estresse
psicossocial prolongado**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Psiquiatria

Orientadora: Profa. Dra. Silvana
Chiavegatto

São Paulo

2008

À ciência e evolução do conhecimento humano, dedico.

***Se quer possuir cidades, é preciso
construir estradas*** – parte da letra de
Comanche (Cake)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Prof. Dra. Silvana Chiavegatto, pois é certo que tornaria possível a realização deste projeto independente de quaisquer adversidades. Pelo seu entusiasmo, dedicação, sabedoria, metodologia, amizade e, principalmente, por me abrir as portas da neurociência... Eternamente agradecido!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio recebido durante parte da realização deste projeto, à Hamilton-Kinder Foundation e University of Tennessee pela bolsa de estudos concedida para participação em curso internacional, e especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio-pesquisa destinado ao presente trabalho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger pela disponibilização de toda infraestrutura do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor onde foi realizado o presente estudo.

À Profa. Dra. Hiro Goto pelo empréstimo da sala localizada no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP, onde está localizado nosso Biotério.

À Marcela Bermudez Echeverry pelos eternos e incomensuráveis ensinamentos em diversas esferas.

Ao Angelo Mendes Lana pelo sempre presente auxílio dedicado e elucidativo em biologia molecular, fundamentais para a execução deste projeto.

Ao grupo Daniela Borba, Guilherme Ambar, Theo Bibancos, Aline Bacurau além de Marcela Echeverry e Angelo Lana. Tenho certeza que teríamos bastante sucesso juntos.

À Silvana Campos, Isabel Lameirinhas, José Arruda, Jânio dos Santos, Marcilene Floriano, Glória Mota, Daniela Jardim, Carlinhos, Vítor Debas e especialmente Eliza Fukushima por toda a infra-estrutura e constante disponibilidade em ajudar.

Aos pesquisadores Luciene Campos, Ayumi Miyakawa, Thais Borin, Mariliza Velho, Allyson Sampaio, Ana Azambuja, Roberta Cravo, Rafael Soares, Márcio Baejelman, Valério Baraúna, Vinícius Melo e Marilene Pavan pelo auxílio e colaboração durante essa pesquisa.

Aos sensacionais Luizinho, Guima e Fafá.

À minha indescritível FAMÍLIA.

SUMÁRIO

Introdução e Justificativa.....	11
Estresse	11
Hipocampo no Estresse.....	12
Modelo Animal de Estresse Psicossocial.....	13
Telômeros e Telomerase.....	15
Estresse e Telômeros.....	19
Objetivos	23
Materiais e Métodos	24
Animais.....	24
Modelo de Estresse	24
Seleção de animais agressivos	25
Indução do estresse	25
Peso corporal.....	26
Temperatura corporal	27
Sacrifício dos animais	27
Extração do DNA genômico hipocampal	27
Extração do RNA total hipocampal	28
Síntese do DNA complementar (DNA) a partir do RNA	29
Desenho de oligos iniciadores (primers)	30
Extração e dosagem das Proteínas Hipocampais	30
Determinação da concentração plasmática de corticosterona	31
Quantificação do tamanho relativo dos telômeros	31
Quantificação da Transcriptase Reversa da Telomerase (mTert) por PCR em tempo real	32

Ensaios para detecção da atividade da telomerase	34
Análise Estatística	37
Resultados	38
Modelo de estresse.....	38
Peso corporal.....	39
Temperatura corpórea	41
Basal durante estresse prolongado.....	41
Após estresse agudo.....	42
Concentração de corticosterona	44
Efeitos do estresse prolongado no tamanho dos telômeros	
Hipocampus.....	45
Efeito do estresse prolongado na Atividade da enzima Telomerase	45
Efeitos do estresse psicossocial prolongado nos níveis de RNAm da	
subunidade catalítica da telomerase (mTert)	47
Discussão	49
Adequação do modelo de subjugação em camundongos	
como estresse psicossocial prolongado	49
Estresse psicossocial prolongado e tamanho dos telômeros.....	51
Expressão gênica da telomerase e sua atividade enzimática no	
hipocampo após estresse psicossocial prolongado.....	52
Possíveis causas para a redução do tamanho dos telômeros	
no hipocampo	53
Considerações Finais	56
Referências.....	58
Material auxiliar 1	70
Material auxiliar 2.....	71
Material auxiliar 3.....	72
Material auxiliar 4.....	73

Anexo I	75
---------------	----

Pereira-Junior, J. *Estudo dos telômeros em tecido hipocampal de camundongos submetidos a um estresse psicossocial prolongado (dissertação)*. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP; 2008.

O estresse é muito presente na vida das pessoas, e grande parte deste é de origem social. O estresse contínuo induz a uma série de efeitos nocivos no organismo. Estes efeitos também podem ser observados no cérebro, principalmente no hipocampo, onde promove alterações na sua morfologia e função. Recentemente, demonstrou-se uma redução do tamanho dos telômeros em leucócitos de mulheres com alto grau de estresse. Os telômeros são seqüências repetitivas dos nucleotídeos TTAGGG, responsáveis por proteger as extremidades dos cromossomos, e sua manutenção e alongamento é mediado, principalmente, pela enzima telomerase. Telômeros e telomerase têm sido alvos de muitos estudos envolvendo o envelhecimento e morte celular. Assim, o presente trabalho estudou os efeitos do estresse psicossocial prolongado em um modelo animal de subjugação/submissão sobre a biologia telomérica do hipocampo. O modelo de subjugação consistiu em um pareamento dos animais experimentais com um camundongo agressivo por 30 minutos. Camundongos machos jovens adultos da linhagem C57BL/6J passaram por este modelo de estresse diariamente por 21 dias. Observou-se um aumento na temperatura corpórea basal em repouso no 21º dia, bem como diminuição na hipertermia reativa a um estresse agudo de manipulação, demonstrando a efetividade do modelo em indução de estresse. Os tamanhos dos telômeros, a expressão gênica da enzima telomerase e sua atividade protéica foram investigados no hipocampo dos camundongos que sofreram o estresse crônico e comparados com animais do grupo controle. Observou-se, após o período de indução do estresse, uma diminuição em aproximadamente 58% no tamanho relativo médio dos telômeros das células hipocampais nos camundongos submetidos ao estresse psicossocial, quando comparados ao grupo controle. A

quantidade de RNAm relativo ao gene da telomerase, bem como sua atividade enzimática, mostraram-se similares entre os grupos controle e experimental. Estes resultados sugerem que o estresse psicossocial prolongado reduz o tamanho dos telômeros do hipocampo de camundongos e que esta redução não parece ser devido a alterações gênicas ou enzimáticas da telomerase. Com este estudo procuramos entender melhor os mecanismos celulares e genômicos cerebrais modulados pelo estresse psicológico prolongado, de natureza social. Uma vez que muitos distúrbios psiquiátricos e neurodegenerativos são provenientes do estresse crônico, nossos resultados fornecem mais subsídios para se evidenciar a importância do ambiente social na saúde mental dos indivíduos.

Palavras-chave: estresse de subjugação; telômero; telomerase; hipocampo

Pereira-Junior, J. *Study on telomere biology of hippocampal tissue of mice submitted to a long term psychosocial stress (dissertation)*. School of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2008.

Stressor stimuli are part of the daily life and the major part is derived from the social context. Long term stress can be very harmful, and induce several noxious events in the organism. These effects can also be perceived in the central nervous system, particularly in the hippocampus, in which morphological and functional damages may be observed. Recently a correlation of perceived stress and telomere length was demonstrated in leukocytes of stressed women. Telomeres, which are *in tandem* repeats of the nucleotides TTAGGG, are responsible to protect the extremities of the chromosomes, and its maintenance and elongation is mainly mediated by the enzyme telomerase. Telomeres and telomerase have been the targets of many studies in the last years, concerning aging and cell death. In this regard, the present study has investigated the effects of prolonged psychosocial defeat stress model in the telomeric biology of the hippocampus. Male C57Bl/6J young adult mice were submitted to a 21 days of psychosocial stress. We observed a raise in body temperature, as well as a decrease in reactive hyperthermia to the handling stress, demonstrating the effectiveness of this stress model. The telomere length, the transcript levels of telomerase mRNA, and the activity of the enzyme telomerase were also investigated in the hippocampus of psychosocially stressed mouse. A decrease of 58% in average telomere length was observed in the hippocampal cells of stressed mice when compared to control group. Levels of telomerase mRNA and telomerase activity were similar between control and defeat groups. In this study, we intend to better understand the cellular and genomic mechanisms promoted by long term psychological stress, with social nature, in brain. Since many psychiatric and neurodegenerative disorders have chronic stress underlying them, our results reinforce the importance of the social environment on individual mental health.

Key words: Defeat stress; telomere; telomerase; hippocampus

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

ESTRESSE

Os primeiros e vários relatos sobre o estresse foram feitos pelo endocrinologista canadense Hans Selye na década de 30. Ele observou que organismos diferentes apresentavam um mesmo padrão estereotipado de respostas fisiológicas frente a estímulos sensoriais ou psicológicos, e que estas respostas poderiam ser divididas em 3 estágios. O primeiro estágio é a reação de alarme, que consiste no reconhecimento de um estímulo estressor (externo ou interno) pelo organismo e a ativação do sistema neuroendócrino, levando ao aumento da liberação do cortisol, adrenalina e noradrenalina pelas adrenais. Assim, observa-se aumento dos batimentos cardíacos, sudorese, dilatação das pupilas, elevação da glicose sanguínea, interrupção da digestão, contração do baço para expulsar mais glóbulos vermelhos e aumentar o fornecimento de O₂ aos tecidos, e a imunossupressão. O segundo estágio do estresse é a adaptação do organismo (e da mente) aos estímulos estressores, visando a homeostase e sobrevivência. Este esforço para a adaptação à nova situação imposta pelo estressor requer energia, a qual é limitada. Portanto, no caso de persistência do estímulo estressor, o organismo poderá entrar

em uma fase de esgotamento. Esta 3ª fase do estresse ocorre quando não há tempo suficiente para a recuperação desses recursos (físicos e psíquicos) recrutados para a adaptação, e que devido à continuidade do estímulo, acabam por esgotar-se (Selye, 1956; Ballone, 2002)

Assim, o estresse apresenta-se como um complexo conjunto de respostas orgânicas, mentais, psicológicas e/ou comportamentais de um indivíduo, provocados por um estímulo ou agente estressor. Estas respostas têm como propósito produzir uma adaptação do organismo frente a esta nova situação, tendo, portanto, um papel benéfico fisiológico e evolutivo. Porém, com estímulos intensos e duradouros, o estresse se torna patológico e mal adaptativo.

Já nas últimas décadas, com a acelerada mudança em todos os níveis da sociedade, o ser humano se depara freqüentemente com uma enorme exigência de adaptação física, mental e social. A necessidade indispensável de ajustar-se a essas mudanças expõe os indivíduos a uma freqüente situação de conflito, ansiedade, angústia e desestabilização emocional. Desta forma, o estresse é considerado um importante fator no desenvolvimento de patologias humanas, como alto risco para várias doenças cardiovasculares, função imune debilitada, incluindo ainda os transtornos afetivos, como depressão e

ansiedade (Selye, 1955; Munck *et al.*, 1984; McEwen, 1998; Segerstrom & Miller, 2004).

HIPOCAMPO NO ESTRESSE

Os efeitos deletérios do estresse crônico também podem ser observados no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo que o hipocampo parece ser a área cerebral mais afetada, devido à grande quantidade de receptores para os hormônios glicocorticóides, os esteróides do estresse (Sapolsky, 2003). Além de sua vulnerabilidade, o hipocampo é uma estrutura muito plástica e adaptável, capaz de uma reorganização estrutural considerável, como por exemplo, o remodelamento de dendritos e mesmo neurogênese de neurônios granulares no giro denteado em resposta ao estresse prolongado (McEwen e Magarinos, 1997; McEwen *et al.*, 2002, Yap *et. al.*, 2006). Dados da literatura fortemente sugerem uma correlação entre elevados níveis de cortisol, depressão, atrofia hipocampal e prejuízo cognitivo (revisado em Brown *et al.*, 2004). A redução do volume hipocampal tem sido observada em estudos de imagem (MRI) em pacientes com depressão (Sheline *et al.*, 1996; Bremner *et al.*, 2000; Mervaala *et al.*,

2000), bem como em pacientes portadores de distúrbios de estresse pós-traumático (PTSD) (Bremner *et al.*, 1995; Bremner *et al.*, 1997). Sugere-se que a atrofia hipocampal encontrada nestes distúrbios possa levar às conseqüências cognitivas encontradas nestes indivíduos, tais como prejuízos na memória explícita (Bremner *et al.*, 1993; Burt *et al.*, 1995).

Porém, o exato mecanismo como o estresse exerce estes efeitos deletérios nos neurônios hipocampais não é conhecido (Sapolsky, 2000 e 2004).

MODELO ANIMAL DE ESTRESSE PSICOSSOCIAL

A grande maioria dos estímulos estressantes em humanos que levam às psicopatologias é de natureza social (Brown & Prudo, 1981). O estresse social é um fator recorrente nas vidas de todos os vertebrados, e portanto se tornou um estímulo importante para a evolução dos mecanismos de estresse (revisado em Bartolomucci *et al.*, 2005). Dentre os modelos de estresse em laboratório, sugere-se que a subjugação, ou submissão social episódica, represente o modelo mais etologicamente válido entre as espécies animais (Tornatzky & Miczek, 1993). Roedores, após terem sido subjugados por um macho da mesma espécie, apresentam mudanças profundas de curto e longo prazo nas esferas comportamentais, cardiovasculares, termoregulatórias e

cronobiológicas (Tornatzky & Miczek 1993, Keeney *et al.*, 2001). Devido à grande similaridade com as alterações fisiológicas e endócrinas observadas em pacientes deprimidos, este modelo tem sido muito útil para o estudo e entendimento dos distúrbios afetivos em humanos (Kudryavtseva *et al.*, 1991; McKittrick *et al.*, 1995; Koolhaas *et al.*, 1997, Keeney & Hogg, 1999). Observa-se que mesmo um episódio único de subjugação, constitui um evento estressante com magnitude capaz de causar uma profunda neuroadaptação. Assim, Miczek e colaboradores em 1982, relataram o desenvolvimento de uma tolerância forte e duradoura aos efeitos analgésicos de opióides em camundongos submetidos a um episódio breve de submissão frente a um camundongo agressivo.

Apesar de outros estressores ambientais causarem habituação em roedores, o estresse social de submissão prolongada e incontrolável não resulta em habituação, gerando um estresse emocional persistente (Tidey & Miczek, 1997). A experiência crônica de subjugação em camundongos leva a uma redução na atividade locomotora exploratória, aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado (teste descrito por Porsolt *et al.*, 1977, muito utilizado para avaliação de drogas antidepressivas), redução do peso corpóreo (Kudryavtseva *et al.*, 1991), hipertermia e grande aumento da

concentração de corticosterona sanguínea (Keeney *et al.*, 2001). Alterações neuroquímicas cerebrais e hormonais subseqüentes ao estresse social de submissão também têm sido descritas. Elas vão desde os antigos relatos de mudanças na atividade da enzima monoamino oxidase (Eleftheriou & Boehlke, 1967), aumento de ACTH e vasopressina (Mason *et al.*, 1968; Thompson & De Wied, 1973), até trabalhos mais recentes mostrando o envolvimento de mecanismos glutamatérgicos no desenvolvimento da sensibilização comportamental (Yap *et al.*, 2005) e diminuição na neurogênese hipocampal (Gould *et al.*, 1997, Yap *et al.*, 2006). Uma recente revisão aborda com detalhes os efeitos prolongados do estresse social em roedores, principalmente no hipocampo (Buwalda *et al.*, 2005).

Assim, o teste de subjugação prolongada em roedores, em condições de estresse social inescapável, representa um modelo replicável e robusto para o estudo dos efeitos do estresse psicossocial crônico no cérebro.

TELÔMEROS E TELOMERASE

Desde as décadas de 40-50, com os primeiros trabalhos relatados independentemente por McClintock e Muller, ganhadores do prêmio Nobel, os telômeros e os mecanismos envolvidos em sua manutenção têm se mostrado uma área de intensa investigação. Telômeros são

estruturas compostas por complexos de DNA e proteínas que estabilizam as terminações dos cromossomos, protegendo-os de degradações, fusões e rearranjos. Os telômeros são representados por seqüências repetitivas de 6 nucleotídeos (TTAGGG)_n nas extremidades de todos os cromossomos eucarióticos, chamadas de DNA telomérico, e várias proteínas acopladas (proteínas teloméricas), que reconhecem e se ligam a esses sítios (revisado em Blackburn, 2005)(figura 1).

Figura 1 – Ilustração da posição e da estrutura telomérica.

Adaptado de Houben e col., 2007.

Uma das proteínas teloméricas é a telomerase, muito importante na regulação do tamanho dos telômeros (Greider & Blackburn, 1985; Morin 1989). Esta enzima é uma transcriptase reversa, que promove a extensão da região telomérica composta por fita única que se projeta das terminações dos cromossomos (fita única rica em G da região 3'). A

telomerase é uma ribonucleoproteína, ou seja, é composta por um RNA e uma proteína (TERT). A TERT utiliza como fita-molde o próprio RNA da telomerase para copiá-lo e estendê-lo. Desta forma, a telomerase promove a extensão regulada das terminações do DNA telomérico para compensar o encurtamento que ocorre devido à ação de nucleases e replicação incompleta do DNA terminal a cada ciclo celular (figura 2).

Figura 2- Ilustração esquemática da enzima telomerase, indicando seu *template* de RNA e sua sub-unidade catalítica, a TERT. Adaptado de Greider & Blackburn, 1996.

Na ausência da telomerase, os telômeros se encurtam podendo levar à interrupção da proliferação da célula. Assim, a telomerase estabiliza o tamanho dos telômeros das células germinativas, dos

tecidos em regeneração e das células tumorais (revisado em Brunori *et al.*, 2005). Estas funções atribuídas a telomerase sugerem um papel nos mecanismos fundamentais do envelhecimento celular e nos processos de replicação como no câncer, áreas de profundas investigações da atualidade (Cech, 2004).

A hipótese telomérica do envelhecimento celular sugere que o encurtamento dos telômeros em células mitóticas somáticas cause sua senescência, e que também poderia induzir a senescência nas células mitóticas e pós-mitóticas vizinhas, sendo assim, responsável em parte pelo envelhecimento do organismo (Fossel, 2000). A associação inversa entre o tamanho do telômero e mortalidade têm sido relatadas em humanos (Cawthon *et al.*, 2003). Telômeros com tamanhos reduzidos têm sido observados em pacientes portadores de doenças associadas ao envelhecimento, tais como: demência vascular, Alzheimer e vários tipos de câncer (Panossian *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; von Zglinicki *et al.*, 2000). Em roedores, experimentos demonstram que ratos idosos possuem um comprimento telomérico menor nas células do rim, fígado, pâncreas e pulmão (Cherif *et al.*, 2003), bem como no córtex cerebral e no cerebelo *in vivo* quando comparados com ratos mais jovens (Flanary & Streit, 2003). Em camundongos, porém, como o tamanho dos telômeros é maior (variam de 10 a 150 kb, sendo que em humanos é de 5- 20 kb), além de ser muito heterogêneo entre os cromossomos (Kipling

& Cooke, 1990; Zijlmans *et al.*, 1997), a hipótese do envelhecimento tem sido desafiada. Mesmo assim, alguns estudos ainda encontraram redução dos telômeros durante o envelhecimento no baço e cérebro dos camundongos, mas não no fígado, rim ou testículos (Prowse & Greider, 1995; Coviello-McLaughlin & Prowse, 1997).

É interessante ressaltar que, muito embora o SNC seja considerado um tecido pós-mitótico, as células da microglia possuem um notável potencial proliferativo, especialmente sob condições de injúria cerebral (Graeber *et al.*, 1988), e que as células progenitoras em cérebro adulto são capazes de se dividir e se diferenciar em neurônios em discretas regiões cerebrais, como a zona subventricular e o giro denteado da formação hipocampal (revisado em Abrous *et al.*, 2005). Sabe-se que aproximadamente 10% das células no cérebro são neurônios pós-mitóticos e as demais são células mitóticas (astrócitos, células tronco e microglias) (Zhang *et al.*, 2007). Curiosamente, alguns pesquisadores têm discutido a possibilidade de que reduções no tamanho de telômeros em células pós-mitóticas possam ocorrer devido a mecanismos não relacionados à divisão celular, como por exemplo, o estresse oxidativo (von Zglinicki, 2002). Ainda assim, o papel dos telômeros no SNC permanece obscuro.

Entre os componentes da telomerase, o nível de expressão do componente catalítico, a TERT, parece se correlacionar bem com o

nível de atividade da enzima (Meyerson *et al.*, 1997; Greenberg *et al.*, 1998). *In vitro*, a expressão exógena da TERT em cultura de fibroblastos humanos normais faz com que estas células permaneçam vivas (Bodnar *et al.*, 1998). Por outro lado, a supressão da TERT em culturas primárias de neurônios embrionários hipocampais de camundongos aumenta sua vulnerabilidade a neurotoxinas e peptídeos amilóides (Fu *et al.*, 2000 & Zhu *et al.*, 2000). Estudos *in vivo* relatam expressão baixa ou às vezes indetectável da TERT na maioria dos tecidos pós-mitóticos adultos, porém recentemente tem-se demonstrado que insultos cerebrais como excitotoxina ou hipóxia induzem expressão da TERT em cérebro de roedores (Fu *et al.*, 2002; Baek *et al.*, 2004). Assim, sugere-se que a expressão induzida de TERT em tecidos cerebrais adultos após injúrias, possua uma função protetora (Kang *et al.*, 2004).

ESTRESSE E TELÔMEROS

No final de 2004, um interessante estudo demonstrou uma associação inesperada entre o estresse psicológico humano e indicadores de envelhecimento celular acelerado nas células mononucleares sanguíneas periféricas. Epel e colaboradores (2004) estudaram mães de crianças com enfermidades crônicas e mães cuidadoras de crianças saudáveis. O nível de estresse crônico objetivo das mães e também o subjetivo, analisado através de questionário, se correlacionaram com o estresse oxidativo, comprimento dos telômeros e atividade da telomerase das células sanguíneas. Os autores conseguiram

demonstrar que quanto maior o estresse psicológico e o tempo de submissão a este, menor são os telômeros e a atividade da telomerase. A extensão de redução do tamanho dos telômeros nas mães com maior estresse relatado equivaleu a 9-17 anos de envelhecimento celular acelerado estimado, quando comparado ao grupo de mães com o menor estresse. Estes estudos levantaram importantes hipóteses para investigações futuras, com o propósito de se entender melhor o mecanismo exato que conecta a mente e a célula. Acompanhando a publicação desta descoberta, um interessante comentário escrito por Sapolsky (2004) ressalta a importância destes achados, que conseguem unir o estresse de um organismo à biologia celular fundamental do envelhecimento e suscita ainda a necessidade de se estudar o estresse psicológico em outros tipos celulares.

Trabalhos posteriores, ainda com ênfase nas células sanguíneas, têm estudado o efeito deletério do estresse sobre os telômeros em outros modelos ou condições experimentais. Cherkas e colaboradores (2006) relataram uma correlação positiva entre nível sócio-econômico e idade biológica, evidenciada pelo tamanho dos telômeros de leucócitos em 1552 mulheres gêmeas. Neste estudo, após a normalização dos resultados (idade dos pais ao nascimento, idade das mulheres, índice de massa corpórea, hábitos tabagistas e atividade física), o tamanho dos telômeros foi significativamente menor em mulheres com menor nível sócio-econômico, apesar da grande variabilidade individual. Por outro lado, Adams *et. al.* (2006) analisando

menor número de sujeitos, porém mais homogêneos com relação à idade (318 indivíduos pertencentes a um estudo de coorte retrospectivo) não acharam correlação evidente entre o tamanho dos telômeros de leucócitos e marcadores do estado sócio-econômico.

Recentemente, observou-se que pacientes psiquiátricos com estresse crônico associado aos transtornos de humor, como depressão e distúrbio bipolar, apresentam telômeros de leucócitos significativamente menores que de indivíduos com saúde mental íntegra, resultado este que, de acordo com os autores, representa um envelhecimento acelerado em até 10 anos (Simon *et al.*, 2006). Cattán e col., em 2008 demonstraram que um tratamento crônico com BSO (butionina sulfoximina), que induz estresse oxidativo, diminuiu o tamanho dos telômeros nas gorduras branca e parda, na cauda, na pele, e nos testículos de camundongos CAST/Ei. Ainda em camundongos, Kotrschal e col., 2007, observaram que camundongos (*Mus musculus*) selvagens submetidos a diferentes tipos de estresse, como por exemplo, a redução do tempo entre gestações (estresse reprodutivo) e, de grande densidade de camundongos em uma gaiola, possuíam seus telômeros sensivelmente reduzidos em células sanguíneas após 6 meses de experimento. Os autores atribuem essa diferença ao estresse oxidativo promovido pelo modelo experimental.

Desta maneira, estes resultados em conjunto justificam a investigação da biologia telomérica no SNC em um modelo animal de estresse prolongado. Este estudo pretende colaborar para o entendimento de mecanismos celulares/moleculares em distúrbios psiquiátricos e neurodegenerativos provenientes do estresse crônico, e ainda evidenciar a importância do ambiente na saúde mental dos indivíduos. Nossa investigação se apoia na união de 2 campos distintos e distantes da pesquisa biomédica, pois utiliza uma abordagem reducionista para investigar um evento tão global e integrado em um organismo, como o estresse psicológico. Ainda, da mesma forma como Selye sugeriu em 1955 (Selye, 1955), "a pesquisa sobre estresse será mais profícua se for guiada pelo princípio de que precisamos aprender a imitar, e se necessário corrigir e complementar, os esforços autofarmacológicos do indivíduo no combate ao estresse nas doenças".

OBJETIVOS

Investigar os efeitos do estresse prolongado de subjugação em camundongos (modelo animal de dominância) sobre a biologia telomérica do hipocampo cerebral. Pretendemos neste estudo responder às seguintes questões:

- a) A subjugação de camundongos por um período mínimo de 3 semanas altera parâmetros fisiológicos como: peso, temperatura corpórea e concentração plasmática de corticosterona quando determinada no último dia?
- b) Este modelo de estresse psicossocial reduz o tamanho dos telômeros dos cromossomos das células hipocampais?
- c) Qual o efeito deste estresse psicossocial na expressão gênica hipocampal da TERT (subunidade catalítica da enzima telomerase)?
- d) O estresse psicossocial em camundongos altera a atividade enzimática da TERT hipocampal?

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Camundongos C57BL/6J machos, adultos, provenientes de colônia estabelecida por nós na FMUSP e originária do Jackson Laboratories (Maine, USA), foram mantidos em gaiolas de polipropileno (28x17x12 cm), recebendo água e comida *ad libitum* em um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas (claro às 7:00 hs) e com temperatura ambiente de 22±2°C. Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com as normas de “Uso de Animais de Laboratório” do centro de Bioterismo da FMUSP, e todo esforço foi feito para minimizar o desconforto dos animais durante o estudo. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa nº 772/05, em anexo).

MODELO DE ESTRESSE

A indução de estresse crônico psicossocial em camundongos foi feita de acordo com os procedimentos descritos abaixo, adaptado a partir de Miczek & O'Donnell (1978) e Czéh e colaboradores (2002).

Seleção de animais agressivos

Esta seleção foi necessária para se obter os camundongos que subjugaram os animais experimentais. Foram testados 12 machos adultos reprodutores, isolados há pelo menos 4 semanas, pois sabe-se que esta condição promove elevação da agressividade. Estes animais foram pareados individualmente em suas gaiolas com um camundongo jovem adulto que estava agrupado com outros animais em suas gaiolas-moradia (condição que promove menor grau de agressividade). Este pareamento foi observado por 10 min. Utilizou-se uma escala de escores (+, ++ ou +++) para classificar o grau de agressividade do camundongo isolado. A agressividade foi avaliada de acordo com parâmetros descritos em Chiavegatto *et al.*, 2001 (latência para a primeira mordida, número total de ataques com mordidas, duração total dos episódios de ataques) e interações agressivas (*grooming* violento, perseguição, ameaças laterais). Os pareamentos foram repetidos por 3 dias consecutivos (1 por dia). Selecionaram-se os animais que apresentaram escore +++ nos dois últimos pareamentos para serem utilizados no teste experimental como indutores do estresse de subjugação.

Indução do estresse

Os animais agressivos selecionados foram mantidos isolados em suas gaiolas-moradia e a maravalha não foi trocada na semana que se

antecedeu ao experimento. Foram confeccionadas telas de arame com malha de diâmetro médio de 0,8cm para separar firmemente cada gaiola ao meio durante o experimento. Para cada camundongo agressivo foi utilizada uma tela de uso exclusivo. No dia do teste, introduziu-se cuidadosamente um animal experimental (escolhido randomicamente entre camundongos agrupados e sem manipulações experimentais) na gaiola do camundongo agressivo isolado (previamente selecionado). Cobriu-se a gaiola com tampa de vidro e a interação foi filmada. Aguardou-se o início da interação agressiva e observou-se o comportamento do animal teste. Quando este apresentou os primeiros sinais de fuga e/ou congelamento (*"freezing"*), estabelecendo-se sua submissão, a tela metálica foi inserida no meio da gaiola de modo a separar os 2 camundongos. Um cuidado adicional foi com relação ao lado da gaiola em que o animal subjugado era mantido após a separação com tela, sendo mantidos de maneira aleatória à esquerda ou à direita do agressor. Após 30 minutos de interação visual, olfativa e auditiva entre eles (sem contato físico), os camundongos-teste foram retirados e recolocados em suas gaiola-moradia. Repetiu-se este procedimento diariamente e no mesmo período (entre 14h e 18h) por não menos que 21 dias, sendo que os mesmos animais não foram pareados mais do que 4 vezes consecutivas (os camundongos agressivos foram alternados). Os animais experimentais foram sacrificados por decapitação 24 horas após o

último pareamento. Os animais do grupo controle foram manipulados diariamente, ao mesmo tempo em que os animais do grupo experimental eram subjugados. Estes animais foram colocados em gaiolas vazias, de mesmas condições, que foram separadas ao meio com uma tela metálica similar, também por 30 min. Cada animal controle possuía sua tela de uso exclusivo.

PESO CORPORAL

Os animais foram pesados no 1º, 7º, 14º, e 21º dia de experimento no período da manhã.

TEMPERATURA CORPORAL

A temperatura corporal basal dos animais (controle e experimental) foi verificada no 1º, 7º, 14º, e 21º dia de experimento no período da manhã. Utilizou-se uma sonda retal para esta medida (termômetro Physitemp, USA). A temperatura de cada animal foi novamente determinada após 5 min da 1ª medida. Estes valores refletem a temperatura corporal reativa ao estresse de manipulação.

SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram sacrificados por decapitação 24h após último pareamento, de maneira intercalada entre os grupos controle e

experimental. Alíquotas de sangue foram rapidamente obtidas do corpo do animal em microtubos com heparina. Os encéfalos foram imediatamente removidos dos crânios e os hipocampus direito e esquerdo dissecados sobre placa de *Petri* contendo gelo picado e congelados individualmente em nitrogênio líquido. As amostras ficaram armazenadas a -80°C até o uso.

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO HIPOCAMPAL

Para extração do DNA genômico, cada hipocampo (unilateral para cada animal) foi homogeneizado em 500 μl de tampão de lise (100 mM Tris HCl pH 8,0; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,2 % SDS; 200 mM NaCl) por 5 seg (Polytron®). Adicionou-se 20 μl da solução de proteinase K (Gibco BRL®) dissolvida no tampão 10 mM Tris HCl pH 7,5; 20 mM NaCl, 50% glicerol. Incubou-se durante a noite a 55°C . Após incubação, adicionou-se 200 μl de fenol saturado com Tris + 200 μl de clorofórmio. Centrifugou-se a 10.000 g, a 4°C por 1 min. O sobrenadante foi transferido e adicionou-se 300 μl de clorofórmio. Centrifugou-se novamente a 10.000 g, a 4°C por 1 min. Coletou-se o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5ml. Adicionou-se 20 μl de NaOAc com concentração entre 3 e 5 M e 1 ml de EtOH a -20°C . Após incubação de 1 h no freezer a -20°C , centrifugou-se a 15.000 g, a 4°C por 15 min. Retirou-se o sobrenadante por sucção, deixando aproximadamente 20 μl de volume no tubo.

Secou-se por aproximadamente 1h. O DNA extraído foi ressuspensão em 50 µl de H₂O miliQ. Deixou-se dissolver durante a noite. Foram retirados 2 µl de cada amostra para quantificação e verificação da integridade do material genético. O restante do material foi acondicionado em freezer -80°C. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro (NanoDrop® Spectrofotometer ND-1000) através de sua absorbância a 260 nm. A quantidade de DNA é equivalente à OD₂₆₀ x 50 ng/µl. A existência de proteínas contaminantes foi verificada através da razão entre as absorbâncias 260 nm/280 nm. A integridade do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1x.

EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL HIPOCAMPAL

Para extração do RNA total, cada hipocampo foi homogeneizado em 1 ml do reagente TRIzol® (Invitrogen) por 10 seg à velocidade máxima (Polytron®) em gelo. Adicionou-se 200µl de clorofórmio, agitou-se no vórtex e centrifugou-se a 12.000 g, 4°C, por 15 min. Transferiu-se a fase aquosa (superior) com cuidado e adicionou-se 1 ml de isopropanol. Centrifugou-se a 14.000 g, 4°C, por 15 min. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 300 µl de EtOH 100% a -20°C. Centrifugou-se novamente a 14.000 g, 4°C, por 15 min. Após removido o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet em 40 µl de água Ultra Pure®

(Gibco). Foram retirados 2 µl de cada amostra para quantificação e verificação da integridade do material genético. O restante do material foi acondicionado em freezer -80°C. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro (NanoDrop® Spectrofotometer ND-1000) através de sua absorbância a 260 nm. A quantidade de RNA é equivalente à OD₂₆₀ x 40 ng/µl. A existência de proteínas contaminantes foi verificada através da razão entre as absorbâncias 260 nm/280 nm. Somente foram utilizadas as amostras que possuíam esta razão entre 1,8 e 2,1. A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x. A relação entre as bandas referentes ao RNA ribossomal 28S (superior) e 18S (inferior) de aproximadamente 2, aliada à ausência de rastro (*smear*) demonstram RNA de ótima qualidade.

SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (DNA) A PARTIR DO RNA

A síntese do cDNA foi feita utilizando-se 2µg do RNA total isolado do hipocampo, 20mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50mM de KCl, 2,5mM de MgCl₂, 10mM de DTT, 0,5µg de oligo(dT), 0,5mM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 200U da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Brasil), em 20µl. A reação foi incubada a 42°C/60 min e interrompida pelo aquecimento a 70°C/15 min. O produto de cDNA foi tratado com 2U de RNaseH (Invitrogen) a 37°C/20 min para remoção do RNA

remanescente, com posterior inativação da enzima a 70°C/15 min. O cDNA sintetizado foi armazenado a -80°C.

DESENHO DE OLIGOS INICIADORES (PRIMERS)

Para o desenho dos iniciadores utilizou-se o programa *Primer 3* (http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Seguindo os parâmetros estipulados, os *primers* fornecidos pelo programa foram testados quanto à presença de estruturas secundárias no programa NetPrimer

(<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>). Os *primers* foram testados quanto suas especificidades no programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e a posição do *primer* em relação aos exons do RNAm foi verificada com auxílio do programa *Spidey – mRNA to genome alignment* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/spideyweb.cgi>.

EXTRAÇÃO E DOSAGEM DAS PROTEÍNAS HIPOCAMPAIS

Para extração de proteínas, o tecido hipocampal ainda congelado foi homogeneizado em 250 µl do tampão de lise *chaps* (Chemicon, USA) por 5 seg (Polytron®). Incubou-se em gelo por 30 min. Centrifugou-se a 12.000 g, 4°C por 20 min. Transferiu-se 50 µl do sobrenadante para 4 tubos, que foram imediatamente congelados em gelo seco. A

dosagem da concentração protéica da amostra foi feita pelo método Bradford (baseado na mudança de coloração e absorbância do *Coomassie Blue* quando ligado a proteínas solúveis - Bio-Rad Protein Assay, BIO-RAD Laboratories). A curva padrão de concentração de proteínas foi feita com albumina bovina sérica. Para a leitura da absorbância a 595 nm, utilizou-se o leitor de placas Victor² Wallac (PerkinEmer LifeSciences).

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA

O sangue coletado de cada animal em microtubo heparinizado foi centrifugado a 1.500g por 15 min à 4° C para separação do plasma. A dosagem de corticosterona foi feita por imunoensaio enzimático (experimento 1 com o kit para ensaio imuno-enzimático OCTEIA - ALPCO Diagnostics # 026-AC-14F1 e no experimento 2 com o kit da empresa Cayman Chemical #500651; esta alteração de fornecedores foi devido à descontinuidade do produto da primeira empresa.). Preparou-se uma curva padrão com concentração conhecida de corticosterona e as amostras foram diluídas. As dosagens foram feitas em duplicata em placa de 96 poços. A incubação foi feita por 2h à temperatura ambiente. Após a revelação (reagente de Ellman por 90 min), leu-se a absorbância em 405 nm no Victor² Wallac (PerkinElmer Lifesciences).

Calculou-se a absorbância média das duplicatas e a partir da curva padrão obteve-se a concentração das amostras.

QUANTIFICAÇÃO DO TAMANHO RELATIVO DOS TELÔMEROS

O tamanho dos telômeros foi determinado com base no protocolo para camundongos padronizado por Callicott & Womack, 2006. O ensaio foi feito por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (real time PCR). As reações foram processadas no Rotor-Gene 3000 thermocycler (Corbett Research, Concord, Australia). O PCR mix foi preparado a partir de 2,5 u platinum taq polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA); 20mM tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; DMSO 1%; DTT 2,5 mM; 400 mM de cada primer (Tel1b tabela 1); 0.4x Sybr Green I (Molecular Probes®, Eugene, OR, USA), e procedeu-se à seguinte reação: 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C, 15 min; 56°C, 30 seg; 72°C, 30 seg. A corrida de amplificação para o gene Tel1b foi normalizada pelos genes autossômicos de cópia única NOS1 e Rplp0 (tabela 1). A quantidade de transcrito em cada amostra foi determinada, relativamente, utilizando a plataforma *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) e baseada no Ct de cada amostra. Os resultados estão expressos em Tamanho Relativo Médio (TRM).

Tabela 1- Sequências dos pares de oligonucleotídeos para a análise do tamanho relativo médio dos telômeros (nome, Gene ID e sequência).

Gene	Gene ID	Sequência 5→3' - F/R
Tel1b		CGG TTT (GTT TGG) ₅ GTT/TTG (CCT TAC) ₅ CCT
Nos1	ID 18125- NCBI	ACCTTCACAGGGGATGGAAC/ CTGGTCTTTGCTGGCTGATG
Rplp0	ID 11837-NCBI	ACTGGTCTAGGAOCOGAGAAG/ TCAATGGTGCTCTGGAGATT

QUANTIFICAÇÃO DA TRANSCRIPTASE TEVERSA DA TELOMERASE (mTERT) POR PCR EM TEMPO REAL

A análise da expressão gênica foi feita através do PCR quantitativo em tempo real (qPCR). As reações de qPCR foram feitas no equipamento *Rotor Gene 3000* (Corbett Research, Concord, Australia). O qPCR determina o Ct para cada amostra, ou seja, o ciclo de amplificação onde o acúmulo de fluorescência na amostra atinge a linha de detecção arbitrária (*threshold*). O resultado é coletado durante a fase exponencial de amplificação, que é quando a emissão de fluorescência é proporcional ao número inicial de cópias do produto amplificado, ou concentração da amostra. Os primers *senso* e *antisenso* específicos para o gene de interesse em camundongos (*Mus musculus*) e para genes candidatos a controle interno (genes com expressão similar entre os grupos experimentais), foram desenhados utilizando-se o software Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) e sua especificidade verificada através do *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As reações continham 200nM de

primers, água Ultra Pure® (Gibco) q.s.p., e 1X Sybr Green master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), otimizados para um volume final de 20µl. Para a escolha da concentração ideal de DNA a ser amplificado, foram feitas 6 diluições seriadas do cDNA obtido das amostras, 40ng, 20ng, 10ng, 5ng, 2,5ng e 1,25ng. Após a análise da curva padrão de amplificação com as diluições para cada par de primer, escolheu-se a de 5 ng, aquela com maior eficiência para a concentração de trabalho. As reações foram incubadas à 95°C por 10 min para a ativação da enzima DNA polimerase, seguidas por 45 ciclos de: a) 15 seg à 95°C para desnaturação, b) 60 seg a 60°C para anelamento, extensão e coleta do sinal de fluorescência. Para cada corrida tivemos controles negativos (ausência do DNA). As amostras referentes ao grupo controle e experimental para cada gene foram processadas em corridas independentes e em triplicata. Após o término de cada corrida, a especificidade do produto de PCR formado foi determinada através de uma corrida de dissociação (95°C por 15 seg, estabilização a 60°C seguido de aumento gradual de temperatura de 1°C por 0,5 min). Assim, somente foram utilizados os primers cujos produtos amplificados mostraram pico único, claro e bem definido na temperatura correta. Os genes cyclophilin A (peptidylprolyl isomerase A: Ppia), glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (Gapdh) and beta-actin (Actb) foram utilizados como gene normalizadores (tabela 2). O software RG-3000 (Corbett Research, Concord, Austrália) foi

utilizado para gerar a curva padrão de cada produto de amplificação, as curvas de dissociação, bem como suas análises. A quantidade de transcrito em cada amostra foi determinada, relativamente, utilizando a plataforma *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) e baseada no Ct de cada amostra.

Tabela 2- Sequências dos pares de oligonucleotídeos para verificação da expressão da mTert

mRNA	Gene	Sequência 5→3' - F/R
mtert	NM_009354-NCBI	TGAOCAGOGTGTAGGAAGAA/ CAGGAGGAAAGGAGCCAGA
ppia	NM_008907- NCBI	AATGCTGGACCAACACAAA/ CCTTCITTCACCTTCCAAA
gapdh	NM_008084- NCBI	AGGAGOGAGACCCCACTAAC/ GTGGTTCACACCATCACA
actb	NM_007393- NCBI	GTGGGAATGGGTCAGAAGG/ GGTCATCTTTCAOGTTGG

ENSAIOS PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE

A atividade da enzima telomerase foi examinada por duas metodologias independentes baseadas no protocolo de amplificação de repetições teloméricas (TRAP), descrito previamente por Kim & Wu (1997). Para a primeira metodologia utilizou-se o kit de detecção TRAPeze® XL (Chemicon International), e o segundo baseou-se no ensaio de qTRAP, padronizado e publicado por Hou *et al.*, 2000. Quantidades iguais de proteína foram utilizadas nos ensaios, após quantificação pelo método de Bradford, descrito acima.

Para o ensaio de TRAPEze procedeu-se conforme o protocolo do fabricante. Nos tubos de reação foram adicionados 800ng de extrato protéico em um volume de 2 µl. O mix de reação continha 10 µl 5X TRAPEZE® XL Reaction Mix (TS primer, RP Amplifluor® primer, K2 Amplifluor® primer, TSK2 template, dA, dC, dG and dTTP, diluídos em 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 7,5 mM MgCl₂, 315 mM KCl, 0.25% Tween 20, 5 mM EGTA, 0,5 mg/mL BSA), 0,4 µl de Platinum taq® DNA polimerase (Invitrogen) (2 unidades) e 37,6 µl de água Ultra Pure® (Gibco), otimizados em um volume final de 40 µl. As amostras foram incubadas em ambiente escuro, à 30°C por 30 min, e procedeu-se uma reação de PCR com o seguinte programa: 36 ciclos de 94°C, 30 seg; 55°C, 30 seg; 72°C, 1 min; seguidos por 72°C, 3 min; 55°C, 25 min; e 4°C, 20 min. O produto da reação foi diluído em 150 µl de tampão específico (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,15 M NaCl; 2 mM MgCl₂), e lidos em leitor de placas Victor² Wallac (PerkinEmer LifeSciences) com os filtros emissão/excitação F485/F535 para fluoresceína e P595/F620 para sulforodamina. No mesmo experimento foi corrido o controle inativado por temperatura (incubado 85°C, 10 min), controle positivo (extrato de células HeLa, lote #90410, Chemicon International), controle isento de telomerase, o controle isento de enzima polimerase e a curva padrão (formada pela diluição seriada do controle TRS8, fornecido pelo fabricante). O aumento na emissão de fluoresceína e sulforodamina foi calculado subtraindo seus respectivos controles. A razão entre a emissão de fluoresceína e

sulforodamina foi calculada, e o valor logarítmico plotado em relação à curva padrão gerada. Os resultados são expressos em produto total gerado.

O ensaio de qTRAP foi adaptado a partir do protocolo de Herbert *et al.*, 2006, com pequenas modificações. A reação de qPCR, contendo 800 ng de proteínas totais previamente extraídas do hipocampo foi realizada no termociclador Rotor-Gene 3000 thermocycler (Corbet Research). Para a reação, foi utilizado 1x Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems), 100ng do primer TS (5'-AATCCCGTCGAGCAGAGTT-3'), 100 ng do Primer ACX (5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC-3') e água Ultra Pure® (Gibco) q.s.p., otimizados para um volume final de 25 µl. Neste ensaio, o primer TS age como substrato para a atividade da telomerase, e após formação do produto, acontece o anelamento do primer ACX e consequente formação da fita dupla, que permite a incorporação do corante Sybr Green para que seja possível a detecção. Após a adição do mix, os tubos foram incubados por 30 min à 30°C no escuro para a extensão do substrato pela telomerase. Após esse período, procedeu-se com o qPCR, de acordo com o seguinte programa de ciclagem: 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95° C por 15 seg e 60° C por 60 seg. Para gerar a curva padrão, foi utilizado extrato de células HeLa (Lote #90410, Chemicon International) com atividade conhecida da enzima

telomerase, nas seguintes concentrações em triplicata: 1600ng, 800ng e 400ng. A curva padrão com o log concentração x valores Ct ($R^2 > 0,90$) foi gerada e utilizada para informar as unidades de Produto Total Gerado (PTG), unidade na qual expressamos os resultados neste trabalho. $PTG = 10(\text{valor Ct} - Y_{\text{int}})/\text{Slope}$, sendo o Y_{int} , o ponto onde a curva padrão intercepta o eixo Y.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com os softwares GaphPad InStat (GraphPad InStat®, USA) e SigmaStat (Aspire Software International, USA). O peso corporal e a temperatura corpórea dos diferentes grupos ao longo do experimento foram analisados pelo teste de ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguidos por teste *pos hoc*. O teste *t* de Student unicaudal foi utilizado exclusivamente para validar a hipótese *a priori* de diminuição no tamanho relativo dos telômeros nos camundongos do grupo estressado em relação ao grupo controle. A quantidade de transcritos para mTert, bem como a atividade relativa da telomerase entre os grupos foi analisada por teste *t* de Student bicaudal. Todos os resultados estão expressos como média $\pm$

erro padrão médio (EPM) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se $p < 0,05$.

RESULTADOS

MODELO DE ESTRESSE

A indução do estresse psicossocial foi feita em 2 baterias experimentais.

- 1ª bateria: Foi realizada em 12 animais experimentais e 12 animais controle. Para a subjugação dos 12 camundongos experimentais utilizou-se 3 animais agressivos (residentes isolados R1, R2 e R3) pareados alternadamente com os animais experimentais em cada dia. O pareamento foi realizado por 21 dias consecutivos e no 22º dia foi feito o sacrifício.
- 2ª bateria: Foi realizada em 14 animais experimentais e 13 animais controle. Utilizou-se 4 camundongos agressivos (residentes isolados R5, R6, R7 e R8) pareados alternadamente com os animais experimentais em cada dia. O pareamento foi realizado por 24 dias e no 25º foi feita o sacrifício.

O procedimento foi filmado para registro do comportamento e está apresentado na seqüência de imagens no material complementar 1. Os animais controle foram colocados em gaiolas similares, porém vazias, no mesmo momento em outro local, e também tiveram suas gaiolas

divididas com uma tela similar. O grau de subjugação dos camundongos teste foi verificado através de escores (semi-quantitativo). O material auxiliar 2 mostra estes resultados para as 2 baterias experimentais. Os comportamentos de interação agressiva observados são ilustrados no material complementar 3. Os dados comportamentais mostram que todos os animais experimentais passaram pelo estresse psicossocial de subjugação na grande maioria dos pareamentos e, portanto foram utilizados para as próximas etapas deste experimento.

PESO CORPORAL

Os dados representados na figura 1 demonstram que não houve alteração no peso corporal entre os grupos controle e experimental em nenhum dos dias verificados ($p>0.05$). Na 1ª bateria experimental, o peso inicial do grupo controle foi de $23,06 \pm 0,8$ g e final de $24,74 \pm 0,7$ g, $n=11$. Para o grupo experimental, o peso inicial foi de $22,18 \pm 0,7$ g e final de $24,37 \pm 0,8$ g, $n=11$. Na 2ª bateria experimental, o peso inicial do grupo controle foi de $28,64 \pm 0,9$ g e final de $27,96 \pm 0,6$ g, $n=13$. Para o grupo experimental, o peso inicial foi de $27,97 \pm 0,6$ g e final de $27,28 \pm 0,5$ g, $n=14$. Estes dados estão ilustrados na figura 3.

Figura 3 - Peso corporal de camundongos machos sob estresse psicossocial prolongado. O Peso (g) para os grupos controle (n=11 bateria 1; n=13 bateria 2) e estressado (n= 11 bateria 1; n=14 bateria 2) foi similar em ambos experimentos. Resultados representados como média $\pm$ EPM. $p > 0.05$, teste ANOVA de duas vias de medidas repetidas.

TEMPERATURA CORPÓREA

Basal durante estresse prolongado

No 1º experimento, a temperatura basal do grupo experimental foi estatisticamente maior em relação ao grupo controle somente no 21º dia de experimento (controle= $36,16 \pm 0,27$ °C, n=11 e estressado= $36,93 \pm 0,24$ °C, n=11; $p < 0,05$).

Na 2ª bateria, a temperatura basal no grupo experimental também foi estatisticamente maior em relação ao grupo controle somente no 21º dia de experimento (controle= $36,39 \pm 0,17$ °C, n=13 e estressado= $36,90 \pm 0,16$ °C, n=14; $p < 0,05$). Estes dados estão ilustrados na figura 4.

Figura 4 – Temperatura corpórea basal de camundongos submetidos a um estresse psicossocial prolongado. Temperatura corpórea em estado de descanso determinada semanalmente nos grupos controle (n=11, bateria 1; n=13, bateria 2) e estressado (n=11, bateria 1; n=14, bateria 2). Um aumento na temperatura corpórea foi observado no 21º dia de pareamento em ambos os experimentos. Resultados representados como média ± EPM. *p<0,05, teste ANOVA de duas vias de medidas repetidas.

Após estresse agudo

A temperatura medida após 5 min da determinação anterior não foi diferente entre os grupos em nenhum momento durante o ensaio. Este resultado se repetiu na bateria experimental 2 ($p>0,05$; figura 5).

Figura 5 – Temperatura corpórea após estresse de manipulação em camundongos submetidos a um estresse psicossocial prolongado. Resultados representados como média $\pm$ EPM. $P>0,05$, teste *ANOVA* de duas vias de medidas repetidas.

A variação na temperatura (ΔT) de cada animal entre a primeira e a segunda medida (após 5 min) é a sua resposta ao estresse da manipulação aguda (retirada rápida do animal da gaiola e inserção da sonda retal). Este incremento de temperatura é denominado

hipertermia reativa ao estresse agudo ou febre emocional. Nos animais estressados prolongadamente, essa reatividade foi menor no 21º dia de experimento em relação à reatividade observada antes do início do estresse prolongado (dia 1) (Experimento 1, estressados dia 1 = $1,15 \pm 0,12$ °C; dia 21 = $0,40 \pm 0,09$ °C, $n=11$, $p<0,001$; Experimento 2, estressados dia 1 = $1,16 \pm 0,16$ °C; dia 21 = $0,79 \pm 0,09$, $n=14$, $p=0,068$, tendência à significância. Isso não aconteceu dentro do grupo controle, cujos incrementos de temperatura foram estatisticamente similares ao se comparar dia 1 e dia 21 de experimento. Estes dados estão ilustrados na figura 6.

Figura 6 - Hipertermia aguda induzida pelo estresse de manipulação após estresse psicossocial prolongado. O incremento na temperatura (ΔT) após 5 minutos de manipulação e introdução da sonda retal mostrou-se diminuído no grupo estressado ($n=11$, bateria 1; $n=14$, bateria 2) após 21 dias de estresse prolongado quando comparado ao dia 0 ($p<0.05$) em ambas as baterias experimentais. Camundongos controle $n=11$ para a bateria 1 e $n=13$ para a bateria 2 ($p>0.05$). Resultados em Média $\pm$ EPM. * $p<0,05$, teste ANOVA de duas vias de medidas repetidas.

CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA

Em ambos os experimentos não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimental. Na bateria experimental 1, a concentração média de corticosterona do grupo controle após 21 dias foi $27,8 \pm 0,8$ ng/ml, $n=11$ e para o grupo experimental foi de $28,6 \pm 0,6$ ng/ml, $n=11$ ($p>0,05$). Na bateria experimental 2, a concentração média de corticosterona no grupo controle após 24 dias foi $45,8 \pm 0,7$ ng/ml, $n=13$ e para o grupo experimental foi $54,2 \pm 0,9$ ng/ml, $n=14$ ($p>0,05$). Resultados representados na figura 7.

Figura 7 – Corticosterona plasmática em camundongos sob efeito de estresse psicossocial prolongado. A concentração de corticosterona plasmática foi similar entre os grupos controle ($n=11$, bateria 1; $n=13$, bateria 2) e estressado ($n=11$, bateria 1; $n=14$, bateria 2) em ambos experimentos ($p>0,05$). Resultados representados como média $\pm$ EPM. Teste *t* Student.

EFEITOS DO ESTRESSE PROLONGADO NO TAMANHO DOS TELÔMEROS HIPOCAMPAIS

O estresse psicossocial prolongado reduziu em 58,4% o tamanho dos telômeros no hipocampo de camundongos, quando comparados ao grupo controle. O tamanho relativo médio dos telômeros foi de $1,13 \pm 0,26$, $n=12$ para o grupo controle e $0,66 \pm 0,10$, $n=11$ para o grupo subjugado ($p<0.05$). (Fig. 8).

Figura 8 - Tamanho dos telômeros nas células hipocampais de camundongos após estresse psicossocial prolongado. O tamanho relativo dos telômeros no hipocampo foi reduzido em aproximadamente 58% nos camundongos do grupo estressado ($n=11$) quando comparados ao grupo controle ($n=12$) ($p<0.05$). Dados são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p<0,05$, teste t Student.

EFEITO DO ESTRESSE PROLONGADO NA ATIVIDADE DA ENZIMA TELOMERASE

A atividade da enzima telomerase não foi alterada no hipocampo de camundongos pelo estresse psicossocial prolongado, ao se utilizar 2 metodologias independentes. Para análise da atividade da telomerase, pelo método TRAPeze® XL (Chemicon International) os resultados são expressos por unidade de produto total gerado (PTG). No grupo controle, as unidades de PTG foram $0,632 \pm 0,032$ (n=9), e no grupo experimental $0,683 \pm 0,05$ (n= 11; $p>0.05$)(figura 9). Em nossos experimentos de qTRAP, obtivemos para o grupo controle, em unidades de PTG $1,197 \pm 0,008$ (n=13), e para o grupo experimental $1,197 \pm 0,009$ (n=14; $p>0.05$) (fig 9). A curva padrão utilizada para os cálculos conforme descrito na metodologia encontra-se no material complementar 4.

Figura 9- Atividade da telomerase no hipocampo de camundongos após estresse psicossocial prolongado. A atividade da telomerase está expressa em unidades de Produto Total Gerado, as quais foram similares entre o grupo controle (n=13) e experimental (n=14) com ambas metodologias (TRAPeze® XL e qTRAP) ($p>0.05$). Resultados em média $\pm$ EPM. Teste *t* Student.

EFEITOS DO ESTRESSE PSICOSSOCIAL PROLONGADO NOS NÍVEIS DE RNAm DA SUBUNIDADE CATALÍTICA DA TELOMERASE (mTERT)

A quantidade de transcritos referentes ao gene mTert nos hipocampus dos camundongos estressados não diferiu daquela encontrada no grupo controle. A média geométrica da quantidade de transcritos referentes aos genes Actb e Gapdh foi utilizada como fator de normalização, pois a expressão destes genes se mostrou mais estável ($M=0,154$ plataforma GeNorm). O nível de transcritos normalizado para o grupo controle foi $0,82 \pm 0,10$, $n=8$; e para o grupo estressado $0,86 \pm 0,11$, $n=7$, $p>0,05$. Os níveis de expressão dos três genes normalizadores

testados não variaram entre os grupos (Actb: $0,63 \pm 0,08$ vs. $0,54 \pm 0,09$; Gapdh: $0,73 \pm 0,07$ vs. $0,59 \pm 0,08$; Ppia: $0,64 \pm 0,07$ vs. $0,57 \pm 0,08$; controle vs. estressado respectivamente; $p > 0.05$). Dados ilustrados na figura 10.

Figura 10 - Quantidade de transcritos da mTert no hipocampo de camundongos submetidos a um estresse psicossocial prolongado. A concentração de RNAm da mTert foi similar entre os grupos controle (n=8) e experimental (n=7) ($p > 0.05$). Os níveis de expressão da Tert foram normalizados pela media geométrica dos níveis de expressão da Actb e Gapdh. Resultados representados individualmente. Teste *t* Student.

DISCUSSÃO

Os efeitos da exposição prolongada ao estresse vem há muito sendo investigados. Sapolsky (1996) discute os efeitos nocivos do estresse no cérebro em sua revisão, e como esta exposição pode levar a um envelhecimento cerebral. Alguns trabalhos demonstram a relação entre estresse e o aumento de radicais oxigenados (Liu *et al.* 1996). Entretanto a relação de como o estresse poderia levar a estes “end-points” no organismo ainda é obscura.

ADEQUAÇÃO DO MODELO DE SUBJUGAÇÃO EM CAMUNDONGOS COMO ESTRESSE PSICOSSOCIAL PROLONGADO

Em nosso experimento de subjugação de camundongos por um período prolongado, a temperatura corpórea basal não difere entre os grupos antes do experimento (medida no 1º dia no período da manhã, antes de qualquer manipulação experimental) e nem mesmo após as 2 primeiras semanas de pareamento do grupo experimental (7º e 14º dia). No 21º dia, que constitui um período de 3 semanas de estresse psicossocial diário, existe uma hipertermia basal no grupo experimental em relação ao grupo controle. Este resultado foi consistente nas 2 baterias experimentais, sugerindo a ocorrência de uma alteração da

sensibilidade à regulação térmica frente ao estresse prolongado após 21 dias. Este resultado demonstra a efetividade de nosso modelo experimental em induzir um estresse fisiologicamente detectável.

A hipertermia reativa ao estresse agudo de manipulação também foi investigada. Os animais subjugados prolongadamente apresentaram uma redução nesta resposta quando comparados aos animais que não passaram pelo estímulo estressante. Pode-se sugerir que os animais que sofreram o estresse psicossocial prolongado se habituaram à situação estressante e “percebem” ou “se incomodam” menos (aumento no limiar cognitivo) com o estresse agudo de manipulação, levando a uma hipertermia reativa menor. A redução da resposta hipertérmica ao estresse agudo pode ser também devido a uma tolerância em mecanismos fisiológicos responsáveis à hipertermia, ou regulação térmica corporal, proveniente da exposição contínua ao estresse psicossocial. Estes resultados ainda sugerem haver uma generalização do tipo de estresse (psicossocial x físico). Mais uma vez, estes resultados demonstram que o modelo experimental de estresse psicossocial empregado resultou em alterações fisiológicas adaptativas.

A ausência de alteração na concentração de corticosterona plasmática entre os grupos de animais foi um dado inesperado para nós. Os níveis de corticosterona plasmática têm sido utilizados como índice de estresse agudo (Korte, 2001). Porém, durante estresse crônico,

tem sido demonstrado que, após o aumento que ocorre inicialmente nas primeiras semanas, os níveis de corticosterona retornam aos basais, mesmo com a exposição continuada ao agente estressor (Silberman, Wald & Genaro, 2003; Reber *et al.*, 2006). Assim, os dados de concentração de corticosterona plasmática similares entre camundongos estressados e não estressados, podem ser devido a processos adaptativos no eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) durante a exposição prolongada ao estresse, para proteger o organismo dos efeitos deletérios de níveis elevados de glicocorticóides.

ESTRESSE PSICOSSOCIAL PROLONGADO E TAMANHO DOS TELÔMEROS

Nos últimos anos, e especialmente com o trabalho de Epel *et al.* (2004), foi evidenciada uma forte correlação entre o aumento do estresse e a diminuição dos telômeros de células sanguíneas em mulheres.

A regulação do tamanho dos telômeros em células de mamíferos é complexa (Prowser & Greider, 1995). Em humanos, estes podem ter tamanho entre 5 e 20 quilobases, já em camundongos podem variar de 20 a 150 quilobases (*apud* Flanary & Streit, 2003). O tamanho dos telômeros é um indicador da capacidade proliferativa das células (Allsopp *et al.*, 1992) e depende tanto da idade celular, quanto do

números divisões a que ela foi submetida (*apud* Flanary & Streit, 2003). Células com longos telômeros são susceptíveis a um maior número de divisões celulares em comparação com células com telômeros menores (Harley *et al.*, 1990; Harley, 1991; Allsopp *et al.*, 1992). A senescência celular pode também ocorrer independentemente da replicação, sendo pelo encurtamento do telômeros (Harley *et al.*, 1990).

A diminuição no tamanho relativo médio dos telômeros em células hipocâmpais foi evidenciada em nossos experimentos para o grupo estressado quando comparado ao grupo controle. Os telômeros neste grupo estavam aproximadamente 58% reduzidos. Não podemos discriminar em qual(is) tipo(s) celular(es) do hipocampo ocorreu esta redução no comprimento telomérico. Sabe-se que os neurônios são células pós-mitóticas, porém as microglias sofrem multiplicação mitótica. Adicionalmente, no hipocampo existem neurônios com poder proliferativo (neurogênese).

EXPRESSÃO GÊNICA DA TELOMERASE E SUA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO HIPOCAMPUS APÓS ESTRESSE PSICOSSOCIAL PROLONGADO

Camundongos possuem telômeros com tamanhos que podem atingir vários quilobases, sendo especialmente a linhagem C57BL/6J de *Mus musculus* a que possui aqueles com maior extensão (Kipling & Cooke, 1990; Starling *et al.*, 1990). A atividade da enzima telomerase é

supostamente necessária para a replicação celular no alongamento destes telômeros.

Investigamos se a redução do tamanho de telômeros observada poderia ser devido a uma alteração na expressão do gene referente à telomerase, através da quantificação do RNAm codificador da sua subunidade catalítica mTert (Meyerson e col., 1997). Nossos resultados mostraram quantidades similares do RNAm da mTert no hipocampo de camundongos estressados e daqueles do grupo controle.

Apesar da expressão gênica ser similar, a redução de telômeros observada nos camundongos estressados ainda poderia ser explicada por uma alteração pós-transcricional e/ou pós-traducional da telomerase (Maser & DePinho, 2002), comprometendo assim sua atividade enzimática. A atividade enzimática da telomerase no nosso modelo experimental permaneceu sem diferenças entre os grupos controle e estressado, possuindo apenas níveis basais de expressão.

Embora nossos experimentos tenham sido realizados em um tecido pós-mitótico de maneira geral, onde a atividade da enzima telomerase é limitada, ainda assim existem células com poder proliferativo na região investigada. Além disso, Fu e col. (2002) demonstraram que a atividade desta enzima pode ser induzida em situações de alteração na homeostase do hipocampo, como indução de danos teciduais e epilepsia.

POSSÍVEIS CAUSAS PARA A REDUÇÃO DO TAMANHO DOS TELÔMEROS NO HIPOCAMPO

Apesar de não podermos excluir uma alteração temporária da expressão gênica ou da atividade da telomerase, que não tenha sido detectada no período após o estresse prolongado estudado, nossos resultados levantam a hipótese de que a diminuição dos telômeros tenha ocorrido por mecanismos não relacionados com a enzima telomerase.

De acordo com Gilley (2007), os telômeros podem sofrer influência de três forças que levam ao seu atrito (redução), acarretando em disfunção e danos potenciais. Estas forças são o envelhecimento, a genética e o ambiente. Dentre os fatores ambientais, o estresse oxidativo direto pode levar à perda da interação entre as proteínas teloméricas com o telômero, além de promover perda na sua função (Opresko e col., 2005; Gilley e col., 2001).

Bar-Or e col. (2002) demonstraram que a seqüência telomérica, mesmo de fita dupla, é bastante susceptível a danos causados por espécies reativas de oxigênio, especialmente aos radicais hidroxilas, e em seus experimentos induz quebras teloméricas causadas pelo estresse oxidativo mediado por cobre conjuntamente ao ácido ascórbico. Neste mesmo sentido, Furumoto e col. (1998) demonstram que o

encurtamento dos telômeros é reduzido por meio do enriquecimento intracelular com vitamina A, reconhecida por seu efeito antioxidante no combate dos radicais livres. Recentemente, Von Zsiglinicki (2002) discute em uma revisão as diversas maneiras de como o estresse oxidativo pode diminuir o tamanho dos telômeros.

De acordo com esta linha de raciocínio, alguns estudos recentes têm demonstrado que o estresse psicossocial pode levar a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis pelo estresse oxidativo. O estresse de imobilização em ratos aumenta a peroxidação lipídica (Muqbil & Banu, 2006; Zaidi e col. 2005). Camundongos expostos a estresse populacional, isolamento social e de confronto demonstraram um aumento na excreção de biopirinas, metabólito oxidativo da bilirrubina (Myiashita, 2006).

Assim, uma hipótese bastante plausível para explicar nossos resultados seria o aumento do estresse oxidativo hipocampal induzido pelo estresse de subjugação prolongado nos camundongos. A administração de antioxidantes neste modelo animal poderia ser utilizada para testar esta hipótese.

Ainda, a redução do tamanho relativo médio dos telômeros no hipocampo de camundongos estressados poderia refletir a senescência microglial. A importância funcional desta senescência não é conhecida, uma vez que o papel das microglias no SNC ainda é controverso.

Enquanto que alguns trabalhos demonstram efeito protetor para as microglias, outros sugerem um efeito deletério neuronal (Hailer, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apresentamos neste trabalho a padronização do modelo de estresse psicossocial prolongado em camundongos.

Estes experimentos foram repetidos em 2 baterias experimentais em momentos distintos. Os resultados mostraram que a subjugação prolongada em camundongos da linhagem C57BL/6J não altera o ganho de peso corporal. A temperatura corporal dos camundongos subjugados se encontra elevada no 21º dia e a hipertermia reativa a um estresse agudo está reduzida nestes animais, sugerindo um processo adaptativo. A concentração de corticosterona plasmática não difere após o estresse psicossocial prolongado, de forma concordante com resultados recentes na literatura, também sugerindo alterações adaptativas.

De acordo com nossa hipótese inicial, este estresse levou a uma redução no tamanho das proteções cromossômicas terminais, os telômeros. Um dos mecanismos de reparo do tamanho dos telômeros descritos na literatura é através da telomerase. Investigamos se a expressão gênica desta enzima pudesse estar alterada e verificamos que se encontra similar. Também investigamos como se encontrava a atividade desta enzima de reparo, mas o estresse psicossocial não induziu alterações neste sentido.

Este é um resultado importante e inédito na literatura. Apesar de não termos identificado um mecanismo para explicar a redução do

telômero verificada em hipocampos de animais subjugados prolongadamente, este parece ser independente da ação enzimática da telomerase. O estresse oxidativo seria um possível evento candidato à redução dos telômeros, que merece ser investigado.

Assim, estes dados respondem às questões levantadas em nosso estudo e abrem novos questionamentos:

- 1- Qual é o sinal ou sinais responsáveis pela tradução do estresse psicossocial em um evento molecular/celular associado ao envelhecimento e maior susceptibilidade a doenças? Teria a participação do estresse oxidativo celular?
- 2- Quando ocorre e, mais importante, é passível de reversão?
- 3- Quais as consequências desta redução telomérica nas células neurais hipocâmpais?
- 4- Isto acontece nos neurônios (na grande maioria células pós-mitóticas) ou na glia? Ou em ambos?
- 5- Esta redução do tamanho dos telômeros também está presente em outras regiões cerebrais dos animais subjugados?
- 6- Isto também ocorre em humanos?

REFERÊNCIAS

- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. **Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology**. Physiol Rev. 2005 Apr;85(2):523-69.
- Adams J, Martin-Ruiz C, Pearce MS, White M, Parker L, von Zglinicki T. **No association between socio-economic status and white blood cell telomere length**. Aging Cell. 2007 Feb;6(1):125-8.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. **Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 1;89(21):10114-8.
- Baek S, Bu Y, Kim H, Kim H. **Telomerase induction in astrocytes of Sprague-Dawley rat after ischemic brain injury**. Neurosci Lett. 2004 Jun 3;363(1):94-6.
- Ballone GJ. **Curso sobre Estresse** - in. PsiqWeb Psiquiatria Geral, Internet, última revisão, 2002 - disponível em <http://www.psiqweb.med.br/cursos/stress1.html>
- Bar-Or D, Winkler JV. **Copper is involved in hydrogen-peroxide-induced DNA damage**. Free Radic Biol Med. 2002 Jan 15;32(2):197-9.
- Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Panerai AE, Sgoifo A, Dantzer R, Parmigiani S. **Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure**. Neurosci Biobehav Rev. 2005 Feb;29(1):67-81. Epub 2004 Dec 9.

- Bibancos T, Jardim DL, Aneas I, Chiavegatto S. **Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice.** Genes Brain Behav. 2007; 6(6): 529-539.
- Blackburn EH. **Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions.** FEBS Lett. 2005 Feb 7;579(4):859-62.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, *et al.* **Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.** Science. 1998 Jan 16;279(5349):349-52.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. **Hippocampal volume reduction in major depression.** Am J Psychiatry. 2000 Jan;157(1):115-8.
- Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA, Seibyl JP, Southwick SM, *et al.* **MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder.** Am J Psychiatry. 1995 Jul;152(7):973-81.
- Bremner JD, Randall P, Vermetten E, Staib L, Bronen RA, Mazure C, *et al.* **Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse: a preliminary report.** Biol Psychiatry. 1997 Jan 1;41(1):23-32.
- Bremner JD, Scott TM, Delaney RC, Southwick SM, Mason JW, Johnson DR, *et al.* **Deficits in short-term memory in posttraumatic stress disorder.** Am J Psychiatry. 1993 Jul;150(7):1015-9.
- Brown ES, Woolston D, Frol A, Bobadilla L, Khan DA, Hanczyc M, *et al.* **Hippocampal volume, spectroscopy, cognition and mood in patients receiving corticosteroid therapy.** Biol Psychiatry. 2004;55(5):538-45.

- Brown GW, Prudo R. **Psychiatric disorder in a rural and an urban population: 1. Aetiology of depression.** Psychol Med. 1981 Aug;11(3):581-99.
- Brunori M, Luciano P, Gilson E, Geli V. **The telomerase cycle: normal and pathological aspects.** J Mol Med. 2005 Jan 4; [Epub ahead of print]
- Burt DB, Zembar MJ, Niederehe G. **Depression and memory impairment: a meta-analysis of the association, its pattern, and specificity.** Psychol Bull. 1995 Mar;117(2):285-305.
- Buwalda B, Kole MH, Veenema AH, Huininga M, de Boer SF, Korte SM, Koolhaas JM. **Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning** Bi. Neurosci Biobehav Rev. 2005 Feb;29(1):83-97.
- Callicott RJ, Womack JE. **Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres.** Comp Med. 2006 Feb;56(1):17-22.
- Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. **Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older.** Lancet. 2003 Feb 1;361(9355):393-5.
- Cawthon RM. **Telomere measurement by quantitative PCR.** Nucleic Acids Res. 2002;30(10):e47.
- Cech TR. **Beginning to understand the end of the chromosome.** Cell. 2004 Jan 23;116(2):273-9.
- Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN. **Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening.** Nucleic Acids Res. 2003 Mar 1;31(5):1576-83.
- Cherkas LF, Aviv A, Valdes AM, Hunkin JL, Gardner JP, Surdulescu GL, Kimura M, Spector TD. **The effects of social status on biological aging**

- as measured by white-blood-cell telomere length.** Aging Cell. 2006 Oct;5(5):361-5.
- Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ. **Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jan 30;98(3):1277-81. Epub 2001 Jan 16.
- Coviello-McLaughlin GM, Prowse KR. **Telomere length regulation during postnatal development and ageing in Mus spretus.** Nucleic Acids Res. 1997; 25(15):3051-8.
- Czéh B, Welt T, Fischer AK, Erhardt A, Schmitt W, Müller MB, Toschi N, Fuchs E, Keck ME. **Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis.** Biol Psychiatry. 2002 Dec 1;52(11):1057-65.
- Eleftheriou BE, Boehlke KW. **Brain monoamine oxidase in mice after exposure to aggression and defeat.** Science. 1967 Mar 31;155(770):1693-4.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM. **Accelerated telomere shortening in response to life stress.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 7;101(49):17312-5. Epub 2004 Dec 1.
- Epel ES, Lin J, Wilhelm FH, Wolkowitz OM, Cawthon R, Adler NE, Dolbier C, Mendes WB, Blackburn EH. **Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors.** Psychoneuroendocrinology. 2006 Apr;31(3):277-87. Epub 2005 Nov 17.
- Flanary BE, Streit WJ. **Telomeres shorten with age in rat cerebellum and cortex in vivo.** J Anti Aging Med. 2003;6(4):299-308.

- Fossel M. **Cell senescence in human aging: a review of the theory.** In Vivo. 2000; 14(1):29-34.
- Fu W, Killen M, Culmsee C, Dhar S, Pandita TK, Mattson MP. **The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function.** J Mol Neurosci. 2000 Feb-Apr;14(1-2):3-15.
- Fu W, Lee J, Guo Z, Mattson MP. **Seizures and tissue injury induce telomerase in hippocampal microglial cells.** Exp Neurol. 2002 Dec;178(2):294-300.
- Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E, Miwa N. **Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress.** Life Sci. 1998;63(11):935-48.
- Gilley D, Herbert BS, Huda N, Tanaka H, Reed T. **Factors impacting human telomere homeostasis and age-related disease.** Mech Ageing Dev. 2008 Jan-Feb;129(1-2):27-34. Epub 2007 Oct 30.
- Gilley D, Tanaka H, Hande MP, Kurimasa A, Li GC, Oshimura M, Chen DJ. **DNA-PKcs is critical for telomere capping.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):15084-8. Epub 2001 Dec 11.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. **Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation.** J Neurosci. 1997 Apr 1;17(7):2492-8.
- Graeber MB, Tetzlaff W, Streit WJ, Kreutzberg GW. **Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy.** Neurosci Lett. 1988 Mar 10;85(3):317-21.

- Grant EC, Mackintosh JH. **A comparison of the social postures of some laboratory rodents.** Behaviour. 1963. 21(1): 246-59.
- Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB, DePinho RA. **Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation.** Oncogene. 1998 Apr 2;16(13):1723-30.
- Greider CW, Blackburn EH. **Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts.** Cell. 1985 Dec;43(2 Pt 1):405-13.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. **Telomeres, telomerase and cancer.** Scientific American, Feb. 1996, pp. 92-97.
- Hailer NP. **Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells.** Prog Neurobiol. 2008 Mar;84(3):211-33. Epub 2007 Dec 23.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. **Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.** Nature. 1990 May 31;345(6274):458-60.
- Harley CB. **Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?** Mutat Res. 1991 Mar-Nov;256(2-6):271-82.
- Herbert BS, Hochreiter AE, Wright WE, Shay JW. **Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol.** Nat Protoc. 2006;1(3):1583-90.
- Kang HJ, Choi YS, Hong SB, Kim KW, Woo RS, Won SJ, *et al.* **Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity.** J Neurosci. 2004 Feb 11;24(6):1280-7.
- Keeney AJ, Hogg S, Marsden CA. **Alterations in core body temperature, locomotor activity, and corticosterone following acute and repeated**

- social defeat of male NMRI mice.** *Physiol Behav.* 2001 Sep 1-15;74(1-2):177-84.
- Keeney AJ, Hogg S. **Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression.** *Behav Pharmacol.* 1999;10(8):753-64.
- Kim NW, Wu F. **Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP).** *Nucleic Acids Res.* 1997 Jul 1;25(13):2595-7.
- Kipling D, Cooke HJ. **Hypervariable ultra-long telomeres in mice.** *Nature.* 1990;347(6291):400-2.
- Kipling D, Cooke HJ. **Hypervariable ultra-long telomeres in mice.** *Nature.* 1990 Sep 27;347(6291):400-2.
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A. **Social stress in rats and mice.** *Acta Physiol Scand Suppl.* 1997;640:69-72.
- Korte SM. **Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology.** *Neurosci Biobehav Rev.* 2001 Mar;25(2):117-42.
- Kotrschal A, Ilmonen P, Penn DJ. **Stress impacts telomere dynamics.** *Biol Lett.* 2007 Apr 22;3(2):128-30.
- Kudryavtseva NN, Bakshtanovskaya IV, Koryakina LA. **Social model of depression in mice of C57BL/6J strain.** *Pharmacol Biochem Behav.* 1991 Feb;38(2):315-20.
- Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN. **Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats.** *FASEB J.* 1996 Nov;10(13):1532-8.
- Maser RS, DePinho RA. **Keeping telomerase in its place.** *Nat Med.* 2002 Sep;8(9):934-6.

- Mason JW, Jones JA, Ricketts PT, Brady JV, Tolliver GA. **Urinary aldosterone and urine volume responses to 72-hr. avoidance sessions in the monkey.** Psychosom Med. 1968 Sep-Oct;30(5):Suppl:733-45.
- McEwen BS, Magarinos AM, Reagan LP. **Studies of hormone action in the hippocampal formation: possible relevance to depression and diabetes.** J Psychosom Res. 2002;53(4):883-90.
- McEwen BS, Magarinos AM. **Stress effects on morphology and function of the hippocampus.** Ann N Y Acad Sci. 1997 Jun 21;821:271-84.
- McEwen BS. **Protective and damaging effects of stress mediators.** N Engl J Med. 1998;338(3):171-9.
- McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. **Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress.** Biol Psychiatry. 1995;37(6):383-93.
- Mervaala E, Fohr J, Kononen M, Valkonen-Korhonen M, Vainio P, Partanen K, *et al.* **Quantitative MRI of the hippocampus and amygdala in severe depression.** Psychol Med. 2000;30(1):117-25.
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, *et al.* **hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization.** Cell. 1997 Aug 22;90(4):785-95.
- Miczek KA, O'Donnell JM. **Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa.** Psychopharmacology (Berl). 1978;57(1):47-55.
- Miczek KA, Thompson ML, Shuster L. **Opioid-like analgesia in defeated mice.** Science. 1982 Mar 19;215(4539):1520-2.

- Miyashita T, Yamaguchi T, Motoyama K, Unno K, Nakano Y, Shimoi K. **Social stress increases biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in mouse urine.** Biochem Biophys Res Commun. 2006 Oct 20;349(2):775-80. Epub 2006 Aug 24.
- Morin GB. **The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats.** Cell 59(3):521-9. (1989).
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. **Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions.** Endocr Rev. 1984 Winter;5(1):25-44.
- Muqbil I, Banu N. **Enhancement of pro-oxidant effect of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) in rats by pre-exposure to restraint stress.** Cancer Lett. 2006 Aug 28;240(2):213-20. Epub 2005 Nov 2.
- Nelson RJ, Chiavegatto S. **Aggression in knockout mice.** ILAR J. 2000;41(3):153-62.
- Opresko PL, Fan J, Danzy S, Wilson DM 3rd, Bohr VA. **Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2.** Nucleic Acids Res. 2005 Feb 24;33(4):1230-9. Print 2005.
- Panosian LA, Porter VR, Valenzuela HF, Zhu X, Reback E, Masterman D, Cummings JL, Effros RB. **Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status.** Neurobiol Aging. 2003 Jan-Feb;24(1):77-84.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. **Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.** Nature. 1977 Apr 21;266(5604):730-2.
- Prowse KR, Avilion AA, Greider CW. **Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Feb 15;90(4):1493-7.

- Prowse KR, Greider CW. **Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May 23;92(11):4818-22.
- Reber SO, Birkeneder L, Veenema AH, Obermeier F, Falk W, Straub RH, Neumann ID. **Adrenal insufficiency and colonic inflammation after a novel chronic psycho-social stress paradigm in mice: implications and mechanisms.** Endocrinology. 2007 Feb;148(2):670-82. Epub 2006 Nov 16.
- Reber SO, Obermeier F, Straub HR, Falk W, Neumann ID. **Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration.** Endocrinology. 2006 Oct;147(10):4968-76.
- Sapolsky RM. **Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders.** Arch Gen Psychiatry. 2000 Oct;57(10):925-35.
- Sapolsky RM. **Organismal stress and telomeric aging: an unexpected connection.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 14;101(50):17323-4. Epub 2004 Dec 3.
- Sapolsky RM. **Why stress is bad for your brain.** Science. 1996 Aug 9;273(5276):749-50.
- Segerstrom SC, Miller GE. **Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry.** Psychol Bull. 2004 Jul;130(4):601-30.
- Selye, H. **Stress and disease.** Science. 1955 Oct 7;122(3171):625-31.
- Selye, H. **The stress of life.** New York : McGraw-Hill, 1956. 324 p.

- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. **Hippocampal atrophy in recurrent major depression.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 30;93(9):3908-13.
- Silberman DM, Wald MR, Genaro AM. **Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity.** J Neuroimmunol. 2003 Nov;144(1-2):53-60.
- Silberman DM, Wald MR, Genaro AM. **Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity.** J Neuroimmunol. 2003 Nov;144(1-2):53-60.
- Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, *et al.* **Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging.** Biol Psychiatry. 2006 Sep 1;60(5):432-5.
- Starling JA, Maule J, Hastie ND, Allshire RC. **Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable.** Nucleic Acids Res. 1990 Dec 11;18(23):6881-8.
- Thompson EA, de Wied D. **The relationship between the antidiuretic activity of rat eye plexus blood and passive avoidance behaviour.** Physiol Behav. 1973 Sep;11(3):377-80.
- Tidey JW, Miczek KA. **Acquisition of cocaine self-administration after social stress: role of accumbens dopamine.** Psychopharmacology (Berl). 1997 Apr;130(3):203-12.
- Tornatzky W, Miczek KA. **Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress.** Physiol Behav. 1993 May;53(5):983-93.

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** Genome Biol. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.
- von Zglinicki T, Serra V, Lorenz M, Saretzki G, Lenzen-Grossimlghaus R, Gessner R, Risch A, Steinhagen-Thiessen E. **Short telomeres in patients with vascular dementia: an indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor?** Lab Invest. 2000;80(11):1739-47.
- von Zglinicki T. **Oxidative stress shortens telomeres.** Trends Biochem Sci. 2002;27(7):339-44.
- Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao H, Grossman BH, Shay JW, *et al.* **Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor.** J Natl Cancer Inst. 2003;95(16):1211-8.
- Yap JJ, Covington HE 3rd, Gale MC, Datta R, Miczek KA. **Behavioral sensitization due to social defeat stress in mice: antagonism at mGluR5 and NMDA receptors.** Psychopharmacology (Berl). 2005 Apr;179(1):230-9. Epub 2004 Oct 23.
- Yap JJ, Takase LF, Kochman LJ, Fornal CA, Miczek KA, Jacobs BL. **Repeated brief social defeat episodes in mice: effects on cell proliferation in the dentate gyrus.** Behav Brain Res., 2006 Sep 25;172(2):344-50.
- Zaidi G, Panda H, Supakar PC. **Increased phosphorylation and decreased level of IkappaBalpha during aging in rat liver.** Biogerontology. 2005;6(2):141-5.
- Zhang P, Dilley C, Mattson MP. **DNA damage responses in neural cells: Focus on the telomere.** Neuroscience. 2007 Apr 14;145(4):1439-48.

Zhu H, Fu W, Mattson MP. **The catalytic subunit of telomerase protects neurons against amyloid beta-peptide-induced apoptosis.** J Neurochem. 2000 Jul;75(1):117-24.

Zijlmans JM, Martens UM, Poon SS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK, Lansdorp PM. **Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 8;94(14):7423-8.

Materiais

MATERIAL AUXILIAR 1

Registro fotográfico do procedimento de indução de estresse psicossocial prolongado. 1. Residente isolado agressivo; 2. Introdução do animal experimental a ser subjugado na gaiola do residente agressivo; 3. Primeiro contato entre os animais para reconhecimento; 4, 5 e 6. Seqüência de perseguições e interações agressivas com mordidas por parte do residente até a subjugação do camundongo experimental; 7. Introdução da tela para separação; 8. Animais separados, permanecendo assim por 30 minutos.

MATERIAL AUXILIAR 2

Verificação do grau de subjugação dos camundongos por meio de escores semi-quantitativos. R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8 indicam o camundongo agressivo utilizado nos pareamentos.

EXPERIMENTO DE SUBJUGAÇÃO - BATERIA 1

	número do animal experimental											
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
paream. 1	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
paream. 2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R2	R2	R1	R2
paream. 3	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R2	R1	R1	R2
paream. 4	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R2	R1	R2	R1
paream. 5	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R1	R2	R1	R2
paream. 6	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R1	R2	R1	R2
paream. 7	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R1	R2	R1	R2
paream. 8	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1
paream. 9	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1
paream. 10	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1
paream. 11	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1
paream. 12	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3
paream. 13	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3	R1	R3
paream. 14	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
paream. 15	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
paream. 16	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
paream. 17	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
paream. 18	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1
paream. 19	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1
paream. 20	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1
paream. 21	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1

EXPERIMENTO DE SUBJUGAÇÃO - BATERIA 2

	número do animal experimental															
	25	27	29	31	33	35	37	39	43	45	47	49	51	53		
paream. 1	R5	R6	R5	R6	R5											
paream. 2	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R6							
paream. 3	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	
paream. 4	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	
paream. 5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	
paream. 6	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	
paream. 7	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	
paream. 8	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	
paream. 9	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	
paream. 10	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	
paream. 11	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	
paream. 12	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	
paream. 13	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	R7	R8	
paream. 14	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	
paream. 15	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	
paream. 16	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	
paream. 17	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	
paream. 18	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	
paream. 19	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	
paream. 20	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	
paream. 21	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	
paream. 22	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	
paream. 23	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	
paream. 24	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	
paream. 25	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	R6	R5	
paream. 26																
paream. 27																

	FORTEMENTE SUBJUGADO, APRESENTANDO SINAIS DE MUITO MEDO, MESMO APÓS SEPARAÇÃO (+++)
	SUBJUGADO (++)
	HOUVE INTERAÇÃO AGRESSIVA, MAS SEM SUBJUGAÇÃO (++)
	SUBJUGADO SEM INTERAÇÃO AGRESSIVA (+)
	NÃO SUBJUGADO (0)

MATERIAL AUXILIAR 3

Esquematização dos comportamentos agressivos observados durante o pareamento residente-intruso durante a indução do estresse de subjugação. 1- Luta; 2- mordidas no dorso; 3- subjugação; 4- tentativa de cópula; 5- mordidas no pescoço; 6- pareamento lateral; 7- perseguição; 8- *grooming* violento; 9- agitação de cauda.

MATERIAL AUXILIAR 4

Curva padrão para cálculo da quantidade relativa de transcrito no ensaio de qTRAP. $R^2=0,9195$; $Y_{int}=38,388$. $\text{Log}^{1800}=3,2412$; $\text{Log}^{900}=2,985$; $\text{Log}^{450}=2,6396$.

Anexos

ANEXO I Parecer do comitê de ética sobre o trabalho desenvolvido.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29.09.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **772/05**, intitulado: **"Estudo dos telômeros em tecido hipocampal de camundongos submetidos a um estresse psicossocial prolongado"** apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. José Eduardo Krieger**

Pesquisador (a) Executante: **Sr. José Pereira Júnior**

CAPPesq, 29 de Setembro de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP

..