

Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia
Programa de Pós-Graduação

João Paulo Correia Lima

**Efeitos de um estresse social sobre a atividade
imune inata de ratos “intrusos”**

São Paulo
2007

João Paulo Correia Lima

Efeitos de um estresse social sobre a atividade imune inata de ratos “intrusos”

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Área de Concentração:
Neurociências e Comportamento

Orientador:
Prof. Dr. João Palermo-Neto

Co-Orientador:
Doutor Dario Abbud Righi

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Lima, João Paulo Correia.

Efeitos de um estresse social sobre a atividade imune inata de ratos “intrusos” / João Paulo Correia Lima; orientador João Palermo-Neto, co-orientador Dario Abbud Righi. -- São Paulo, 2007.

130 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Neuroimunomodulação 2. Stress 3. Neutrófilos 4. Serotonina
5. Ansiedade 6. Ratos I. Título.

QP356.47

FOLHA DE APROVAÇÃO

LIMA, João Paulo Correia

Efeitos de um estresse social sobre a atividade imune inata de ratos “intrusos”

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Neurociência.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aprovado em ____/____/____.

Este trabalho e o esforço que o sustentou,
é dedicado à tentativa de me fazer um pouco merecedor
da confiança em mim depositada por aqueles que buscam ajuda,
me concedendo o privilégio e a licença de participar,
por alguns momentos, de suas vidas.

Assim como também dedico os poucos méritos desse trabalho
aos amigos e familiares que souberam,
com sua paciência e generosidade,
rodear-me da compreensão por tantas ausências.

AGRADECIMENTOS

Como não poderia deixar de ser, especialmente para um psicólogo empreendendo aventura temerária em um Laboratório de Patologia, tenho muito a agradecer a muitos:

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Patologia-VPT da FMVZ, sempre presentes e ocupados em viabilizar, com o máximo conforto e pontualidade, todos os recursos necessários a mim e a todos que lá trabalham: dos animais, ao café, dos reagentes ao material. Assim como e nos mesmos termos a todos os funcionários da Pós-Graduação do IP e da Secretaria do Programa de Neurociências e Comportamento.

A todos os professores, sempre solícitos e atenciosos, que com a simpatia dos vocacionados sempre souberam bem acolher minhas dúvidas e dificuldades.

Um agradecimento especial aos colegas e professores que participaram de maneira mais próxima, sem os quais absolutamente não teria sido possível o presente trabalho:

Prof.. César Ades, pela sua instigadora prosa, pelos caminhos indicados e por fazer da investigação um prazer, o de estar entre pessoas e viver em um mundo tão belo e curioso.

Dario Abbud Righi, quem mais de perto acompanhou os trabalhos, pelos seus ensinamentos e direções, que, sempre entusiástico com sua inabalável fé nas pessoas e com seus múltiplos talentos, tornou tudo muito mais agradável e ameno, registro aqui, meu abraço fraterno.

Elza M. Faquim, a atenciosa bibliotecária da FMVZ.

Glauclie Jussilane Alves, pelo auxílio na coleta de tecidos encefálicos e citometria.

Prof. Jorge C. Flório, pela inestimável colaboração e sempre bem humorada disposição.

Júlia S. Queiroz, pela sua carinhosa indicação do meu nome para este trabalho.

Karin Kieling, pela atenção constante e auxílio nos mistérios e enigmas de um laboratório.

Prof. Luiz G. de Britto, pelo seu estímulo e orientação, sem o qual aqui não estaria.

Márcia H. Sukikara, pela generosa disponibilidade para o ensino de várias técnicas.

Priscila Viau Furtado, pelas imprescindíveis análises de corticosterona,

Ricardo Lazzarini, pela disposição sempre sorridente e positiva,

Soraya Habr, pelo ensino paciente de técnicas e procedimentos cirúrgicos,

Viviane Ferraz de Paula, pelo auxílio inestimável com o citômetro e

Wanderley M. Quinteiro Filho, pela dedicação de incansáveis horas de cirurgia habilidosa.

A todos os amigos do Departamento de Patologia da FMVZ que, com sua presença, ajuda em centenas de detalhes (pequenos e grandes), cujos bons momentos e amizade fizeram dos meus tempos de trabalho neste Laboratório uma experiência mais do que acadêmica, mas uma parte de minha história, que, desde já, se reveste da agradável nostalgia da vida bem vivida.

E, por fim, a quem já é tamanha minha lista de agradeceres que ficou maior que meu vocabulário, não há verbo nem prosódia, gramática ou prosa para expressar minha gratidão e a importância de sua presença em minha jornada, não só a que aqui se resume nestas páginas, mas também naquela – especialmente esta – de que estas são introdução. Espero, um dia, poder transmiti-lhe em gesto, melhor sucedâneo das palavras, minha gratidão e admiração pelo homem que acredita no que faz e nos faz acreditar que podemos fazer, cuja força criou e mantém esse nosso grupo: o querido Prof. Dr. João Palermo Neto.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Em alguns lugares, a generosidade é tão espontânea que gestos dela decorrentes acontecessem com tanta naturalidade que se fazem cotidianas, tão comuns, que as pessoas que o cometem nem se apercebessem disso. Assim fosse com todas as coisas boas, como o foi comigo nos laboratórios em que trabalhei e que fui tão bem recebido. Mas, se a pessoa que tem por natural e simples a capacidade de acolhimento e comunhão de recursos, quem recebe não pode perder a noção do seu valor.

Por isso, agradecimentos mais que especiais dedico ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, que, me abrindo suas portas, cedendo os equipamentos e todo o pessoal e recursos dos seus laboratórios e biotérios, que sabemos de difícil e árdua obtenção e manutenção, possibilitou a realização deste trabalho

Apreendi com tudo isso, não apenas Neuroimunomodulação, mas também a generosidade desinteressada que permeia a Ciência.

RESUMO

LIMA, J. P. C. **Efeitos de um Estresse Social sobre a Atividade Imunológica Inata de Ratos “Intrusos”**. [Effects of A Social Stress Over Innate Immune Response of “Intruders” Rats.] 2007. 130 f. (Dissertação em Neurociência e Comportamento). Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Foram estudados os efeitos de um estresse social, produzido pela introdução de um rato, na condição de “intruso”, por uma hora, em uma comunidade formada por três elementos (macho dominante, macho submisso e fêmea), com relações sociais pré-estabelecidas, sobre o comportamento, a bioquímica e a atividade imune inata de neutrófilos. Os animais intrusos apresentaram, em relação ao grupo controle, tendência a serem mais ativos e menos ansiosos no Campo Aberto e no Labirinto em Cruz Elevado, níveis significativamente mais elevados de corticosterona sérica, *burst* oxidativo induzido por SAPI significativamente aumentado e, tanto no córtex frontal como no hipotálamo, sistemas serotoninérgicos significativamente mais ativados. Os dados, foram interpretados como decorrentes de uma reação de estresse preparando o organismo dos animais intrusos para novo desafio: um eixo HPA mais ativado, com conseqüências favoráveis para uma ação rápida; uma resposta imune inata mais efetiva, para defesa contra possíveis injúrias e uma neuroquímica denotando um refreamento de comportamentos impulsivos, permitindo escolhas mais adequadas em contexto de confrontação social. Essa reação tornou os organismos mais ativos e eficazes, um exemplo do aspecto positivo do estresse. Demonstrou-se, também, a existência e importância das grandes diferenças individuais e necessidade de se tratar estatisticamente e interpretar com muito cuidado os efeitos de estímulos estressores mais sutis, onde essas diferenças despontam com menor clareza e podendo induzir a erro interpretativo.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação, stress social, neutrófilos, 5HT, ansiedade.

ABSTRACT

LIMA, J. P. C. Efeitos de um Estresse Social sobre a Atividade Imunológica Inata de Ratos “Intrusos”. [Effects of A Social Stress Over Innate Immune Response of “Intruders” Rats.] 2007. 130 f. (Dissertação em Neurociência e Comportamento). Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The present work shows the effects of social stress, produced by introducing a rat, in the condition of “intruder”, for one hour, in a community formed for three elements namely a dominant male, submissive male and a female, with preset social relations, concerning their behaviour, the biochemistry and the innate immune activity of neutrophils. The intruder animals displayed, in relationship to the control group, a tendency towards being more active and less anxious in the Open Field and the Plus Maze, as well as of serum corticosterone levels with higher values, as well as its oxidative burst being significantly increased. And, as in the frontal cortex as in hypothalamus is concerned, the author found significant activation of serotonergic systems. The data, had been indicative of the function of the reaction of stress in order to prepare the organism for a challenge: a activated HPA axis was increased, with favorable consequences for a fast action; an innate immune reply more effective and neurochemistry denoting inhibition of impulsive behaviours, allowing more adjusted choices in the context of social confrontation. This reaction turned the organisms more active and efficient, in an example of the positive aspect of stress reaction. The data also demonstrated the existence and importance of the great individual differences and the need of keeping in mind the statistic approach and very careful interpretation of subtle stressors, whenever these differences appear clearly and may eventually induce to an interpretative error.

Word-key: neuroimmunomodulation, social stress, neutrophils, 5HT, anxiety.

SUMÁRIO

<i>1.- INTRODUÇÃO</i>	11
<i>2.- REVISÃO DE LITERATURA</i>	14
2.1.- DEFINIÇÃO DE NEUROIMUNOMODULAÇÃO (NIM)	14
2.2.- CONSIDERAÇÕES SOBRE ORIGENS E ANTECEDENTES DA NIM	14
2.3.- O SURGIMENTO DA NIM	18
2.4.- GENERALIDADES SOBRE A NIM	23
2.5.- DEFINIÇÕES DOS TERMOS DO TÍTULO	35
2.6.- GENERALIZAÇÕES DO MODELO ANIMAL PARA O SER HUMANO	48
2.7.- O RATO WISTAR COMO ANIMAL SOCIAL	50
2.8.- PROPOSIÇÃO DO PRESENTE TRABALHO	51
<i>3.- OBJETIVOS</i>	54
3.1.- OBJETIVO GERAL	54
3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
<i>4.- MATERIAL E MÉTODOS</i>	55
4.1.- ANIMAIS	55
4.2.- FÁRMACOS, REAGENTE E SUBSTÂNCIAS BIOLÓGICAS	55
4.3.- EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTOS	56
<i>5.- ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	70
<i>6.- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS</i>	71
EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS INTRUSOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	71
- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	71
PARTE 1 – CAMPO ABERTO	71

<u>PARTE 2 – LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)</u>	<u>73</u>
<u>EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DO BURST OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS E DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA DE RATOS INTRUSOS</u>	<u>74</u>
<u>- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</u>	<u>74</u>
<u>PARTE 1 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA</u>	<u>75</u>
<u>PARTE 2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS</u>	<u>75</u>
<u>EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DO TURNOVER E DOSAGEM DOS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES</u>	<u>76</u>
<u>- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</u>	<u>76</u>
<u>PARTE 1 – DOSAGENS NEUROQUÍMICAS DO HIPOTÁLAMO</u>	<u>76</u>
<u>PARTE 2 – DOSAGENS NEUROQUÍMICAS DO CÓRTEX FRONTAL</u>	<u>78</u>
<u>EXPERIMENTO 4 – DETERMINAÇÃO DE CORRELAÇÕES ENTRE OS DADOS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E DE ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS DE RATOS INTRUSOS</u>	<u>79</u>
<u>7.- DISCUSSÃO</u>	<u>81</u>
<u>8.- CONCLUSÕES</u>	<u>115</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>117</u>
<u>APÊNDICES</u>	<u>126</u>
<u>APÊNDICE A – DESCRIÇÃO SUMÁRIA DA RECEPTÃO DOS RATOS INTRUSOS NAS COLÔNIAS</u>	<u>127</u>
<u>APÊNDICE B – GRÁFICOS E TABELAS</u>	<u>136</u>

1 INTRODUÇÃO

A Ciência, que não é um projeto acabado e nem, por certo, “acabável”; caracteriza-se pelos conhecimentos sempre mutantes e provisórios que proporciona. Mesmo assim, muitos têm sido aqueles que demandam dela préstimos, quase religiosos, na busca de soluções para enigmas e para fundamentar o próprio posicionamento do ser humano diante de si mesmo e do universo. A Ciência é apenas – como se fosse pouco – o imenso esforço conjunto de gerações de apaixonados pela Natureza e pelos seus mistérios que procuram acercar-se desse fugidio objeto de curiosidade e encanto: o conhecimento das coisas que nos cercam. Cada pequena nova notícia conseguida, fruto do trabalho árduo, objeto da determinação e da constância da paixão de uns poucos é recebida com entusiasmo e alegria, gerando novas perguntas e novos projetos. De fato, ao conhecimento novo quase sempre são apresentadas contradições que demandam novas aventuras para solvê-las, na busca de um melhor entendimento. E assim é o conhecimento científico: provisório e cambiante, mas sempre em constante expansão, onde cada passo leva a novas questões que estimulam novos passos. Alguns destes passos são mais circunscritos e, embora não menos importantes, confirmam dados, acrescentam pequenas novidades; outros, pelo acúmulo de informações que proporcionam ou pela sua própria natureza, conduzem a grandes reformas e, às vezes, até mesmo a revoluções e a completas reestruturações do pensamento. A “Neuroimunomodulação” ou “Psiconeuroimunologia”, penso, é um desses casos.

Quando estudante de graduação, em meados da década de 1980, assistia com grande constrangimento à luta que se travava entre “organicistas x psicologicistas”, fato que ocorria em um momento histórico em que a visão sobre cada campo ainda era muito rudimentar e, muito menos se sabia, então, como se dava essa passagem do campo

orgânico ao psíquico e vice-versa. A essa luta, acreditava eu, deveria assistir bem mais preocupado o paciente, que solicitava da Ciência a ajuda para o seu sofrer.

Uma imensidão de fatos clínicos foi-se acumulando e pressionando o monopólio do modelo anatomocitopatológico de Virchow, que havia adquirido, naquela época, imenso prestígio. Mas, como de hábito em Ciência, por mais perfeita que seja uma fórmula, ela não consegue abarcar o todo. Porém, não há como impedir que o entusiasmo inicial leve a que se tente resolver o todo com uma nova fórmula ou com um novo paradigma, que prevalece até que se venha a perceber as limitações daquilo que se usa.

Foi nesse vai-e-vem entre discussão-dúvida-progresso-discussão que surgiram as ferramentas técnicas e conceituais para o estudo das relações entre os grandes sistemas do ser humano e de outros organismos. A Neuroimunomodulação (NIM), área que estuda as relações recíprocas existentes entre o Sistema Imune (SI) e o Sistema Nervoso (SN) e de como essas inteirações se processam, é uma destas áreas. Essa área da Ciência possibilita uma análise do organismo como um sistema complexo e, não como um feixe de sistemas isolados. Uma verdadeira “sociopsicobiologia” ganha espaço, sendo feita sem os reducionismos e disputas que caracterizavam a oposição “organicistas x psicologicistas”. Pelo contrário, nestes novos modelos, uma área dá subsídios e orientações à outra proporcionando uma imagem muito mais vívida do complexo sistema dinâmico que é um organismo; cada qual, à sua vez é Ariadne deixando seu fio no frio labirinto da dúvida onde habita o Minotauro da necessidade, motor da atividade humana. Sem dúvida, as novas ferramentas deste ramo do conhecimento têm trazido grandes progressos e benefícios no avanço do entendimento dos fenômenos da natureza, assim como, e talvez principalmente, no relativo ao atendimento clínico/ambulatorial. Necessidade impulsora da atividade científica e demanda sempre urgente, a cada dia fica mais evidente que o sofrimento humano é multideterminado e que os sistemas agem conjuntamente e que não

se pode compreender certo parâmetro ou sintoma, sem que se considere o contexto em que ele ocorre, sem considerar o todo.

O presente trabalho é um projeto de investigação que se insere dentro desse campo. Busca constatar vínculos e influências mútuas entre a rede social, o comportamento, o sistema nervoso e o sistema imunológico de um organismo. Especificamente, pretende-se estudar o impacto de uma situação social aguda e de grande demanda adaptativa – a confrontação social – sobre os comportamentos e sobre o sistema imune inato de ratos. Isso se fará através da exposição de um roedor, o chamado “rato intruso”, a uma comunidade de co-específicos já estabelecida. Para tanto, após exposição a essa comunidade, os ratos “intrusos” serão avaliados para registro do comportamento no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, e para análise de sua imunidade inata através dos registros da atividade de neutrófilos circulantes (*burst* oxidativo e fagocitose); também serão avaliados os níveis séricos de corticosterona e os níveis e *turnover* de alguns neurotransmissores em áreas do Sistema Nervoso Central destes animais (serotonina e noradrenalina).

Espera-se que os frutos deste experimento venham a acrescentar alguns elementos no entendimento destas relações, de forma tal a avivar uma discussão em torno da repercussão que um estresse de natureza social tem sobre o comportamento e a imunidade inata de um organismo, assim como sobre os processos a ela subjacentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A atividade acadêmico-científica é uma atividade eminentemente social. Tudo o que fazemos está relacionado com os trabalhos de toda uma comunidade. A revisão que apresentaremos abaixo é a contextualização da presente dissertação, dentro dessa área de produção científica coletiva, da qual explicitaremos os itens mais intimamente relacionados ao escopo de nosso trabalho.

2.1 DEFINIÇÃO DE NEUROIMUNOMODULAÇÃO (NIM)

É uma área de estudos interdisciplinares que se ocupa da análise das relações recíprocas entre os Sistemas Nervoso e Imune, os “mecanismos através dos quais estes sistemas trocam informações, que resultam em influência mútua, com possíveis implicações fisiológicas e patológicas” (PINTO, 2004). Algumas vezes, encontramos o vocábulo “psiconeuroimunologia” como sinônimo *sensu lato*, ou, em um sentido mais específico, com ênfase no aspecto comportamental como ponto de partida para análise das relações entre os citados sistemas. Assumimos o uso diferenciado de ambas as denominações, uma vez que há delineamentos experimentais mais aproximados para abordagem de cada uma delas e, pelo fato de que os diferentes vocábulos, nesse caso, enriquecem nossa compreensão deste relacionamento recíproco.

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE ORIGENS E ANTECEDENTES

Penso que sem uma visão da história de qualquer atividade ou ramo do conhecimento, por mais sucinta que ela seja, dificilmente pode alguém acercar-se de uma

compreensão mais acertada de sua natureza. Este pressuposto serve tanto para um assunto em pesquisa como, também, para as próprias disciplinas que o compõem. Uma noção do desenvolvimento histórico de um campo de estudo nos faz compreender a seqüência lógica em que os conceitos foram se desenvolvendo, conferindo significado e sentido ao conjunto de esforços empreendidos na busca de seu entendimento. Assim, uma pequena consideração sobre o histórico da NIM é muito necessária. Esse campo de pesquisa surgiu da necessidade de aproximar dados de várias disciplinas para solução ou compreensão de um problema antigo: as relações corpo-mente, dentro de uma perspectiva que não fosse metafísica, mas sim científica. Não que a metafísica seja menor ou pior em qualquer sentido, mas porque Ciência e Metafísica, pertencendo a esferas diferentes, não podem fazer muito uma pela outra, no dia a dia. Podem – e já é muito – uma inspirar a outra com temas e proposições de trabalhos e reflexões, mas não penso que uma delas possa solver os dilemas da outra.

A Ciência herdou as dificuldades práticas decorrentes da cisão do ser humano em corpo e mente, radicalizada nos anos 1600 e sintetizada por Descartes, como representante máximo da cultura de sua época, nas expressões “*rés cogitans*” e “*rés extensa*” (DESCARTES, 1978), sendo a primeira a “matéria pensante” e a segunda a “matéria extensa”, ou seja, aquela que ocupa lugar, que é mensurável, que é palpável, tem forma. Instaurou-se, assim, o início de uma visão do ser humano como composto de duas substâncias de naturezas absolutamente diversas. A isso seguiu-se uma grande dificuldade filosófica, pois tornou-se difícil não apenas determinar de modo mais específico a natureza dessas substâncias, mas também explicar a possibilidade de influências mútuas (TEIXEIRA, 1998; TRIPICCHIO; TRIPICCHIO, 2004). Por outro lado, os efeitos das então chamadas “paixões” e seus correlatos físicos eram reconhecidos desde os tempos mais remotos, quando autores médicos como Hipócrates (2003) ou teóricos como

Aristóteles (1982) - para ficar com dois dos mais representativos pensadores – as incluíam entre os ítems passíveis de causar doenças e, sem dúvida, de influenciar as funções orgânicas. Como se depreende do que se lê nessa passagem de Platão (1973), no diálogo “Carmides”: “a cura para muitas doenças é desconhecida dos médicos de *Hellas*, porque eles desconsideram o todo, o que precisa ser estudado também, porque a parte nunca vai estar bem a menos que o todo também esteja”, indicando as dificuldades técnicas, já de então, para se abarcar o problema do todo na saúde e na doença.

Nesse ponto, penso ter a Ciência herdado as conseqüências práticas desse dilema filosófico, um fato lógico se considerarmos que muitas vezes a própria Ciência é um acordo de “boa vontade” filosófica compartilhada por uma comunidade (GIANNETTI, 2003). Assim penso, porque grande parte da metodologia científica foi construída baseada em idéias representadas pelo sistema cartesiano, cujos pressupostos colocam a mente e o corpo em esferas absolutamente diferentes e de acesso também diferenciado. A prática clínica, no entanto e especificamente, desmente cotidianamente esse pressuposto dualista (MELLO Filho, 1992). São inúmeros os casos que em nosso consultório observamos e qualquer clínico pode comprovar, como o surgimento e o agravamento de sintomas físicos seguidos a grandes traumas ou situações difíceis dos pacientes. De igual forma, fatos laboratoriais trazem, na grande maioria das vezes, problemas teóricos profundos e interessantes, que nos levam à busca de correlações clínicas, forçando a necessidade de revisões metodológicas¹. Essa discussão metafísica, no entanto, não nos compete, como cientistas ou profissionais da saúde. Por mais interessante que ela seja, deve-se deixá-la aos filósofos, já que não se pode albergar tudo. Porém, não podemos prescindir dela, já que é a investigação e expressão dos sistemas que estruturam nossa visão do mundo, onde planejamos e ocorre a

1 - Para uma visão mais detalhada dessa questão, sugerimos a leitura dos textos muito instrutivos de Avelino Luiz Rodrigues (RODRIGUES; FRANÇA, 1977), professor dessa Universidade, e também o de Lipowski (1984).

atividade científica. Como nos disse uma vez Rubem Alves (1982), sem a Filosofia o cientista corre o risco de se tornar aquele remador que fica muito feliz em que o navio vai cada vez mais depressa, mas que não tem a menor idéia de para onde o barco está indo. Neste contexto, é que os cientistas e clínicos têm trilhado seus próprios caminhos e contribuído, cada qual à sua maneira, para a compreensão da questão mente-corpo, traduzindo-a ora clínica e ora laboratorialmente como uma “teoria do campo unificado” da Biologia, descobrindo razões e mecanismos que dão ao organismo a propriedade de ser um “todo” a que se referiu Platão, como citado acima: o incremento da cultura dualista que se desenvolveu no positivismo contemporâneo (TURATO, 2003), trouxe diferenças metodológicas entre a Psicologia e a Fisiologia/Anatomopatologia de então (RODRIGUES; FRANÇA, 1997); estas diferenças não permitiam o diálogo entre estas áreas de pesquisa, como se vê em Pierre Janet (1997), que dizia que “o paralelismo dos sentimentos e das alterações viscerais já não se aceita hoje”, como se fosse um progresso.

O pano de fundo onde se desenvolveu a NIM, em resumo, foi aquele da dificuldade metodológica e da falta de dados concretos sobre as relações entre a atividade do Sistema Nervoso e uma série de eventos observados tanto na clínica como no laboratório, dentre os quais aqueles ligados à esfera comportamental e imune, como pode ser apreciado em autores como Damásio (1996), Bear et al (2002) e Kandel (1999). As alterações da atividade nervosa e/ou do comportamento observadas na vigência de processos imuno-inflamatórios (como por exemplo, processos infecciosos), enquadram-se, também, neste contexto.

O que acentuo é que não podemos perder de vista que a NIM não surgiria na Índia e que um tibetano não se indagaria sobre a questão corpo-mente. E, ao final e ao todo, são todos problemas técnicos e dificuldades que advêm da nossa tradição filosófica e métodos que construímos em nossa civilização para abordamos nossas dúvidas e problemas. A volta

e o retorno a esse contexto conceitual, o trabalho com atenção constante nos fundamentos filosóficos de nossa atividade é de suma importância para que não nos deixemos afundar nas falsas noções de “obviedade” que destroem nossa criatividade, com a promessa fácil e cômodo apego das questões “já resolvidas” ou do “não concordo” a priori com que tantos profissionais e pesquisadores recebem conceitos e idéias de outras áreas.

Penso que o primeiro dever do pesquisador é manter uma mentalidade sempre renovada pelo exercício diário do desapego a opiniões formadas e idéias feitas. O prazer do cientista e o progresso da Ciência se fazem com o brilho da dúvida, do mistério desafiante. O mundo das certezas e idéias feitas só interessa ao Poder, onde quer que se encontre.

2.3 O SURGIMENTO DA NIM

A abordagem destes fatos de difícil compreensão lógica – sintomas clínicos que desafiavam a anatomopatologia, evidências de que sistemas concebidos como isolados estariam se influenciando – começou a ser possível principalmente quando do desenvolvimento do conceito de “stress”, cunhado por Hans Selye, que, como sempre, foi fruto do trabalho de muitos anteriores a ele.

2.3.1 estresse

Esse conceito, criado pelo austríaco Hans Selye em 1936 (SELYE, 1936) foi, talvez, o maior passo para a aproximação dos conhecimentos de diferentes disciplinas e para a criação de um campo de estudo capaz de atender, ao mesmo tempo, demandas científicas e clínicas. Seu surgimento permitiu abarcar, de maneira experimental, os problemas que não podiam ser resolvidos com uma atuação embasada apenas na

compreensão compartimentalizada dos órgãos e sistemas dos diversos organismos, abordagem privilegiada pela Ciência analítica de então, onde se buscava entender “o papel de cada coisa” não a relação entre eles.

Selye chamou de “stress” (transposto para nossa língua com “estresse”) o “grau de desgaste total causado pela vida” (SELYE, 1965). Como nos ensina nessa obra, o estresse não é danoso em si; representa apenas o esforço feito pelo organismo para adaptar-se às demandas das tensões e pressões do dia-a-dia. Como ele diz “a vida é especialmente um processo de adaptação à condição em que vivemos” (SELYE, 1965).

As implicações dos trabalhos de Selye foram por demais amplas para serem todas comentadas aqui, neste trabalho. Um dos seus grandes méritos, no entanto, foi observar que, independentemente do tipo de agente agressor segue-se sempre uma mesma síndrome, quando o organismo é submetido a uma tensão adaptativa por período prolongado, que tem as seguintes características:

- aumento de tamanho do córtex das glândulas supra-renais;
- atrofia do timo, baço, nódulos e de outras estruturas linfáticas, diminuição e até mesmo desaparecimento de leucócitos e
- aparecimento de gastrite e, inclusive, de úlceras perfuradas no estomago e no duodeno.

Selye também percebeu que essa tríade fazia parte de um grande esforço do organismo para fazer frente a uma demanda; em outras palavras, estes sinais e sintomas estereotipados eram parte de um esforço orgânico de adaptação.

Neste contexto, o fracasso ou esgotamento dessa tentativa de adaptação era o fator que desencadeava a tríade observada e/ou os muitos outros sintomas que em seu conjunto foram chamados de “doenças de adaptação”. Esse processo foi denominado de “síndrome de adaptação geral”, que foi dividido posteriormente em três fases: alarme, adaptação e

exaustão, sendo este último aquele período em que se verifica a tríade exposta acima (SELYE, 1936).

Como nos legou o autor: “a vida é especialmente um processo de adaptação às circunstâncias em que subsistimos (...) O segredo da saúde e da felicidade reside no ajustamento bem sucedido às condições desse mundo (...); o preço do malogro, nesse grande processo de adaptação é constituído pela doença e infelicidade” (SELYE, 1965). Assim, neste momento, se uniram num mesmo contexto a “demanda externa”, o esforço fisiológico de adaptação do organismo e a capacidade psicológica de interpretar e mediar o comportamento nesses diversos contextos. Coube a Selye, relacionar funcionalmente o esforço adaptativo orgânico com o conhecimento fisiológico de então, inclusive com a resposta imunológica envolvida, para a qual chamou a atenção. Como observa Pinto (2004):

Como essa síndrome pode ser gerada por estímulos físicos e psicológicos, e tem decorrências tanto comportamentais quanto endócrinas, incluindo influência sobre a atividade de órgãos linfóides, e, conseqüentemente, sobre o sistema imunológico, parece natural supor que o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Imune (SI) interajam na preparação do organismo para acomodar mudanças impostas pelo estressor.

Ficamos então, além dessa noção, com aquela de que “estressor” ou “agente estressor” é todo estímulo, seja de que natureza for, que provoque no organismo um esforço adaptativo. Esse esforço pode ser produtivo ou não. No caso de não ser produtivo, o esforço orgânico não será suficiente para fazer frente ao desafio situacional e não o solucionará, de modo que o mesmo permanece, mantendo-se o esforço orgânico, até a exaustão e eventual falência geral dos sistemas. Para separar esses dois sentidos, a literatura (RODRIGUES; FRANÇA, 1997), costuma diferenciar o “distresse” do “eustresse”, sendo esse último o esforço produtivo e o primeiro o esforço que conduz à exaustão, chamando a atenção para o fato muitíssimo importante de que também é

igualmente nociva a ausência de um certo grau de solicitação ambiental sobre um organismo.

Estava lançada a ponte entre a fisiologia, movimentos moleculares, celulares e teciduais e os desafios ambientais de diversas naturezas, tendo como elo de ligação a vivência e interpretação desse ambiente. De modo que, começou a fazer sentido uma idéia unificada de “corpo e mente”. Já era possível pensar como a *rés cogitans* afeta a *rés extensa*. E, principalmente, se obteve uma abordagem experimental para os problemas dessa natureza: a visão, já bastante fundamentada, de que os mecanismos homeostáticos são integrados pelos sistemas nervoso e endócrino, amplia-se pela informação de que esses sistemas interagem com o sistema imune, de modo que respostas imunes alteram as funções neurais e endócrinas, assim como a recíproca também se verifica, conforme descreveremos melhor a seguir.

Começou, então, a fazer sentido que estados mentais ou avaliações cognitivas disparem reações fisiológicas, cujas vias e mecanismos começam a ser conhecidas e produzam efeitos orgânicos notáveis, funcionais ou estruturais, fazendo com que as observações clínicas deixassem de ser “apenas” relatos de casos, anedóticos, indicações baseadas na percepção e vivência clínicas, mostra da sagacidade dos experimentados. E esse fato é notado através de toda a história da luta dos seres humanos contra o sofrimento e a doença, como podemos observar nessa citação do médico Lorenzo Sassuoli (1402):

Deixe-me dizer algumas coisas sobre aquilo que deve evitar. Não importa se, de vez em quando, você se enraivece e vocifera, desde que o fervor e a vontade de viver continuem altos. O que faz mal é entristecer-se e preocupar-se excessivamente com as coisas. Porque isso, como toda a Física ensina, pode destruir o seu corpo, mais do que qualquer outra coisa (in BIZZARRI, 2001).

Ou nesta passagem de um livro do também médico, Archer, de 1673:

A observação que eu tenho feito na prática médica de muitos anos tem confirmado minha opinião de que a causa original da maior parte das doenças de homens e de mulheres, inclusive sua morte, é, em primeiro lugar, algum grande descontentamento, que traz o hábito da tristeza na mente. (in LIPOWSKI, 1984).

Essa intuição clínica, advinda da observação de inúmeros casos, voz corrente de todos os habituados em acompanhar o sofrimento e a doença, com o passar do tempo foi se estruturando em desenvolvimentos teóricos mais consistentes. Muitos trabalhos concorreram para esse desenvolvimento, como os de Cannon ou os de Freud e Franz Alexander, Groddeck, e muitos, muitos outros. Ciência é sempre uma atividade coletiva, e na nossa escalada, sempre ficam alguns marcos, onde – no momento – nos apoiamos.

2.3.2 Psiconeuroimunologia de Ader e Cohen

Robert Ader, psicólogo, no início da década de 70, a quem mais tarde se uniu Nicholas Cohen, imunologista, deu novo impulso à pesquisa interdisciplinar com a fundação da “Psiconeuroimunologia”, que, em linhas gerais e conforme já salientado, tem o mesmo sentido de NIM. Para Ader a Psiconeuroimunologia é o estudo das interações entre comportamento, função neural, endócrina e processos imunes. Este autor parte da premissa de que a adaptação é produto de um único e integrado sistema de defesa. Nesse sentido, cada parte desse sistema teria evoluído para executar funções especializadas. Conseqüentemente, a imunorregulação não poderia ser entendida completamente sem que se levasse em consideração as relações entre o organismo e os meios externo e interno no qual as respostas imunes ocorrem” (COHN, 2003). O trabalho inicial desse autor (ADER, 1974), baseou-se em um resultado para ele inesperado e que foi observado em um estudo que fazia de um condicionamento clássico ou pavloviano de aversão a um sabor. Neste trabalho, ciclofosfamida (um fármaco imunossupressor) era injetada no animal, logo após a ingestão de sacarina, pois a primeira causa desarranjos intestinais e a segunda é naturalmente preferida pelos animais utilizados por Ader (ratos). Após poucas apresentações associadas dessas substâncias, o rato adquiria um comportamento aversivo

em relação à sacarina. Mas, o surpreendente estava por vir: quando se iniciaram os procedimentos de extinção, onde o animal era repetidamente apresentado ao estímulo condicionado (sacarina) sem que o estímulo incondicionado (ciclofosfamida) estivesse presente (para desfazer-se a associação, e, portanto, o condicionamento), o que chamou a atenção de Ader foi o fato de que ocorria queda das competências imunológicas dos animais, que acabavam morrendo. Ader, então, se deu conta de que o que havia acontecido é que o sistema imune havia sido condicionado! A sacarina havia adquirido a capacidade de ser imunossupressora, juntamente com a capacidade de provocar desarranjos intestinais, pois ao ser apresentada aos animais condicionados repetidamente, havia provocado extensa e, várias vezes fatal, imunossupressão. A conclusão do trabalho foi a de que o SI podia aprender, como outros sistemas do organismo. Ora, o próximo pensamento, óbvio e automático é que havia forte conexão entre o SN e o SI. Com esses dados e conhecimentos e à luz da noção que tinha das idéias de estresse divulgadas por Hans Selye, o autor constituiu, em definitivo, o campo de estudo da NIM ou da Psiconeuroimunologia, como já definidos. Seus trabalhos podem ser encontrados em sua obra magna, “Psychoneuroimmunology”, já em sua quarta edição (ADER, 2006).

2.4 GENERALIDADES SOBRE A NIM

Passados anos de esforços conjuntos empreendidos por vários laboratórios (aqui na USP representado pelo Grupo de Neuroimunomodulação da FMVZ), por clínicos e por pesquisadores dedicados ao problema e, vale dizer, muito trabalho de paciente insistência com as resistências arraigadas contra as novas idéias, consolidou-se esse ramo da pesquisa. De maneira que hoje se tem uma metodologia e concepções próprias desse novo ramo da Ciência e novo campo de pesquisas, que estão resumidos a seguir:

2.4.1 efeitos do SN sobre o SI (SN \Rightarrow SI)

Ocorre quando uma situação qualquer que estimule o SNC produz como efeito, uma alteração da resposta imune. Exemplo clássico desta relação (SN \Rightarrow SI) pode ser encontrado no trabalho de Bartrop e seus colaboradores (BARTROP et al., 1977), em que se estudaram pessoas que haviam perdido seus cônjuges (luto); estas pessoas apresentavam uma diminuição do número das células T (células que intermedeiam e orquestram vários aspectos da resposta imune). Esse fato ocorria sem que se observassem alterações das taxas de hormônios glicocorticóides, levando a supor que esta diminuição se devia a sinais neurais. Outro exemplo muito interessante desta relação (SN \Rightarrow SI) pode ser encontrado no estudo de Morgulis (MORGULIS et al, 2004), realizado em nossos laboratórios. Os autores observaram que a convivência de camundongos saudáveis com outros doentes levava os animais saudáveis a apresentar, entre outros sinais e sintomas, uma leucopenia, apesar de manterem níveis normais de corticosterona. Esses estudos indicam que o SN tem vias que permitem afetar o SI, que não através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, isto é, através de hormônios glicocorticóides. Nos estudos clássicos a ênfase era no efeito dos hormônios do estresse sobre a resposta imune. Só ainda não se sabia qual eram as vias dessa influência.

Para o estudo de quais seriam essas vias não hormonais em que o SN afetaria o funcionamento do SI, através de vias próprias e específicas, se desenvolveu três métodos de estudo:

➤ emprego de técnicas que usam de estimulação de áreas específicas do SNC: através da estimulação elétrica de áreas do encéfalo pode-se, por exemplo, mensurar os efeitos dela decorrentes sobre o SI. Um exemplo disso é o trabalho de Vljakovic e colaboradores (VLAJOKOVIC et al. 1994) em que esses autores efetuaram estimulação elétrica da

substância cinzenta periaquedutal de ratos avaliando, após esse procedimento, a reação dos animais a uma imunização com hemácias de carneiro ou albumina bovina; notaram que esta estimulação elétrica aumentava a produção de anticorpos para ambos os antígenos.

➤ emprego de lesões experimentais no SNC: neste caso, ao invés de estimular áreas cerebrais para avaliação de seu impacto no SI, recorre-se a lesões do tecido nervoso para avaliar-se os efeitos que produzem nestes mesmos parâmetros. Como exemplo, pode-se citar o trabalho do grupo de Jankovic, por ser muito ilustrativo. Estes autores demonstraram que lesões praticadas no *locus ceruleus*, núcleo do tronco encefálico com maior concentração de neurônios noradrenérgicos do SNC, levava a uma diminuição da produção de anticorpos contra albumina bovina e uma redução do número de células T CD4+ circulantes e a uma atrofia do timo (JOVANOVA-NESIC; NIKOLIC; JANKOVIC, 1993).

➤ emprego de manipulação funcional (variáveis psicológicas): neste caso, várias linhas de trabalho têm sido usadas. Dentre estas, destacamos algumas, listadas abaixo, nas quais nos demoraremos um pouco mais. Os outros dois métodos (acima) são mais relacionados à localização de estruturas e vias envolvidas nos fenômenos identificados de modulação recíproca entre os sistemas nervoso e imune, campo de extrema importância, mas não central em nosso interesse. Já a investigação de variáveis psicológicas, não vai nos informar sobre as questões estruturais/anatômicas (infra-estrutura para a ocorrência dessa modulação), mas sim nos dar um quadro dessas estruturas e sistemas trabalhando, reagindo, como um todo organizado, frente a desafios situacionais elaborados pelo experimentador. O estudo das variáveis psicológicas vai, enfim, nos indicar a função e dinamismo do comportamento. Abaixo, alguns exemplos:

• condicionamentos de respostas imunes: como já sabemos, “condicionamento” é processo clássico, onde o pareamento de um estímulo, chamado incondicionado, que

natural/fisiologicamente elicia certa resposta (como o alimento elicia a salivação) com um estímulo inicialmente neutro (que não gera essa resposta, como o som de uma sineta), acaba por transferir essa capacidade eliciatória ao estímulo inicialmente neutro, processo descrito inicialmente por I. P. Pavlov (2003)². Daí, diz-se do segundo estímulo, “condicionado”, após adquirir a propriedade eliciatória da resposta, antes natural do estímulo incondicionado. Essa transferência da propriedade eliciatória só se dá sob a condição do pareamento, de onde a denominação de “condicionamento” ao processo. O autor, Pavlov (1970), acentuava que essa capacidade permitia uma maior capacidade adaptativa aos animais, pois podiam reagir a sinais dos objetos de importância biótica e não apenas aos mesmos. A estes chamou de primeiro sistema de sinais, que permitia uma plasticidade original a cada organismo e sua história. Pode-se citar como um elegante exemplo em que se valeu do condicionamento clássico para verificar se os parâmetros imunológicos eram afetados por processos de aprendizagem foi o de Palermo-Neto e Guimarães (2000). Nesse experimento, os autores procuraram verificar se era possível impor o condicionamento pavloviano em uma resposta anafilática do pulmão (LAR), um modelo experimental de asma em ratos. Dois experimentos foram realizados. No primeiro, a inalação de um aerossol da albumina de ovo (OVA), que induz sinais e os sintomas do LAR em ratos ova-sensibilizados, foi emparelhada com um estímulo audiovisual: o ruído do motor do vaporizador e uma luz verde indicativa de funcionamento do aparelho (estímulo CS, condicionado). Após a re-exposição ao CS, os sinais e os sintomas do LAR foram medidos quantitativamente nestes animais, usando-se uma escala de escores desenvolvida especialmente para esta avaliação. Sendo que os níveis da resposta de estresse e de ansiedade foram igualmente determinados. Os resultados mostraram que nos

2 – edição recente onde pode se apreciar os trabalhos originais de Ivan Petrovich Pavlov, é a bem cuidada re-impressão da editora Dover, em PAVLOV, 2003. Há também uma edição em português com o título “Reflexos Condicionados e Inibições”, I. P. Pavlov, da ed. Zahar e muitas outras versões.

ratos re-apresentados ao CS somente, os escores de LAR não eram significativamente diferentes daquelas dos animais re-apresentados ao CS e ao antígeno. Altos níveis de estresse e de ansiedade foram observados 30-40 minutos após o desafio dos animais OVA-sensibilizados com aerossol de OVA. No segundo experimento, os ratos sensibilizados com OVA e submetidos ou não ao condicionamento pavloviano foram observados no Campo Aberto e no Labirinto em Cruz Elevado na presença do estímulo condicionado, i.é., sem OVA; após as observações comportamentais os animais foram sacrificados para a determinação do nível do corticosterona sérica. Os dados comportamentais e bioquímicos mostraram altos níveis de estresse e de ansiedade nos ratos em que o antígeno foi emparelhado previamente com o CS. Os dados mostraram não somente que o LAR (asma) pode ser submetido ao condicionamento pavloviano, mas também expuseram o fato de grande significância que os altos níveis de estresse e da ansiedade estavam relacionados ao curso do LAR (asma). Na discussão o autor aponta que o SNC, via sistema nervoso autônomo, estaria habilitado a comunicar-se com o sistema imune e modular a resposta alérgica, assim como receber informações do sistema imune, alterando o comportamento. Nesse caso, se acentuaria que a resposta do organismo não é fragmentária, pois os sistemas não são incomunicáveis e sim funcionalmente interligados. Ao mesmo tempo, se associa a noção de flexibilidade adaptativa do conceito de “condicionamento” à resposta imune, enfatizando a variabilidade individual em função da história do organismo. Pode-se acrescentar que seria essa a finalidade de um organismo condicionável: tornar possível que estímulos-sinais provoquem respostas antes só disparadas por estímulos inatamente reconhecidos, tornando o organismo mais plástico e mais apto a adaptações. A flexibilidade parece ser interessante à vida e a variabilidade individual, sua máxima expressão.

• modelos de estresse: construindo situações controladas que induzem esforço adaptativo orgânico é possível mensurar as variações dos diversos parâmetros imunológicos. Nosso laboratório, sobre a orientação e coordenação do Prof. Dr. João Palermo Neto, tem produzido muitos trabalhos nessa linha. Um deles é o trabalho do colega Carlos de Paula Portela (PORTELA, 2004), onde se estudaram os efeitos do estresse social sobre a asma experimentalmente induzida em ratos. Especificamente, demonstrou-se uma correlação positiva entre os níveis de ansiedade/estresse e a resposta inflamatória pulmonar e um antagonismo parcial dos efeitos estresse pelo tratamento dos animais com capsaicina. Outros dois trabalhos, que citaremos dentro muitos, são de Evelise de Souza Monteiro Fonseca (2001) e de Welker Robespierre de Souza (2001). Fonseca demonstrou haver influência do estresse pré-natal da mãe sobre parâmetros comportamentais e de atividade de macrófagos da prole, discutindo esses dados à luz de uma ação do estresse pré-natal sobre o desenvolvimento do sistema catecolaminérgico desta mesma prole. As mães eram submetidas a choque inescapável nas patas no período da organogênese da gravidez. Após essas sessões, eram avaliados seus níveis de ansiedade no Campo Aberto (CA) e no Labirinto em Cruz Elevado (LCE), encontrando-se esses níveis elevados em relação aos animais do controle. A prole dessas ratas, assim estressadas, já nasciam com pesos menores e apresentavam maiores índices de ansiedade quando desafiadas com choque nas patas em sua vida adulta (medidos também no CA e no LCE). Em sessões de estresse por choque, na vida adulta, esses animais apresentaram menores níveis de corticosterona sérica e a análise da atividade de seus macrófagos peritoniais mostravam menores índices de fagocitose; os animais mostravam também elevados níveis de NOR e DA no SNC, o que levou a autora a discutir a participação do SNA, divisão simpática, nesses resultados. O trabalho de Souza (PALERMO-NETO, 2003) apresentou evidências experimentais de que um estresse físico (choques) e outro de natureza psicológica (observar a aplicação de

choque em um congêneres) afeta, ao mesmo tempo, a atividade de macrófagos, a taxa de crescimento do tumor de Ehrlich e os níveis de ansiedade, medidos pelos clássicos aparelhos de CA e LCE. Mais especificamente, o experimento consistiu, então, de um grupo que recebia choques inescapáveis e um outro grupo que recebia choques escapáveis (podia fugir para o compartimento onde o chão era isolado) e um grupo que presenciava aos choques inescapáveis, não recebendo estes choque algum. O resultado observado foi que o grupo dos animais que assistiam aos choques teve os diferentes parâmetros analisados modificados de forma semelhantes aos do grupo que recebia choque inescapável: menores índices de comportamento exploratório no CA e LCE, diminuição da atividade de macrófagos, mais desenvolvimento de tumor de Ehrlich pré-inoculado. A impossibilidade de escapar do choque, por outro lado, reduziu a magnitude das alterações observadas. Esses dados só confirmam a importância e o peso do estresse de caráter puramente psicológico (cognitivo), uma vez que os animais desse grupo não sofreram o menor dano físico. Os autores sugerem as íntimas relações entre os sistemas neural e imune, enfatizando também a importância do tipo de estresse sobre os fenômenos imunológicos.

Outra linha de pesquisa que tem sido desenvolvida nos nossos laboratórios é a do trabalho de Alves (2006), em que se investiga a atividade de neutrófilos em camundongos em função do tipo de companheiro de suas gaiolas. Em um grupo, os camundongos inoculados com o tumor convivem com companheiros saudáveis, em outro grupo, controle, animais também saudáveis convivem com companheiros saudáveis. Os camundongos que convivem com doentes apresentaram alterações comportamentais marcantes: letargia, interesse reduzido pelo ambiente e decréscimo da capacidade de reagir ao camundongo normal. Os resultados demonstram marcante diminuição dos níveis e aumento do *turnover*

de NOR no hipotálamo e decréscimo da atividade de neutrófilos (fagocitose por *S. aureus* e induzida por PMA) nos animais que conviveram com os doentes. Em trabalho anterior em que se usou o mesmo modelo e iniciando essa linha de pesquisa em nossos laboratórios, Morgulis et al (2004), demonstraram que se verificou imunodepressão sem que houvesse aumento dos níveis de corticosterona. De modo que, parece ser possível pensar que a responsabilidade pela diminuição da atividade de neutrófilos recai sobre as catecolaminas, uma vez que há receptores β -adrenérgicos na membrana celular de macrófagos e neutrófilos, que, quando ativados, modificam seu padrão funcional. (MORGULIS et al, 2004). Estes são alguns exemplos de trabalhos desenvolvidos pelo grupo de Neuroimunomodulação da FMVZ-UPS, onde se estuda a reação diversos tipos de estressores sobre a resposta imune.

2.4.2 efeitos do SI sobre o SN (SI \Rightarrow SN)

Esta vertente de análise é oposta à anterior. Nela o SNC é um dos seus principais produtos, o comportamento, se vê afetado por variações ocorridas no sistema imunológico. Esse ramo do estudo da NIM dedica-se a compreender como os sinais provenientes do sistema imune (anticorpos, citocinas, mediadores lipídicos e outros) são transmitidos ao SNC e quais resultados são consequência dessa sinalização. Esse estudo têm sido feito principalmente em duas áreas:

➤ substrato neural afetado: neste tipo de abordagem, estudam-se as áreas influenciadas, sistemas de neurotransmissão utilizados e mecanismos moleculares decorrentes desta interação. Como exemplo, podemos citar o clássico estudo de Besedovsky e colaboradores, onde demonstraram que a imunização com diferentes antígenos era capaz de induzir mudanças endócrinas dependentes do SNC. Eles também encontraram que, seguindo-se a

uma imunização, havia um aumento da taxa de disparo dos neurônios da região ventromedial do hipotálamo, no tempo correspondente ao pico de produção de anticorpos. (BESEDOVSKY et al, 1975). O mesmo autor, em outra publicação, faz ampla revisão dessas vias de interação, de onde podemos citar agora já clássicos exemplos, como o fato de que linfócitos secretarem fatores de liberação hormonais, como o CRH, ou a capacidade que tem a IL-1 de ativar a produção de CRH, via hipotálamo produzindo liberação de glicocorticóides (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). A lista de moléculas liberadas pelo sistema imune e as alterações que podem provocar no SNC é imensa, mas aqui nos limitaremos a dois desses exemplos.

➤ *decorrências funcionais*: nestes casos, estuda-se o comportamento e outros parâmetros fisiológicos. Uma maneira clássica para se ilustrar essas reações é a análise do chamado “comportamento doentio”, descrito primeiramente por Hart (1988). Trata-se do quadro de redução da atividade, inapetência, diminuição da libido e da motivação e febre que acompanham processos infecciosos-inflamatórios e que teriam como explicação uma necessidade adaptativa, desencadeada por citocinas (em especial a IL-1, conforme citado abaixo). Estas alterações, em seu sentido maior, colaborariam tanto para a sobrevivência como para a recuperação do doente, tendo claro papel adaptativo: a febre dificulta as condições de reprodução dos patógenos, a inapetência, diminuição da motivação e libido, diminuiriam os motivos para que o organismo se expusesse a novas fontes de infecção (competição por alimento, predadores, etc.) e pouparia energia que seria usada para o processo de combate à infecção e recuperação. Outro exemplo bastante ilustrativo da influência do Sistema Imune sobre o comportamento é o trabalho de Basso (2004), onde verificou que camundongos sensibilizados com ovalbumina apresentavam maiores índices de ansiedade, maiores índices de corticosterona com maior ativação do núcleo paraventricular do hipotálamo, além de observar que esses animais passavam a evitar

consumo de solução contendo clara de ovo. O autor indicou a relevância desses achados para a possível compreensão de desordens psicológicas em pacientes alérgicos. Ainda outro é o trabalho de Pinto (2004) em que seu desenho experimental, também com camundongos sensibilizados com OVA, permitiu confirmar os achados de Basso (citado acima) e de demonstrar que os animais assim sensibilizados evitavam ambientes nebulizados com OVA, demonstrando a influência da atividade imune sobre o comportamento. Usando técnicas de FOS e outros recursos, pode-se também confirmar a ativação de áreas encefálicas envolvida no estresse e na ativação autonômica e que as alterações comportamentais se deviam à presença de degranulação dos mastócitos mediadas por anticorpos IgE.

2.4.3 Concepções Teóricas da NIM

Em seu conjunto, todos esses estudos e dados coletados em laboratórios e em pesquisas isoladas permitiram a formulação de algumas noções axiomáticas básicas em relação à maneira através da qual concebemos o todo do funcionamento orgânico e seu impacto sobre o sistema imune e vice-versa. Assim:

➤ **visão integrada baseada no conhecimento das vias de interação SN ↔ SI:**

- bioquímica: os dois sistemas compartilham de receptores comuns para citocinas, neurotransmissores (NT), neuropeptídeos (NP) e hormônios. Estes produtos eram tidos anteriormente como específicos do SI ou do Sistema Neuroendócrino (SNE); sabe-se, hoje coexistirem nos tecidos linfóide, endócrino e nervoso. Assim, mediadores endócrinos e neurais podem afetar o SI e mediadores imunes podem afetar estruturas neurais e

endócrinas reciprocamente (BESEDOVISCK; DEL REY, 1996; ALVES; PALAERMO-NETO, 2007).

- anatômica: as relações profundas entre as terminações nervosas e as estruturas imunológicas permitem compreender a existência de uma íntima relação entre a atividade nervosa e a competência imunológica (MADEN; FELTEN, 1995); neste contexto, são bem conhecidas as associações das terminações nervosas simpáticas com os tecidos linfóides (FELTEN e col., 1985) e, também, a relevância de aferências vagais para informações geradas na periferia dos processos imune-inflamatórios (BASSO, 1999; ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

- endócrina (HHA – o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal): é o responsável pela secreção de glicocorticóides em situações de estresse ou infecção. Esse sistema é controlado por um grupo diversificado de aferências que atingem o núcleo para-ventricular (NPV) do hipotálamo, sendo esta região considerada crucial para regulação da atividade deste eixo (HERMAN; COLLINAN, 1997). Assim, a ativação do NPV pode ser causada por estressores físicos/comportamentais ou até mesmo por estimulação imune. Neste último caso, a ativação seria mediada direta ou indiretamente por citocinas, como a IL-1, IL-6 e TNF, que seriam produzidas por linfócitos e macrófagos ativados na região da infecção/inflamação. Essa ativação levaria à produção de CRH pelo NPV, ativando-se a hipófise que responderia produzindo ACTH, que, elevando os níveis de corticosteróides exerceria uma ação moduladora sobre diversas funções orgânicas, dentre as quais aquela que controla um processo inflamatório e/ou infeccioso em curso, inibindo, por exemplo, entre tantos fatores, a produção de IL-1 (DUNN, 1995).

➤ **a defesa dos organismos é estruturada em diferentes níveis e por diferentes sistemas que trocam informação constantemente e que se influenciam reciprocamente:** essa posição é o corolário da anterior, pois, como podemos observar nos dados acima e em outros obtidos em nossos laboratórios, podemos concordar com Basso (1999), quando afirma que esses resultados “permitem a discussão conceitual do Sistema Imune na fisiologia do animal, como também a relevância da integração dos diferentes sistemas orgânicos na elaboração de respostas adaptativas frente a estímulos provenientes do meio externo”. Essa posição se apoiaria nas relações entre a atividade do eixo HHA, com efeitos tanto comportamentais como imunes cuja atividade, por sua vez, também é modulada pelo SI, conforme exposto no item anterior.

2.4.4 Relevância e implicações clínicas da NIM

Há três maneiras de se alterar uma resposta imune pelo estresse, criando-se quadros conhecidos como “imunopatológicos”:

- a) falha de distinguir “eu” e “não eu”, levando a processos autoimunes,
- b) imunodeficiência, com quadros de baixa resistência a patógenos ou
- c) hipersensibilidade, alergia, com forte reação, desproporcional a um elemento qualquer ou mesmo respostas intensas a elementos inócuos.

Como vemos, há uma grande variedade de circunstâncias clínicas onde se pode aplicar esse conhecimento: não apenas naqueles quadros em que o estresse esteja produzindo o sintoma principal, como em quadros conhecidos como “distúrbios somatoformes” (OMS, 1998)), mas também naquelas em que o estresse pode estar disparando, mantendo ou agravando quadros de natureza diversa, conforme se pode ver nos estudos da OMS, onde os índices clínicos em diversas doenças é bem pior naqueles

indivíduos que padecem de depressão associada (OMS, 2007). Entender esses mecanismos e suas vias, não só dá suporte experimental para os fatos reconhecidos na clínica, como permitem modelos explicativos de como as situações às quais atribuímos tal ou qual efeito, pode produzi-lo. Do mesmo modo, quando da época de Semmelweis (NULAND, 2005), as pessoas já tinham clara noção de que a higiene podia afetar a recuperação de feridos em hospitais e que a limpeza e a ventilação estava associada às endemias hospitalares, mas faltava por completo qualquer explicação para o fenômeno. Por outro lado, estabelecendo-se uma base para a compreensão das influências recíprocas, pode-se separar o que é fato do que é, digamos, “folclore”, em clínica. Esse tipo de orientação pode nos permitir a criação de métodos de tratamento mais eficazes e novas linhas de pesquisa.

2.5 DEFINIÇÕES DOS TERMOS DO TÍTULO

O título do presente trabalho é “Efeitos do Estresse Social sobre a Atividade Imune Inata de Ratos ‘Intrusos’”, vamos apresentá-lo no contexto do que foi até agora discutido.

2.5.1 estresse

Esse conceito indica um esforço orgânico de adaptação frente às demandas ambientais. É nesse esforço adaptativo que serão analisadas, no presente trabalho, as relações $SN \Rightarrow SI$. Na prática, a situação experimental é um exemplo dentre muitas situações onde o desafio de viver vai exigir dos organismos – no caso, ratos – uma resposta e um esforço diante das suas necessidades e solicitações ambientais, que poderá levá-los à saúde e adaptação ou ao desgaste improdutivo e ao favorecimento da doença.

2.5.2 modelos de estresse

Há uma série de procedimentos padronizados para estudar o estresse e seus efeitos ou reflexos orgânicos. Geralmente, estes estudos são feitos em NIM com o propósito de testar o efeito de algum fármaco ou os processos que eles desencadeiam sobre o SI. A seguir comentamos alguns procedimentos indutores de estresse comumente empregados em laboratório cuja listagem será importante para nossas discussões. Análise mais detalhada pode ser conseguida em Souza (2001).

- imobilização-contenção: consiste em amarrar as patas dos animais e envolvê-los, ou não, posteriormente, firmemente com uma toalha ou fita adesiva ou, ainda, de colocá-los em um tubo estreito e que não permite movimentos.
- exposição ao frio: consiste em expor o animal a temperaturas que variam entre 4° C e 10°, de modo agudo ou crônico.
- natação forçada: consiste em colocar o roedor em um recipiente de água aquecida (37°), do qual não pode escapar, sendo obrigado a nadar para manter-se à superfície.
- ruído: consiste em expor o animal a ruídos que variam de 80-100 dB por um período de 60 minutos.
- choque inescapável: os animais são colocados em situações em que nada podem fazer para evitar um choque elétrico, geralmente liberado em suas patas, através da grade do piso de uma caixa metálica.
- observação de punição: um animal é colocado em situação a observar, de gaiola geminada (geralmente dividida em dois compartimentos por um separados removível de acrílico ou equivalente, perfurado), um congênere recebendo estimulação aversiva, mantendo com este contato visual, auditivo e olfativo, sem receber igual estímulo.

2.5.3 estresse social

Não é um tipo de procedimento. É um tipo de estressor. Podemos classificar o esforço adaptativo de um organismo de diversas maneiras e segundo diferentes critérios. No caso dos modelos acima citados, estamos apenas listando procedimentos, a título de ilustração, não fazendo uma verdadeira classificação. *Aqui, estamos utilizando o critério da natureza do estímulo que solicita o esforço adaptativo do organismo.* Poderíamos listar outros grupos de estressores, como químicos, radiativos, mecânicos, etc.

O casal Blanchard (BLANCHARD; BLANCHARD, 2001), apresenta uma interessante revisão dos modelos de estresse social, propriamente dito, definindo esses procedimentos (de estresse social) como aqueles que envolvem exposição de um animal a coespecífico. Os autores também chamam a atenção para o fato de que geralmente se estudam os machos adultos, nos quais a hierarquia de dominância é muito mais notável. A hierarquia dos machos também afeta uma grande variedade de comportamentos, como reprodução, interação social, alimentação, etc. Enquanto que na fêmea, fica mais restrito ao comportamento maternal.

Segundo esses autores, na citada revisão, podemos classificar os estudos e procedimentos que se baseiam na exposição de um animal a um coespecífico para estudos de estresse social seguindo diferentes critérios:

- segundo frequência da exposição
 - única (aguda)
 - intermitente
 - longa (crônica)
- segundo os tipos de interação, que podem variar conforme:
 - espécie

- gênero
- idade
- história prévia
- circunstâncias em que ocorre a exposição
 - segundo a natureza do comportamento, que se situaria em ponto entre os pólos de:
 - de afiliativo a agonista
 - de defensivo a agressivo
 - De acordo com a constelação grupal:
 - isolamento
 - díade (dois animais)
 - grupos (vários indivíduos)
 - colônia (vários indivíduos com relações estruturadas)
 - instável (dominância e hierarquias alteradas por inclusão ou exclusão de indivíduos)
 - multidão (colocação de mais indivíduos em um espaço do que é média da espécie)
 - Ambiente:
 - semi-natural
 - artificial
 - natural

Importante notar que cada tipo de procedimento, cada tipo de variável manipulada, produz um diferente tipo de estresse em indivíduos diferentes. Ou seja, para cada tipo de estresse, cada tipo de situação, há uma modulação específica das respostas que irão caracterizar o esforço adaptativo do animal. Mas, sendo escopo desse trabalho o de analisar os efeitos de um estressor de natureza social, a pergunta que cabe é: porque um estímulo ou situação social pode representar um estressor?

Organismos sociais o são por não se bastarem. Entre eles surge uma tessitura de relações com finalidades dirigidas a obter coisas ou eventos que sozinhos não conseguiriam. Em última análise, o organismo busca duas coisas, com toda a sua atividade:

- continuar vivo, em condições adequadas e
- reproduzir-se e garantir sua prole.

Por “condições adequadas” acima, podemos entender aquelas em que há existência de equilíbrio ambiental e relacional e que, por isto mesmo, não produzem problemas que forcem a atividade do organismo além de sua capacidade operacional fisiológica. O estado psíquico correspondente a esse estado de equilíbrio poder-se-ia chamar de “bem estar”.

No entanto, como já comentado, se os mecanismos de adaptação e ajuste são obrigados, pela relação entre demanda ambiental e repertório do organismo, a ultrapassar seus limites operacionais, eles se tornam nocivos, isto é, levam a disfunções, lesões ou falência de órgãos, sistemas ou até mesmo ameaçam a vida. Neste contexto, um mecanismo adaptativo perderia sua função e passaria a ser fonte e causa de problemas e dificuldades para a forma de vida para ele previsto. Portanto, como já se disse, tudo o que ameaça o indivíduo e que causa estresse, pode, eventualmente, se mantido por longo tempo ou ultrapassar certos limites, tornar-se prejudicial. Ora, se as relações de grupo são fundamentais para a sobrevivência e continuidade do organismo, qualquer coisa que ameace a posição hierárquica assumida por um membro, dentro desse grupo, será estressante.

Conforme nos ensina Freud (1973):

A oposição entre Psicologia Individual e Psicologia Social ou Coletiva - que à primeira vista pode parecer muito profunda - perde grande parte de sua significação se a submetemos a um exame mais detido. A Psicologia Individual se limita, certamente, ao homem isolado e investiga os caminhos pelos quais o mesmo tenta alcançar a satisfação de seus instintos, mas só muito poucas vezes e sobre determinadas condições excepcionais lhe é dado prescindir das relações de indivíduo com seus semelhantes.

O mesmo poderia ser dito, talvez, acerca de um animal mantido isolado. De fato, embora, existam muitos problemas relacionados ao uso de modelos de uma espécie para a compreensão de fenômenos que ocorrem em outra, conforme será discutido brevemente abaixo, não nos parece que a afirmativa do mestre de Viena seja circunscrita aos seres humanos. Pelo menos, em se tratando de organismos sociais.

Freud continua, no mesmo texto, nos dizendo que, nas relações sociais, os membros de uma mesma espécie podem assumir uma das seguintes quatro posições, que, salvo melhor juízo, poderão ser também aplicadas a uma comunidade de ratos (me parece justo que estudos sobre a organização social humana ajudem a entender mecanismos sociais de ratos, uma vez que as informações obtidas com eles muitas vezes foram utilizadas para a compreensão de fenômenos humanos):

- modelo: aprendizagem por imitação, por exemplo;
- objeto: quando o próprio indivíduo é fonte de satisfação instintiva;
- auxiliar: quando a soma de indivíduos de algum modo favorece alguma atividade conjunta;
- adversário: quando um igual se interpõe entre o indivíduo e a gratificação instintiva que busca.

Assim sendo, há grande variedade de oportunidades onde as relações sociais dos animais podem gerar situações de ameaça que solicitem esforços adaptativos. Isso poderia se dar, segundo penso, de três formas:

• pela ausência de relações sociais: a perda de relações sociais é tão importante que ameaças de exclusão podem tornar-se extremamente perigosas. Estudos recentes, por exemplo, colocam essa “emoção” decorrente da ameaça da perda de vínculos como uma reação de proteção e alarma de perigo acerca de relações importantes (BUSS, 2000). Como nos diz o próprio autor:

“cada ser humano vivo é uma história de sucesso evolucionário. Se qualquer um dos nossos ancestrais não tivesse conseguido sobreviver a uma idade do gelo, a uma seca, a um predador ou a uma peste, eles não seriam nossos ancestrais. Se qualquer um não tivesse conseguido cooperar com pelo menos alguns outros no

grupo ou tivesse caído abaixo de uma posição mínima na hierarquia social, teriam certamente se defrontado com a morte por serem expulsos do grupo. Se apenas um tivesse fracassado em escolher, cortejar e manter um parceiro, a cadeia anteriormente inviolada de descendentes teria sido irreparavelmente rompida, e não estaríamos vivos para contar a história. Cada um de nós deve a existência a milhares de gerações de ancestrais bem sucedidos. Como seus descendentes, herdamos as paixões que levaram ao seu sucesso – paixões que nos impelem e freqüentemente cegam numa jornada de vida inteira na luta pela sobrevivência, na caça de posição na busca de relações”.

Embora longa, a citação é perfeita para os propósitos desta discussão. Mais uma vez, pensa-se ser possível empregar o mesmo raciocínio com os ratos, uma vez que foi aplicada aqui uma fórmula geral de “organismos” e não como um mecanismo específico dos seres humanos.

- pela ameaça do igual nas relações: seja esta ameaça um empecilho para que o organismo atinja os fins que lhe são necessários ou a presença de um adversário capaz de lhe ferir nessa disputa. É preciso, porém, separar a reação de estresse diante de uma situação daquela de agressão, que muitas vezes acompanha a decisão de questões sociais. Em ambas, no entanto, haverá o desafio social – há um estressor – que põe em perigo a sobrevivência do animal e/ou a possibilidade de dano físico ou injúria que pode ser semelhante a uma queda ou ao enfrentamento com um predador.

- pelos mecanismos de controle da cooperação: os mecanismos de estruturação de uma rede cooperativa trazem em si muitos perigos de dano e castigo, bem como a possibilidade de exclusão, como já descrito acima. Essa abordagem cooperativa, no entanto, visaria à manutenção de uma finalidade importante para o grupo, tendo sido, por isso mesmo, referida como “comportamento altruísta” em estudos recentes com seres humanos (FEHER; FISCHBACHER, 2003).

Algumas vezes, no decorrer deste trabalho, o leitor encontrará a referência a certas “sutilezas” do estresse social, no sentido de que este estressor seria “sutil”. Penso que são necessárias algumas palavras sobre o sentido dessa palavra em nosso contexto.

Em primeiro lugar, é importante salientar que dizemos “sutil” em dois sentidos:

1 – *em relação, comparativamente* aos outros modelos de estresse utilizados em geral, para esse tipo de pesquisa (por exemplo, choque nas patas, contenção ou natação forçada) como listados acima, são modelos que reproduzem situações extremas ou limites, que nos paralelos humanos só teriam par em catástrofes, seqüestros ou tortura. Esses modelos seriam, talvez, modelos experimentais para categorias diagnósticas como síndrome do estresse pós-traumático (cf. GRAEFF, F. G; HETEM, L. A., 2004, para modelos animais desta síndrome), mas dificilmente seriam muito ilustrativos dos problemas mais cotidianos e em geral enfrentados pela imensa maioria dos organismos. São imensamente úteis para estudo dos mecanismos e vias de comunicação entre os sistemas, mas pouco dizem sobre as solicitações e mecanismos *utilizados em situações sociais propriamente ditas*. E a natureza do estímulo, a demanda da situação, é crucial para a caracterização da resposta, como já visto: embora, o estresse tenha uma base geral sempre igual, há toda uma modulação específica para cada tipo de resposta e situação (BUCKINGHAM;GILLIES;COWELL, 1997).

2.- usamos a palavra “sutil” para qualificar o estressor social também no sentido de dizer que ele permite uma margem de modulação bastante acentuada. Não é bruto, final ou padronizado como ocorre para certas respostas – mais uma vez – extremas. O clássico exemplo de nos defrontarmos com um leão. É um estímulo tão intenso e de natureza tal que dispara reações tão padronizadas, que a variabilidade da resposta vai ser mínima e em uma pequeníssima parcela da população. A maioria imensa das pessoas teriam reações e patamares de hormônios e neuromediadores extremamente semelhantes. Penso que essa estreita margem de variação encontrada em resposta a estressores extremos, decorre do fato de que não há uma solicitação

massiva do sistema de emergência automático que representa a fisiologia do estresse, provavelmente base e baseada na sua própria história evolutiva, uma vez que, podemos supor com boa chance de estarmos certos, o sistema de emergência luta-fuga-sobrevivência, veio primeiro e tem sua resposta mais profunda e padronizada. Por outro lado, baseio a idéia de “sutileza” no fato de que todos os sistemas que conheço só permitem margem de manobra quando não estão no seu limite. E também no fato de que as respostas tendem a ser mais padronizadas, tanto mais intensas forem as solicitações.

3.- ainda podemos acrescentar que “sutil” é um qualificativo em oposição ao bruto, ao óbvio. Em uma sessão de choques inescapáveis, há uma explicitude, se nos permitem o neologismo, uma materialidade, de uma evidência descarada, fortemente aversiva, mas que não ameaça a vida do animal diretamente. Já certas ameaças sutis, podem carregar ameaças veladas e implícitas à nossa vida, à nossa segurança ou à toda nossa estrutura de subsistência, como o emprego. Algumas situações que acompanhei como clínico são bom exemplo: o patrão diz aos funcionários que eles não são forçados a trabalhar mais do que as 10 horas de sempre, mas... que precisam se cuidar porque, hoje em dia, está difícil obter emprego...

Mas, isso merece um esclarecimento mais: baseado no afirmado acima, não se deve entender nossa posição sobre a sutileza do estresse social, em relação a certos procedimentos fortes utilizados em laboratório ou certas situações-limites que os organismos enfrentam, com o pensar que achamos que a questão social seja uma questão “menor”, em relação a outros problemas com que a vida se depara.

Como os Blanchard já afirmam (BLANCHARD; BLANCHARD, 2001):

“estresse social, ao lado do estresse dos predadores, tem dado muito do impulso evolutivo na análise dos mecanismos do estresse. Ambos os estressores são

importantes, mas o primeiro é uma constante na vida dos animais sociais e um evento intermitente em espécies solitárias, enquanto que o estresse dos predadores varia consideravelmente entre as espécies”.

Neste mesmo trabalho já foi afirmado a importância do estresse social, e, dada essa importância, tudo o que abala as relações sociais de espécies sociais, abala profundamente a viabilidade da vida: da reprodução aos mecanismos de associação e defesa. Além do que, a confrontação que é envolvida nas disputas hierárquicas, pode levar a sérios ferimentos e, inclusive, à morte.

Por outro lado, as relações sociais não são apenas de grande importância para o indivíduo, mas também veículo para forças evolutivas de relevância, como podem demonstrar os estudos sobre altruísmo e parentesco (SLATER, 1994; RIDLEY, 2000). O uso dessas estratégias sociais pode ser de tal monta e importância que pode determinar até mesmo o rumo evolutivo de uma espécie (OTTA; BUSSAB; RIBEIRO, 2006; SLATER; HALLIDAY, 1994).

O fato de ser uma constante e de natureza variável e muitas vezes sutil, não faz com que essa modalidade de estresse seja menos importante, especialmente se tratando de espécies, como os seres humanos, que, no seu cotidiano, já não têm grandes problemas com predadores ou alimentos. No caso dos seres humanos, inclusive, essa importância se acentua, pois é conhecido o fato de serem as relações sociais fatores decisivos no desenvolvimento da personalidade e estarem na origem de inúmeras condições psicopatológicas, como foi já tão amplamente descrito em trabalhos clássicos como o de Freud e muito outros, como a teoria do Duplo Vínculo de Gregory Bateson (SLUZKI, 1974), Watzlawick e colaboradores (1967), a fenomenologia social de Ronald Laing (1967) e a análise dos vínculos de John Bowlby (1984), somente para citar apenas alguns.

Por outro lado, pode-se acrescentar, a própria natureza estratégica e de eventos, como coalizões, que envolvem as questões sociais, pode ter constituído os mecanismos de

enfrentamento das situações de confronto e estresse social com uma natureza mais sutil em si mesma, mais controlada e reflexiva, mas, como dito acima, nem por isso menos importante e fundamental (GOODALL, 1991; DAVIS, 1973; RIDLEY, 2000). Talvez essa sutileza seja apenas um epifenômeno ou causa da evolução do córtex cerebral nas espécies sociais. A natureza estratégica de muitos estressores sociais pode eliciar mecanismos mais complexos de avaliação e enfrentamento, que não precisam ser deflagrados em situações como, por exemplo, no enfrentamento de um leão. Enfim, “sutil” não é menos, nem mais, pior ou melhor, em si, do que qualquer outro tipo de estresse, mas é um qualificativo importante, penso, diferenciando de “brutal”, descaradamente material.

2.5.4 atividade imune inata

Segundo Dawkins (1990), quando do início da vida no planeta é razoável supor que ainda havia disponibilidade e abundância de material para a construção dos sistemas dotados desta qualidade. Mas, em breve a profusão de formas de vida eram tantas que o material disponível não era mais tão sobejante e os organismos começaram a buscar os materiais necessários à continuidade de sua organização nas fontes mais óbvias: outros organismos. Dito na sua forma simples, criou-se o matar e comer, a denominada relação presa – predador. Mas, nossa existência não é só ameaçada neste contexto, onde sua continuidade pode ser interrompida para consumo e manutenção de outras formas de vida, formas macroscópicas mais evidentes e perceptíveis, como leões ou tubarões. Para estas, temos diversos mecanismos de defesa, em sua grande parte comportamentais: podemos fugir, lutar, nos proteger com armas ou ardis. Além destas, existem formas de vida microscópicas e imperceptíveis ao senso, ao que tudo indica, evolutivamente mais antigas. Nossa matéria constitutiva e nossos sistemas orgânicos podem ser de interesse vital para

esses microorganismos, contra os quais esses sistemas de defesa seriam de pouca ajuda. Da necessidade de um tipo de defesa eficaz contra tais ameaças de nível celular, denominados “patógenos” – hoje classificados como vírus, bactérias, fungos, protozoários e parasitas multicelulares – nosso organismo foi provido no decorrer da evolução de um sistema de defesa denominado “sistema imune”. Esse sistema teria como função reconhecer esses elementos e elaborar uma resposta para eliminá-los ou minimizar seus danos, pareado com outros sistemas de defesa de outros níveis, que envolvem mais atividade do sistema nervoso central, como planejamento e elaboração de comportamentos protetivos. A defesa proporcionada pelo Sistema Imune seria mais de nível molecular/celular e seus meios para combate dessas ameaças seriam também deste nível. Desta forma, o SI faz parte dos sistemas de proteção do organismo, a nível celular e/ou molecular, baseado no reconhecimento de substâncias nocivas ou não, conhecidas ou não, através de células imunes e dos assim chamados “antígenos”, que são moléculas constituintes da parede das membranas de células, bactérias, fungos ou vírus, assim como de outras substâncias (ROITT et al, 2003). Assim, o SI distingue o que é próprio (“eu”) do que não o é (“não-eu”), separa o que deverá ser destruído e eliminado do que não o deverá. Para isso vale-se de diversos recursos, que não é propósito deste projeto levantar.

Embora haja uma grande interação entre as atividades imunes, é clássico nos manuais encontrar-se a divisão dessa atividade, com propósitos práticos, em dois grandes blocos:

- imunidade inata: o conjunto de barreiras que impedem a entrada de substâncias estranhas ao organismo. É a chamada “primeira linha de defesa”, por assim dizer. Essa linha de defesa geral e inespecífica dispõe de vários recursos para realizar esse bloqueio: pele, reflexo da tosse, enzimas presentes na lágrima, muco dos tratos digestivo e respiratório, etc. Se algum antígeno passa por essas barreiras externas, há um grupo de células capazes

de reconhecer o “não-eu” e destruir essas substâncias, fagocitando-as e procedendo à sua lise. São denominados genericamente de “fagócitos”, tipo especial de leucócitos. O tipo de leucócito com mais forte papel fagocítico é o neutrófilo. Além desse, existem, também, os macrófagos. A imunidade inata, então, é aquela que já temos programada, independe de experiência prévia do organismo com um antígeno. São sistemas de reconhecimento do “não-eu”, ataque e destruição desses elementos.

Os neutrófilos são células que pertencem ao grupo dos granulócitos polimorfonucleares e que não apresentam a especificidade característica da imunidade adquirida. Existem três tipos de granulócitos que são classificados dependendo de como reagem às propriedades ácido-básicas de seus corantes (neutrófilos, basófilos e eosinófilos). Os neutrófilos são produzidos à taxa de 7 milhões por minuto e vivem de 2 a 3 dias. Possuem a capacidade de aderir ao endotélio e migrar para os tecidos (diapedese). São importantes na infecção aguda, pois quando diminuídos, resulta menor a resistência à infecções e sua ativação é dependente de fatores quimiotáticos (complemento ativado). Possuem enorme arsenal de proteínas antibióticas (grânulos: lisossomo e fagossomo). Os neutrófilos são células bastante ativas em processos inflamatórios, portanto, qualquer processo relacionado ao estresse que possa afetar sua funcionalidade, pode resultar não apenas em uma resposta imune menos efetiva, mas também em exacerbação de processos auto-imunes ou alérgicos, processos de alto interesse clínico.

• imunidade adquirida: é o subsistema do SI que constrói defesas específicas contra antígenos específicos. Por isso, depende de memória e de contato prévio com o antígeno, para análise e elaboração de um anticorpo. Nesses mecanismos específicos estão implicados os linfócitos e seus vários sub-tipos, cuja descrição foge do escopo desse trabalho, bastando apenas lembrar que sua ação não é específica e sendo construída pela relação do sistema imune com os patógenos.

Vale a pena relembrar que essa divisão da resposta imune em inata e adquirida é matéria de muita discussão e tem um propósito apenas didático, pois, na prática, as duas acham-se intimamente ligadas, bastando lembrar para deixar isso claro que os linfócitos B para serem ativados e produzirem anticorpos, precisam que lhe apresentem os antígenos, o que pode ser feito por macrófagos, parte da resposta inata. Por outro lado, os macrófagos só procedem à lise do conteúdo fagocitado se forem ativados por um linfócito T. Além do mais, há uma série de eventos que só se verificam pela cooperação entre ambos os sistemas: a resposta inflamatória provocada por macrófagos, neutrófilos e outros elementos afetam a distribuição e estado de ativação dos linfócitos, células caracterizadas por sua resposta imune adquirida. Por outro lado, os linfócitos ao serem colocados em sua forma ativada, também liberam citocinas que recrutam componentes característicos da resposta imune inata, como células ou complemento (BUCKINGHAM; GILLIES; COWELL, 1997). De modo, que é muito grande e complexa a interação entre os componentes da resposta imune adquirida e inata, a ponto de ser razoável duvidar-se da legitimidade de sua proposição. Mas, não se pode negar, por outro lado, a correção da observação de que umas células reagem a um elemento nunca antes apresentado, enquanto outras não se ativam até terem tido um contato prévio com um antígeno qualquer. De modo que, esta, como tantas outras expressões e termos, devem ser usados com cuidado e com o conhecimento de suas inexactidões.

2.6 GENERALIZAÇÕES DO MODELO ANIMAL PARA O SER HUMANO

Podemos estudar uma espécie com o interesse nela mesma ou estudá-la usando-a para compreender algum aspecto dos organismos em geral ou, ainda, com o propósito específico de entender um equivalente em uma outra espécie em particular. Ou seja,

generalizar. Isso é comum especialmente quando estudamos organismos mais simples para aplicar os resultados obtidos para processos semelhantes observados em seres humanos.

A base desse raciocínio já estava nos escritos do sábio de Estágira (ARISTÓTELES, 1985), onde estabelecia uma regra lógica fundamental para o raciocínio científico que mais tarde se desenvolveu: o que se predica do gênero, se predica da espécie, o inverso não sendo possível, pois o que diferencia a espécie do gênero é-lhe específico.

Para se aplicar o conhecimento adquirido com o estudo de uma espécie animal para outras espécies, temos o sério obstáculo de fazer, preliminarmente, as distinções entre o que faz parte do gênero e que se estuda na espécie, e o que é próprio da espécie e que justamente a diferencia do gênero. De fato, como exposto em Liard (1979), como regras para definição de termos, a definição deve incluir o definido e só o definido e todo o definido. Obviamente, estudos como o que se pretende: um modelo para avaliação do impacto de estressores sociais sobre a imunidade inata, tem grande possibilidade de ser utilizado para generalizações e extrapolações para o ser humano, sabidamente um animal intensamente social e grandemente afetado por estressores sociais. Mas, embora esse “*ímpetus generalizandi*” seja bastante compreensível, esta pretensão constitui um salto arriscado e, portanto, deve ser tentada com muita cautela.

Pretende-se com o presente trabalho, construir um modelo de estressor social em ratos que possa ser o passo, quiçá inicial, para a criação de instrumentos e métodos que permitam uma melhor e maior compreensão sobre os processos de estresse social no ser humano e em outros animais. Neste contexto, temos plena consciência de que a distância entre os resultados da pesquisa aqui delineada e esse objetivo mais amplo, é muito grande e só poderá ser percorrida com muito esforço e através de pesquisas adicionais. Não é objetivo deste trabalho, refazer as bases teóricas sobre as quais se assentam as

generalizações possíveis, mesmo porque, não se pretende fazê-las aqui, mas é importante situar o assunto.

Ao se pensar nesses termos, é muito apropriado ter-se em mente as observações de Beach, citadas por Blanchard e Blanchard (2003), sobre duas regras da comparação de comportamentos entre espécies:

- a) não basear as comparações em características formais do comportamento (como topografia), mas nos mecanismos causais e conseqüências funcionais e
- b) a análise inter-espécies não pode exceder a segurança da análise intra-específica, pois comparações de um tipo particular de comportamento em duas espécies diferentes só é possível na medida em que o comportamento tenha sido adequadamente estudado em cada espécie em si.

Acrescentaria, como fundamento desse tipo de comparação, os trabalhos e indicações que se sucederam aos de Darwin (2000)³, que estabelecem que o comportamento está sujeito às mesmas pressões evolutivas que a morfologia, juntamente com as vias e funções que lhe são fundamento. Isso nós dá segurança teórica para pensar que um comportamento pode ter semelhanças que justifiquem a comparação funcional do comportamento entre duas espécies, mas devemos ter em mente que há também diferenças.

2.7 O RATO WISTAR COMO ANIMAL SOCIAL: O MODELO INTRUSO-RESIDENTE

Como nos diz Perón, ao fazer uma análise etológica quantitativa do comportamento do animal elegido, “dentro da unidade social (colônia experimental), o rato albino pode exibir um repertório complexo de comportamentos sociais, que se exprimem através de

³ – o original dessa obra é de 1872. Muitas edições e revisões foram apresentadas. Talvez a mais recente seja a segunda edição da obra pela Dover Publications, de 2007.

padrões estruturados e associados a sinais relacionados a outros animais e ainda ao meio ambiente” (PERON, 1989). Esse autor faz uma análise da propriedade do uso de diferentes tipos de colônias para se estudar o comportamento social utilizando-se de um modelo intruso-residente. Demonstrou que colônias compostas por dois ratos machos e uma fêmea, sendo um dominante e outro submisso, parecem conter os fatores ambientais relevantes ao estudo do comportamento agonístico do rato albino; de fato, ela pode ser tomada como um modelo simplificado, porém adequado, da situação natural. Há, neste caso, impossibilidade de fuga e de construção de tocas, com o que se evita respostas irrelevantes à situação que se pretende investigar. Por outro lado, vincula-se a manutenção de prerrogativas da situação natural, como posse de recursos vitais (tais como, território, alimento, água, fêmeas, etc.) pelos dominantes, bem como as diferenças que são características das disputas intra-específicas (tempo de chegada no ambiente experimental, peso, tamanho, idade, habilidade para luta, etc.). Esse modelo, denominado pelo autor de C3 reproduz os fatores ambientais mais relevantes para a espécie em estudo (PERON, 1989). Sendo assim, é, portanto, adequado aos propósitos deste trabalho.

2.8 PROPOSIÇÃO DO PRESENTE TRABALHO

Espera-se que um rato “intruso” colocado em uma comunidade já formada experimente uma situação de estresse social. De fato, um problema lhe será colocado: como as relações sociais lhe são fundamentais – por ser ele um organismo social – deverá ser compelido a aproximar-se do grupo, com ele relacionar-se e nele colocar-se como membro. No entanto, para que isso ocorra, deverá lutar ou aprender a evitar confrontos. Muitas vezes isso significará embates físicos, com possíveis danos potenciais, assim como a tensão gerada pela expectativa de perder algo de máxima importância para a sua

sobrevivência e reprodução. Pretendemos, com isso, avaliar o impacto desse tipo de solicitação ambiental sobre os parâmetros bioquímicos, sobre o SI inato do organismo e sobre o comportamento, avaliados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, assim como pelo registro da atividade dos neutrófilos circulantes, dos níveis séricos de corticosterona e dos níveis e do *turnover* de noradrenalina e de serotonina no córtex e no hipotálamo.

Esse tema parece-nos interessante porque pensamos que estressores clássicos e marcantes como choque, frio ou imobilização, que têm sido freqüentemente usados como modelos experimentais para a análise de efeitos do estresse sobre o processo imune, são bons modelos, justamente por sua magnitude extrema, mas lhes falta o caráter de cotidiano. E generalizações, como exposto nos itens 2.5 e 2.6, ficam mais complicadas, levando-se em conta situações onde as generalizações seriam mais ricas. Por outro lado, o modelo que se propõe a usar, acredita-se, não produza sofrimentos maiores do que os habituais de suas existências, estando mais próximo à realidade da nossa vida cotidiana e àquela da maioria dos organismos de vida livre.

Nesse aspecto, um estressor social parece um bom modelo para análise das relações neuroimunes. De fato, as relações sociais que atravessam a vida de inúmeros animais (entre os quais o ser humano), são a base e o sustentáculo para uma série de elementos fundamentais ao ciclo de vida, como reprodução, suporte social para atividades como alimentação, proteção, etc., conforme exposto acima. Em todos eles, uma homeostase imunológica desempenha papel primordial e central.

Daí, portanto, o interesse do presente trabalho em estudar a influência de um fator cotidiano, mas constante e vigoroso esteio da vida dos organismos sociais, que é justamente a exposição de um indivíduo a um grupo de iguais já estabelecido e

estabilizado, caracterizando o poder estressor da situação, de forma a, inclusive, disponibilizar um modelo para outros experimentos.

Por tudo quanto já foi dito, escolhemos o modelo “intruso-residente” denominado por Perón de C3 para este trabalho. Propomo-nos estudar o efeito deste tipo de estresse sobre o comportamento e a imunidade inata do rato intruso, isto é, aquele que foi introduzido em uma comunidade previamente estabelecida. Em especial, pretende-se avaliar o impacto desse estressor sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e de a atividade de neutrófilos sanguíneos em “ratos intrusos”, à luz dos conhecimentos de neuroimunomodulação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos de um estresse social produzido pela introdução de um rato em uma comunidade com relações sociais pré-estabelecidas sobre o comportamento, a bioquímica e a atividade imune inata.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) analisar através de metodologias comportamentais (campo aberto e labirinto em cruz elevado) os efeitos da condição de rato intruso¹.
- b) dosar os níveis de corticosterona sérica de ratos intrusos.
- c) dosar os níveis e avaliar o *turnover* de noradrenalina e de serotonina no córtex frontal e no hipotálamo de ratos intrusos.
- d) avaliar, através da citometria de fluxo, a fagocitose e o *burst* oxidativo de neutrófilos sanguíneos de ratos intrusos.
- e) relacionar as alterações comportamentais e bioquímicas com aquelas de atividade de neutrófilos observadas em ratos intrusos à luz dos conhecimentos de neuroimunomodulação.

1.- entende-se como “rato intruso” aquele que é introduzido em um grupo em que as hierarquias sociais já foram estabelecidas, ou seja, um rato é intruso quando tem que enfrentar o desafio de se relacionar com iguais em uma comunidade pré-estabelecida da qual ele não fazia parte.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes de uma prole obtida nos Biotérios do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram utilizados segundo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ-USP (Protocolo 844/2006).

Antes do início dos experimentos, os ratos foram alojados, em número de 6, em gaiolas de moradia padrão do Biotério da FMVZ-USP (41 x 34 x 16cm), que foram mantidas em salas com umidade (65 a 70%) e temperatura ambiente (22°C - 26°C) controlados por meios de aparelhos apropriados de ventilação, exaustão e refrigeração, em um ciclo de 12 horas de claro e 12 horas escuro, com luz ligada às 7 horas. Água e comida foram fornecidas ao animais “*ad libitum*” durante todo o experimento, exceto durante a realização dos testes comportamentais.

4.2 FÁRMACOS, REAGENTES E SUBSTÂNCIAS BIOLÓGICAS

- *Staphylococcus aureus* - Bactéria marcada com iodeto de propídeo que foi utilizada para analisar a atividade fagocítica realizada por neutrófilos sangüíneos;
- Diacetato 2',7'-Diclorofluorisceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR) – empregado na citometria de fluxo;
- EDTA (Sigma®) – utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3 mM, com o objetivo de interromper a reação após o período de incubação das amostras;

- Heparina (Liquemine[®]-Roche) – utilizado para evitar a coagulação das amostras de sangue após a coleta;
- Iodeto de Propídio (PI) – utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha das amostras captadas pelo citômetro;
- Kit para dosagem de corticosterona Coat-a-Count (DPC[®]) – kit de radioimunoensaio para dosagem de corticosterona;
- NaCl 0,2% e 1,6% – soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras;
- NaCl 0,85% e NaCl 0,9% – soluções utilizadas na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;
- PBS (Phosphate-buffered saline, pH=7,2-7,4) – solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose;
- PBS glicosado – solução utilizada na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;
- PMA - Miristato-acetato de forbol-(Calbiochem[®]) – utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo de neutrófilos.

4.3 EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTOS

4.3.1 Formação da colônia de ratos

O modelo escolhido como sendo o mais apropriado para este trabalho, em especial pela economia e simplicidade do manejo, foi o chamado C3. Esse modelo, descrito por Perón (PERON, 1989), faz uso de comunidades de ratos formadas por um macho dominante, um submisso e uma fêmea, cujo conjunto é denominado “grupo residente”. Cada comunidade de 3 animais (grupo residente) foi mantida em gaiola de polipropileno

contendo maravalha, medindo 41 x 34 x 16cm. No procedimento experimental, é introduzido no grupo residente um outro animal, estranho a esse grupo, denominado “intruso”, que será objeto de nossos estudos. A montagem dessa colônia obedeceu aos passos a seguir descritos.

Fase 1 – triagem dos animais para formação da colônia residente:

a) fêmeas: foram selecionadas fêmeas com aproximadamente 3 meses de idade, sendo escolhidas e separadas para que se procedesse à ligadura bilateral dos cornos uterinos (laqueadura). Para tanto elas foram retiradas de suas gaiolas e submetidas à anestesia (as fêmeas foram anestesiadas com FRANCOTAR® e ROMPUM® – 1ml/Kg de animal de cada solução FRANCOTAR® – Ketamina 0,1 % [Virbac do Brasil Ind. Com. LTDA] ROMPUM® – Solução aquosa a 2 % de Cloridrato de 2 – [2,6-xilidino] – 5,6-dihidro-4-H1,3-tiazina [BAYER S. A – Saúde Animal]) e, a seguir, foi realizado o procedimento cirúrgico de ligadura bilateral dos cornos uterinos, com o propósito de impedir a reprodução, mantendo-se o ciclo estral, de modo a permitir que ela continuasse sexualmente ativa, sendo objeto de disputa entre os machos da colônia. Após 15 dias de repouso para recuperação do procedimento cirúrgico, as fêmeas foram destinadas, ao acaso, aos grupos residentes em formação.

b) machos: os ratos foram triados pela idade, para designação dos dominantes, submissos e intrusos. Os animais selecionados para a posição de dominantes foram machos adultos com 5 meses de idade. Os animais selecionados para a posição de submissos foram ratos adultos com aproximadamente 3 meses de idade e com peso aproximadamente 10 a 20% abaixo daquele dos animais dominantes, conforme parâmetros comuns da espécie.

Fase 2 – formação do grupo residente:

O macho mais velho e mais pesado (dominante) foi colocado primeiro na gaiola experimental, junto com a fêmea jovem. Decorridas 48 horas, foi introduzido o outro

macho da colônia, mais jovem e mais leve, destinado a ocupar a posição de submisso, escolhido aleatoriamente do grupo de machos jovens. Ao se compor o grupo desta maneira, a expectativa foi de que se desenvolvesse uma hierarquia de dominância, que estabelecesse o macho mais velho como dominante e o mais novo como submisso. Conforme indicado por Perón (1989), alguns machos desenvolvem, nesta condição, um comportamento agonístico intenso, outros apresentam um comportamento que foi denominado pelo autor de “complacente”, caracterizado por grande latência para estabelecimento da hierarquia social. As colônias, com dominante desse tipo foram desprezadas, uma vez que nosso objetivo era buscar situações de confronto. O animal dominante típico apresentava padrão de comportamento agonístico caracterizado principalmente por itens exibitórios (ameaças) e, ocasionalmente, pela presença de ataques diretos em relação aos intrusos. Assim, foram montadas 24 grupos residentes, de forma tal que foi possível selecionar pelo menos 18 colônias com as características adequadas a este trabalho. O número de 24 colônias foi fixado levando-se em conta a expectativa de que a existência de dominantes típicos situa-se ao redor de 70% do total de ratos designados para a condição de dominantes ($70\% \text{ de } 20 = 14$) e o total desses arranjos é satisfatório para as análises propostas, com uma pequena margem para acasos adversos. Foi utilizado um número de colônias um pouco maior (18), numa tentativa de obter-se melhor representação estatística, uma vez que todos grupos residentes preencheram os requisitos esperados.

Fase 3 – formação dos grupos experimentais:

Ratos machos Wistar adultos jovens, com aproximadamente 3 meses de idade e peso de 10 a 20% abaixo dos dominantes das colônias C3, foram divididos aleatoriamente em dois grupos: experimental (E) e controle (C). Os animais do grupo controle (C), foram manipulados por 3 minutos e recolocados em sua gaiola de moradia. Os animais do grupo experimental (E) foram introduzidos por uma hora nas colônias C3. O conjunto formado

pelo grupo residente e o animal intruso foi denominado no presente trabalho de “colônia experimental” (CE).

A colocação do animal intruso na colônia C3 levou a uma interação social ativa, de caráter agonístico. Os animais do grupo E permaneceram, então, na CE por 1 hora, finda a qual, foram retirados para análise dos diversos parâmetros especificados nos objetivos do presente trabalho; esses parâmetros foram também analisados nos sujeitos do grupo controle (C). Adotamos um padrão experimental de 1 hora de exposição, pois estudos pilotos por nós realizados demonstraram que após uma hora os animais se aquietavam e recolhiam-se novamente a uma posição. Tememos, com isso, que os níveis dos parâmetros comportamentais, emocionais, bioquímicos e neuroquímicos caíssem a níveis basais no momento da coleta ou mesmo que coletássemos os dados em um momento descendente das curvas desses parâmetros.

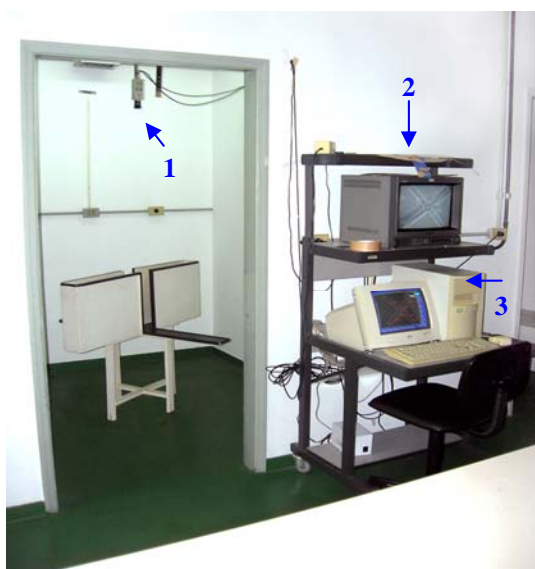


Figura 1 – foto das salas e aparelhos utilizados para a análise comportamental. 1, filmadora; 2, monitor e 3, computador.

4.3.2 EthoVision

Para registro e análise comportamental foi utilizado o aparelho Ethovision[®] (Noldus Information Technology[®], Leesburg, VA, USA) que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo, análise do movimento e reconhecimento comportamental. O sistema é composto pelo programa EthoVision Pro-Color 1.9 e pelos itens de *hardware*: câmara filmadora (CCD-Iris color Sony), monitor de vídeo (Sony),

computador (Pentium 133, 16 MB de memória RAM, 1,2 gB de disco rígido) com placa de captura de vídeo, monitor SVGA, teclado e mouse, além de cabos e conectores (figura 1).

O sistema de observação indireta é constituído pela filmadora instalada no teto da sala de observação, conectada ao monitor e ao microcomputador, localizados fora da sala. Para interpretar as imagens observadas durante a realização dos testes comportamentais no campo aberto (CA) e no labirinto em cruz elevado (LCE) o *software* (EthoVison – Vídeo Tracking, Motion & Behavior Recognition System® - versão 1.90) fez virtualmente as divisões do campo aberto em 4 áreas concêntricas (central, intermediária e externa e tigmotáxica) e em braços abertos, braços fechados e área central no LCE. Este sistema digitalizou e analisou os comportamentos dos animais.

Após uma hora do período experimental, os sujeitos experimentais (E) e controles (C), foram colocados intercaladamente e por cinco minutos em cada um dos aparelhos descritos nas seções seguintes.

4.3.3 Análise Comportamental

Os aparelhos e os parâmetros comportamentais registrados serão descritos a seguir.



Figura 2 – Foto do Campo Aberto (Open Field): uma arena circular de madeira com 97 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, pintada na cor cinza (figura 2), com o piso subdividido virtualmente (figura 3) pelo EthoVision®, descrito no item 4.3.2., de forma tal que se pode avaliar a atividade geral dos animais por meio da

a) campo aberto (*Open Field*): o campo aberto é constituído por uma arena circular de madeira com 97 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, pintada na cor cinza (figura 2), com o piso subdividido virtualmente (figura 3) pelo EthoVision®, descrito no item 4.3.2., de forma tal que se pode avaliar a atividade geral dos animais por meio da

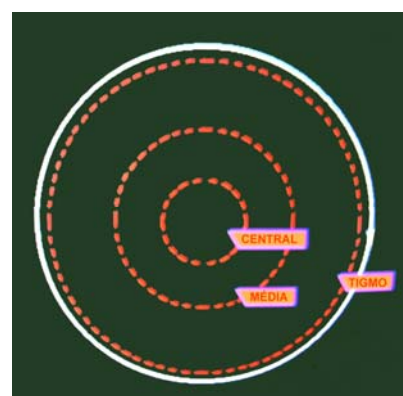


Figura 3 – Zonas virtuais do campo aberto, como vistas na tela do computador.

observação computadorizada, em um período selecionado por nós de cinco minutos. Esta arena está contida em um caixa de madeira distante 48 cm do chão.

Os parâmetros que foram escolhidos para análise da emocionalidade dos animais foram os seguintes:

- **distância movida:** este parâmetro se refere à totalidade da distância (cm) percorrida pelo animal na exploração do aparelho.
- **velocidade:** marca a velocidade (cm/seg.) com que o animal percorre as distâncias movidas em todo o aparelho.
- **tempo de permanência:** quanto tempo (seg.) o animal permanece em cada uma das diferentes zonas virtuais do campo aberto. Neste item registramos o tempo de permanência em cada uma das três zonas virtuais da arena: central, média e tigmotáxica.
- **freqüência de levantar:** número de vezes em que o animal fica apoiado apenas nas patas posteriores, com a cabeça dirigida para cima e com o corpo vertical em relação ao chão da arena, tocando ou não as paredes laterais do CA com as patas anteriores.

b) labirinto em cruz elevado (LCE ou *Plus-Maze*):

Outro modelo para estudo comportamental foi aquele descrito por Pellow (1985). Trata-se de um labirinto em forma de cruz, de madeira pintada de cinza, constituído por dois braços abertos, medindo 50 cm de comprimento por 11 cm de largura cada um, em oposição a dois braços fechados de 50 cm de comprimento, por 10 cm de largura, com



Figura 4 – Foto do Labirinto em Cruz Elevado utilizado neste trabalho.

paredes laterais de 40 cm de altura (figura 4). Na intersecção entre os braços abertos e os fechados, forma-se um espaço central de 100 cm² de área, denominado “centro”. O assoalho do aparelho é colocado sobre um suporte, de modo a ficar a 55 cm do chão. Em nosso procedimento, cada e todo animal foi colocado no espaço central do aparelho, imediatamente após ser retirado do Campo Aberto, sendo observado, a partir disso, por 5 minutos com o auxílio do EthoVision® (conforme descrito em 4.3.2.). Resultados anteriores de estudos feitos por este e outros laboratórios têm mostrado que submeter os animais ao CA ou ao *hole board* antes do teste do LCE aumenta significativamente a atividade destes animais no equipamento, isto é, o número total de entradas nos braços abertos e fechados, facilitando-se, desta forma, a análise dos dados neste labirinto (PELLOW, 1985). O piso deste aparelho é subdividido virtualmente conforme indicado na figura abaixo (figura 5):

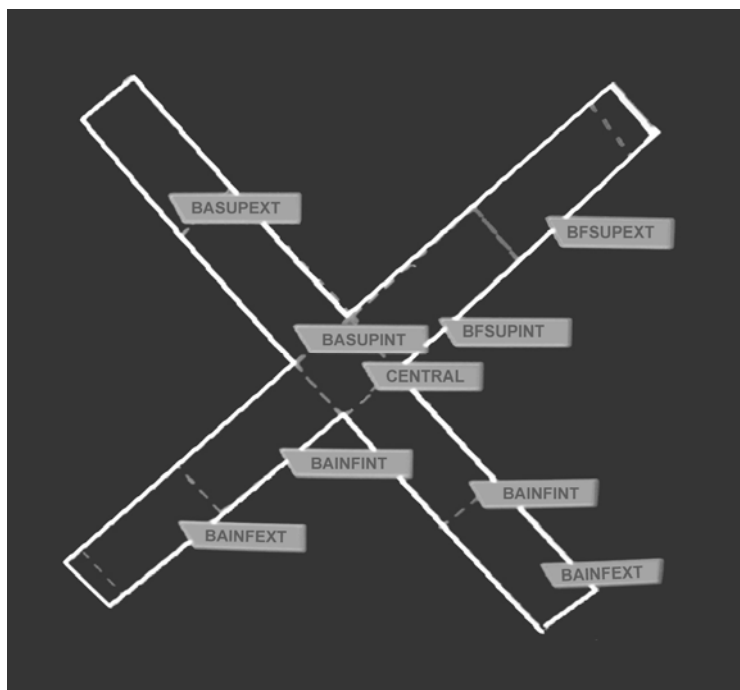


Figura 5 – Zonas virtuais do labirinto em cruz elevado, como vistas à tela do computador: a arena está dividida em braços abertos (segmentos esquerdo inferior e direito superior), braços fechados (segmentos esquerdo superior e direito inferior) e zona central. Os braços abertos e fechados estão subdivididos em dois (separados por pontilhados, sendo que a metade externa, supostamente, deve eliciar mais ansiedade).

Na avaliação dos animais no labirinto em cruz elevado (LCE), consideraram-se os seguintes parâmetros:

- número de entradas nos braços abertos (EBA);
- número de entradas nos braços fechados (EBF);
- tempo de permanência nos braços abertos (TBA);
- tempo de permanência nos braços fechados (TBF) e
- tempo de permanência no terço final dos braços abertos (TMF).

Para comparação dos níveis de ansiedade entre os grupos empregaram-se as seguintes taxas:

- taxas de entrada nos braços abertos:

$$(\% \text{ EBA}) = \text{EBA} / (\text{EBA} + \text{EBF}) \times 100$$

- taxas de entrada nos braços fechados:

$$(\% \text{ EBF}) = \text{EBF} / (\text{EBA} + \text{EBF}) \times 100$$

- taxas de permanência nos braços abertos:

$$(\% \text{ TBA}) = \text{TBA} / (\text{TBA} + \text{TBF}) \times 100$$

- taxas de permanência nos braços fechados:

$$(\% \text{ TBF}) = \text{TBF} / (\text{TBA} + \text{TBF}) \times 100$$

- taxas de permanência na metade final dos braços abertos:

$$(\% \text{ PMF}) = \text{TMF} / (\text{TBA} + \text{TBF}) \times 100$$

Em todas as observações comportamentais (Campo Aberto e LCE) os animais experimentais foram intercalados com aqueles dos grupos controles; as observações foram feitas sempre no mesmo horário (8:00hs às 12:00hs), para minimizar possíveis interferências de variações circadianas sobre os comportamentos avaliados. Entre as observações, os aparelhos foram limpos com uma solução de água-álcool a 5 %.

c) descrição das interações dos animais na recepção dos intrusos pela colônia: os primeiros quinze minutos do período de uma hora em que os sujeitos experimentais foram colocados nas colônias foram filmados e uma descrição sumária destas pode ser encontrada no apêndice A. A filmagem foi efetuada usando-se uma câmera JVC VideoMovie VHSC GR-AX227 (produzida na Zona Franca de Manaus – AM – BR). Alguns problemas com a filmagem, infelizmente, impediram a ampla utilização dos dados, conforme pode-se observar no apêndice A.

4.3.4 coleta de sangue e dos tecidos encefálicos

A coleta do sangue foi feita logo após os animais terem sido apresentados aos aparelhos de avaliação comportamental. Os animais foram conduzidos em gaiolas – um por um e na seqüência da experimentação – para uma sala contígua, onde forem submetidos à secção cervical transversal, realizada através de um aparelho do tipo guilhotina, e imediato exsangüineamento. O sangue, foi, então, coletado em tubos de polietileno do tipo *ependorf*. A coleta dos tecidos encefálicos foi realizada nos mesmos animais. Para isso, os encéfalos foram rapidamente retirados, sendo lavados com solução salina gelada (4° C). Imediatamente após, foram dissecados sobre uma placa de Petri rodeada por gelo seco, formando-se assim, um micro-ambiente o mais frio possível. O córtex frontal e o hipotálamo foram então, retirados, pesados e congelados a - 80°C num tempo máximo de 3 minutos, onde permaneceram até serem processados para as dosagens neuroquímicas.

4.3.5 citômetro de fluxo

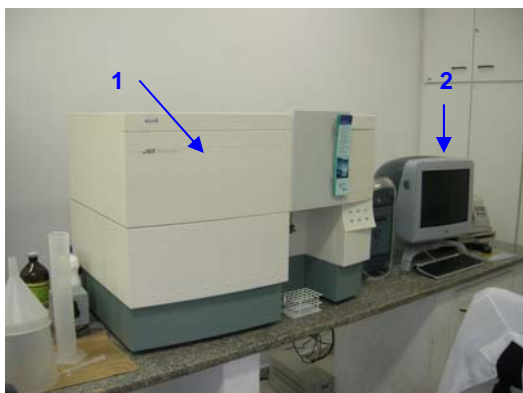


Figura 6 – Citômetro de Fluxo FACScalibur (1) e computador Apple conjugado (2).

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA), conectado com um computador Macintosh Apple, CA, USA), conforme se vê na figura 6. Os eventos foram analisados utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson

Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades *FSC – Forward Scatter* e *SSC Side Scatter* do aparelho que avaliam o tamanho e a complexidade interna das mesmas, respectivamente. A fluorescência verde emitida pelo DCFH foi usada para estimar o *burst* oxidativo das células analisadas em diferentes situações de estimulação. A fagocitose foi estimada pela intensidade média da fluorescência/célula emitida pelo PI. A porcentagem de fagocitose (porcentagem de neutrófilos que fagocitaram as bactérias) foi calculada através do número de neutrófilos fluorescentes divididos pelo número total destas células e multiplicada por 100. Através do Cell Quest Pro[®] foi analisada a população de interesse em cada experimento (neutrófilos), excluindo-se as populações de linfócitos e monócitos por meio da análise dos *gates* (figura 7). Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo *branco* usado como controle de refração basal da célula a ser analisada.

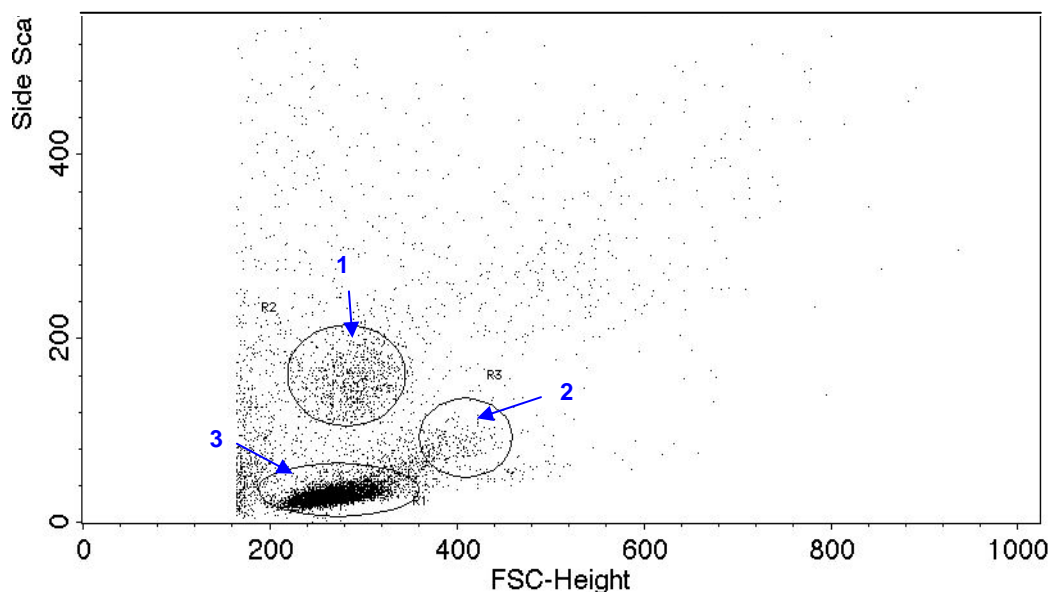


Figura 7 – Estabelecer um “gate” é estabelecer uma região de tamanho e granulidade determinados para que o aparelho conte os eventos dentro dessa margem. Acima, detalhe da tela do computador conectada ao citômetro onde se observa a visualização dos “gates” para diferentes populações celulares: “1” se refere à população de neutrófilos, “2” de monócitos e “3” de linfócitos. As marcações 2 e 3 estão presentes de modo meramente ilustrativo, uma vez que para este trabalho, foram contabilizados os eventos encontrados dentro da área delimitada pelo gate 1.

4.3.6 atividade de neutrófilos

O registro desta atividade foi feito a partir dos neutrófilos sanguíneos colhidos, como descrito acima (4.3.4) e preparados conforme Hasui et al (1989).

a) medida do *burst* oxidativo através do citômetro de fluxo: para tal medida, foi utilizado o método proposto por Fonseca et al (1985), onde o DCFH-DA reage com os radicais livres do oxigênio produzido por monócitos e neutrófilos do sangue e emite fluorescência verde. O PMA e o LPS foram usados como estímulos *in vitro* para avaliação de neutrófilos e da produção de radicais livres de oxigênio. A magnitude do *burst* oxidativo foi avaliada pela citometria de fluxo.

b) fagocitose: com relação à atividade fagocítica de neutrófilos, buscou-se determinar o número de neutrófilos que fagocitaram o *S. Aureus* marcado com PI e conseqüentemente fluorescentes em vermelho (figura 8a). Foi avaliada também a intensidade de fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas). Os valores da intensidade de fagocitose foram registrados por meio da média geométrica de fluorescência verde (figura 8b) emitida pelos neutrófilos. Essas medidas foram obtidas utilizando-se um citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA), acoplado a um computador Apple, Macintosh (G4) e analisados pelo software Cell Quest Pró (Becton Dickinson Immunocytometry Systems. USA), conforme metodologia proposta em Silva (SILVA, 2003), conforme descrito em 4.3.5.

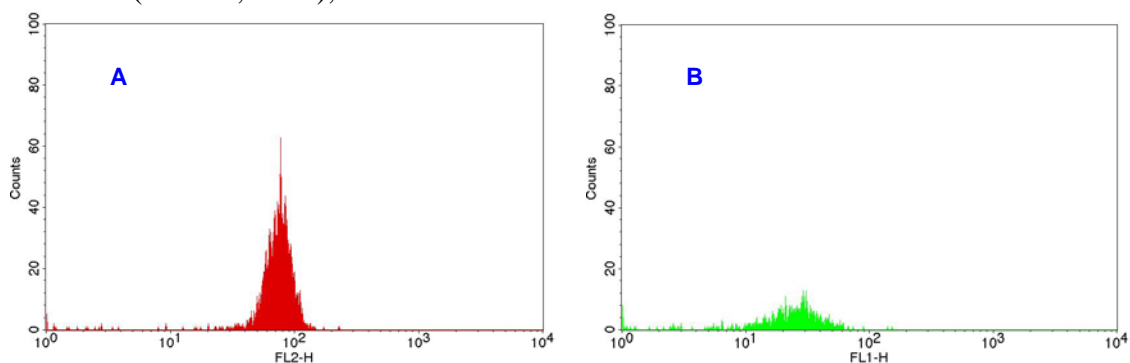


Figura 8 – Histogramas, onde em “A” se vê a fluorescência vermelha indicativa da porcentagem de fagocitose. Em “B” se vê a fluorescência verde da intensidade de fagocitose.

4.3.7 quantificação dos níveis plasmáticos de corticosterona

As alíquotas de sangue colhidas como descrito em 4.3.4., permaneceram à temperatura ambiente até a retração do coágulo sendo, então, centrifugadas sob refrigeração (2.000 rpm/15 minutos e temperatura ao redor de 4 °C) para obtenção do soro, o qual foi armazenado em *freezer*, a -20°C por no máximo 30 dias até o momento da realização das dosagens hormonais. A dosagem de corticosterona foi realizada através de kits comerciais (Coat-a-Count - DPC®), que quantifica a corticosterona através de um

método de radioimunoensaio em fase sólida. No momento da dosagem, as amostras de sangue previamente identificadas foram retiradas do *freezer* e mantidas à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) para o descongelamento, sendo submetidas ao processamento necessário para esta dosagem. Os parâmetros de qualidade do ensaio foram os seguintes: CV% baixo (4,16%), CV% alto (0,17%), Sensibilidade (91,30%) e Dose Mínima (3,161 ng/ml).

4.3.8 dosagens neuroquímicas



Figura 9 – Aparelho de HPLC.

Noradrenalina (NOR) e seu metabólito VMA (ácido vanil mandélico) foram dosados por HPLC, com detector eletroquímico. Foi calculada também, a relação NOR/VMA, considerada como indicativa da taxa de renovação (*turnover*) de NOR. O mesmo foi realizado para a serotonina e seu metabólito 5HIAA, assim como para a relação 5HT/5HIAA, considerada como indicativa da taxa de renovação (*turnover*) de serotonina.

As dosagens das aminas cerebrais e de seus metabólitos foi realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) a partir de método previamente descrito em nossos laboratórios (FELÍCIO et al., 1996).

O sistema de HPLC-ED (SHIMATZU Modelo 6 A) usado (figura 9), é composto por uma bomba, um amortecedor de impulsos, uma válvula injetora de 20 μ l, um detector eletroquímico, um forno de coluna para manutenção da temperatura, um registrador e um integrador (Modelo Chromatopac), todos marca SHIMATZU. A coluna cromatográfica utilizada foi a C-18 (SUPELCO).

A técnica utilizada foi a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico. Esta técnica fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção. As substâncias foram reconhecidas segundo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, através de comparação com os padrões de concentrações conhecidas.

Antes das dosagens os tecidos cerebrais foram homogeneizados por sonicação (caneta sonicadora), durante 2 ou 3 minutos sobre uma cuba de gelo seco, com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA, utilizado como padrão interno para as dosagens de monoaminas. Após a homogeneização, as amostras foram colocadas na geladeira onde permaneceram por uma noite; no dia seguinte foram centrifugadas a 1.200 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro *eppendorf*, sendo as amostras em seguida congeladas a -80°C , onde ficaram aguardando a leitura no aparelho.

A recuperação dos neurotransmissores e metabólitos das amostras foram superiores a 80% e o limite de detecção e para os neurotransmissores e seus metabólitos foi de 0,02 ng ou 0,8 ng/ml. O limite de quantificação é acima de 2 ng/ml.

As micro-seringas, pipetas automáticas e vidrarias volumétricas usadas foram todas de boa procedência, tendo em vista a necessidade de precisão exigida para estas dosagens.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Verificamos, primeiramente, se os dados obtidos apresentavam distribuição normal utilizando o teste proposto por Kolmogorov e Smirnov, após o que, os conjuntos de dados que se revelaram paramétricos e heterocedásticos foram analisados pelo teste “t” de Student e os não paramétricos ou heterocedásticos pelo teste U de Mann-Whitney.

Foram consideradas significantes as análises que apresentaram p menor ou igual a 0,05. Foram utilizados os pacotes estatísticos GraphPad InStat (versão 3.0) e o Microsoft Excell 2003 para Microsoft Windows.

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Experimento 1 – avaliação comportamental de ratos intrusos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado (LCE):

- **Delineamento experimental:** 36 ratos foram escolhidos ao acaso entre 54 para comporem 2 grupos: C (controle) e E (experimental), com 18 animais cada um. Os animais do grupo E (intrusos) foram colocados individualmente e por uma hora em colônias experimentais C3, sendo filmados os primeiros 15 minutos para registro da forma com foram recebidos (vide apêndice A). Aqueles do grupo C permaneceram em suas gaiolas sendo apenas manipulados. Imediatamente após estes procedimentos os ratos dos grupos C e E foram colocados, individualmente, primeiro em um Campo Aberto e, logo após, em um Labirinto em Cruz Elevado, para registro comportamental, conforme descrito em 4.3.2. e 4.3.3. Esse procedimento foi repetido a cada 15 minutos, intercalando-se um animal experimental com um animal controle.

- Parte 1 – Campo Aberto:

Neste equipamento registramos resultados dos parâmetros apresentados a seguir, nas três zonas do campo aberto (central, média e tigmotáxica).

- **distância movida em toda a arena:** como se pode notar na tabela 1 e na figura 11 (apêndice B), não se observaram diferenças significantes entre os dois grupos nesse parâmetro ($p = 0,35$). Nota-se, porém, que houve considerável variabilidade entre os resultados individuais obtidos, refletida pelos valores do desvio padrão.

- **velocidade em toda a arena:** não se encontraram diferenças significantes entre os grupos experimental e controle ($p = 0,35$), no tocante à velocidade com que os animais se deslocaram no campo aberto, conforme se vê na tabela 2 e figura 12 (apêndice B). Note-se a variabilidade dos resultados individuais, refletida nos grandes intervalos do desvio padrão.

- **tempo de permanência em cada uma das três zonas.**

- **tempo de permanência na zona central:** não se encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos para essa variável ($p = 0,28$). Note-se o desvio padrão enorme (maior, inclusive, que a própria média do grupo), i. é, a variabilidade individual para esse parâmetro foi marcante, modificando os resultados dos grupos como um todo (tabela 3 e figura 13, apêndice B).
- **tempo de permanência na zona média:** para este item de análise do CA, não se notaram diferenças entre os dados dos E e C ($p = 0,36$); no entanto, é muito importante notar que os desvios padrão estão muitíssimo elevados, reflexo das diferenças individuais marcantes. Ou seja, as diferenças individuais causaram forte impacto na análise resultados do grupo como um todo, conforme pode ser observado na figura 14 e na tabela 4 do apêndice B.
- **tempo de permanência na zona de tigmotaxia:** não encontramos diferença entre os grupos experimental e controle neste parâmetro ($p = 0,49$), conforme se pode observar no demonstrado na tabela 5 e figura 15 (apêndice B). Observe-se que os desvios padrão não foram muito altos e a variabilidade individual foi pouco marcante.

- **freqüência de levantar na arena:** para este parâmetro observou-se diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$), com os animais experimentais exibindo uma maior freqüência deste comportamento em relação aos do grupo controle, embora o desvio padrão também tenha sido elevado (tabela 6 e figura 16 do apêndice B).

Parte 2 – Labirinto em Cruz Elevado (LCE):

- **taxa de permanência nos braços abertos:** aqui foram encontradas diferenças significantes ($p = 0,048$) entre os animais dos dois grupos, com os ratos do grupo E permanecendo mais tempo nos braços abertos que os do grupo C. Há que destacar, mais uma vez, a grande variação individual dos resultados, conforme se vê na tabela 7 e na figura 17 (apêndice B).

- **taxa de entrada nos braços abertos:** não se observaram diferenças para este parâmetro comportamental ($p = 0,56$). Outra vez observou-se um desvio padrão muito grande, devido à alta variação individual. Note-se, por exemplo, que o animal experimental n^o 1 teve uma taxa de entrada quase 14 vezes maior do que o de n^o 6. O animal controle de n^o 18 teve uma taxa de entrada 75 vezes maior do que os animais controles de n^{os} 4, 6, 12 e 14 (vide figura 18, apêndice B).

- **taxa de permanência nos braços fechados:** houve diferença significativa ($p = 0,02$), indicando esse fato que os sujeitos do grupo E permaneceram menos tempo nos braços fechados do LCE que àqueles do grupo C, com variação individual pequena, conforme vemos na tabela 9 e na figura 19, no apêndice B.

- **taxa de entrada nos braços fechados:** encontramos diferenças significantes ($p = 0,0496$), para a taxa de entrada nos braços fechados do LCE, para um menor número de entradas dos ratos do grupo experimental nos braços fechados do que os controles. Mais uma vez, registramos considerável variação individual e observamos os efeitos desse fato sobre os resultados analisados “em bloco” (tabela 10 e figura 20 do apêndice B).

- **taxa de permanência na metade externa nos braços abertos:** não encontramos diferença entre os animais do grupo E e do grupo C na sua permanência na metade externa dos braços abertos do LCE ($p = 0,36$). Com o desvio padrão já bastante elevado, registramos mais uma vez a grande variação individual. Este parâmetro do aparelho refina a análise do nível de ansiedade dos animais, pois essa área representa o local mais exposto do local aberto e onde, teoricamente, o nível de conflito entre o impulso exploratório e o receio de se expor seria maior (cf. tabela 11 e figura 21 do apêndice B).

Experimento 2 - avaliação do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos e dos níveis séricos de corticosterona de ratos intrusos:

- **Delineamento experimental:** os mesmos animais do experimento anterior, imediatamente após as análises comportamentais, grupos E e C, foram conduzidos a um laboratório onde tiveram seu sangue e cérebro coletados, conforme descrito em 4.3.4. Alíquotas de sangue foram, então, colhidas e processadas para determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos, assim como dos níveis séricos de corticosterona, conforme descrito em 4.3.6. e 4.3.7., respectivamente. Os resultados da análise seguem abaixo.

Parte 1 - determinação dos níveis séricos de corticosterona: encontrou-se diferença significativa e expressiva entre os níveis séricos de corticosterona dos ratos dos dois grupos (tabela 12 e na figura 22, apêndice B), tendo os animais do grupo experimental nível mais elevado ($p = 0,01$) desse hormônio que os do grupo controle.

Parte 2 – determinação da atividade de neutrófilos:

- **Burst oxidativo basal:** não encontramos diferenças estatisticamente significantes ou tendência para a diferenças no *burst* basal dos neutrófilos dos animais, dos dois grupos (tabela 13 e figura 23, apêndice B), com o valor de $p = 0,84$.

- **burst oxidativo induzido por *S. aureus*:** a tabela 14 e a figura 24 (apêndice B), mostram que o *burst* oxidativo induzido por *S. aureus*, foi maior nos ratos do grupo experimental em relação àquele medido nos ratos do grupo controle ($p = 0,03$).

- **porcentagem de fagocitose de *S. aureus*:** em relação a este parâmetro não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os ratos dos dois grupos ($p = 0,88$). Apenas, o indivíduo experimental 1 mostrou discrepância, com aumento marcante de porcentagem de fagocitose em relação aos outros (tabela 15 e figura 25, apêndice B).

- **Intensidade de fagocitose de *S. aureus*:** aqui observamos ausência de diferenças entre os dados dos dois grupos ($p = 0,78$), com pouca diferença individual, a não ser por um indivíduo discrepante (experimental 1), conforme se observa na tabela 16 e na figura 26 (apêndice B).

- **Burst oxidativo induzido por Miristato-acetato de forbol (PMA):** O *burst* oxidativo induzido por PMA não apresentou diferença de valores entre os grupos ($p = 0,38$). Nota-se, mais uma vez, uma acentuada diferença individual entre os resultados dos diferentes animais (tabela 17 e figura 27, do apêndice B).

Experimento 3 - avaliação do turnover e dosagem dos níveis de neurotransmissores:

- **Delineamento experimental:** imediatamente após as análises comportamentais, os mesmos ratos utilizados no experimento 1, grupos E e C, foram conduzidos a um laboratório onde tiveram seu sangue coletado (experimento 2), juntamente com seus tecidos encefálicos, conforme descrito em 4.3.4. Esses tecidos foram, então, processados para dosagem dos níveis de noradrenalina (NOR), de seu metabólito ácido vanil mandélico (VMA) e da serotonina (5HT) e seu metabólito ácido 5 hidroxil indolacético (5HIAA), o que permitiu o cálculo das respectivas taxas de *turnover*, como apresentado em 4.3.8. As análises foram realizadas em duas estruturas, cujos resultados são apresentados a seguir, tanto para os grupos, como para os indivíduos.

Parte 1 – dosagens neuroquímicas no hipotálamo:

- **Níveis de Noradrenalina (NOR):** em relação às concentrações de noradrenalina no tecido hipotalâmico, não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os dados dos grupos E e C ($p = 0,32$). Mais uma vez, porém, uma grande variação individual esteve presente (tabela 18 e figura 28, apêndice B).

- **Níveis de VMA (metabólito da noradrenalina):** em relação a esse metabólito, não encontramos diferença entre os grupos ($p = 0,37$), mas, observe-se, em especial, os animais experimentais 4 e 6, que demonstram altos níveis desse metabólito. Note-se que a variação

individual dos dados dos ratos do grupo controle foi menor do que aquela dos experimentais (tabela 19 e figura 29, apêndice B), o que poderia indicar que a pressão que incide no grupo talvez possa ser um fator de indução dessa variação.

- **Níveis de Serotonina (5-hidroxitriptamina – 5HT):** para esse parâmetro encontramos uma diferença estatisticamente significativa no hipotálamo entre os animais dos grupos experimental e controle, sendo maior no primeiro ($p = 0,0499$). Note-se que alguns animais experimentais apresentam níveis bem mais elevados (os mesmos que apresentam níveis maiores de NOR), conforme se observa na tabela 20 e na figura 21 (apêndice B).

- **Níveis de 5HIAA (metabólito da serotonina):** encontramos diferença significativa entre os valores dos ratos do grupo experimental (maior) em relação aos do grupo controle, indicando uma maior atividade deste sistema nos animais experimentais ($p = 0,01$). As diferenças individuais ainda foram marcantes (tabela 21 e figura 31, apêndice B).

- **Turnover de Noradrenalina:** o *turnover* de noradrenalina calculado nos tecidos hipotalâmicos coletados não foi diferente entre os grupos ($p = 0,69$), conforme se vê na figura 22 e na tabela 32 (apêndice B).

- **Turnover de 5HT – 5HIAA:** o *turnover de* serotonina foi diferente entre os grupos E e C, sendo que foram encontrados valores maiores nos ratos do grupo E, em relação aos do grupo controle, conforme se confere na figura 23 e na tabela 33 do apêndice B, com $p = 0,04$.

Parte 2 – dosagens neuroquímicas do córtex frontal:

- **Níveis de Noradrenalina (NOR):** no córtex frontal dos animais, não observamos diferença de concentrações de NOR nos animais do grupo experimental ($p = 0,26$). Mais uma vez, observamos grande variação individual (apêndice B, figura 24 e tabela 34).

- **Níveis de VMA (metabólito da Noradrenalina):** analisando os níveis de VMA no córtex frontal, observamos que as taxas deste metabólito foram praticamente iguais nos animais dos dois grupos ($p = 0,55$), conforme se vê na tabela 25 e figura 35 do apêndice B.

- **Níveis de serotonina (5HT):** os níveis de 5HT medidos no córtex frontal dos ratos do grupo experimental e controle não foram diferentes entre si ($p = 0,25$). As constantes variações individuais também aqui se fizeram presentes, conforme se verifica na tabela 26 e na figura 36 do apêndice B.

- **níveis de 5HIAA (metabólito da serotonina):** não observamos diferenças entre os dados dos grupos experimental e controle, com se pode ver à tabela 27 e figura 37 no apêndice B ($p = 0,37$). Os valores individuais continuam demonstrando grande variação, com alguns números menores do que a metade de outros apresentados por indivíduos do mesmo grupo (cf. dados do animal experimental 9 e 11 ou dos controles 4 e 6, por exemplo).

- **turnover de noradrenalina (VMA/NOR):** como a tabela 28 mostra e a figura 38 ilustra (apêndice B), o *turnover* de NOR medido no córtex frontal dos ratos dos grupos C e E não foi significativamente diferente ($p = 0,21$).

- *turnover* de serotonina (5HIAA/5HT): análise do *turnover* de serotonina mostra diferença muito significativa ($p = 0,002$) entre os grupos, com valores maiores nos ratos do grupo experimental, em relação aos do grupo controle. As diferenças individuais foram menos acentuadas, mas presentes (tabela 29 e figura 39, do apêndice B).

Experimento 4 – determinação de relações entre os dados comportamentais, bioquímicos e de atividade de neutrófilos de ratos intrusos:

Uma vez obtidos os dados, conforme apresentados acima, buscamos interpretar as relações entre as alterações comportamentais, neuroquímicas e de atividade de neutrófilos que se mostraram mais relevantes nos ratos “intrusos”.

parâmetro	Sub-tipo	*	$p =$
Comportamento - CA	Velocidade		0,35
Comportamento - CA	Distância movida		0,35
Comportamento - CA	Tempo de permanência na zona central		0,28
Comportamento - CA	Tempo de permanência na zona média		0,36
Comportamento - CA	Tempo de permanência na zona de tigmotaxia		0,49
Comportamento - CA	Freqüência de levantar	●	0,03
Comportamento - LCE	Taxe de entrada nos Braços Abertos (BA)		0,56
Comportamento - LCE	Permanência no BA	●	0,048
Comportamento - LCE	Permanência nos Braços Fechados (BF)	●	0,02
Comportamento - LCE	Taxa de entrada no BF	●	0,0496
Comportamento - LCE	Permanência na Metade Externa do BA		0,36
Corticosterona	Corticosterona sérica	●	0,01
Citometria	<i>Burst</i> Oxidativo Basal induzido por DCFH		0,84
Citometria	<i>Burst</i> induzido por SAPI	●	0,03
Citometria	Porcentagem de fagocitose de <i>S. aureus</i>		0,88
Citometria	Intensidade de fagocitose de <i>S. aureus</i>		0,78
Citometria	<i>Burst</i> induzido por PMA		0,38
Neuroquímica Hipotálamo	NOR		0,32
Neuroquímica Hipotálamo	VMA		0,37
Neuroquímica Hipotálamo	5HT	●	0,0499
Neuroquímica Hipotálamo	5HIAA	●	0,01
Neuroquímica Hipotálamo	<i>Turnover</i> de NOR		0,69
Neuroquímica Hipotálamo	<i>Turnover</i> de 5HT	●	0,04
Neuroquímica Córtex	NOR		0,26
Neuroquímica Córtex	VMA		0,55
Neuroquímica Córtex	5HT		0,25
Neuroquímica Córtex	5HIAA		0,37
Neuroquímica Córtex	<i>Turnover</i> de NOR		0,21
Neuroquímica Córtex	<i>Turnover</i> de 5HT	●	0,002

Figura 40 – O quadro apresenta esquematicamente os resultados da análise de significância encontrados para os diferentes parâmetros entre os grupos controle e experimental: na coluna “ p ”, vêm-se os números correspondentes a este valor, obtidos conforme análise estatística descrita no item 5 (indicados por círculos pretos na coluna “*”). As respectivas tabelas e gráficos com os dados estão no apêndice B.

Analisando-se os dados em seu conjunto, podemos dizer que os animais intrusos se mostraram mais ativos e mais investigativos/exploratórios do que os animais do grupo controle em alguns parâmetros comportamentais analisados, apresentando valores significativamente mais elevados de corticosterona em relação aos do grupo controle. Embora, para a maioria dos parâmetros imunes os resultados obtidos tenha sido muito semelhantes, o *burst* oxidativo induzido por SAPI foi significativamente aumentado nos animais intrusos em relação aos valores do grupo controle e os sujeitos intrusos tiveram um sistema serotoninérgico mais ativado tanto no hipotálamo quanto no córtex do que os do grupo controle.

7 DISCUSSÃO

A premissa básica de que partimos em nossa experimentação é a de que a colocação de um rato macho em um grupo já pré-formado de co-específicos, ou seja, na condição de intruso, é uma situação de estresse que, por isso, ativaria o seu eixo HPA (SELYE, in GOLDBERG, 1982; BUCKINGHAM, 1997; SMAGIN et al, 2000), levaria a um aumento dos níveis e turnover de NOR (PALAMARCHOUK, 2000; KANDEL, 2000; BLANCHARD, 2001 e CARRASCO, 2003) em algumas regiões específicas do encéfalo e uma diminuição da atividade imune inata, representada aqui pela mensuração da atividade dos neutrófilos (BESEDOVISCK, 1996; MATALKA, 2003). Discutiremos nossos achados em face dessas expectativas e à luz do estado atual do conhecimento.

Considerando-se “estresse” como um esforço adaptativo orgânico a uma nova circunstância que representa uma ameaça a esse organismo (como visto na revisão de literatura), pode-se dizer que a exposição de um organismo a um novo e desconhecido grupo (a colônia) é estressora para espécies sociais, como o *Ratus norvegicus* (PERÓN, 1983). Nestas espécies, o contato social é muito importante, do ponto de vista do apoio, da oposição ou como objeto mesmo de satisfação de várias das necessidades do indivíduo (FREUD, 1973), daí a capacidade da situação social eliciar estresse, além de ser forte vetor evolutivo.

Portanto, colocar-se dentro de uma hierarquia grupal é uma tarefa altamente significativa, tanto para o indivíduo como para a espécie, visto que pode comprometer inclusive sua capacidade reprodutiva. De fato, ratos em posições hierarquicamente inferiores não se reproduzem, assim como outras espécies animais (MOBERG, 1991; CREEL, 2001). Assim, dar conta do desafio de buscar uma boa posição hierárquica

mobilizaria recursos energéticos e disposições fisiológicas específicas, de onde a reação de estresse e a ativação do eixo HPA.

Essa suposição foi confirmada nesse trabalho pelo aumento estatisticamente significativo dos níveis de corticosterona sérica dos nossos sujeitos experimentais (tabela 12). O aumento de produção deste hormônio é entendido como resultado de uma ativação do eixo HPA, indicativo fisiológico de uma reação de estresse, como nos mostram Palermo-Neto (2000), Clow (2004) e Alves e Palermo-Neto (2007). Ou seja: como primeira conclusão, podemos dizer que ser exposto a um grupo social desconhecido é, para o rato Wistar, um estressor, e dada a sua natureza, afirmar que seja um estressor social.

A ativação do hipotálamo, entendida aqui pelo aumento da atividade do eixo HPA, é de suma importância na preparação e mobilização do organismo, pois essa atividade proporciona:

- a) expressão fisiológica da emoção: essa expressão serve tanto para fins de ação propriamente dita como para fins de comunicação com congêneres em espécies sociais.
- b) adequação fisiologia geral do organismo para ações e trabalhos implicados na linha de conduta eleita, ou seja, tem papel primordial na construção da resposta do organismo diante de um desafio: integrar a resposta autônoma e a endócrina com o comportamento eleito (KANDEL, 2000). É grande a atenção que se dedica à análise do papel dessa estrutura em comportamentos homeostáticos (como frio ou sede), e não há sombra de dúvida que, sem sua participação a resposta ao estresse social, ou a outro tipo de estresse, seria inviável. É através dele que o organismo dispara respostas autonômicas, hormonais e comportamentais, importantes para adequação do organismo às necessidades circunstanciais.

É importante lembrar que, embora a reação de estresse seja inespecífica, como nos colocou Hans Selye (vide revisão da literatura), isso não pode, hoje, ser tomado ao “pé da letra”. De fato, trabalhos recentes têm demonstrado que, embora sob certo ponto de vista, a ativação do eixo HPA possa ser igual em todas as situações de desafio, as ações específicas desencadeadas para cada desafio podem exigir respostas comportamentais muito diferentes, isto é, exigir preparações orgânicas diversas. Comparemos, por exemplo, a resposta de luta ou fuga com aquela desencadeada pelo frio ou o confronto social com o avistamento de um predador (BUCKINGHAM; GILLIES; COWEEL, 1997; KANDEL, 2000).

Como se daria ativação do eixo HPA a partir de uma exposição a um estressor social? E, que ajustes mais específicos a apresentação desse estressor demanda, se é que o demanda? Para discutir esses pontos e relaciona-los com outros parâmetros é preciso trazer à discussão o conceito de emoção.

Em primeiro lugar, não há dúvida de que em nossa situação experimental toda reação e alterações fisiológicas dos animais se iniciam quando o rato intruso se defronta com essa condição. Ao ser colocado em uma colônia, o animal experimental provavelmente tem avaliações de várias naturezas que lhe permitem identificar que foi colocado em um ambiente semelhante ao que habitava anteriormente, mas habitada por diferentes indivíduos, congêneres a si, mas diferentes em idade, peso, sexo, etc. Não fora essa constatação, a natureza do estresse não seria social evidentemente, e provavelmente nem mesmo algum estresse seria possível, no contexto.

Esse conhecimento da natureza da sua situação (ser “novo” em um ambiente social distinto do anterior) depende de avaliações de dois tipos distintos:

- a) cognitivas: os dados sensoriais são conduzidos aos centros de memória explícita e identificados como “estranhos”, pois não haveria registros de experiência prévia com aqueles indivíduos, embora e principalmente fossem reconhecidos como congêneres e
- b) inatas: o “peso” biótico que a evolução traçou previamente na história filogenética para o fato reconhecido.

Portanto, deduz-se disto, que a reação aqui analisada não é uma resposta estereotipada a um estímulo interno, homeostático, mas uma reação que se constrói a partir do reconhecimento e interpretação de uma situação, realizada por um misto de dados cognitivos e valorizações internas inatas e aprendidas (nosso repertório de enfrentamento dos desafios e demandas para manutenção da homeostase parece ser organizado em dois níveis: um, que já vem inscrito em nossa estrutura, fixo e estereotipado que é disparado por um certo estímulo pré-determinado e um outro conjunto, flexível e adaptável a que chamamos de “comportamento” propriamente dito). E produto final desses dados cognitivos e valorizações inatas e aprendidas produz uma experiência que se pudesse ser traduzido em palavras seria algum equivalente a “estou em um grupo novo”, acompanhado de um “colorido” afetivo que indicaria essa constatação como positiva ou negativa. Esses processos incidirão sobre o organismo criando um estado emocional que possui dois componentes (de onde nossa eleição dessas estruturas para a análise neuroquímica):

- a) sensação visceral: controlada pelo hipotálamo, amígdala e tronco encefálico que costumamos chamar de “emoção” e
- b) estados mediados pelo córtex cerebral (giro do cíngulo e lobo frontal), que poderíamos também chamar de “experiência” ou “vivência”, denominados como “sentimentos” (convém assinalar que este tema resvala nos mais difíceis com que a Neurociência têm se confrontado: a relação corpo-mente e a consciência; pois,

embora, um sentimento esteja em grande parte dependente de uma certa consciência e a existência desta em ratos seja assunto controverso, não podemos nos furtar a aceitar que, de algum modo ou medida, haja no rato uma certa unidade psíquica funcional que seja “emocionável”. Mesmo não sendo finalidade deste trabalho discutir essa questão, achamos importante referenda-la).

Uma maneira complementar à acima exposta de compreender a emoção, é a de Magda Arnold, que a considera como uma “tendência a agir” (apud KANDEL, 2000). Essa tendência a agir decorreria da avaliação de um fato como benéfico ou ameaçador, o que é vivenciado como “colorido emotivo”. Na história fisiológica a emoção decorre do reconhecimento pelo organismo de que o sujeito experimental é um estranho entre iguais.

A preparação para enfrentar um desafio desse tipo envolve (KANDEL, 2000; LEDOUX, 2001; SAPOLSKY, 2004; GRAEFF; HETEM, 2004):

- a) o córtex frontal, como reconhecimento da situação;
- b) o hipocampo, com a memória do contexto de eventos já vividos pelo sujeito e
- c) a amígdala, envolvendo registros de respostas autonômicas e somáticas.

Este conjunto constituirá uma experiência vivida (o conjunto do retorno sensorial dessas alterações com as informações de memória explícita e implícita, mais a valoração filogenética da situação), conforme indicado no diagrama abaixo (figura 41):

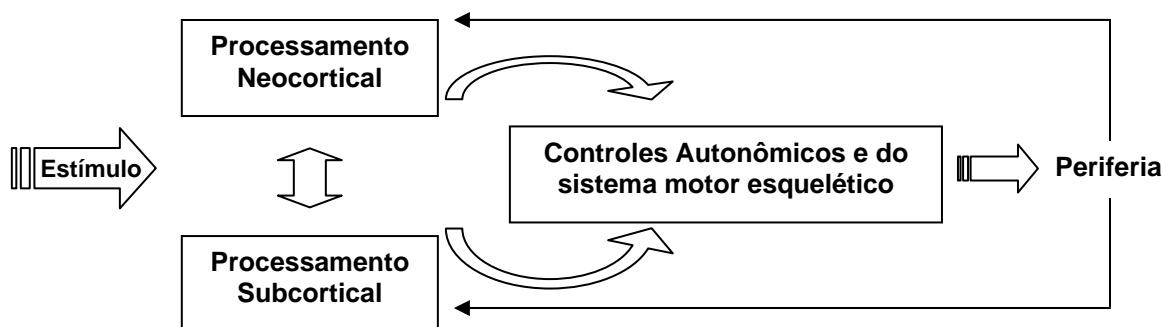


Figura 41 – Diagrama do fluxo de processamento da informação no sistema neural de modo a produzir uma experiência vivida, com seus aspectos emocional e afetivo (adaptado de GRAEFF; HETEM, 2004).

Evidentemente, o que até aqui descrevemos, constitui um sistema que permite uma resposta com alto índice de variabilidade individual, pois depende não só da programação inata do animal, mas também de sua experiência prévia e avaliação presente. Assim, consideramos que os altos desvios padrões encontrados nos dados analisados, isto é, a elevada variabilidade individual observada em nossos resultados decorreram, provavelmente, desses fatos. Teoricamente, portanto, os animais do grupo E teriam uma vivência de caráter diferenciado em relação aos do grupo C, e estariam vivendo emoções de caráter específico, com preparações fisiológicas compatíveis à sua experiência: um desafio social, confirmado pela ativação do eixo HPA, com entornos emocionais diferentes e individuais, calcados na vivência e nos planos de ação individuais decorrentes. É importante notar que, em seres humanos, foi constatada que técnicas de treinamento cognitivo para enfrentamento de situações de estresse agudo, reduzem a resposta do cortisol, demonstrando quão variável é essa reação (GAAB et al. 2006).

Assim compreendida, a emoção em seus componentes periféricos, visaria, então, preparar o corpo para uma ação, (tendência para agir) e para a comunicação com os seus congêneres, orquestrada pelo eixo HPA. Essa função preparatória possui um aspecto geral (um tônus de alerta) e um outro específico, decorrente da linha de ação que se desenha a partir dessa avaliação. Assim, supomos que se encontram nossos sujeitos experimentais: ativados e preparados fisiologicamente para dar conta do novo desafio que foi posto: a necessidade de maior atenção, um estado de alerta mais acentuado (que envolveria a ativação do sistema noradrenérgico). Isso fez com que elegêssemos a quantificação da noradrenalina como um dos parâmetros a se avaliar.

Como amplamente difundido, os conhecidos “sistemas moduladores de projeção difusa” (BEAR, 2002), são pequenos grupos de neurônios, em geral localizados no tronco

encefálico e que possuem em comum o fato de liberarem certo tipo de neurotransmissor. A NOR é o neurotransmissor que caracteriza o sistema noradrenérgico, cuja produção quase que exclusiva se deve a um núcleo situado no tegumento do mesencéfalo denominado de *Locus Ceruleus*. Esse núcleo é conhecido por seu envolvimento nos processos de atenção, do alerta, também denominados pela expressão inglesa “*arousal*” e também por seu envolvimento com o sistema imune (KOHM; SANDERS, 2000). Por essa razão, nossa expectativa neste experimento era a de que houvesse um aumento da atividade desse sistema nos animais do grupo experimental em relação aos do grupo controle. Essa expectativa se justificava pelo fato de que, ao ser colocado nessa situação de novidade e tensão, seria necessária uma maior demanda pelos recursos corticais e, portanto, se verificaria um estado de maior alerta (FOOTE, 1980; KANDEL, 2000).

No entanto, não encontramos uma diferença estatisticamente significativa das concentrações de NOR no hipotálamo (tabela 18). Mas, observamos grande variação individual nas concentrações de NOR nessa estrutura nos animais intrusos. Já enfatizamos que a resposta individualizada faz todo o sentido no presente trabalho, uma vez que a preparação fisiológica decorrente do desafio que se pos diante do sujeito experimental depende de vários fatores: receptividade dos indivíduos da colônia, histórico individual e influências genéticas ou congênitas. O mesmo em relação às concentrações do ácido vamil mandélico (VMA), metabólito desse neurotransmissor.

É inevitável refletir, porém, que o sistema noradrenérgico também poderia estar ativado nos sujeitos do grupo controle, uma vez que foram igualmente colocados em uma situação nova: o campo aberto e, logo após, no labirinto em cruz elevado, além de terem sido manipulados. É provável que esses estímulos tenham contribuído para a ausência de dados estatisticamente significantes entre os grupos controle e experimental do presente experimento, pois, como Rodgers e colegas demonstraram, o simples fato de ser colocado

no Labirinto em Cruz Elevado aumenta em 153% a taxa de corticosterona em ratos em comparação aos sujeitos controle que usaram e que ficavam na caixa de moradia (RODGERS et al, 1999).

Note-se, também, que o desafio de estresse social, como aqui configurado, não é um estímulo dos mais intensos, se comparado com aqueles tradicionalmente usados em experimentos similares (natação forçada, choques elétricos, contensão, etc.). Assim, agora nos parece lógico e natural não encontrar uma variação explosiva nos níveis deste neurotransmissor nos ratos intrusos, mas sim índices altamente diferenciados e de alguma forma homogêneos entre os grupos. Um estímulo sutil, uma resposta sutil, variações mais visíveis individualmente, dependentes do histórico e de outros fatores. Voltamos aqui a frisar o sentido em que empregamos a palavra “sutil”, conforme especificado à página 43: sutil, por ter uma margem de modulação bastante acentuada e um caráter estratégico, não bruto, direto e inequívoco, com poucas alternativas de enfrentamento. Provavelmente, fosse aplicado um estímulo de natureza mais brutal e inequívoca, teríamos patamares de reatividade do sistema NOR mais elevados, o que, sem dúvida, dissolveria a fineza da resposta individual, enfatizando a resposta do grupo em níveis máximos da espécie. Enfim, disso podemos sugerir que estímulos sutis e mais cotidianos manifestariam com mais vigor a reatividade individual, especialmente em uma situação social, onde o desempenho correto depende de fatores muito mais complexos e dependentes de interpretações, do que a resposta, por exemplo, a um choque nas patas. Ao que parece, a resposta ao estresse surgiu evolutivamente primeiro para preparar o organismo para situações-limite de luta-e-fuga, de onde uma maior padronização dessa reação em níveis intensos e em diferentes grupos de organismos e, com a evolução, essa resposta foi se diferenciando em uma amplitude maior, conforme a fineza das ameaças e aproveitada por organismos sociais para

uma modulação mais flexível de respostas de enfrentamento, tendo sua expressão máxima na variação individual.

Nesse contexto, as diferenças observadas entre os ratos dos grupos controle e experimental não dependeriam apenas de terem eles os sistemas noradrenérgicos mais ativados (por uma maior solicitação, a qual, como vimos, incidiu também sobre os controles), mas pelo simples fato de estarem, os animais intrusos, vivenciando emoções de caráter diverso daquelas dos animais do grupo controle.

As sugestões mais lógicas para explicar o ocorrido seriam “medo” e “ansiedade”. Convém distingui-las (GRAEFF; BRANDÃO, 1999):

- a) medo: conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas eliciadas em situações de confronto com ameaças ao bem estar ou sobrevivência (ínatas ou aprendidas) presentes e
- b) ansiedade: reação preparatória em função de um perigo incerto, potencial.

Obviamente, e mais uma vez, a avaliação de uma situação como representando perigo ou incerteza quanto à probabilidade de ocorrência depende de uma avaliação cognitiva.

Como nos diz Graeff (1999):

...mesmo nos animais destituídos de linguagem, a capacidade de processar estímulos e contextos físicos, e de compará-los com expectativas formadas a partir de informações arquivadas nos bancos de memória, levando em conta também os planos de ação formulados pelo animal, são fundamentais para a detecção do perigo e a avaliação de sua intensidade e eminência. Também na escolha da estratégia de defesa a ser adotada, bem como no controle de sua execução intervêm operações cognitivas.

Assim, não é possível fazer uma consideração “objetiva” da resposta do animal, sem que se leve em conta a interpretação do contexto elaborada pelo animal intruso, dependente de seu histórico, assim como da variação das atitudes tomadas em sua presença pelos membros da colônia. Essa avaliação cognitiva da situação, dependente de tantos

fatores, seria mais um elemento que colaboraria para a grande variabilidade das respostas. Assim, a reação de “medo” ou “ansiedade” de nossos ratos intrusos deve ter variado também em função da história e da interpretação dos indivíduos somados às atitudes mais ou menos agressivas com que foram recebidos. Isso torna esse tipo de experimento com ratos bastante similar aos contextos humanos.

É importante notar que não é necessário ter “acesso” ao conteúdo consciente do rato para se supor que a subjetividade do animal exista e que influi em tais casos. LeDoux (2001), nos aponta que o fato de um conteúdo poder ser consciente não foi obstáculo para o estudo de outras funções cerebrais: por exemplo, a memória ou a percepção visual também têm correlatos subjetivos (cor e sabor) e, no entanto, a memória ou a percepção visual foram estudadas sem esse embaraço. Desse modo, o mesmo deve acontecer com o estudo das emoções.

Por outro lado, essas respostas – “medo” e “ansiedade” – estão vinculadas a sistemas de defesa dos animais sendo ativados quando seu bem estar, sua integridade física ou sobrevivência estão ameaçadas (GRAEFF; BRANDÃO, 1999). Isso se dá, em geral, por estímulos noceptíveis, confronto social, novidade no ambiente ou presença de predador. Esses estímulos, por sua vez, eliciam um desses comportamentos: luta defensiva, fuga, submissão ou imobilidade. E, como sabido, um dos moduladores do comportamento de defesa é o sistema serotoninérgico. De fato, há muito tempo se relaciona o aumento de atividade da serotonina no SNC a uma diminuição da impulsividade (PALERMO NETO, 1971).

Porém, uma contradição nasceu dos estudos encontrados na literatura e que envolvem o sistema 5HT: em experimentos com conflito o aumento dos níveis de 5HT resultava em maiores níveis de ansiedade. Animais previamente condicionados a procurar um certo estímulo, passavam a ser punidos na mesma situação. Isso produzia,

teoricamente, um conflito entre aproximar-se de tal estímulo e evita-lo. Os animais tratados com ansiolíticos tendiam a aumentar a frequência de aproximação do elemento punido. Mas, em experimentos com estimulação elétrica dos sistemas serotoninérgicos da SCPA (substância cinzenta peri-aquedutal) havia uma diminuição da mesma, quer dizer, a fuga e a luta (comportamentos considerados “ansiosos), seriam evitadas. A 5HT estaria envolvida, então, na ansiedade inibitória da emissão de um comportamento punido e na SCPA estaria envolvida na inibição da fuga (fuga que se suporia ser expressão da ansiedade), logo, a 5HT aumentaria a “ansiedade” em um caso e a diminuiria em outro. Esta constatação dificultou a interpretação dos dados que pareciam contraditórios em diferentes experimentos. Mas, os estudos de Deackin e Graeff (1991) colaboraram para solver essa aparente contradição. Esses autores propuseram que cada uma dessas reações se comporia de emoções diferentes, pertencentes a dois sistemas serotoninérgicos diferentes e ligados a comportamentos com funções diversas.

A proposição desses autores foi baseada no conceito de Blanchard e Blanchard sobre níveis de defesa (BLANCHARD; FLANNELY; BLANCHARD, 1986), que passamos a expor. Os autores sugeriram que os animais, apesar da existência de evidentes diferenças inter-espécies, podem ter seu comportamento defensivo organizado em três diferentes níveis. No primeiro deles, há possibilidade de ameaça, mas não sua identificação presente (perigo potencial). Esta fase seria de expectativa e ansiedade, gerando comportamentos de “avaliação de risco” (comportamentos exploratórios e cautelosos). Em um segundo nível, já com ameaça detectada no campo perceptual do animal, mas a uma distância ainda segura, este apresentaria uma paralisia e tensão. Seria a fase do medo, com a presença física do perigo. E em um terceiro nível, o animal entraria em contato direto com o objeto ameaçador, que dispararia emoções de raiva/pânico e comportamentos de luta e fuga.

No primeiro nível, o próprio casal Blanchard e colaboradores notaram a semelhança deste comportamento com aquele que havia sido descrito e identificado por Gray e McNaughton (2003) como “sistema de inibição comportamental”. Assim, estabeleceu-se que, em termos neuroanatômicos, as estruturas neurais básicas responsáveis pelos comportamentos de defesa de nível 1 seria o sistema septo-hipocampal (SSH). Os autores atribuíram a esse sistema a função de identificar conflitos, especialmente os do tipo aproximação-evitação. Nesse caso, o sistema suspenderia toda atividade do organismo, provocaria um aumento de atenção e disporia o organismo para uma ação vigorosa. Neste sistema, a amígdala (AM) seria responsável pelo colorido afetivo que essa reação assumiria. O sistema de inibição comportamental pode ser graficamente representado no diagrama apresentado na figura 42:

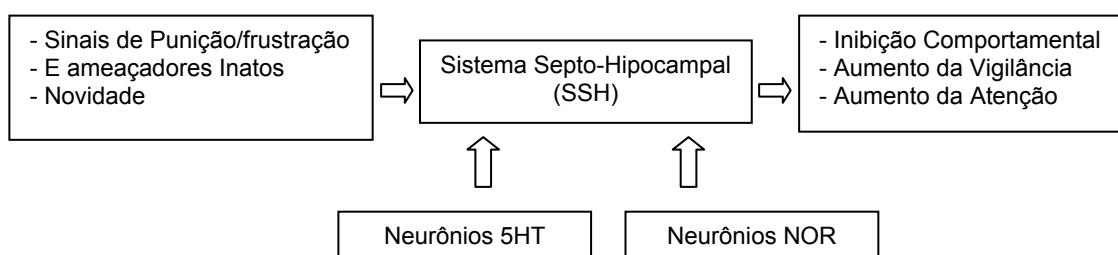


Figura 42 – Representação gráfica do SIC (sistema de inibição comportamental) de Hetem e Graeff (adaptado de GRAEFF; HETEM, 2004).

No segundo nível, podemos notar a semelhança do comportamento descrito pelos Blanchard com o que Davis propôs em seus trabalhos (DAVIS, 1992), onde expõe que a via que conecta a AM e a porção ventral da substância cinzenta peri-ventricular/aquedutal (SCPA) é aquela responsável pela imobilidade, encontrada nas respostas de medo.

Para os comportamentos de nível 3 (luta e fuga), foram os clássicos trabalhos de Hess e seus discípulos (MOLINA; HUNSPERGER, 1959) que apresentaram suas bases neurais; esses autores demonstraram que estimulando-se eletricamente a SCPA o animal exibia comportamentos evasivos e de luta defensiva próprios da espécie. Essas estruturas

comporiam o Sistema Cerebral de Defesa, como se vê no diagrama representado na figura 43.

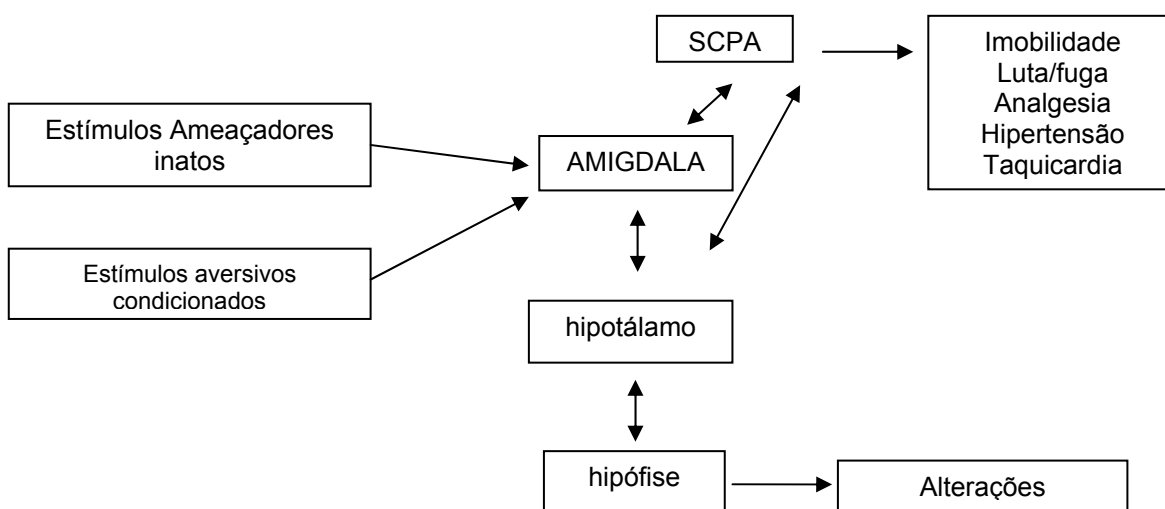


Figura 43 – Representação gráfica do SCD (sistema cerebral de defesa), conforme apresentado por Hess e discípulos (adaptado de GRAEFF; HETEM, 2004)

Em resumo, unindo essas informações, podemos propor o seguinte quadro sinótico (figura 44):

perigo	potencial	distal	proximal
Comportamento	investigação	Imobilidade tensa	Ameaça/luta/fuga
Estrutura SNC	Amígdala (SSH)	N. Raphe SSH/SCPA	Hipotálamo SCPA
emoção	ansiedade	medo	Raiva/pânico

Figura 44 – Escala de comportamentos em relação à proximidade da ameaça. Ver texto.

Isso posto, voltemos à aparente contradição ansiogênica/ansiolítica da 5HT acima esboçada, detendo-nos na solução proposta por Deakin e Graeff (GRAEFF; DEAKIN, 1991 e GRAEFF; HETEM, 2004). Os autores propuseram um modelo que colocaria defesa potencial ou distal, amígdala, ansiedade antecipatória ou generalizada de um lado e defesa proximal, SCPA e pânico do outro. Assim, a 5HT aumentaria a ansiedade e inibiria o pânico, levando, em ambos os casos, a comportamentos mais cautelosos. Em outras

palavras, o sistema 5HT facilitaria a defesa potencial ou distal e inibiria a proximal, conforme representação gráfica a seguir (figura 45):

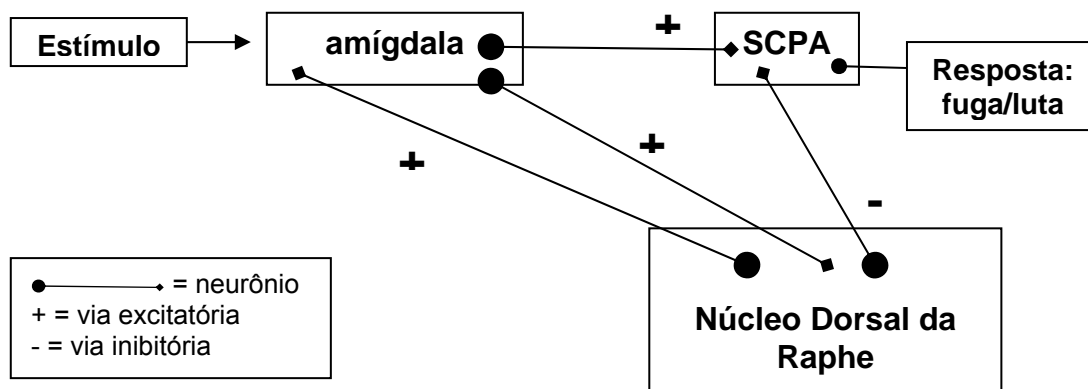


Figura 45 – Representação gráfica da proposta de Deakin e Graeff para a dupla função do sistema 5HT no comportamento de defesa (adaptado de GRAEFF; DEAKIN, 1991).

Um fato importante em nosso contexto é que, segundo pesquisas (SEWARDS; SEWARDS, 2002), estudos de neuroimagem mostraram que a ativação das estruturas meso-diencefálicas responsáveis pela defesa proximal também inibem as estruturas pró-encefálicas envolvidas na ansiedade antecipatória. Faz sentido, pois que comportamentos exploratórios não são o que mais se deseja no momento de um embate com um predador ou em confronto onde é inevitável a luta.

É importante notar que os ratos intrusos desse experimento estavam fechados em uma caixa relativamente pequena, o que reduz as condutas possíveis, privilegiando respostas de imobilidade; permitir que a resposta emocional evoluísse para “raiva/pânico” poderia ser catastrófico em um ambiente sem possibilidade de fuga. Essa seria mais uma razão para a ativação do Sistema Inibitório do Comportamento (SIC), que “ganharia tempo” para coleta de informações, processamento das mesmas (incluindo memórias relativas) e escolha da conduta mais adequada.

Quando os animais intrusos são colocados na caixa, iniciam comportamento de investigação, com o típico farejar de uns e outros, reconhecendo-se. Penso que não seria demasiado supor que este tenha sido um momento de ansiedade para os sujeitos experimentais, onde haveria o conflito entre aproximar-se dos novos companheiros e evitar confrontos decorrentes de disputas hierárquicas com elementos desconhecidos. A situação de conflito que se instalou é evidente, pois a mesma tanto poderia ser promissora de bons ou maus momentos. Juntar-se ao grupo e afastar-se dele são duas variáveis opostas de forte vetor. Isso caracterizaria o primeiro nível de defesa e a ansiedade. Logo após, ou mesmo durante esse exame, os intrusos apresentaram imobilidade (vide anexo A), possivelmente reflexo do medo, emoção própria do segundo nível de defesa, às investidas mais enfáticas de seus novos companheiros. Atitudes mais agressivas dos componentes da colônia colocariam os sujeitos experimentais na situação de “perigo proximal”, com ataques e investidas contra o intruso por parte dos elementos da colônia; essa situação ativaria, agora, o terceiro nível de defesa e seus componentes neurais: luta defensiva, fuga, submissão, assim disparando o sistema serotoninérgico de modulação destas respostas.

Visto assim, esses estímulos ameaçadores adentrariam o sistema via amígdala e esta, processando esses dados, modulariam a atividade hipotalâmica, ativando a hipófise com o sentido de produzir as alterações hormonais que seriam necessárias para as condutas decorrentes. A amígdala também ativaria a SCPA para promover esses comportamentos (luta/fuga à imobilidade), modulados, neste caso, em grande parte, pelos sistemas serotoninérgicos, modulação esta que, como visto, parece ser necessária pela radicalidade de seu repertório. Essa função é executada pelo sistema modulador serotoninérgico de projeção difusa, que exerce duplo papel (ora inibindo, ora promovendo ansiedade) na regulação do comportamento de defesa e estados de ansiedade, mantendo o comportamento em níveis mais adequados para perigos potenciais ou distais. Inibindo a

SCPA evitar-se-iam comportamentos intempestivos (luta ou fuga), possibilitando estratégias mais adequadas ao momento delicado que nossos sujeitos experimentais atravessavam, dando conta de um confronto social severo sem possibilidade de fuga. Há uma expressão popular contemporânea que bem descreveria essa situação: “muita calma nessa hora!”, tradução verbal jocosa da inclinação de funcionamento do SNC em momentos tensos, onde há muita coisa em jogo e que as alternativas de ação precisam ser analisadas com máxima frieza. Convém notarmos que essas reações são de difícil apreensão experimental e que ainda são tema de muitas controvérsias e pesquisas.

Como exposto, parece-nos que esses fatos são coerentes com os nossos resultados, uma vez que se verificou no hipotálamo dos animais experimentais um aumento significativo da 5HT (Tabela 20), nos níveis do ácido 5 hidroxí indolacético (5HIAA), metabólito da 5HT (Tabela 21) e do *turnover* de 5HT (Tabela 23), situação registrada no momento da coleta e que indicariam aumento da atividade de 5HT. Em outras palavras, aparentemente, o sistema 5HT no hipotálamo dos animais experimentais tinha sido mais solicitado e havia respondido a esta solicitação. Em parte, a presença aumentada de 5HT seria conseqüência de uma ativação do sistema serotoninérgico para desencadeamento de uma inibição comportamental em situação de risco. Essa inibição se faria através do aumento da ansiedade no nível inicial de defesa (potencial) e por diminuição desta, no nível de defesa para perigos distais ou proximais, como visto acima.

No córtex frontal observou-se um aumento significativo do *turnover* de 5HT, indicando aumento da atividade deste sistema (tabela 29) nos ratos intrusos. Esses dados estão de acordo com os da literatura, ao colocar a situação de estresse social como de perigo potencial e mesmo proximal, demandando uma modulação do comportamento, cuja expressão emocional é comumente associada à modulação dos níveis de defesa. Um sistema 5HT bem regulado geraria aquele grau de tensão ótimo para a execução de uma

atividade. Qualquer desbalanço e essa reação ótima não seria mais possível, gerando-se desequilíbrios, como paralisias, demoras, baixo rendimento e escolhas comportamentais inadequadas; como se disse, aparentemente, é função do sistema 5HT inibir reações intempestivas gerando comportamentos de “cautela” e “calma” para situações críticas.

Por outro lado, como já afirmamos em relação a outros tópicos, a intensidade da reação vai depender profundamente tanto do próprio indivíduo e de sua história como do grupo que o recebe, assim como da natureza de seu dominante (variável, conforme pode-se avaliar pelos registros apresentados no apêndice A, mesmo incompletos). Essa contabilidade pode resultar em diferentes graus de ativação de diferentes estruturas cerebrais. Já refletimos também, e salientamos novamente que, se a resposta eliciada pelo procedimento experimental alcançasse os tetos da capacidade de resposta de um organismo, teríamos uma uniformidade muito maior dos dados relativos aos parâmetros que avaliáramos. No entanto, nossos ratos vivenciaram uma situação de desafio mais sutil, no sentido aqui entendido, onde, acreditamos, as variações individuais, de história e de contexto puderam se expressar como justificado pelas grandes variações individuais encontradas, de acordo com o que pensamos seja o propósito com que essas foram trabalhadas pela evolução.

Após essas considerações, podemos afirmar que a situação de ser intruso é um estressor, pois ativa o eixo HPA, acrescentando que é um estressor de natureza social que produz um quadro emocional que poderíamos chamar de “prudência cautelar”, inferência feita a partir de dados de 5HT e dos conhecimentos sobre as reações de ansiedade, medo e raiva/pânico, possivelmente apresentados pelos sujeitos.

Essas inferências são confirmadas, de certa maneira, pelos resultados encontrados no Campo Aberto e no Labirinto em Cruz Elevado. Nestes aparelhos, clássicos para se

avaliar atividade exploratória e os níveis de ansiedade dos animais (PELOW et al, 1985; ARCHER, 1973), obtivemos dados opostos aos que esperávamos. Encontramos em vários dos parâmetros analisados uma tendência dos animais intrusos para exibir comportamentos menos ansiosos, ou seja, uma diferença significativa para explorar mais as regiões abertas do LCE e a exibir uma frequência de levantar maior no CA.

Mais especificamente, no Campo Aberto encontrou-se muito pouca diferença entre os dados dos dois grupos, sendo que os animais do grupo experimental exibiram uma maior frequência de levantar (tabela 6), que é entendido como um comportamento exploratório. Já no Labirinto em Cruz Elevado as diferenças foram mais enfáticas: os animais experimentais apresentaram uma taxa de permanência significativamente maior nos braços abertos (tabela 7) e com taxas quase iguais de entradas neste segmento do aparelho (tabela 8). Nos braços fechados, estes animais permanecerem menos tempo (tabela 9) e entraram menos (tabela 10) neste segmento, com diferenças estatisticamente significantes.

Os dados desses aparelhos são, normalmente, interpretados à luz da informação de que representam um conflito para o animal: o impulso de explorar o novo versus o impulso de evitar áreas abertas, conforme amplamente discutido (PELOW et al, 1985; ARCHER, 1973), desde as primeiras observações de Kurt Lewin e Konrad Lorenz (LEWIN, 1969; LORENZ, 1994). Não só o tempo de permanência é importante, como representativo desse conflito, mas também o grau de atividade que o animal desempenha nos aparelhos. Em geral, é assumido que o efeito ansiolítico de um fármaco se reflete num aumento de exploração dos braços abertos do LCE, sem aumento da atividade motora. Mas, não só ansiolíticos como também psicoestimulantes podem produzir resultados semelhantes, uma vez que os segundos aumentam a atividade exploratória (WEISS et al, 1998).

Como podemos observar nas tabelas 1 e 2, quase não houve diferença em relação à velocidade ou distância movida pelos animais no Campo Aberto. É importante notar que Dawson e colegas mostraram que os ansiolíticos, como os benzodiazepínicos, aumentam os índices de comportamento exploratório no CA, mas não aumentaram a atividade psicomotora (DAWSON et al, 1995).

A interpretação purista dos dados de comportamento no Campo Aberto e no Labirinto em Cruz Elevado seria a de que os ratos intrusos do grupo experimental apresentaram parâmetros que os caracterizariam como animais menos ansiosos que os do grupo controle. No entanto, eles poderiam ser interpretados também como decorrentes da ativação dos sistemas serotoninérgicos para uma “prudência cautelar” produzida por uma inibição das reações de medo e pânico, embora com uma ativação maior do hipotálamo e do eixo HPA. Conforme discutido acima, o sistema serotoninérgico em situações de perigo proximal exerce uma inibição do comportamento de luta e fuga e uma inibição das áreas corticais frontais, responsáveis pela ansiedade. Embora, em princípio possa parecer paradoxal, é seletivamente justificável pensar-se que esse quadro deixaria os animais melhor preparados e com mais tranquilidade para explorar ambientes novos, ou seja, menos suscetíveis à ansiedade eliciada pela novidade, já que estariam mais energizados (eixo HPA e sistemas NOR ativados) e com o sistema serotoninérgico inibitório de reações emocionais intensas mais ativado ou, se preferirem, melhor modulado, gerando as discretas tendências observadas.

No entanto, não se deve esquecer que a manipulação e a própria exposição do animal controle aos aparelhos de comportamento são, em si mesmos, eliciadores de respostas de estresse. Portanto, *nossos ratos do grupo controle não eram neutros*, nem estavam em estado de “repouso”. De fato, e como já comentado, isso está de acordo com os resultados destes aparelhos, uma vez que o propósito do CA e LCE é mensurar a reação

dos animais diante de estímulos que provocam conflito, com o pressuposto de que, caso a emocionalidade de fundo dos indivíduos esteja alterada, diferenciada serão as respostas emitidas.

Nesse sentido, nossas reflexões nos conduzem ao fato de que, os sistemas de inibição de respostas de pânico deveriam estar mais ativados nos sujeitos intrusos e, portanto, eles deveriam estar menos contidos que os do grupo controle, para os quais o desafio representado pelos labirintos foi mais ansiogênico. No mais, é nosso entendimento que as grandes diferenças individuais se explicariam pelo histórico pessoal de cada animal e pelas diferenças de recepção dos intrusos nas colônias.

Isso nos faz pensar sobre o próprio conceito de “ansiedade” e dos limites em que podemos experimentá-la, sem que nos sintamos inibidos ou que seus níveis possam vir a ser contraproducentes.

Agora, a última questão a ser abordada, segundo a proposta do presente experimento envolve aspectos de neuroimunomodulação, isto é, a resposta imune inata avaliada através da medida da atividade dos neutrófilos.

Escolhemos a atividade de neutrófilos como parâmetro para avaliação da resposta imune inata por serem essas células parte da “linha de frente” do sistema imune, como parte da resposta imune inata. Como nos indica Sendo (1997), os neutrófilos têm um papel muito mais abrangente do que se lhes costumam atribuir, pois estudos recentes mostram que eles também regulam a resposta imune através da secreção de citocinas e de outras potentes moléculas bioativas, H_2O_2 , como o óxido nítrico, não sendo, portanto, apenas células efetas. Essa escolha, no entanto, em absoluto, não minimiza a relevância da realização de outros estudos dirigidos especificamente para avaliar os efeitos de um

estresse social sobre a resposta imune adquirida ou sobre outros elementos da resposta imune inata.

O desafio dessas células com a bactéria *S. aureus* pareceu-nos conveniente pela simplicidade de manuseio e também por permitir inferências sobre a resistência orgânica dos animais a agentes infecciosos.

Nossos resultados mostram que a atividade basal dos neutrófilos colhidos em animais de ambos os grupos eram iguais (tabela 13). No entanto, após o desafio dessas células por *S. aureus*, o burst oxidativo apresentou diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,01$), sendo maior nos ratos intrusos, indicando que essas células apresentavam uma ativação mais intensa (tabela 14). Em conjunto, podemos dizer que os neutrófilos colhidos dos ratos intrusos estavam com um metabolismo basal igual aos do grupo controle antes do desafio e que fagocitaram *S. aureus* de igual forma, tanto em porcentagem, quanto intensidade (tabelas 16 e 17). No entanto, os neutrófilos do grupo experimental apresentaram um metabolismo mais intenso do que os dos animais do grupo controle, após desafio com *S. aureus*. Em outras palavras, os dados encontrados foram indicativos de que houve uma pequena melhora na eficiência da resposta de ativação dos neutrófilos, os demais parâmetros não variando nos dois grupos. Como interpretar esses dados?

É comum esperar-se que uma alta taxa de corticosterona circulante leve a uma diminuição da atividade de neutrófilos (GOULDING, 1998), por terem eles efeitos anti-inflamatórios na clínica médica. É fato clínico cotidiano que altas doses de corticosteróides são imunossupressoras e é largamente acreditado que o estresse suprime a função imune e aumenta a susceptibilidade às doenças (KORT, 1994; MAIER; WATKINS; FLESHNER, 1994).

Em nosso caso, os dados indicaram que os neutrófilos dos animais intrusos estavam com um *burst* oxidativo mais acentuado. Esse dado, à primeira vista contraditório com os

da literatura, não o é, uma vez que o efeito do corticosterona, ou em sentido mais amplo, da ativação do eixo HPA que ela representa não é linear no tempo ou mesmo dose dependente (SAPOLSKY, 2004).

Embora no início das pesquisas sobre estresse fosse comum e assentado haver uma associação entre imunossupressão e altas doses de corticosterona, o fato é que essa era uma resposta medida em um momento no tempo da curva de resposta ao estresse e não fruto da resposta imune ao estresse propriamente dita. O momento em que os pesquisadores colhiam seus dados e observavam as correlações estava relacionado mais à recuperação do sistema imune após a descarga inicial do que à resposta em si. Hoje, sabemos que o efeito da ativação do eixo HPA sobre a resposta imune apresenta uma curva temporal. Segundo Sapolsky (2004), diversos pesquisadores mostraram a ocorrência de uma ativação da resposta imune na primeira meia hora pós-estímulo, com um decréscimo da mesma, após uma hora. Essa ativação se fazia presente especialmente na resposta imune inata, com efeitos diversos: no início do processo mais células iriam para a circulação, as células responderiam melhor às citocinas e mais anticorpos seriam secretados na saliva. Isso se daria como efeito inicial da corticosterona e da ativação do sistema nervoso autônomo simpático. Essa melhora da resposta obedeceria à lógica de que, no momento de uma emergência ou numa situação aguda este seria o tipo de resposta imune mais adequada às necessidades decorrentes dos enfrentamentos que levaram ao estresse (uma luta, ferimentos e outras ocorrências). O fato de ser a imunidade inata o alvo dessa mobilização decorreria do fato de que seria ela a mais solicitada em caso de ferimentos decorrentes de confrontos. Após uma hora, aproximadamente, a superexposição à corticosterona e a ativação adrenérgica simpática produziriam uma imunossupressão. Costuma-se pensar que esse declínio da resposta imune teria o sentido de evitar possíveis alterações decorrentes de

processos auto-imunes. Supõe-se que isso se deva por serem as respostas ao estresse seletivamente desenvolvidas para preparar o organismo para situações agudas do mesmo.

Confirmando essa concepção Straub (2005), em sua revisão, demonstra que na maioria dos estudos acerca das doenças inflamatórias como artrite reumatóide, o estresse agudo aumenta a reação inflamatória e o estresse crônico inibe essa reação, ou seja, um estresse *agudo piora* a doença inflamatória, indicando um efeito pró-inflamatório. Esses efeitos anti-inflamatórios da ativação do Sistema Imune se justificariam pelo perigo que uma ativação excessiva da imunidade traria ao organismo. A que tudo indica, é a própria corticosterona que faz uma retro-alimentação para balancear as concentrações sanguíneas desta substância a fim de que o organismo não se veja às voltas com problemas de auto-imunidade ou reações alérgicas intensas (BESEDOVSKY et al, 1975), de onde a tendência à imunossupressão tão propalada dos corticosteróides.

Também é preciso observar que o efeito clínico da aplicação dos glicocorticóides como antiinflamatórios se verifica com seu uso em dosagens farmacológicas e não com as semelhantes àquelas verificadas *in vivo*. Cabe comentar, ainda, que os esteróides adrenais também afetam a produção de citocinas, de modo a influenciar a classe de resposta imune ativada, elevando a imunidade humoral e suprimindo a imunidade celular. Além do que, corticosteróides alteram (algumas para mais e outras para menos) a produção de muitas citocinas. Estas fazem parte de um sistema conhecido como de citocinas com perfil Th1-Th2 (pró-inflamatórias e anti-inflamatórias) que atuam de forma diferenciada sobre os neutrófilos. Em outras palavras, a atividade de neutrófilos é influenciada por várias citocinas que são moduladas, por sua vez, de forma diferencial pela corticosterona, dentro de uma certa faixa de concentração e tempo. Para solucionar esse paradoxo, Dhabhar e McEwen propõem que o estresse tenha um efeito bi-direcional: um estresse agudo, adaptativo, também denominado de “eustresse”, resultaria em uma imunoestimulação,

enquanto que um estresse crônico, fisiologicamente inadaptativo, denominado “distresse”, seria imunossupressor (DHABHAR; McEWEN, 1997). Em outros trabalhos, o autor demonstrou que o estresse agudo resulta em um rápido, significativo e reversível decréscimo do número absoluto de células T, B e NK, assim como de monócitos, no sangue circulante (DHABHAR; McEWEN, 1997), e que, em certas circunstâncias, isso representa uma redistribuição dos leucócitos do sangue para outros órgãos do corpo (pele, linfólóculos ou medula óssea), onde, acrescentamos, poderiam ser mais úteis em uma situação de confronto. É preciso ter em mente que a reação de estresse parece ter surgido justamente da necessidade de adaptar o organismo a situações como estas, que são disparadas por um SN que busca preparar o corpo para enfrentamento. Esta linha de pensamento surge do reconhecimento de que a percepção do estresse pelo cérebro resulta em uma resposta neuroendócrina que prepara diferentes sistemas fisiológicos no corpo para enfrentar as ameaças potenciais impostas pelas ações do agente estressor, isto é, as respostas tipo luta-fuga.

Como na situação experimental do presente trabalho, foi de uma hora, é provável que a coleta do sangue tenha ocorrido próximo ao ponto de inversão da curva de eficiência da resposta imune influenciada pelas reações de estresse e que teria ocasionado uma homogeneização dos parâmetros, embora por razões diversas. É razoável supor que uma eficiência discretamente acentuada do *burst* oxidativo nos animais do grupo experimental, em relação aos do grupo controle, decorra do efeito ativador inicial da resposta do estresse. De fato, ratos intrusos mostraram uma diferença estatisticamente significativa nas quantidades de corticosterona e, portanto, uma maior ativação do eixo HPA. Em conseqüência, somos levados a considerar os dados imunes dos animais do grupo experimental como retratos de um momento da curva da resposta estresse/sistema imune.

Os sujeitos experimentais desse trabalho teriam, portanto, modulado seus sistemas de defesa (não só os comportamentais descritos acima), mas, também o imune, pois do confronto poderiam advir ferimentos, portas de entrada para infecções. De fato, algumas



Figura 46 – O círculo indica lesões resultantes de confronto social na região posterior dorsal de um macho submisso, residente na colônia.

barreiras externas dificultam a entrada de microorganismos patogênicos no meio orgânico. Com a perspectiva de uma luta decorrente de um confronto social eminente e reconhecido, seria válido inferir, que nossos sujeitos intrusos teriam seus organismos preparados para a possibilidade de verem essas barreiras rompidas por lesões decorrentes de

eventuais confrontos sociais, como, por exemplo, ilustradas pela figura 46. No contexto de uma confrontação social, o recrutamento rápido e inicial da imunidade inata é de muita utilidade (JANEWAY et al, 2002). Esse vínculo entre possibilidade de um confronto, identificação do perigo, do provável ferimento resultante e modulação da resposta imune preparatória adequada para o contexto é um belíssimo exemplo das conexões neuroimunes e do trabalho integrado de todo o organismo.

Dhabhar e McEwen (DHABHAR; McEWEN, 1996) sugerem que, assim como o SNC prepara as respostas dos sistemas cardiovascular, músculo-esquelético, neuroendócrino e outros ao estresse agudo, igualmente preparariam o sistema imune, para fazer frente aos desafios que poderiam surgir. No entanto, os mesmos autores argumentam que é um paradoxo que em certas circunstâncias o estresse suprima a imunidade de

maneira a aumentar a susceptibilidade às doenças infecciosas e câncer, citando inúmeros estudos que apresentam tais resultados (aos quais podemos acrescentar o interessante livro de Bizzarri [2001]), enquanto que, em outras circunstâncias ele exacerbe ou desencadeie respostas como asma ou artrite (como, em nossos laboratórios os trabalhos de Portela, [2004], têm demonstrado).

Feitas essas reflexões, notemos, então, que um estresse social agudo aparentemente tornou os organismos um pouco mais eficientes imunologicamente, o que, sob vários pontos de vista, está de acordo com o fato amplamente difundido de que o estresse, em si, não é maligno ao organismo e em doses adequadas, estimula a imunidade (SAPOLSKY, 2000). Isso ocorre em uma situação que em si não deve ser nada confortável, pois os animais enfrentam conflitos e muitas vezes sofrem agressões. Assim, nossos dados estariam corroborando com outros da literatura em relação aos efeitos positivos do estresse (também denominado de “eustresse” [SELYE, 1974]).

Baseados nisso, cremos ser possível dizer também, que resultados de imunidade aparentemente pouco diferentes entre si, podem ocultar outras alterações. Se nossos dados não nos mostram diferenças significantes, só podemos dizer que nossos instrumentos de medidas nada registraram e não que nada havia. Parece razoável, no nosso caso, propor que as pequenas diferenças encontradas podem estar, mais uma vez, baseadas em grandes diferenças de processos individuais de resposta ao contexto experimental; às vezes, muita coisa está acontecendo para que pareça que não está acontecendo nada. Aliás, essa é uma situação bastante freqüente na vida social humana.

Por tudo quanto exposto, que nos parecer que o modelo de colônia experimental C3 é um modelo válido para pesquisas com estresse social. Restaria fazer pesquisas semelhantes com diferentes tempos de exposição dos animais ou diferentes métodos de

coleta de dados. Isso é animador, pois é um modelo que ocupa pouco espaço e utiliza poucos indivíduos, além de realçar as respostas mais sutis do estresse como mais comumente se apresenta na vida cotidiana e, portanto, mais próximo às situações humanas que trazem sofrimento e doenças. Como sugestão para pesquisas posteriores, acrescentamos que a variável espaço talvez possa influir no repertório de comportamentos possíveis em situações de grave confronto, pois na gaiola padrão utilizada em nosso biotério, a fuga é impossível, favorecendo a ocorrência de comportamentos de imobilidade. Gostaríamos também de aqui consignar que foi muito proveitoso que os dados tenham trazido à tona a participação da serotonina nos processos de estresse, que geralmente não ganham muito relevo em relação a outros sistemas, como nos acentuam Paré e Glavin (apud HAAERN, 1993).

Ainda sobre os dados obtidos, podemos refletir que toda teoria está baseada em concepções, na prática, algo próximo a axiomas informais, que determinam – sem se explicitarem – a maneira como vemos os fatos ou orientamos nossas teorias. Atentar às teorias à luz dos fatos nos traz confirmações ou contradições dessas teorias, pela maneira como se relacionam. Atentar às concepções nos faz refletir sobre a maneira como estruturamos o campo onde os eventos estudados ocorrem. Pensamos ser este um momento muito necessário e produtivo, tanto quanto discutir os próprios resultados, pois, não atentar às concepções com que trabalhamos é como trabalhar sem nunca olhar para as ferramentas ou sem parar para imaginar como elas produzem o fruto de nosso trabalho. Assim fazendo, podemos realizar trabalhos excelentes, mas nossa capacidade de progresso ficará bastante limitada, pois um dia encontraremos seu limite. Não há dúvida de que algum ancestral nosso parou de olhar para a caça que cortava com seu machado de pedra e olhou para o próprio machado. Esse dia foi, com certeza, início de uma grande revolução. E de lá para cá, não vemos por que não cultivarmos esse hábito tão benéfico e produtivo. Ou seja, os

dados devem propiciar não só discussões acerca da maneira como se relacionam, mas a maneira ou as regras de como relacioná-los devem também produzir reflexões.

Nesse sentido, um pensamento foi constante durante todo o experimento: sempre procuramos diferenças entre os dados do grupo experimental e os do grupo controle. Assim agimos por motivos sobejamente conhecidos, sendo esta a essência do método experimental. Mas, assim, fazendo, passamos por cima das variações individuais. E, variações individuais carregam uma lógica interna, às vezes mais reveladora da trama funcional do que o dado coletivo. Ao transformar as taxas de corticosterona numa média, podemos não atentar ao fato de que ela é uma função, por exemplo, do nível de atividade neural dos indivíduos (entre outros, dos sistemas 5HT e NOR) e que tenha variado em função de aspectos dos próprios indivíduos, sua de história e do como foram recebidos pelos membros da colônia experimental. Em alguns momentos, essa lógica do sistema como um todo pode ser muito mais instrutiva sobre o arranjo funcional do organismo do que a tendência do grupo. Pensando somente em termos de grupos, tendemos a construir uma “Gaia Ciência do Grande Rato”: um corpo de dados que dá vida e materialidade a uma entidade matemático-conceitual, como se a espécie fosse o que realmente existisse e somente nela procurássemos o conhecimento. Não há dúvida sobre a fecundidade e os serviços que essa concepção – comparar grupos e não entender indivíduos – tem trazido; mas é preciso ter sempre em mente sua natureza: a de que se trata o grupo, de certa maneira, como uma entidade. É preciso, de vez em quando, olhar para o machado de pedra.

Já Aristóteles nos instruía sobre a natureza da definição: definir é uma operação intelectual sobre o mundo concreto que envolve duas regras: ao se definir, se expressa algo acerca do definido que deve incluir todo o definido e somente o definido. (LYARD, 1979). Ao fazer isso, isolamos do indivíduo certas características, abstraindo-as do restante de sua existência concreta, conforme aspectos pré-definidos e damos a este conjunto um nome,

um termo, que passará a definir essa classe de objetos. Por exemplo: “rato”. A idéia de “rato” é composta de uma lista de características que são encontradas em todos os indivíduos de certo tipo e somente nesses. Ou seja, os animais que têm essas características serão considerados “ratos” e os que não as possuem, serão colocados fora dessa classe. Mas, não podemos nos esquecer que o que realmente existe é o indivíduo, não a espécie. A espécie será sempre uma abstração, pois ao construir um conceito isolamos uma série de atributos que não existem isoladamente. Um exemplo disso é a própria noção de “cor”. Não existe “cor” que não seja “cor” de alguma coisa na prática. Deste modo, falar sobre as propriedades do “vermelho”, por exemplo, é uma fala venturosa, pois, a rigor, “vermelho” não existe. Assim trabalhar e construir dados sobre abstrações são muito úteis e assim o tem demonstrado a história, mas não nos devemos esquecer de seu status lógico: existem indivíduos, seres concretos, com funcionamentos específicos, vivendo situações específicas em contextos específicos.

Uma ilustração muito interessante desse ponto é o que nos diz LeDeoux (2001) sobre a emoção:

Cada sistema desenvolveu-se para solucionar os diferentes problemas com que os animais defrontam-se. Da mesma maneira, as diversas formas de emoção são mediadas por sistemas neurais distintos, cuja evolução obedeceu a diferentes razões. O sistema de que fazemos uso para nos defendermos do perigo é diferente daquele que está em jogo na procriação, e os sentimentos resultantes da ativação desses sistemas – o medo e o prazer sexual – não tem uma origem comum. Não existe a faculdade da ‘emoção’, e tampouco existe um único sistema cerebral encarregado dessa função fantasma. Se quisermos entender os vários fenômenos aos quais atribuímos a palavra ‘emoção’ teremos de aprofundar as classes específicas de emoção. Não devemos misturar descobertas referentes a emoções distintas, sem tomarmos em conta a emoção que produziu tais descobertas. Infelizmente, é exatamente isso que a grande maioria dos estudos em Psicologia e Ciência tem feito.

Ou seja, ao abstrairmos certas propriedades daquilo que chamamos “emoção” criamos uma categoria lógica respectiva para tal entidade e tendemos a “materializá-la”, procurando um sistema responsável pelas “emoções”, como se a abstração fosse realidade. É algo como “se todo humano tem mãe, então, quem é a mãe da humanidade?”

Por essas razões, enfatizamos que a resposta diferenciada faz todo o sentido no presente trabalho, uma vez que a preparação fisiológica decorrente do desafio que se põe diante do sujeito experimental depende de vários fatores: receptividade dos indivíduos na colônia, histórico individual e influências genéticas ou congênitas. É preciso ter em mente, neste ponto, que a possibilidade de uma ampla gama de variações individuais nas respostas torna o organismo muito mais eficiente para enfrentar um ambiente também cambiante e que essa propriedade é evolutivamente muito importante. Os animais de respostas fixas são em geral animais de prole fácil e numerosa, já os animais de custo de tempo e energético maiores possuem aparelhos capazes de gerar respostas variáveis, aparentemente com o fito de preservar esse investimento (LURIA, 1979). Estas variações são importantes para se entender a variação individual e constituem a concretude situacional do indivíduo, o parâmetro realmente funcional para compreensão da resposta que ele apresenta. Em nosso experimento, isso se traduz no fato de não ser o estresse social que usamos um estímulo estressor intenso como choques nas patas ou contensão, de modo que, não tivemos uma reação explosiva, com índices altamente diferenciados e homogêneos entre os grupos. Um estímulo sutil, uma resposta sutil, variações mais visíveis, individualmente, dependentes de histórico e outros fatores. Em resumo, podemos dizer que a situação limite testa o organismo filogeneticamente, mas situações mais sutis põem relevo nos mecanismos ontogênicos (que repousam sobre os primeiros, obviamente). Estímulos sutis e mais cotidianos envolvem com mais vigor a resposta individual.

A abstração que denominamos acima de “classe” ou “categoria”, o conjunto de atributos isolados logicamente dos entes, encontra amparo matemático na noção de “média estatística”. E criamos um universo médio para uma abstração conceitual. É como se pegássemos uma foto de um por do sol e tirássemos a média das luminosidades e pintássemos uma página com a cor correspondente a esse valor, indicando essa como a cor

média da paisagem. Dessa forma, o que não estaria dentro da “média” seria descartado como sem significância. Ênfase veementemente: essa abordagem é, sempre foi e continuará a ser enormemente fecunda, mas não podemos esquecer, em nome de seus préstimos, de sua natureza abstrata e desconsiderarmos a existência individual e concreta do indivíduo, sua história e sua reação frente a um contexto e a riqueza de assim estudá-lo. O preço de ignorarmos esse fato básico será o de estacionarmos nossa compreensão dos organismos em generalidade, incapacitados de nos apercebermos da integração funcional entre as partes componentes do sistema, reagindo a um problema concreto, ocasião onde a variabilidade individual nos mostrará um novo tipo de abstração: a função, uma estrutura móvel, em seu balanço adaptativo. Além do que, como visto acima, corremos o risco de tomar o abstrato como real. Esses prejuízos não são só teóricos, mas também práticos, pois como nos aponta Sapolsky (1994), compreender os mecanismos que sustentam as variações individuais é de fundamental importância para providenciar ajuda efetiva para as pessoas mais susceptíveis aos efeitos deletérios do estresse.

Outro exemplo dos perigos de se lidar com médias é a “síndrome X” ou “síndrome metabólica”. Neste caso, o paciente pode não apresentar nenhum valor anormal, mas poderá haver algo errado nele. Como nos diz Sapolsky (2004):

A Medicina, normalmente, trabalha com categorias de diagnóstico: tem glicose acima do nível X, e isto é oficial, você tem hiperglicemia; tem pressão arterial acima de Z, você é hipertenso. Mas, e se seus níveis de glicose, pressão arterial colesterol HDL e assim por diante, estão todos nos limites normais, mas todos estão muito próximos do ponto onde você deve começar a se preocupar? Tecnicamente, não há nada errado, a não ser que obviamente essas coisas não estão certas.

Outro aspecto que consideramos importante de considerarmos em relação às nossas ferramentas intelectuais e que é uma idéia básica que sustenta nossa interpretação dos resultados é a seguinte: “um fato produz um efeito”. Em outras palavras: um fato é provado pela permanência do efeito. Há certa estaticidade neste pensamento que não se enquadra

com a principal característica dos seres vivos: movimento. A vida é um processo absolutamente dinâmico, onde não há uma linearidade de causa-efeito ou efeitos dependentes de dose (uma causa de valor 1 produzindo um efeito de valor 1, uma causa 2, efeito 2, causa 3, efeito 3... causa n, efeito n...). Uma certa substância em certa dose produz um efeito, em uma dosagem maior, pode não produzir um efeito maior, mas um efeito diferente. É preciso nos acostumar com isso. As moléculas, por outro lado, não só variam de efeito em quantidades diferentes, mas também em locais diferentes e agindo em receptores diferentes em sistemas diferentes de indivíduos diferentes. Os avanços da Neurobiologia nos últimos anos têm demonstrado isso amplamente. E isso tem tornado o raciocínio experimental muito mais complexo e delicado do que antes, nos felizes tempos de “uma molécula, um efeito, em relação linear de dose”.

A realidade é cambiante: um acontecimento produz uma reação que se modifica com o tempo, não permanecendo em cena até que o retratemos. No momento seguinte, já não mais estará lá. É como tentar pintar um por do sol, com modelo “vivo”: só um modelo contratado posa. Ou a diferença entre a fotografia e o filme: o momento x movimento. Assim, as taxas de corticosterona variam no decorrer de um período de tempo. Todas as moléculas liberadas têm curvas de concentração que contam sua história funcional, nem sempre coincidentes, pois o tempo de sua metabolização é variável conforme inúmeros fatores, para cada substância e para cada indivíduo.

Volto a dizer, essas não são críticas que invalidam o método quantitativo de comparar parâmetros de dois grupos (experimental e controle), pois seria absurdo não atender aos seus préstimos e tudo o que tem nos proporcionado. É até mesmo provável que, se aumentássemos em muito o “n” experimental, encontraríamos maiores diferenças significantes entre nossos grupos. Mas, penso, esse método de quantificação está para a pesquisa como a taxonomia para a ecologia. A pesquisa quantitativa monta uma imagem

de uma espécie, de certos padrões de reatividade, mas não nos diz muito sobre a operacionalidade concreta do indivíduo. É um passo necessário, mas não o único, é uma técnica extraordinária, mas não a única. E nem por útil, necessariamente, será inócua à nossa compreensão.

Acredito que estejamos adentrando agora em um terreno diferente: o que avalia as sutilezas do dia-a-dia, onde as situações não-extremas produzem variações de grande significado. Dito de outro modo, penso que estamos entrando no terreno das flutuações individuais. Penso que, em breve, precisaremos adequar nossos métodos de pesquisa para purificação e detecção dessas variações. Penso que é a esse caminho que precisamos estar atentos, onde ele surgir, pois ele será muito necessário em breve. A compreensão assim o exigirá, pois as reações aos estímulos extremos já estarão mapeadas suficientemente para que novas questões comecem a surgir. Assim também a prática vai solicitar da pesquisa, pois nos pedirá a intervenção em fenômenos mais sutis do dia-a-dia e dele mais próximos.

Como nos observa Sapolsky sobre a questão do aumento da resposta imune que o estresse inicialmente tem, mas que não foi considerado nem constatado nos inícios da pesquisa sobre o estresse (SAPOLSKY, 2004):

Comece marretando uma manipulação experimental. Se nada acontece, escolha outro campo de estudo. Se alguma coisa acontece e isso é replicado tantas e suficientes vezes que você está confiante sobre isso, apenas então comece a pensar sobre elaborações mais sutis. Assim, nos anos iniciais, as pessoas apenas estudavam aqueles tipos de estressores ou padrões de exposição a glicocorticóides que levariam à fase tardia de imunossupressão, e somente mais tarde se aproximaram das sutis circunstâncias que revelaram a fase de imunoestimulação.

O fato de serem os processos vitais dinâmicos e não estáticos também demanda cuidados metodológicos e novas metodologias. Os processos estão acontecendo e não simplesmente “acontecem” e só aparecemos lá para registrar o que houve. Este estado, resultado de um certo acontecimento não fica lá, à espera de nossos aparelhos e registro. Isso pode nos levar a entendimentos absolutamente inadequados em relação aos dados,

como, por exemplo, em relação aos efeitos da confrontação social sobre o comportamento, os glicocorticóides e o sobre o sistema imune inato.

A questão de que uma determinada molécula tenha efeitos variados em diferentes locais também começa a demandar métodos de pesquisa mais elaborados, como no caso da 5HT, com suas múltiplas vias e diversos receptores.

Assim é que, a Ciência poderá se revelar eterna, mas seus produtos sempre cambiantes. E o pesquisador deve ter sempre e apenas uma certeza perene: ser humilde para conviver com a certeza de que, no fundo e ao final, está, na melhor das hipóteses, certo temporariamente e, a longo prazo, seu trabalho será sempre um equívoco da boa vontade.

Aparte todas essas reflexões, podemos dizer que a situação de intruso em um grupo já formado pelo período de uma hora, provou ser um efetivo estressor social, levando os sujeitos experimentais a uma ativação significativa do eixo HPA, e a um aumento da atividade dos sistemas serotoninérgicos, compatível com um estado de cautela e expectativa, inibindo comportamentos ansiosos, tendenciando os animais a manifestarem comportamentos exploratórios mais acentuados nos LCE e CA e ocasionando uma discreta melhora da resposta imune dos neutrófilos.

8 CONCLUSÕES

Analisando através de metodologias específicas os parâmetros comportamentais, bioquímicos e de imunidade inata, encontramos nos ratos expostos à condição de rato intruso por uma hora, o seguinte:

- a) no CA e especialmente no LCE os animais intrusos se apresentaram mais ativos e aparentemente menos ansiosos do que os animais do grupo controle para a diversos parâmetros comportamentais analisados.
- b) na dosagem de corticosterona sérica os animais intrusos apresentaram valores significativamente mais elevados que os do grupo controle.
- c) nas dosagens neuroquímicas não foi verificada diferença significativa para os valores de NOR, tanto no córtex frontal como no hipotálamo, porém nas duas estruturas verificou-se que os sistemas serotoninérgicos estavam mais ativados nos animais intrusos que nos controles.
- d) na citometria de fluxo, os resultados nos indicaram valores de burst oxidativo basal iguais nos dois grupos, com o *burst* oxidativo induzido por SAPI significativamente aumentado nos animais intrusos em relação aos valores do grupo controle. A porcentagem e a intensidade de fagocitose, no entanto, foram equivalentes em ambos os grupos, assim como o *burst* oxidativo induzido por PMA.

e) relacionando-se esses dados, notamos consistência entre eles, uma vez que se tenha em mente a função do de estresse, qual seja, preparar o organismo para o desafio que se apresenta: um eixo HPA mais ativado, com conseqüências favoráveis para uma ação rápida; uma resposta imune inata aparentemente mais efetiva e uma neuroquímica denotando um refreamento de comportamentos impulsivos, permitindo escolhas comportamentais mais adequadas. Nesse sentido, essas reações tornariam os organismos mais ativos e eficazes, num claro exemplo do aspecto positivo do estresse. Encontrou-se, porém, na análise dos resultados, grandes diferenças individuais o que reforça a necessidade sempre presente de se interpretar com muito cuidado os resultados de análise estatísticas referentes aos efeitos de estímulos estressores mais sutis, que dependem de variáveis internas, onde essas diferenças despontam com maior clareza.

Em seu conjunto, os resultados obtidos permitem concluir que o estresse social, produzido pela condição de intruso por uma hora, torna os ratos discretamente menos ansiosos, comportamentalmente, ativa o eixo HPA, assim como o sistema serotoninérgico dos mesmos, promovendo um ligeiro aumento da eficiência da resposta dos neutrófilos sangüíneos, com a forte indicação de que a magnitude e a configuração dessa resposta depende muito do individuo e da maneira como esse foi recebido pelo grupo social no qual foi colocado.

REFERÊNCIAS

- ADER, R. Letter to the editor: behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosomatic Medicine*. 1974, v. 36, p. 183-184.
- ADER, R. (ed.) *Psychoneuroimmunology*. 4th ed. London: Elsevier Academic Press, 2006.
- ALVES, Glauçie J.; VISMARI, L.; FLÓRIO, Jorge C.; PALERMO-NETO, João. Cohabitation with a sick cage mate: effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. *Neuroscience Research*, 2006, 56, p. 172-179.
- ALVES, Glauçie J.; PALERMO-NETO, João. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 2007. ISSN 1516-4446. In press. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbp/nahead/2427.pdf>>
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.* 1973, 21, p. 205-235.
- ARISTÓTELES. *Metafísica*. Madrid: Editorial Gredos S. A., 1982.
- ARISTÓTELES. *Organon*: categorias. Lisboa: Guimarães Ed. Ltda., 1985.
- BARTROP, R. et al. Depressed lymphocyte function after bereavement. *Lancet*. 1977, v. 1, n. 8016, p. 834-836.
- BASSO, Alexandre Salgado. *Envolvimento do sistema nervosa na alteração de preferência ao sabor induzida imunologicamente em camundongos*. 1999. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BASSO, Alexandre Salgado. *Percepção neural da alergia alimentar: envolvimento de mecanismos dependentes de IgE e das fibras nervosas do tipo C*. 2004, 151 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. *Neurociências*: desvendando o sistema nervoso. 2. ed. Porto Alegre: Artemed, 2002.
- BESEDOVSKY, H. et al. Changes in blood hormone levels during the immune response. *Porc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Novembro, 1975, 150(2), p. 466-70.
- BESEDOVSKY, Hugo Oscar; DEL REY, Adriana. Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews*, 1996, v. 17, n. 1, 1996.
- BIZZARRI, Mariano. *A Mente e o Câncer*. São Paulo, Summus Editorial, 2001.

BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol. Rev.* 1989, v. 69, n. 1, p. 1-32.

BLANCHARD, RJ, Flannelly, KJ, BLANCHARD, DC. Defensive reactions of laboratory rats and wild *Rattus norvegicus*. *J. Comp. Physiol Psychol.* 1986, 100, p. 100-7.

BLANCHARD, Robert J.; BLANCHARD, D. Caroline; McKITTRICK, Christina R. Animal Models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior.* 2001, 73, p. 261-271.

BLANCHARD, Robert J.; BLANCHARD, D. Caroline. What can animal aggression research tell us about human aggression? *Hormones and Behavior*, 2003, 44, p. 171-177.

BOWLBY, John. *Apego e Perda*. São Paulo, Livraria Martins Fontes Editora, 1984.

BUCKINGHAM, J. C.; GILLES, G. E.; COWELL, AM. (ed.). *Stress, Stress Hormones and the Immune System*. West Sussex, John Wiley & Sons Ltd, 1997.

BUSS, David M. *A Paixão Perigosa*: porque o ciúme é tão necessário quanto o amor e o sexo. 2. ed. Rio de Janeiro; Editora Objetiva Ltda., 2000.

CARRASCO, Gonzalo A. & Van de KAR, Louis D.. Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology.* 2003, p. 235– 272.

CLOW, Ângela. Cortisol as a biomarker of stress. *Journal of Holist Health Care.* November, 2004, vol. 1, p. 10-14 .

COHN, Daniel Wagner Hamada. *Efeitos da administração de lipopolissacarídeo (LPS) de Escherichia coli sobre o comportamento de camundongos dominantes e submissos*: uma abordagem etofarmacológica ao estudo do comportamento doentio. 2003. 147 f. Dissertação (Mestrado em) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CREEL, Scott. Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology & Evolution.* September, 2001, vol.16, no.9 September, p. 491-497.

DAMÁSIO, Antonio R. *O Erro de Descartes*: emoção, razão e o cérebro humano. São Paulo: Companhia das Letras, 1996.

DARWIN, Charles. *A expressão das emoções nos homens e nos animais*. São Paulo, Companhia das Letras, 2000.

DAVIS, M. The role of the amígdala in fear and anxiety. *An. Rev. Nerusci.* 1992, 15, p. 353-75.

DAVIS, Morton. *Teoria dos jogos: uma introdução não técnica*. São Paulo, Ed. Cultrix, 1973.

DAWKINS, Richard. *The Selfish Gene*. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1990.

DESCARTES, Renne. *Discurso sobre o Método*. São Paulo: Ed. Hemus Ltda., 1978.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J. Immunology*. 1996, 156, p. 2608–2615.

DHABHAR, F. S. and McEwen, B. S. Acute Stress Enhances while Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity *in Vivo*: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behavior, And Immunity*. 1997, 11, p. 286–306.

DUNN, A. J. Interactions Between the nervous system and the immune system: implications for psychopharmacology. In: BLOOM, F. E.; KUFER, D. J. (ed.). *Psychopharmacology – the forth generation of progress*. 3. ed. New York, Raven Press, 1995. p. 719-731.

FEHER, E.; FISCHBACHER, U. The Nature of Human Altruism. *Nature*. October, 2003, vol. 425, p. 785-791.

FELICIO, L. F., FLORIO, J. C. ; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E. ; BRIDGES R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. *Brain Research Bulletin*. 1996, 40, 253-256.

FELTEN, D. L. et al. Noradrenergic and Peptidergic Innervations of Lymphoid Tissue. *J. Immunol*. 1985, vol. 135, n. 2. suppl., p. 755-765.

FELTEN, D. F.; JÓZEFOWICZ, R. F. *Atlas de Neurociência Humana de Netter*. Porto Alegre: Ed. Artmed Ltda., 2005.

FERNANDES DE MOLINA, A.; HUNSPERGER R. W.. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. *J. J. Physiol*. 1959; 145, p. 251-65.

FONSECA, Evelise de Souza Monteiro. *Efeitos de um Estresse Pré-Natal no Comportamento e na Atividade de Macrófagos Peritoneais de uma Prole de Camundongos Swiss Avaliada aos 30 e aos 60 Dias de Idade*. 2001. 132 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

FOOTE S. L.; ASTON-JONES, G.; BLOOM, F. E. Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal (norepinephrine/sleep/neurotransmitters/electrophysiology). *Neurobiology*. May, 1980, vol. 77, no. 5, p. 3033-3037.

FREUD, Sigmund. Psicologia de las masas y analisis del yo (1921). In _____ *Obras Completas*. 3. ed. Madrid: Editorial Biblioteca Nueva, 1973.

GAAB, J. et al.. Psychoneuroendocrine effects of cognitivebehavioral stress management in a naturalistic setting—a randomized controlled trial. *Psychoneuroendocrinology*. 2006, 31, p. 428–438.

GIANNETTI, Eduardo. *Felicidade: diálogos sobre o bem estar na civilização*. São Paulo: Companhia das Letras, 2003.

GOODALL, Jane. *Uma janela para a vida: 30 anos com os chimpanzés da Tanzânia*. Rio de Janeiro, Zahar Editores, 1991.

GOULDING, N. J. et al. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. *Inflamm. Res.* October, 1998, vol. 47, p. 158–165.

GRAEFF, F. G. *Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação*. São Paulo: Ed. Pedagógica, 1989.

_____. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Rev Bras Psiquiatr* 2003, 25 (Supl II), p. 42-5.

GRAEFF, FG; HETEM, LA. *Transtornos de Ansiedade*. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

GRAEFF, F. G.; DEAKIN, J. F. W. 5-HT and mechanisms of defense. *J. Psychopharmacol.* 1991, 5, 305-15.

GRAEFF, Frederico Guilherme; BRANDÃO, Marcus Lira. *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 5. ed. São Paulo: Lemos Editorial, 1999.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, H. *The neuropsychology of anxiety*. 2. ed. Ed. New York: Oxford University Press; 2003.

HAAREN, Frans van (ed.). *Methods in Behavioral Pharmacology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993.

HART, B. L. Biological basis or the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1988, v. 12, n. 2, p. 123-137.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J. Immunol Methods*. 1989, v. 117, p. 53-58.

HEIJNEN, C. J.; KEVELAARS, A.; BALLIEX, R. E. Corticotropin-Releasing Hormone and proopiomelanocortin-derived peptides in the modulation of immune function. In: ADER, R; FELTEN, D. L.; COHEN, H. (ed.) *Psychoneuroimmunology*. 2. ed. San Diego, Academic Press, 1991. p. 429-446.

HERMAN, J. P.; COLLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 1997, vol. 20, n. 2, p. 78-84.

HERON, Woodburn. A patologia do tédio. In: *Psicobiologia: as bases biológicas do comportamento*. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora, 1973. (textos da Scientific American).

HIPÓCRATES. *Aforismos*. São Paulo: Ed. Martin Claret, 2003.

JANET, Pierre. *Psicologia de los Sentimientos*. México: Fondo de Cultura Econômica, 1997.

JANEWAY, Charles; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHICK, M. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed Editora, 2002.

JOVANOVA-NESIC, K.; NIKOLIC, V.; JANKOVIC, B.D. *Locus cereuleus and immunity: supression of experimental allergic encephalomyelitis and hypersensitivity skin reactions in rats with lesioned locus ceruleus*, *Int. J. Neurosci.* February, 1993, 68, p. 289-94.

KANDEL, Eric. R. Biology and the Future of Psychoanalysis: a new intellectual framework for Psychiatry Revisited. *A. J. Psyquiatry*, April, 1999, 156, p. 505-524.
 KOHM, A. P.; SANDERS, V. M. Norepinephrine: a messenger from de brain to the immune system. *Trends: Immulogy Today*. 2000, Vol. 21, no. 11, p. 539-541.

KORT, W. J. The effect of chronic stress on the immune system. *Adv. Neuroimmunol.* 1994, 4, p. 1-11.

LAINING, Ronald. D. *Politics of Experience*. London, Penguin Books, 1967.

LEDOUX, Joseph. *O Cérebro Emocional: os misteriosos alicerces da vida emocional*. Rio de Janeiro: Ed. Objetiva, 2001.

LEWIN, Kurt. *Principles of topological psychology*. New York: McGraw-Hill, 1969.

LIARD, L. *Lógica*. 9. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1979.

LIPOWSKI, Z. J. What Does the Word “Psychosomatic” Really Mean? A Historical and Semantic Inquiry. *Psychosomatic Medicine*. Mach/April, 1984, vol. 46, no. 2, p. 153-171.

LORENZ, Konrad. *Os Fundamentos da Etologia*. São Paulo: Ed. da UNESP, 1995.

LURIA, A. R. *Curso de Psicologia Geral: vol 1 – introdução evolucionista à Psicologia*. São Paulo, Editora Civilização Brasileira, 1979.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol. Rev.* 1995, v. 75, n. 1, p. 77-106.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R.; FLESHNER, M.. Psychoneuroimmunology—The interface between behavior, brain, and immunity. *American Psychologist*. 1994, 49, p. 1004-1017.

MATALKA, Khalid Z. Neuroendocrine and cytokines-induced responses to minutes, hours, and days of mental stress. *Neuroendocrinology Letters*. October, 2003, no.5, vol.24, 283-92.

McEWEN, Bruce S and SAPOLSKY, Robert M. Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology* 1995, 5, p. 205-216.

McEWEN, B. S. et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews*. February, 1997. vol. 23, 79–133.

McNAUGHTON, Neil; GRAY, Jeffrey A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of Affective Disorders*. 2000, 61, p. 161–176.

MELLO Filho., Julio de (org.). *Psicossomática Hoje*. Porto Alegre, Artes Médicas, 1992.

MORGULIS, M. S.; STANKEVICIUS, D; ROCHA-SÁ, L. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: consequences on behavior and on ehrlich tumor growth. *Neuroimmunomodulation*, 2004, v. 11, n. 1, p. 49-57.

MOBERG, G. P. How Behavioral reproduction in stress disrupts the endocrine control of domestic animals. *J. of Dairy Science*. 1991, vol. 74. no. 1.

NULAND, Sherwin B. *A peste dos médicos: germes, febre pós-parto e a estranha história de Ignác Semmelweis*. São Paulo, Companhia Das Letras, 2005.

OMS – Organização Mundial da Saúde. *CID-10 – Classificação de Transtornos Mentais*. Porto Alegre, Editora Artmed, 1993.

OMS – Organização Mundial da Saúde. World Health Statistics. Disponível em: <http://www.who.int/whosis/whostat2007_10highlights.pdf>. Acesso em 10 out. 2007.

OTTA, E.; BUSSAB, V. S. R.; RIBEIRO, F. Nem Alfa, Nem Ômega, Anarquia na Savana. Texto de aula da disciplina PSE5778 “Comportamento Humano: origens evolutivas”, ministrada no Instituto de Psicologia, programa de Psicologia Experimental, da Universidade de São Paulo, em 2005.

PALAMARCHOUK, Vitaliy S.; ZHANG, Jian-Jun; ZHOU, Guiying; SWIERGIEL, Artur H.; DUNN, Adrian J. Hippocampal norepinephrine-like voltammetric responses following infusion of corticotropin-releasing factor into the locus coeruleus. *Brain Research Bulletin*, 2000, vol. 51, no. 4, p. 319–326.

PALERMO-NETO, J.: GUIMARÃES, R. K. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats. *Life Sciences*, December, 2000, 68, p. 611-623.

PALERMO-NETO, J. *Influência da D1.-dihidroxifenilalanina e da D.1.-Clorofenilalanina sobre o comportamento agressivo induzido em ratos pela Cannabis sativa L.* 1971. 105 f. Dissertação. (Mestre em Farmacologia) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C de O.; SOUZA, W. R. Effects of Physical and Psychological Stressors on Behavior, Macrophage Activity and Ehrlich Tumor Growth. *Brain Behav Immun.* 2003, Feb, 17 (1), p. 43-54.

PAVLOV, Ivan Petrovich. *Pavlov: obras escolhidas*. São Paulo, Ed. Hemus, 1970.

_____. *Conditioned Reflexes*. New York, Dover Publications, 2003.

PELLOW, Sharon; CHOPIN, Philippe; FILE, Sandra E.; BRILEY, Mike. Validation of open-closed-arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. August, 1985, vol. 14, p. 149 – 167.

PERON, José Eduardo. *Análise Etológica Quantitativa do Comportamento Social do Rato Albino (Ratus norvegicus), em Colônias Experimentais, com o uso do Paradigma Intruso-Residente*. 1989. 250 f. Tese (Doutorado em Psicologia) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PINTO, FREDERICO A. da COSTA. *Correlatos Neurais e Comportamentais da Asma Alérgica Experimental em Camundongos*. 2004. 133 f. Tese. (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

PLATÃO. *Diálogos*: Carmides. Belém: Universidade Federal do Pará, 1973.

PORTELA, Carlos de Paula. *Avaliação da Resposta Inflamatória Pulmonar em Ratos Submetidos a Estresse*. 2004. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

RIDLEY, Matt. *As Origens da Virtude: um estudo biológico da solidariedade*. São Paulo, Ed. Record Ltda., 2000.

REICHE, Edna Ma V.; NUNES, Sandra O.V.; MORIMOTO, Helena K. Stress, depression, the immune system and cancer. *The Lancet Oncology*, October, 2004, volume 5, issue 10, p. 617-625.

RODGERS, R. J. et al. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & Behavior*. 1999, 68, p. 47-53.

RODRIGUES, Avelino Luis; FRANÇA, Ana Cristina Limongi. *Stress e Trabalho*: guia básico com abordagem psicossomática. São Paulo: Editora Atlas S.A., 1997.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 6. ed. Barueri: Editorial Manole, 2003.

SAPOLSKY, Robert M.. Individual differences and the stress response. *The Neuroscience*. 1994, vol. 6, p. 262-269.

_____. Stress hormones: good and bad. *Neurobiology of Disease* 2000, 7, p. 540–542.

_____. *Why Zebras Don't Get Ulcers*. 3. ed. New York: Owl Books, 2004.

SELYE, Hans. A Syndrome produced by noxious agents. *Nature*. 1936, v. 32.

_____. *Stress: tensão da vida*. 2. ed. São Paulo: IBRASA, 1965.

_____. *Stress without distress*. New York: Nal Penguin Inc., 1974.

_____. History and present status of the stress concept. In: GOLDBERGER, Leo; BREZNITZ, Shlomo (ed.). *Handbook of Stress - Theoretical and Clinical Aspects*. New York, The Free Press, 1982. p. 7-17.

SENDO, F.; KATO, T.; YAZAWA, H.. Modulation of neutrophil apoptosis by psychological stress and glucocorticoid. *Int. J. Immunopharmac.*, 1997. vol. 19, no. 9/10, p. 511-516.

SEWARDS, T. V.; SEWARDS, M. A. Fear and power dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002, 26, p. 553-79.

SILVA, Fábio Ribeiro da. *Efeitos da Administração de Benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos: uma avaliação por citometria de fluxo*. 2003. 179 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

SLATER, P. J. B; HALLIDAY, T. R. Behavior and Evolution. Cambridge, University Press, 1994.

SLUZKI, Carlos E. (Ed.). *Interacción familiar: aportes fundamentales sobre teoría y técnica*. Buenos Aires, Editorial Tiempo Contemporáneo, 1971.

SMAGIN, G. N.; HEINRICHS, S. C.; DUNN, A. J. The role of CRH in behavioral responses to stress. *Peptides*. 2001, 22, p. 713–724.

SOUZA, Welker R. de. *Efeitos do Estresse sobre o Comportamento, a atividade de Macrófagos e o Desenvolvimento da Forma Ascítica do Tumor de Ehrlich*. 2001. 103 f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

STRAUB, RH; DHABHAR, FS.; BIJLSMA, JWJ; CUTOLO, M. How Psychological Stress Via Hormones and Nerve Fibers May Exacerbate Rheumatoid Arthritis (REVIEW). *ARTHRITIS & RHEUMATISM (American College of Rheumatology)*, January, 2005, vol. 52, no. 1, p. 16–26.

TEIXEIRA, João de Fernandes. *Mentes e Máquinas: uma introdução à Ciência cognitiva*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998.

TRIPICCHIO, Adalberto; TRIPICCHIO, Ana C. C. L. Teorias da Mente. Ribeirão Preto: Tecmed, 2004.

TURATO, E. R. *Tratado da metodologia da pesquisa clínico-qualitativa*. Rio de Janeiro: Ed.Vozes, 2003.

VLAJOKOVIC, S.; MILANOVIC, J. P.; CVIJANOVIC, V.; JANKOVIC, B. D. Behavioral and immunological events induced by electrical stimulation of the rat midbrain periaqueductal gray region. *Int. J. Neurosci.*, 1994, v. 77, n. 3-4 , p 287-302.

WILSON, D. S.; COLEMAN, K.; CLARK, A. B.; BIERDERMAN, L. Shy-Bold continuum in pumpkinseed sunfish (*Leponis biggus*): an ecological study of a psychological trait. *Journal of Comparative Psychology*, 1993, v. 107, n. 3, p. 250-260.

WATZLAWICK, Paul; BEAVIN, Janet Helmick; JACKSON, Don D. **Pragmatics of human communication: a Study of interactional patterns, pathologies, and paradoxes**. New York, W.W. Norton & Co, 1967.

WEISS, S. M.; WADSWORTH; G., FLETCHER, A; DOURISH, C. T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci and Biobehavioal Reviews*. 1998, 23, p. 265-271.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Descrição Sumária da Recepção dos Ratos Intrusos nas Colônias

- **Histórico do registro:** 36 ratos foram escolhidos ao acaso entre 54 para comporem 2 grupos: C (controle) e E (experimental), com 18 animais cada um. Os animais do grupo E (intrusos) foram colocados por uma hora em uma colônia experimental. Aqueles do grupo C permaneceram em suas gaiolas sendo apenas manipulados. Esse procedimento foi repetido a cada 15 minutos, intercalando-se um animal experimental com um animal controle. A recepção dos ratos intrusos pelos animais da colônia experimental (dominante, submisso e fêmea) foi filmado nos seus primeiros quinze minutos após a introdução daquele. A seguir pequeno relato sintético dos acontecimentos em cada colônia. O conjunto de letra e número (E01, por exemplo), em negrito, se refere ao número de ordem do animal experimental.

- Resumo dos primeiros 15 minutos da introdução do intruso em cada colônia:

E01: todos os animais se encontravam quietos e dormindo. Quando coloco o intruso na colônia, a presença deste é causa de grande agitação. É cercado e examinado por todos, olha para todos os lados acompanhando os movimentos dos seus pares. Aparentemente, se certificando da natureza dessa aproximação. Não só o intruso é alvo de atenção, mas sua presença parece despertar súbito interesse de uns pelos outros. A fêmea é muito ativa nessa parte da investigação, farejando muito o macho intruso. Aos poucos a calma retorna, uma calma relativa, uma vez que todos se movem pela gaiola, mas já não demonstrando tanto interesse uns pelos outros. Depois de alguns minutos o dominante começa a atacar o intruso. Não consigo discriminar se houve um estímulo (um comportamento do intruso) ou não, mas este – o intruso – fica em *freezing* no meio da gaiola, assim permanecendo um bom tempo, sendo que os outros ficam todos quase congelados também, olhando em

direção à interação do intruso com o dominante. O macho dominante começa a empurrar maravalha em um canto da gaiola. Depois de passado um tempo nessa atividade, começa a examinar o intruso, especialmente em sua região posterior (costas, genitais e abdômen). O intruso fica em *freezing* e depois, quando o dominante começa a montá-lo, reage, mas não partindo para um confronto direto, apenas tentando escapar. *Freezing* do intruso novamente. O dominante começa a morder e a puxar o submisso. Depois, reinicia-se o ciclo, intercalado com um período de desinteresse do dominante. Todos os outros assistem à estas cenas, também em *freezing*, olhando, de longe e do canto, em direção à interação entre o intruso e o dominante.

E02: quando o intruso ingressa na gaiola é objeto de grande interesse de todos, conforme descrito na colônia anterior. É literalmente seguido por todo onde quer que vá. Mas, não há sinal de confronto ou comportamento agonístico, os ratos apenas farejam muito ao intruso. Ele também não demonstra a rigidez típica do *freezing*, com essa investigação. Permite esse exame, nada fazendo para evitá-lo, sem interromper suas próprias investigações sobre o novo ambiente e seus habitantes. Há grande alternância de interesse. Ora um, ora outro é investigado pelos demais. Há algumas demonstrações de submissão, oferecendo o abdômen àquele que começa farejando esta região, forçando a elevação do examinado com o focinho. Mas, isso não parece causar tensão entre os animais, pois também se alternam nessa atividade, sem comportamentos de *freezing*. O macho dominante demonstra grande interesse pela fêmea, permanecendo boa parte do tempo a farejá-la. Ela tenta evita-lo algumas vezes, empurrando-o com as patas traseiras. O intruso parece ser menos evitado pela fêmea. Enfim, a impressão geral é de que foi uma interação social sem graves contendas ou confrontos: dir-se-ia “uma boa recepção”. Não houve nenhum comportamento declaradamente agressivo, seja demonstrativo ou de fato.

E03: Não houve registro. Defeito na câmera.

E04: tive problemas, a fita acabou logo no início da sessão, onde demonstravam uma atividade característica (uma certa atividade contrastante com o período de repouso, buscando farejar tanto uns aos outros, como ao ambiente, embora, nesse momento, não demonstrassem muito interesse pelo intruso). Depois de inserir novo tape e reiniciar a gravação, o período de entrada já havia se findado. Mesmo assim, o comportamento geral era de baixa atividade em relação às demais. Chegaram mesmo a se encolher em baixo da maravalha. O intruso parecia mais ativo em explorar o ambiente e os seus habitantes do que a recíproca.

E05: inicialmente estava predominando um padrão mais complacente com todos farejando todos, com alternância de pequenas concessões à exames recíprocos (farejamentos na região ano-genital), assim como interesse generalizado, tanto uns pelos outros, assim como pelo ambiente. Depois de algum tempo, o dominante começou a demonstrar muito interesse em farejar a região ano-genital do intruso. Este empurrou-o com as patas traseiras, ao que o dominante reagiu com um comportamento mais enfático e iniciaram uma luta, rolando agarrados pelo chão da gaiola, após o que, paravam, como que congelados um ao lado do outro. Depois disso, o macho dominante reiniciava a seqüência, com desfecho cada vez mais intenso, até que o intruso se recolheu a um canto da gaiola, junto aos outros que já apresentavam comportamento de *freezing*.

E06: no início não havia muito movimento dos ratos, em relação às outras colônias, com aquela equi-paridade de todos se alternando nos exames e farejamentos. O dominante parecia ou doente ou cansado ou, ainda, dormindo, enfim, não demonstrando interesse

algum. Neste momento, o interesse dos residentes pelo intruso diminuiu, aumento o deste por aqueles. Inclusive, este começou a examinar o dominante, que, aos poucos, com este estímulo, aparentemente, despertando e demonstrando comportamentos de exibição (empurrar com a perna, empurrar e apertar o intruso contra o canto, tentar farejar a região do baixo abdômen). O intruso evitava aos outros, empurrando e tentando distanciar-se, mas ainda assim tentando examinar o dominante, o que eliciava comportamentos de exibição mais fortes e intensos por parte deste. Isso foi num crescendo até que o intruso terminou no canto, em pé, permitindo que o dominante examinasse seu abdômen. Após, isso, de tempo em tempo o dominante ia lá e fazia novo exame no intruso, que manteve essa postura de submissão. Os demais residentes da gaiola permaneceram imóveis nos cantos da gaiola, não participando do conflito. Assim que sua dominância ficou clara, pelo comportamento do intruso, o dominante, com todos os residentes quietos em seus cantos, ficou andando vagarosamente pela gaiola, hora ou outra, examinando os outros animais.

E07: essa gaiola tinha uma população menos ativa, pois a chegada do intruso não provocou a onda de exames e nem a insistência deste em examinar seus novos pares. O resultado foi pouca estimulação de ambas as partes, tanto dos residentes para com o intruso, como vice-versa. Em breve, os animais estavam todos com os níveis de excitação baixos e após dos 15 minutos, recolheram-se, buscando, aparentemente, dormir. O intruso não apresentou comportamentos de exame insistente de sua parte para com os outros.

E08: como freqüente, todos os membros da colônia receberam o intruso com grande agitação, ficando muito ativos pela presença de um congênere e iniciando intensa interação e exame. Depois de algum tempo o dominante começou a intervir de maneira mais intensa na interação e a exhibir os comportamentos de antagonismo: morder a lateral,

tentar virar o intruso e costas, aproximar-se por trás, empurrar para o canto com o corpo e os membros inferiores. A tudo isso o submisso permitiu em *freezing*, já a fêmea circulou bastante durante os primeiros momentos dessa demonstração de posição e hierarquia a que estava sendo submetido o intruso. Depois, quando essas demonstrações começaram a ficar mais enérgicas, mesmo a fêmea colocou-se ao canto e aquietou-se também. Após isso, o intruso deu mostra de aceitação da dominância do macho mais velho e também recolheu-se ao canto sem demonstrar antagonismo.

E09: a sessão experimental iniciou-se com exames do intruso pelos residentes. Depois, todos começam a se examinar mutuamente. Tudo na gaiola ganha vívido interesse, não apenas o intruso. Logo após, os residentes colocam o intruso encostado em um canto e começam a examiná-lo detidamente, o que o mesmo permite passivo, em pé e paralisado. Depois começaram as mordidas do dominante no intruso. Começam os embates, o dominante atacando com energia e o intruso tentando afasta-lo. O dominante o perseguiu pela gaiola. Na seqüência, a fêmea é posta de costas pelo intruso, que exhibe ferimentos nas costas. O padrão se mantém com encontros regulares até o fim da sessão.

E10: todos os membros da colônia se interessam pelo intruso, que fica cercado pelos residentes. O intruso tenta afasta-los, como que para abrir espaço ou porque a situação começa a ficar mais tensa, pelo vigor e contundência dos residentes. Como sempre, depois de um tempo o interesse recai sobre o ambiente e todos se ocupam de explorar a gaiola. O intruso se aproxima da fêmea e a fica examinando e acaba por coloca-la de costas no chão. Ela o empurra com a pata. O submisso está ausente das atividades. O filme acabou antes do período experimental se completar, não havendo, portanto, registro do que se sucedeu a seguir.

E11: assim que colocado na colônia, todos os residentes voltam suas atenções para o intruso. Não houve comportamentos antagonísticos da parte dos residentes para com o intruso nesta gaiola, tendo-lhe sido permitido examinar a todos no mesmo grau em que era examinado. Apenas o dominante interpelava o intruso quando este começava a interagir com a fêmea, interpondo-se entre eles ou indo examinar o intruso ou a fêmea, interrompendo a atividade de exame do intruso na fêmea. Ao final do período, o dominante iniciou um exame enérgico no intruso (movimentos bruscos e fortes, sem permitir alternativa de nega-los ao intruso) que tentava afasta-lo. O dominante reagiu a isso com energia e, aferrando-se ao intruso e lutando agarrado a este pela gaiola, acabou por se impor e o intruso, demonstrou submissão recolhendo-se a um dos cantos da gaiola.

E12: Não houve registro por problemas com a câmera.

E13: assim que colocado na colônia, todas as atenções se voltam para o intruso, que faz os residentes despertarem e ativamente buscar o foco do novo interesse. Interessante que o submisso e a fêmea, quase não interagiram com o intruso, apenas o dominante. Mas, não houve propriamente uma disputa, embora o dominante tenha imposto seu exame no intruso, com comportamentos bruscos e fortes, dificultando que o intruso escolhesse outra conduta a não ser aceitar o exame do dominante, mas, não resultando disso nenhum confronto propriamente dito, apenas algum comportamento exibitório.

E14: essa colônia teve um padrão diferente. Todos foram examinar o intruso assim que introduzido. O dominante se aproximou de um modo mais direto que os demais membros da colônia, iniciando de modo abrupto seu exame. O intruso conseguiu afasta-lo. Aparentemente, isso resultou em certo equilíbrio, onde não houve demonstrações de

submissão de nenhuma das partes. Mas, o intruso pareceu acuado. Os outros membros da gaiola não ficaram congelados nos cantos, como nas demais gaiolas, apenas dirigindo seu olhar para a interação do dominante com o intruso. Notou-se eriçamento dos pelos do intruso. Ele fica em *freenzing* no meio dos residentes, que o examinam. Quando o deixam, após o exame, o intruso busca algum contato com os residentes, farejando-os, mas há reação de evitação do intruso pelos residentes. Não há movimentos lentos como nas outras gaiolas, tudo é feito por sobressaltos e movimentos rápidos. Não há a alternância observada nas outras gaiolas nos exames. O dominante segue o intruso por toda a gaiola e este nunca permite que ele se aproxime de sua lateral (pareceu que o dominante já o havia mordido, não pude confirmar). Eles se engalfinham, rolando pela gaiola. Tensão, movimentos rápidos, o dominante se impõe a todos. Mas, não aconteceu nenhuma interação agonística com ferimentos ou luta efetiva.

E15: passados alguns segundos da entrada do intruso, o dominante apresenta intenso comportamento agonístico, jogando o intruso no chão com as patas viradas para cima e examinando-o energicamente. Não parou de segui-lo em todo o período e voltando a este comportamento várias vezes, tentando morde-lo pelas laterais. A fêmea, mais ativa, explorava a gaiola, enquanto o macho submisso permanecia em sua posição, no canto da mesma. Depois de um período sem interações entre os indivíduos, o dominante atacou de novo a lateral do intruso que reagiu em postura de boxeio, sem se recolher ao canto. Não ficou uma situação clara, com o intruso não se pondo declaradamente na posição de submissão. O macho submisso residente ficou em *freezing* o tempo todo.

E16: quando o intruso foi introduzido, foi grande a excitação com todos os residentes se aproximando ao mesmo tempo e o intruso ao canto, sem comportamentos agonísticos, com

reconhecimentos recíprocos e alternados. O intruso ficou parado permitindo amplos exames pelos residentes. O dominante começou a impor-se sobre o submisso e a fêmea, que se afastaram e se recolheram ao canto. Aparentemente reagiam a algum sinal de tensão que não pude identificar: foi como se soubessem ou percebessem que o período de exploração tinha acabado e algo tenso estava principiando. Na medida em que o intruso não se mostrava opositor aos exames do dominante, este se tornou mais ativo e começou a morder a lateral do intruso e puxa-lo com os dentes. O intruso nada mais fazia do que retrair-se, sem demonstrar qualquer sinal de evitação deste ataque. O dominante continuou sua perseguição do intruso por toda a gaiola, empurrando-o com o corpo, mordendo, examinando o intruso forçadamente, virando-o de costas para o chão. Rolou com o intruso em luta. Após o que, o intruso apresentou comportamento de *freezing*. Nesse momento, todos estão congelados e o dominante começa a dispor comportamentos exibitórios. Todos congelados.

E17: grande mobilização nos membros da colônia, logo após a introdução do intruso. Principalmente o dominante e a fêmea assim agiram, sendo que a fêmea, em geral, é mais ativa do que o submisso da colônia no comportamento exploratório do novo elemento. O dominante não dispensou muita atenção ao intruso e este se aproximou da fêmea. Mas, foi o submisso da colônia que não permitiu a interação entre os dois (fêmea e intruso), intervindo com comportamentos exploratórios no intruso e efetiva intrusão entre os dois. Todos examinam todo o ambiente e reciprocamente. Neste momento, o dominante vira o intruso, colocando-o de costas no meio da gaiola. Aparentemente, foi uma reação do dominante a um excesso de interações do intruso, em algum ponto, tornou-se demasiado. Enquanto isso, o submisso e a fêmea ficam se examinando. O dominante mordeu o intruso,

ao que todos rolam com o intruso, que permaneceu em *freezing* no meio da gaiola, por longo período de tempo.

E18: Não houve registro por problemas com a câmera.

APÊNDICE B – Gráficos e Tabelas

Tabela 1 – Efeitos de um estresse por confrontação social na distância movida por ratos no Campo Aberto (somatória das três zonas: central, média e tigmotóxica), expresso em centímetros.

No. do rato	Distância Movida (em cm)	
	controle	experimental
1	1710,31	3119,02
2	3245,50	3175,47
3	3142,05	2235,32
4	2876,43	3977,16
5	3082,80	3386,53
6	3374,36	3095,73
7	2766,29	2128,00
8	3172,93	2869,32
9	3238,49	3043,00
10	2821,23	3064,15
11	2060,30	3020,95
12	2879,43	3121,06
13	2475,91	2080,67
14	1549,72	3031,74
15	3317,85	3020,02
16	3640,07	3605,77
17	3076,46	3177,98
18	3512,53	3984,64
	2885,70 ± 589,07	3063,14 ± 524,94
p		0,35

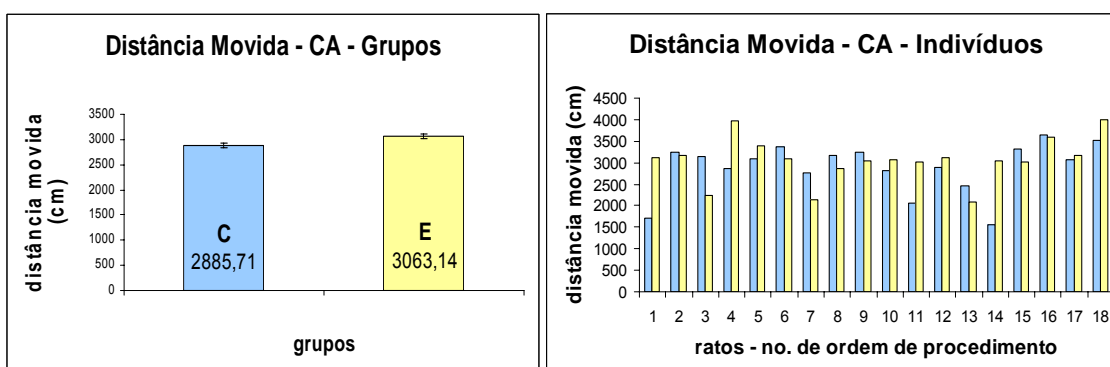


Figura 10 – Efeitos de um estresse por confrontação social na distância total movida (centímetros) por ratos no CA. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 2 – Efeitos de um estresse por confrontação social na velocidade dos ratos no Campo Aberto (somatória das três zonas: central, média e tigmotóxica), expresso em centímetros percorridos por segundo.

No. do rato	Velocidade (em cm/s)	
	controle	experimental
1	5,70	10,40
2	10,82	10,59
3	10,48	7,45
4	9,59	13,26
5	10,28	11,29
6	11,25	10,32
7	9,23	7,10
8	10,58	9,57
9	10,80	10,15
10	9,41	10,22
11	6,87	10,07
12	9,60	10,41
13	8,26	6,94
14	5,17	10,11
15	11,07	10,07
16	12,14	12,03
17	10,26	10,60
18	11,71	13,29
	9,62 ± 1,96	10,22 ± 1,75
p		0,35

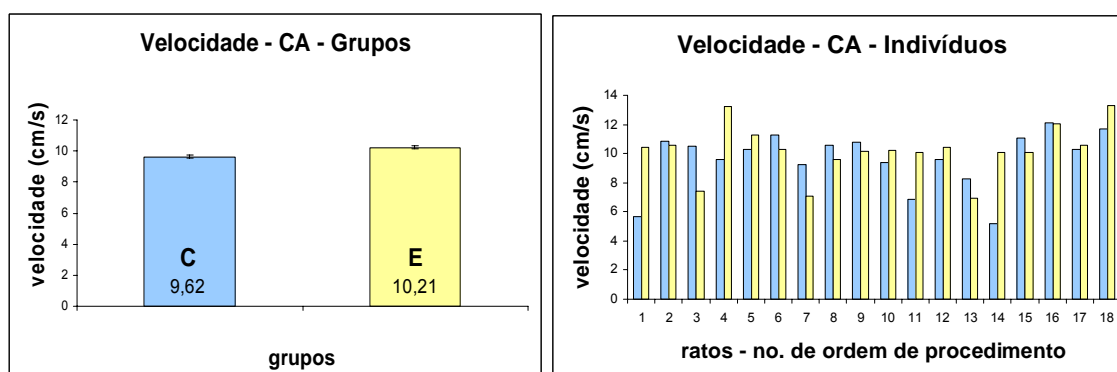


Figura 12 – Efeitos de um estresse por confrontação social na velocidade (centímetros por segundo) de ratos no CA. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 3 – Efeitos de um estresse por confrontação social no tempo de permanência (em segundos) na Zona Central do Campo Aberto.

No. do rato	Tempo de Permanência na Zona Central do CA (s)	
	controle	experimental
1	0,00	3,90
2	1,95	1,80
3	0,75	0,00
4	0,00	0,75
5	0,00	4,00
6	0,00	0,90
7	0,00	0,00
8	0,90	0,45
9	0,30	4,65
10	1,35	1,80
11	0,00	5,25
12	0,00	0,75
13	1,20	0,00
14	6,15	0,00
15	0,00	15,30
16	2,25	0,00
17	5,10	3,75
18	0,00	0,00
	1,11 ± 1,80	2,42 ± 3,70
p		0,28

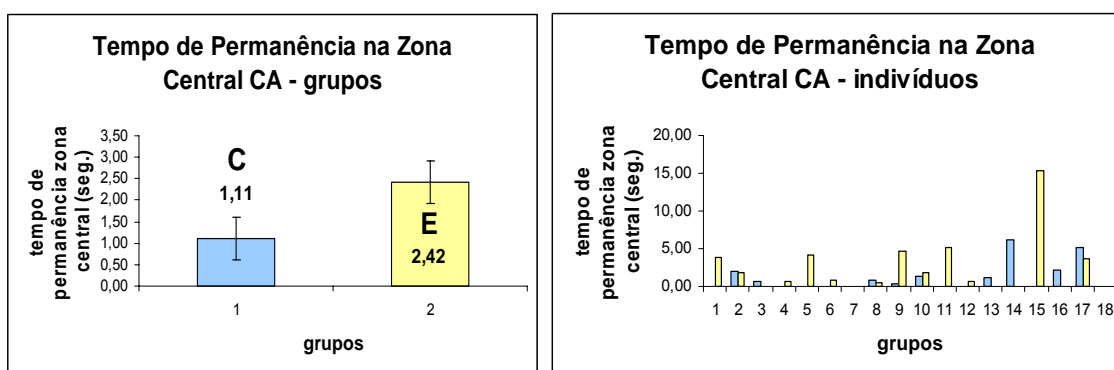


Figura 13 – efeitos de um estresse por confrontação social no tempo de permanência de ratos na zona central do CA. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 4 – Efeitos de um estresse por confrontação social no tempo de permanência na Zona Média do Campo Aberto.

No. do rato	Tempo de Permanência na Zona Média do CA (s)	
	controle	experimental
1	0,00	2,25
2	11,85	12,30
3	4,80	0,45
4	0,00	7,05
5	1,95	7,20
6	0,00	3,30
7	4,95	8,10
8	6,30	2,55
9	6,00	6,60
10	3,98	15,15
11	0,00	4,95
12	1,20	7,50
13	1,20	0,00
14	4,65	0,45
15	6,00	5,56
16	3,30	6,60
17	14,55	3,15
18	3,00	2,70
	4,10 ± 4,01	5,33 ± 4,03
p		0,36

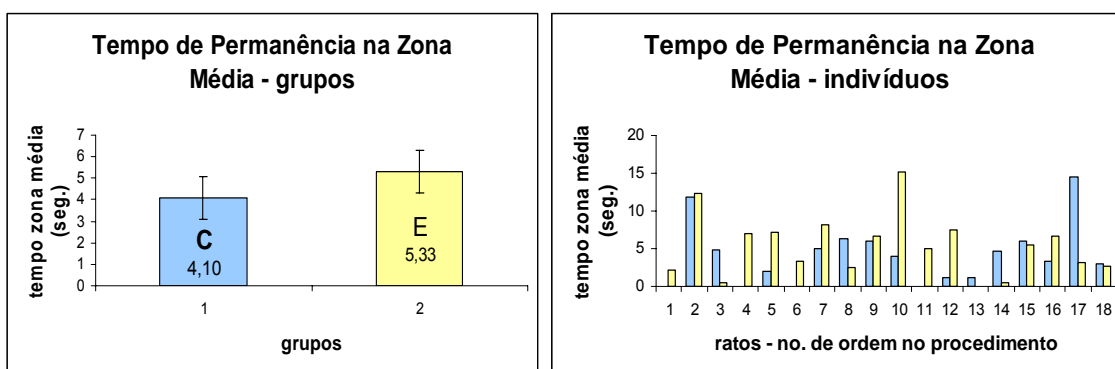


Figura 14 – efeitos de um estresse por confrontação social no tempo de permanência (em segundos) de ratos na zona média do CA. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 5 – Efeitos de um estresse por confrontação social no tempo de permanência na Zona de Tigmotaxia do Campo Aberto.

No. do rato	Tempo de Permanência na Zona de Tigmotaxia do CA (seg.)	
	controle	experimental
1	300,00	293,85
2	286,20	285,90
3	294,45	299,55
4	300,00	292,20
5	298,05	256,65
6	300,00	295,80
7	294,15	291,90
8	293,40	297,00
9	292,65	288,75
10	255,90	283,05
11	300,00	289,80
12	298,80	291,75
13	288,90	300,00
14	289,20	299,55
15	293,70	260,85
16	294,45	293,40
17	280,35	293,10
18	297,00	297,30
	292,07 ±10,50	289,47 ± 12,10
p		0,49

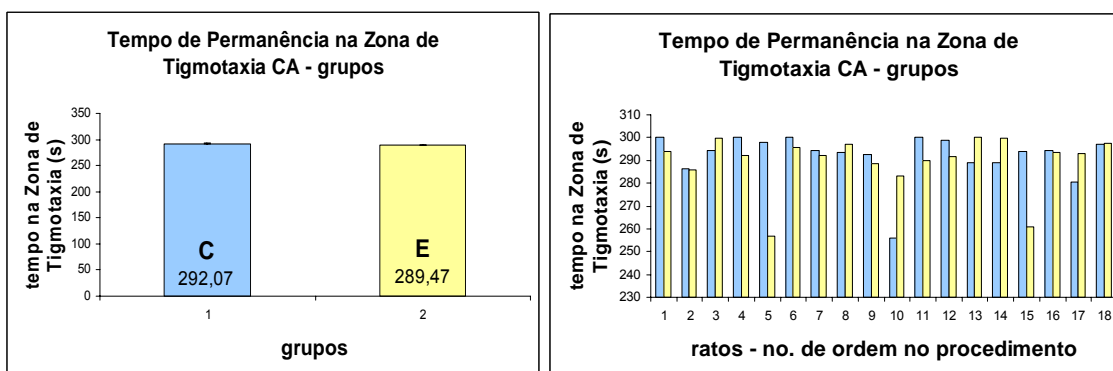


Figura 15 – Efeitos de um estresse por confrontação social no tempo de permanência (em segundos) de ratos na zona de tigmotaxia do CA. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 6 – Efeitos de um estresse por confrontação social na freqüência do levantar-se do CA (medido em unidades).

No. do rato	Freqüência do Levantar no CA (unid.)	
	controle	experimental
1	1	4
2	3	5
3	1	1
4	1	2
5	1	2
6	1	3
7	1	2
8	2	3
9	3	5
10	2	5
11	1	1
12	2	1
13	2	2
14	2	3
15	2	2
16	1	4
17	2	1
18	3	3
	1,72 ± 0,75	2,72 ± 1,40
p		0,03

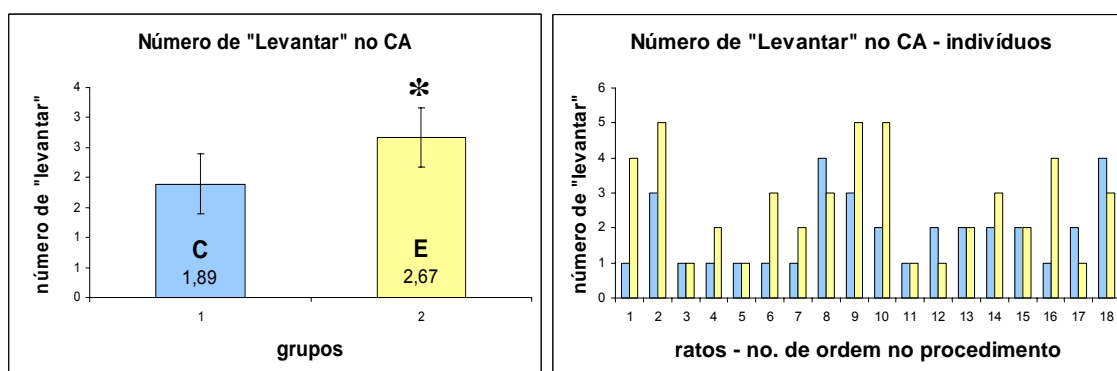


Figura 16 – Efeitos de um estresse por confrontação social na freqüência do levantar-se no CA, medido em unidades. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 7 – Efeitos de um estresse por confrontação social na taxa de permanência dos animais nos braços abertos do LCE.

No. do rato	Taxa de Permanência nos BAs do LCE (% do tempo)	
	controle	experimental
1	8,03%	19,71%
2	4,00%	1,91%
3	5,48%	8,30%
4	0,00%	7,26%
5	1,72%	0,00%
6	0,00%	0,20%
7	8,84%	9,46%
8	0,41%	0,00%
9	0,81%	8,80%
10	2,18%	13,04%
11	7,05%	6,36%
12	0,00%	11,74%
13	4,48%	2,71%
14	0,00%	14,38%
15	9,29%	0,10%
16	0,65%	30,18%
17	16,22%	10,91%
18	3,05%	28,01%
	4,01% ± 4,45	9,62% ± 9,05
p		0.048

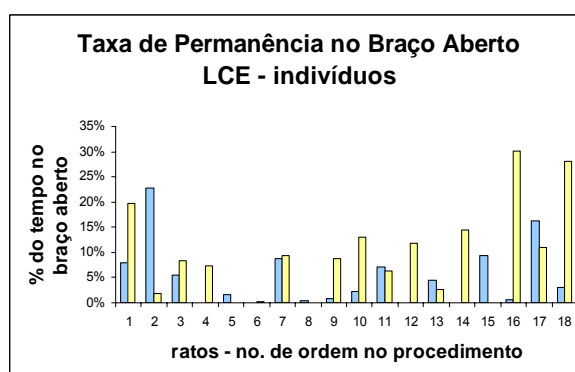
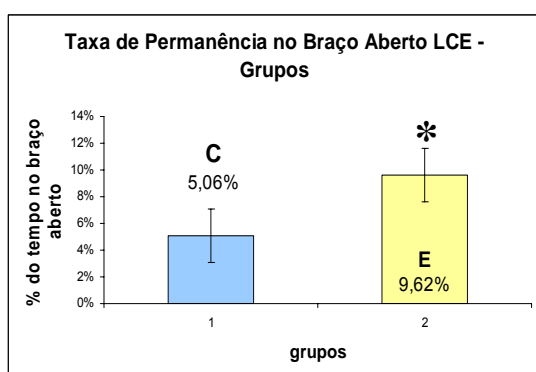


Figura 17 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre a taxa de permanência (% do tempo) no BA do LCE. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 8 – Efeitos de um estresse por confrontação social na taxa (%) do número de entrada dos animais nos braços abertos do LCE.

No. do rato	Taxa de Entrada nos BAs do LCE (% de entrada)	
	controle	experimental
1	46,15%	63,64%
2	56,25%	50,00%
3	33,33%	38,46%
4	0,00%	31,25%
5	30,00%	0,00%
6	0,00%	4,76%
7	30,00%	45,45%
8	28,57%	0,00%
9	11,11%	41,67%
10	55,56%	26,47%
11	27,27%	40,00%
12	0,00%	7,69%
13	28,57%	41,67%
14	0,00%	64,71%
15	47,37%	6,90%
16	16,67%	61,90%
17	33,33%	42,86%
18	75,00%	28,57%
	28,84% ± 21,79	33,11% ± 21,57
p		0,56

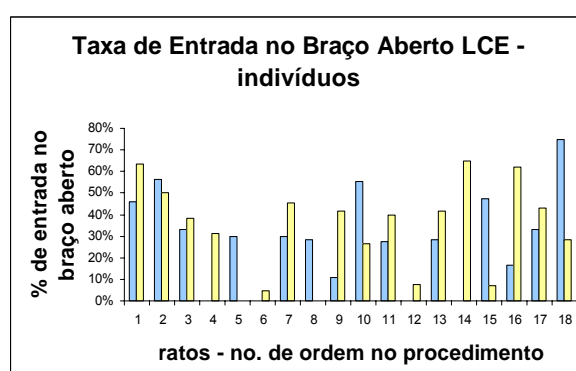
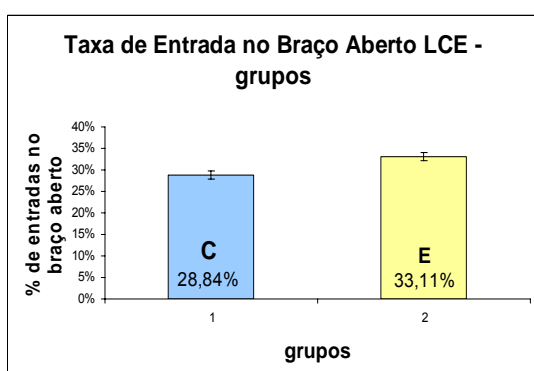


Figura 18 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre a taxa de entrada no BA do LCE. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 9 – Efeitos de um estresse por confrontação social na taxa (%) de tempo de permanência dos animais nos braços fechados do LCE.

No. do rato	Taxa de Permanência nos BFs do LCE (% de tempo)	
	controle	experimental
1	92%	80%
2	95%	98%
3	95%	92%
4	100%	93%
5	98%	100%
6	100%	100%
7	91%	91%
8	100%	100%
9	99%	91%
10	98%	87%
11	93%	94%
12	100%	88%
13	96%	97%
14	100%	86%
15	91%	100%
16	99%	70%
17	84%	89%
18	97%	72%
	96% ± 4,39%	90% ± 9%
p		0,02

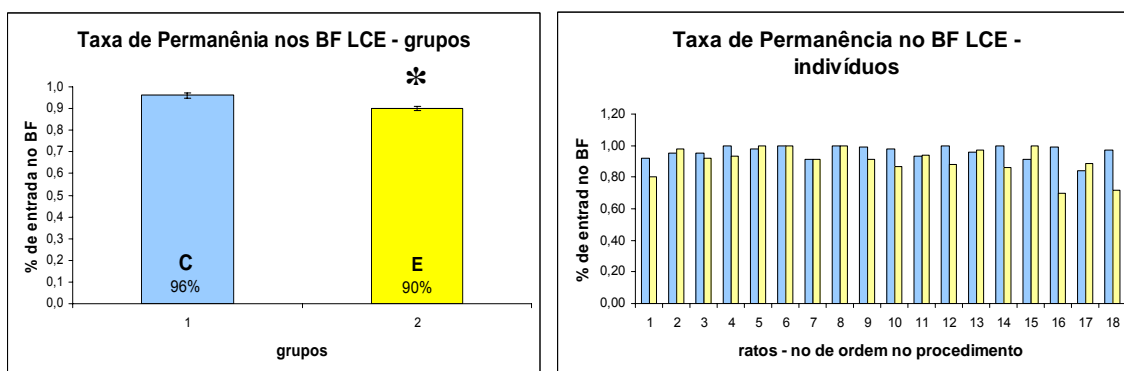


Figura 19 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre a taxa de permanência nos braços fechados do LCE. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

No. do rato	Taxa de Entrada nos BFs do LCE (% de entradas)	
	controle	experimental
1	53,85%	36,36%
2	43,75%	50,00%
3	66,67%	37,50%
4	100,00%	68,75%
5	70,00%	100,00%
6	100,00%	80,00%
7	70,00%	54,55%
8	71,43%	100,00%
9	88,89%	50,00%
10	44,44%	73,53%
11	72,73%	60,00%
12	100,00%	40,00%
13	71,43%	58,33%
14	100,00%	35,29%
15	52,63%	75,00%
16	83,33%	38,10%
17	66,67%	57,14%
18	25,00%	57,89%
	72,88% ± 18,95%	59,61% ± 20,26%
p		0,0496

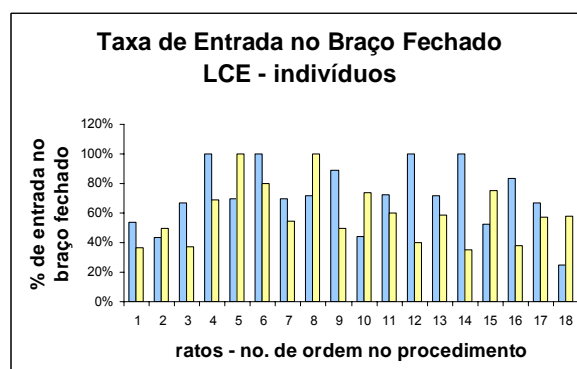
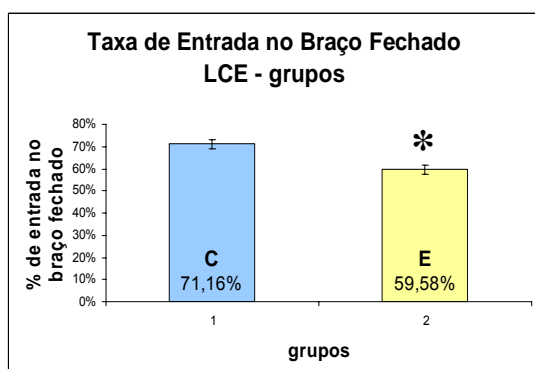


Figura 20 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre a taxa de entrada nos abraços fechados do LCE. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 11 – Efeitos de um estresse por confrontação social na taxa de permanência de ratos na metade externa dos braços fechados do LCE, teste “t” de Student com correção de Welsh.

No. do rato	Taxa de Permanência na Metade Externa dos BAs do LCE (% do tempo)	
	controle	experimental
1	0,00%	7,62%
2	13,92%	0,00%
3	2,17%	0,00%
4	0,00%	0,00%
5	0,00%	0,00%
6	0,00%	0,00%
7	0,56%	0,64%
8	0,00%	0,00%
9	0,00%	2,34%
10	0,00%	0,00%
11	2,00%	0,00%
12	0,00%	5,23%
13	0,00%	0,00%
14	0,00%	6,87%
15	0,00%	0,00%
16	0,00%	12,36%
17	9,10%	3,90%
18	0,00%	11,11%
	1,54% ± 3,78%	2,78% ± 4,13%
p		0,36

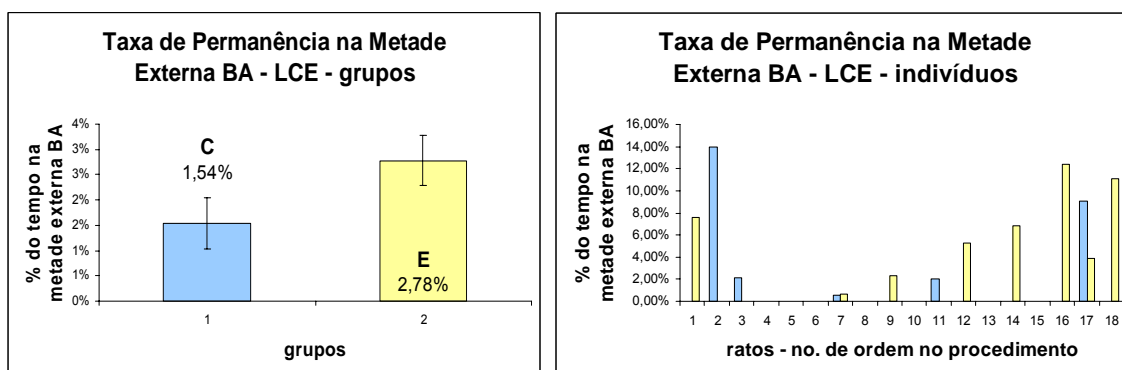


Figura 21 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre a taxa de permanência na metade externa dos braços abertos do LCE. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 12 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis séricos de corticosterona de ratos.

No. do rato	Níveis séricos de corticosterona (ng/ml)	
	controle	experimental
1	447,74	371,37
2	399,11	515,06
3	480,55	604,07
4	405,44	554,92
5	480,00	547,18
6	469,23	507,25
7	493,42	428,93
8	436,10	436,10
9	512,64	522,59
10	339,17	547,85
11	383,98	450,49
12	450,09	551,03
13	388,20	488,32
14	477,46	481,19
15	383,91	539,26
16	591,82	492,93
17	407,89	472,19
18	540,99	559,38
	449,32 ± 63,49	503,90 ± 55,77
p		0,01

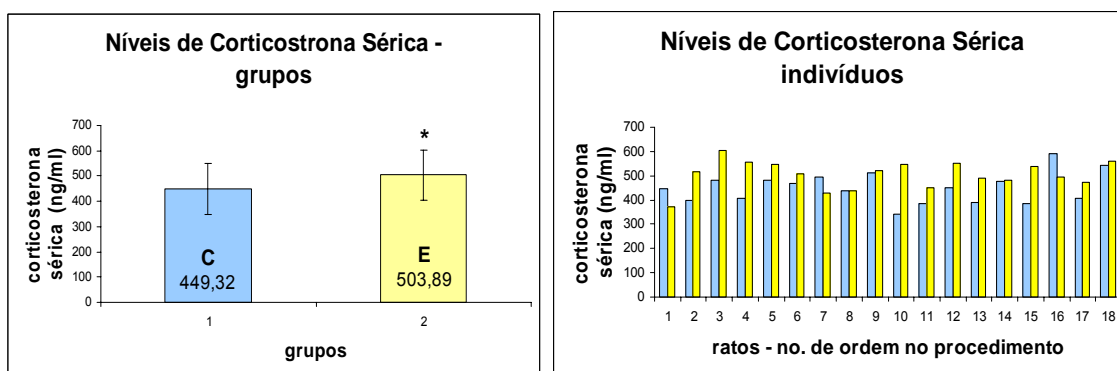


Figura 22 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis séricos de corticosterona de ratos. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna. (* = $p \leq 0,05$).

Tabela 13 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o *burst* oxidativo basal de neutrófilos de ratos.

No. do rato	<i>Burst</i> Oxidativo Basal induzido por DCFH (intensidade de fluorescência)	
	controle	experimental
1	22,08	13,48
2	29,06	14,7
3	24,1	21,45
4	17,92	27,85
5	20,18	21,71
6	23	10,86
7	39,35	23,73
8	32,91	36,63
9	14,24	19,35
10	13,79	22,44
11	19,7	24,88
12	19,2	27,77
13	18,43	15,26
14	15,47	18,67
15	14,07	12,87
16	16,4	15,57
17	ND	ND
18	9,31	13,48
	20,54 ± 7,54	20,04 ± 6,80
p		0,84

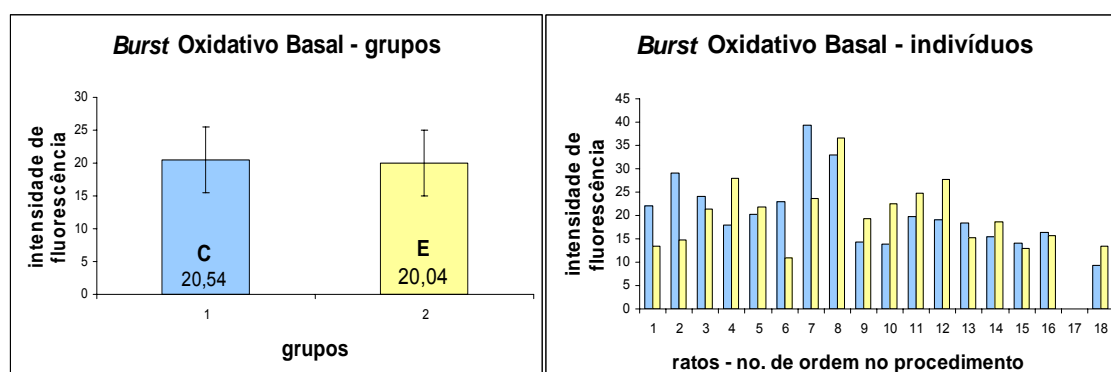


Figura 23 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o *burst* oxidativo basal de neutrófilos de ratos. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 14 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o *burst* oxidativo induzido (*in vitro*) por *S. aureus* em neutrófilos de ratos.

No. do rato	<i>Burst</i> Oxidativo induzido por <i>S. aureus</i> (intensidade de fluorescência)	
	controle	experimental
1	34,33	39,46
2	22,16	109,68
3	67,26	105,5
4	ND	162,24
5	53,48	75,8
6	79,41	42,85
7	85,13	112,34
8	78,31	96,29
9	89,27	179,89
10	121,81	59,86
11	ND	166,98
12	37,79	78,32
13	90,83	72,47
14	49,26	235,4
15	64,99	140,09
16	96,56	161,34
17	ND	28,15
18	80,39	34,03
	70,06 ± 26,76	105,59 ± 58,43
p		0,03

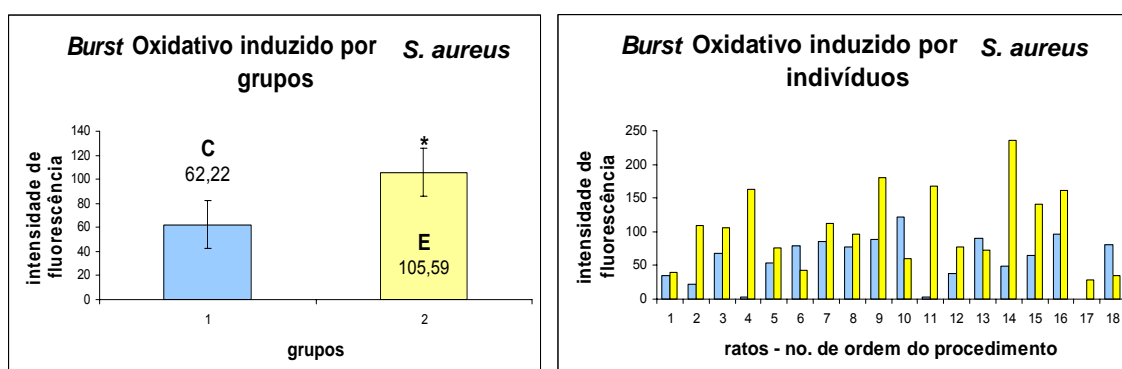


Figura 24 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o *burst* oxidativo induzido (*in vitro*) por *S. aureus* em neutrófilos de ratos. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna. (* = $p \leq 0,05$).

Tabela 15 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre a porcentagem de fagocitose de neutrófilos de ratos.

No. do rato	Porcentagem de fagocitose de <i>S. aureus</i>	
	controle	experimental
1	20,92	38,70
2	20,50	19,77
3	17,80	13,28
4	18,60	18,26
5	18,70	19,91
6	22,86	18,78
7	14,34	14,11
8	14,32	15,31
9	16,38	12,82
10	17,34	17,61
11	16,33	13,64
12	14,02	14,01
13	16,67	16,33
14	16,14	15,49
15	16,56	16,20
16	16,01	17,19
17	ND	14,18
18	12,55	15,59
	17,06 ± 2,67	17,29 ± 5,77
p		0,88

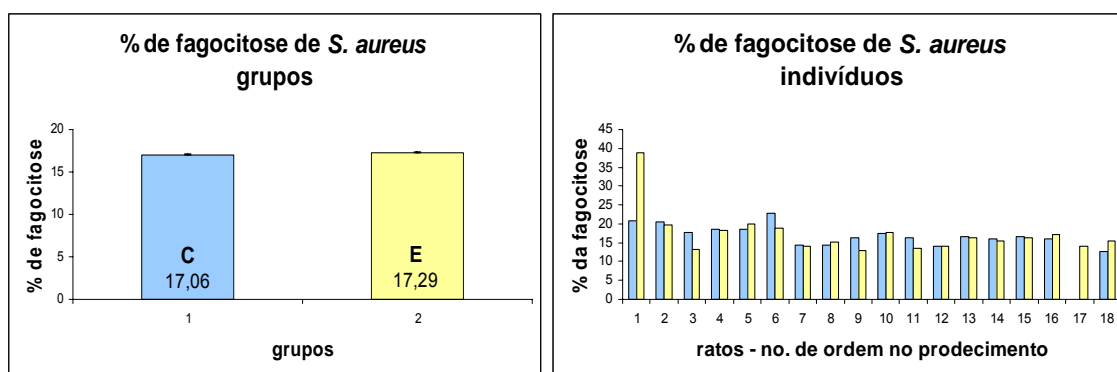


Figura 25 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre a porcentagem de fagocitose *in vitro* de neutrófilos de ratos. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 16 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre a intensidade de fagocitose de *S. aureus* (*in vitro*) por neutrófilos de ratos.

No. do rato	Intensidade de fagocitose de <i>S. aureus</i>	
	controle	experimental
1	13,80	32,86
2	12,06	12,09
3	10,24	1,08
4	13,18	9,26
5	14,78	11,74
6	16,60	4,25
7	4,52	3,77
8	5,31	7,84
9	7,88	6,30
10	5,27	10,59
11	8,40	4,69
12	4,26	4,21
13	6,01	2,85
14	2,27	6,38
15	5,20	7,44
16	7,37	6,55
17	ND	4,01
18	4,45	4,10
	8,33 ± 4,32	7,78 ± 6,97
p		0,78

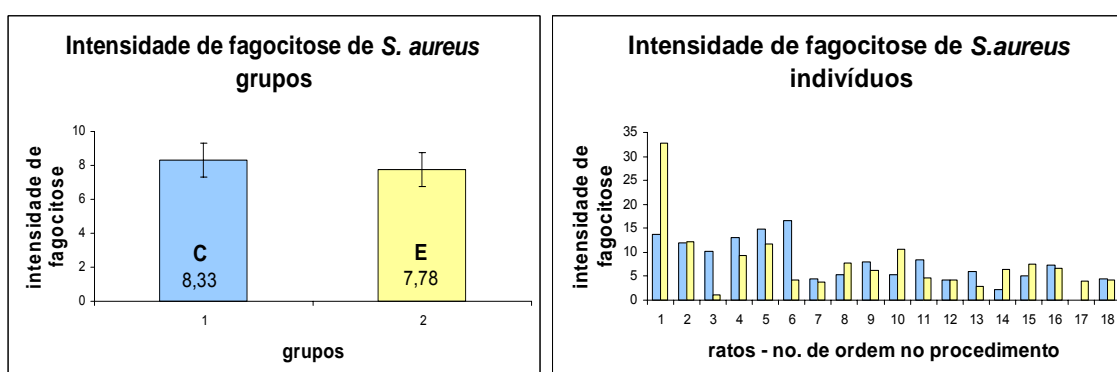


Figura 26 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre a intensidade de fagocitose de *S. aureus* (*in vitro*) por neutrófilos de ratos. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 17 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o *burst* oxidativo induzido, *in vitro*, por PMA em neutrófilos de ratos.

No. do rato	<i>Burst</i> oxidativo induzido por PMA (intensidade de fluorescência)	
	controle	experimental
1	73,87	275,24
2	116,06	70,48
3	34,36	131,20
4	96,81	138,44
5	51,31	119,94
6	74,74	24,69
7	118,84	126,58
8	278,02	265,50
9	188,02	291,80
10	104,91	34,18
11	179,80	245,66
12	1,27	1,64
13	126,77	126,77
14	166,85	166,85
15	92,02	92,02
16	185,87	185,87
17	ND	ND
18	75,26	75,26
	115,58 ± 67,69	139,54 ± 89,05
p		0,38

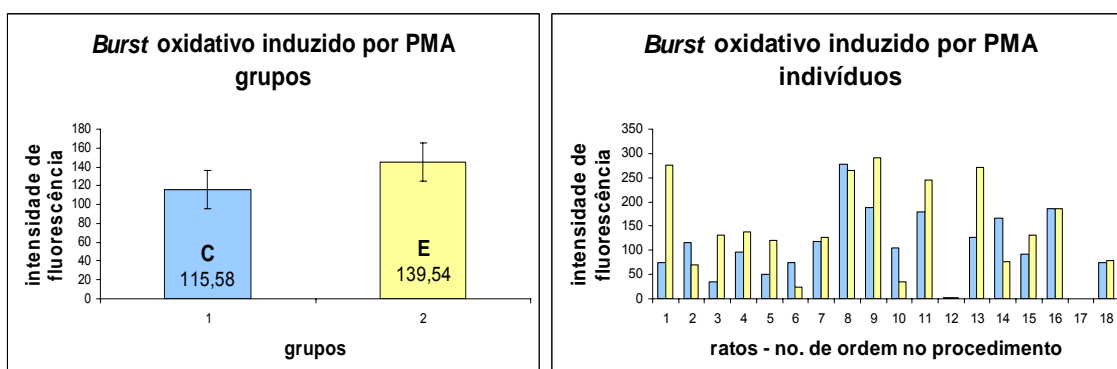


Figura 27 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o *burst* oxidativo induzido, *in vitro*, por PMA em neutrófilos de ratos. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 18 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de noradrenalina hipotalâmica de ratos (ng/g).

No. do rato	Hipotálamo Níveis de Noradrenalina (ng/g)		No. do rato
	controle	experimental	
1	769,83	2133,30	1
2	715,23	1335,18	2
3	1241,70	1212,89	7
5	440,60	2346,98	8
9	1137,11	681,99	9
10	1562,27	2415,90	10
11	1364,39	1112,58	11
12	1646,18	1281,57	12
14	1475,67	1641,88	13
16	1636,44	677,54	14
17	555,59	1456,65	15
18	1473,16	1289,83	16
...	...	1236,35	17
...	...	460,77	18
	1168,18 ±437,35	1377,39 ± 595,85	
p		0.32	

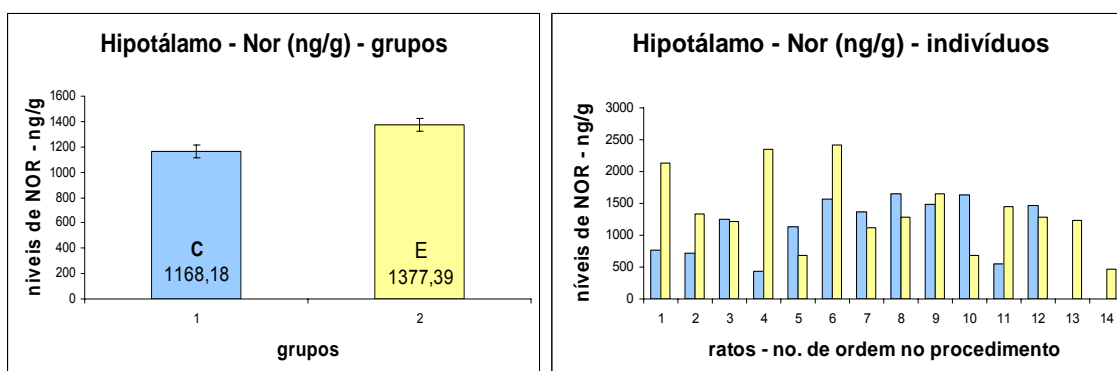


Figura 28 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de noradrenalina hipotalâmica de ratos. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 19 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de VMA hipotalâmico de ratos.

No. do rato	Hipotálamo Níveis de VMA (ng/g)		No. do Rato
	controle	experimental	
1	1412,17	1850,36	1
2	1123,79	2488,64	2
3	2682,36	2052,48	7
5	2515,63	4725,14	8
9	2250,00	2274,66	9
10	2734,61	4594,00	10
11	2087,66	2312,25	11
12	2786,43	2052,05	12
14	2116,37	2833,11	13
16	2537,44	1878,10	14
17	2206,52	2071,97	15
18	2618,26	1951,03	16
...	...	2589,82	17
...	...	1816,86	18
	2255,94 ± 523,48	2535,03 ± 948,08	
p		0.37	

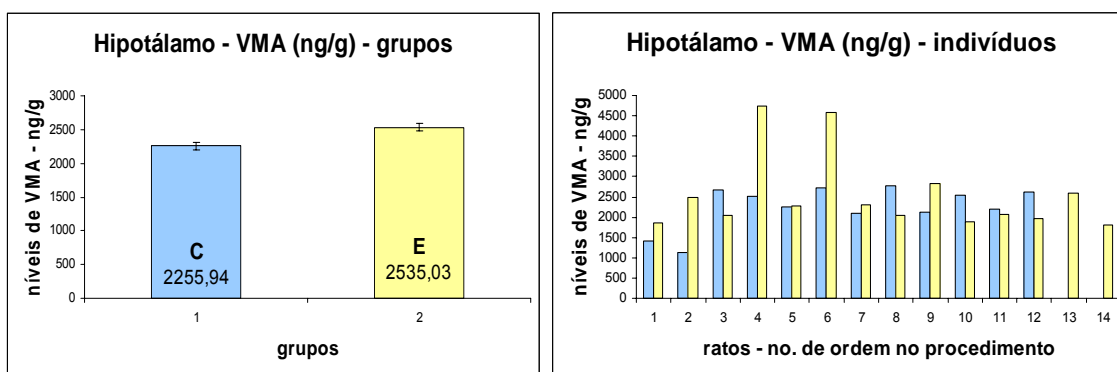


Figura 29 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de VMA hipotalâmico de ratos. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 20 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de 5HT hipotalâmica de ratos.

No. do rato	Hipotálamo Níveis de Serotonina (ng/g)		No. do rato
	controle	experimental	
1	829,04	2615,89	1
2	825,00	1616,99	2
3	1618,24	1333,27	7
5	1315,12	2243,30	8
9	1424,16	1273,29	9
10	1793,78	2211,63	10
11	1459,44	1674,21	11
12	1761,06	1351,47	12
14	1279,71	1789,48	13
16	1634,32	1500,00	14
17	1394,72	1502,94	15
18	1320,00	1225,07	16
...	...	1917,96	17
...	...	1423,90	18
	1387,88 ± 361,62	1691,38 ± 418,47	
p		0,0499	

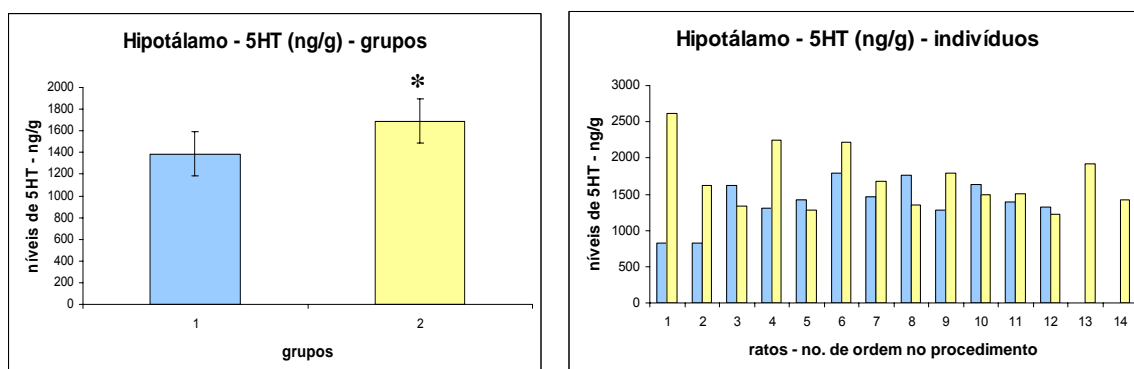


Figura 30 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de 5HT hipotalâmico de ratos. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 21 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de 5HIAA hipotalâmica de ratos.

No. do rato	Hipotálamo Níveis de 5HIAA (ng/g)		No. do rato
	controle	experimental	
1	766,70	2110,45	1
2	608,28	1602,75	2
3	1144,82	1085,03	7
5	328,64	2035,91	8
9	1158,11	1586,39	9
10	1430,95	2125,76	10
11	1149,42	1457,97	11
12	1630,86	1217,04	12
14	1020,22	1658,21	13
16	1251,82	1595,46	14
17	1656,47	1322,33	15
18	1696,84	931,46	16
...	...	1862,50	17
...	...	1510,20	18
	1153,59 ± 427,24	1578,68 ± 367,66	
p		0,01	

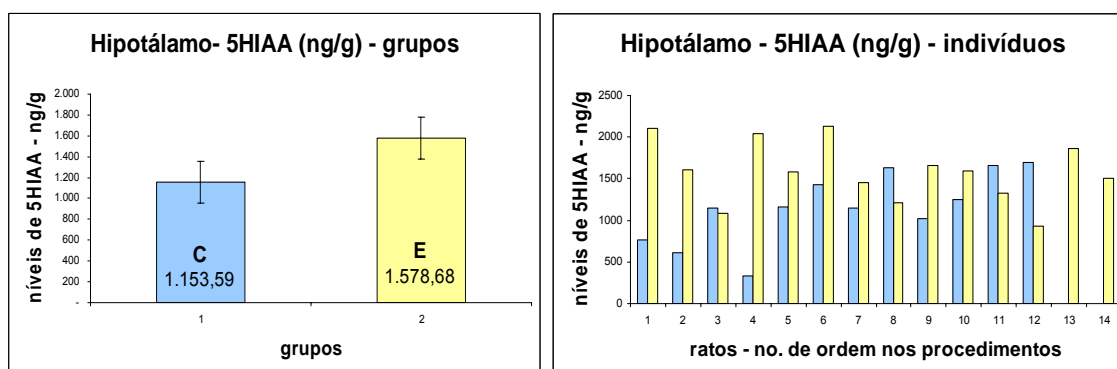


Figura 31 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de 5HIAA hipotalâmico de ratos. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna. (* = $p \leq 0,05$).

Tabela 22 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o *turnover* de noradrenalina no hipotálamo de ratos.

No. do rato	Hipotálamo <i>turnover</i> de Noradrenalina		No. do rato
	controle	experimental	
1	1,83	0,87	1
2	1,57	1,86	2
3	2,16	1,69	7
5	5,71	2,01	8
9	1,98	3,61	9
10	1,75	1,90	10
11	1,53	2,08	11
12	1,69	1,60	12
14	1,43	1,73	13
16	1,55	2,77	14
17	3,97	1,42	15
18	1,78	1,51	16
...	...	2,09	17
...	...	3,94	18
	2,25 ± 1,28	2,08 ± 0,84	
p		0,69	

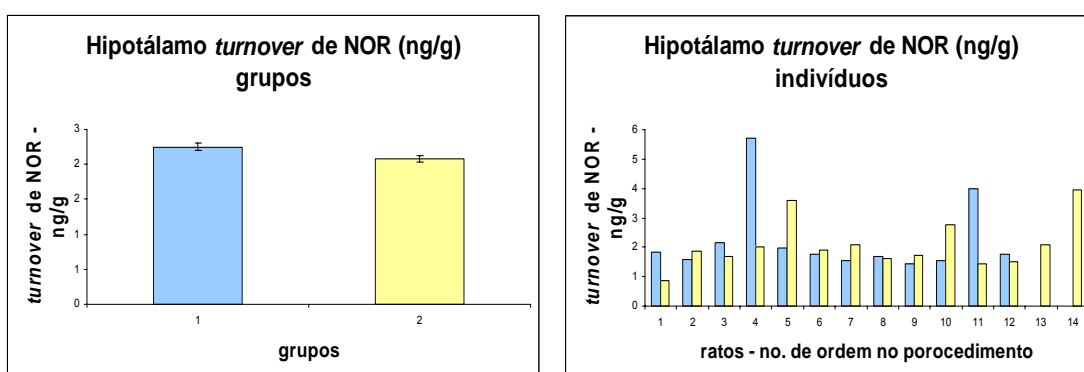


Figura 32 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre as taxas de *turnover* de noradrenalina no hipotálamo de ratos, calculadas sobre o índice VMA/NOR. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 23 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre as taxas de *turnover* de serotonina no hipotálamo de ratos.

No. do rato	Hipotálamo Taxas de <i>turnover</i> de Serotonina		No. do rato
	controle	experimental	
1	0,92	0,81	1
2	0,74	0,96	2
3	0,71	0,81	7
5	0,34	0,91	8
9	0,81	1,25	9
10	0,80	0,96	10
11	0,79	0,87	11
12	0,93	0,90	12
14	0,80	0,93	13
16	0,77	0,89	14
17	1,19	0,88	15
18	0,93	0,76	16
...	...	0,97	17
...	...	1,06	18
	0,81 ± 0,21	0,93 ± 0,12	
p		0,04	

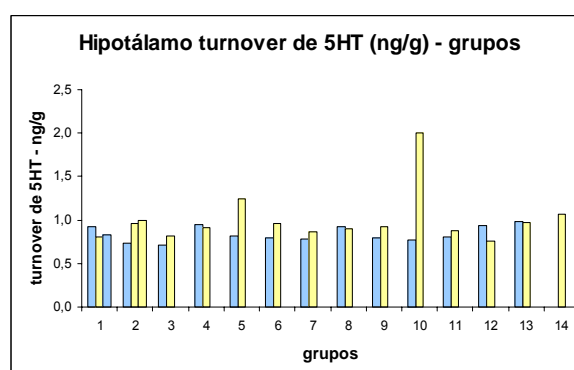
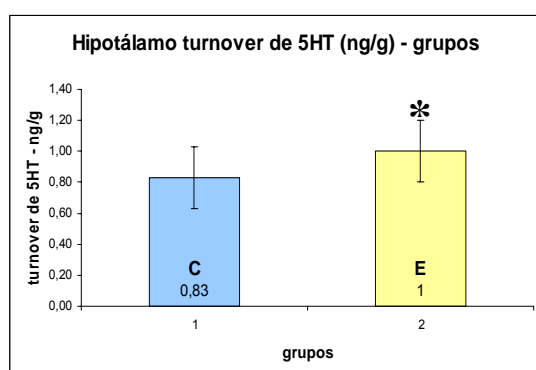


Figura 33 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre as taxas de *turnover* de noradrenalina no hipotálamo de ratos, calculadas sobre o índice 5HIAA/5HT. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 24 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o nível de noradrenalina do córtex pré-frontal de ratos.

No. do rato	Córtex Pré-Frontal Nível de Noradrenalina (ng/g)		No. do rato
	controle	experimental	
1	1625,04	1102,67	1
3	1244,09	805,04	3
4	356,96	379,81	5
5	261,82	350,99	6
6	1295,51	1208,68	7
7	1325,55	320,67	8
8	495,82	440,38	9
9	948,02	454,38	10
10	333,20	1209,59	11
11	1181,12	1208,59	12
12	375,39	287,42	13
13	1330,74	1083,93	15
14	1547,21
	947,73 ± 508,24	737,68 ± 398,50	
p		0,26	

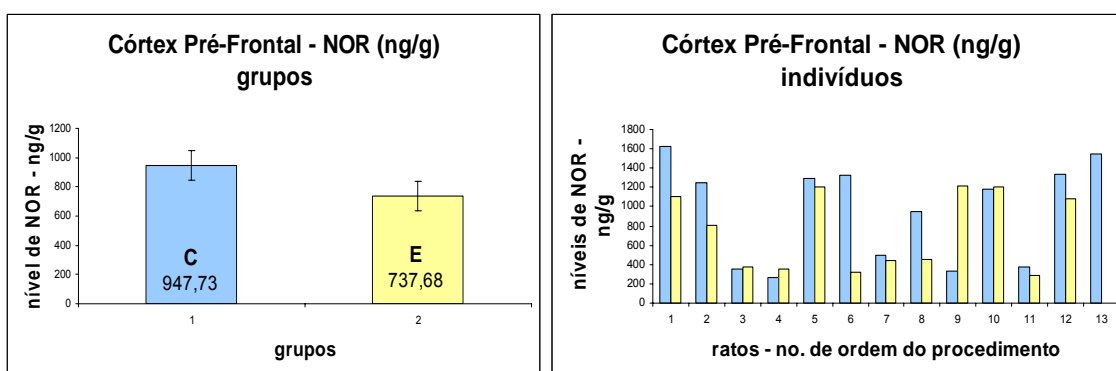


Figura 34 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de NOR no córtex pré-frontal de ratos. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 25 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o nível de VMA no córtex pré-frontal de ratos.

No. do rato	Córtex Pré-Frontal Níveis de VMA (ng/g)		No. do rato
	controle	experimental	
1	3989,82	3138,24	1
3	2941,11	3055,80	3
4	1909,15	1903,37	5
5	1214,26	1891,91	6
6	3594,54	3370,53	7
7	3369,54	2043,57	8
8	2001,61	2011,61	9
9	3000,00	1876,22	10
10	1564,54	3085,32	11
11	3225,32	2970,42	12
12	1680,99	1443,43	13
13	3260,32	3007,12	15
14	3018,04
	2674,56 ± 884,65	2483,13 ± 672,16	
p		0,55	

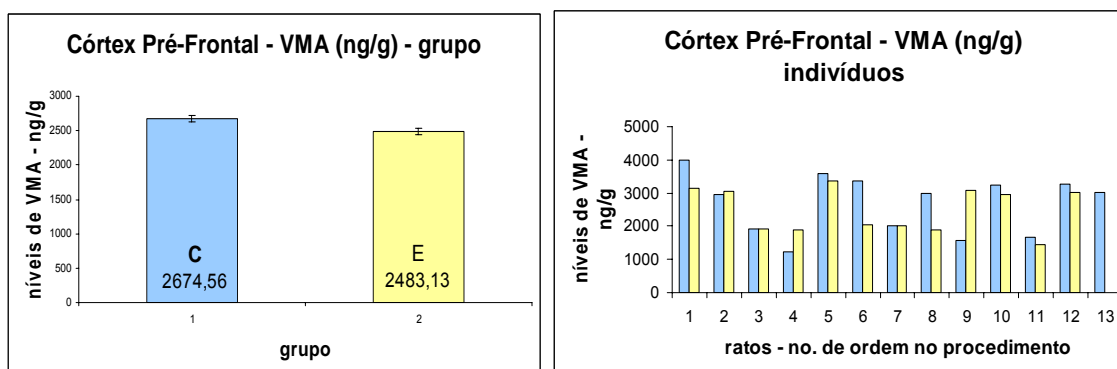


Figura 35 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de VMA no córtex pré-frontal de ratos. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 26 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o nível de 5HT no córtex pré-frontal de ratos.

No. do rato	Córtex Pré-Frontal Níveis de Serotonina (ng/g)		No. do rato
	controle	experimental	
1	1909,43	1209,76	1
3	1141,75	1191,63	3
4	957,05	1025,01	5
5	632,78	951,68	6
6	1598,66	1559,21	7
7	1677,26	1142,03	8
8	1058,33	862,28	9
9	1557,29	1001,83	10
10	990,62	1403,27	11
11	1393,94	1262,15	12
12	829,63	845,79	13
13	1315,43	1181,84	15
14	1633,19
	1284,26 ± 381,79	1136,37 ± 213,32	
p		0,25	

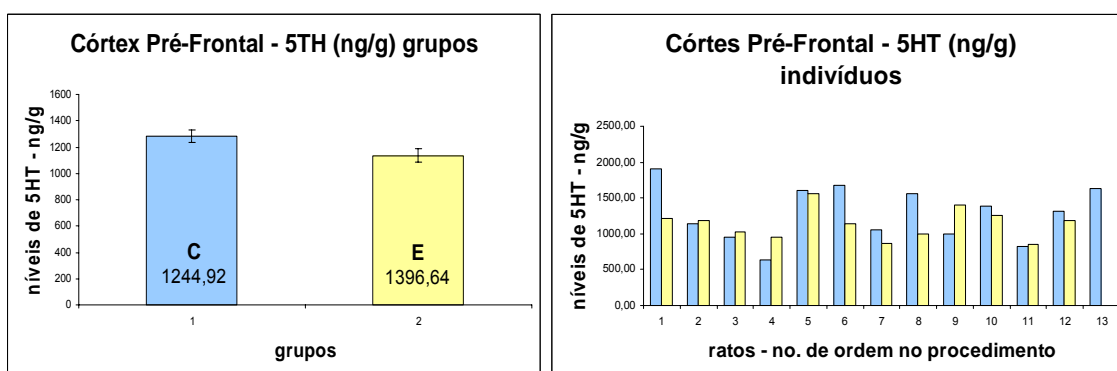


Figura 36 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre os níveis de 5HT no córtex pré-frontal de ratos. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 27 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o nível de 5HIAA no córtex pré-frontal de ratos.

No. do rato	Córtex Pré-Frontal Níveis de 5HIAA (ng/g)		No. do rato
	controle	experimental	
1	1541,90	1580,34	1
3	1377,00	1414,49	3
4	1012,39	1115,53	5
5	533,89	1481,54	6
6	1787,97	1690,62	7
7	1919,37	1153,66	8
8	926,05	1126,24	9
9	1515,73	964,37	10
10	689,43	2008,86	11
11	1532,89	1897,20	12
12	770,01	775,17	13
13	946,31	1551,67	15
14	1631,06
	1244,92 ± 451,42	1396,64 ± 376,75	
p		0,37	

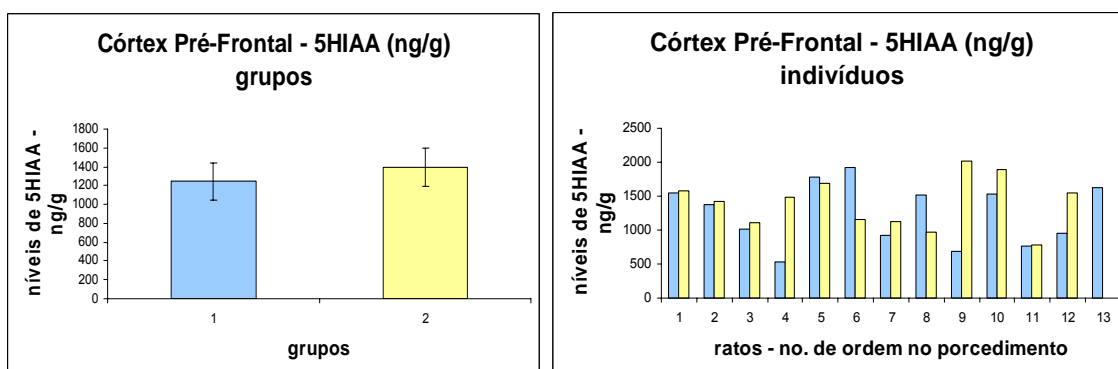


Figura 37 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o nível de 5HIAA no córtex pré-frontal de ratos. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 28 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre turnover de noradrenalina no córtex pré-frontal de ratos.

No. do rato	Córtex Pré-Frontal Turnover de Noradrenalina		No. do rato
	controle	experimental	
1	2,46	2,85	1
3	2,36	3,80	3
4	5,35	5,01	5
5	4,64	5,39	6
6	2,77	2,79	7
7	2,54	6,37	8
8	4,04	4,57	9
9	3,16	4,13	10
10	4,70	2,55	11
11	2,73	2,46	12
12	4,48	5,02	13
13	2,45	2,77	15
14	1,95
	3,36 ± 1,12	3,98 ± 1,31	
p		0,21	

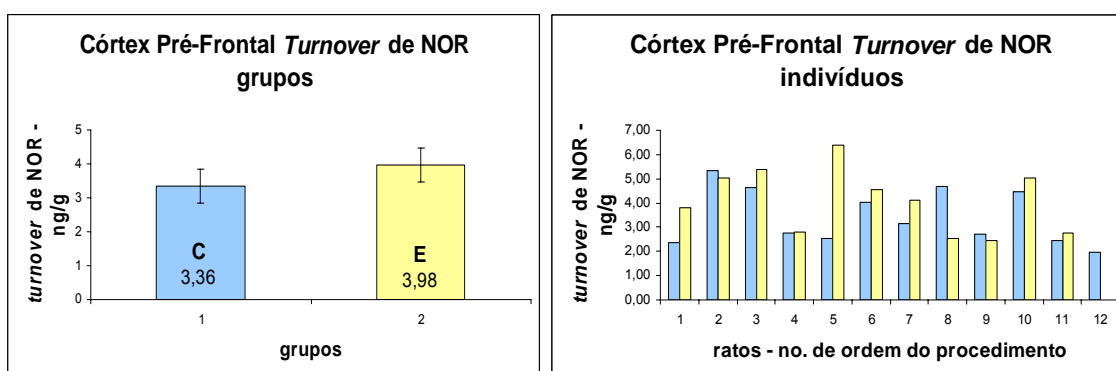


Figura 38 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o turnover de noradrenalina no córtex pré-frontal de ratos. À esquerda, média \pm DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna.

Tabela 29 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre *turnover* de serotonina no córtex pré-frontal de ratos.

No. do rato	Córtex Pré-Frontal <i>Turnover</i> de Serotonina		No. do rato
	controle	experimental	
1	0,81	1,31	1
3	1,21	1,19	3
4	1,06	1,09	5
5	0,84	1,56	6
6	1,12	1,08	7
7	1,14	1,01	8
8	0,88	1,31	9
9	0,97	0,96	10
10	0,70	1,43	11
11	1,10	1,50	12
12	0,93	0,92	13
13	0,89	1,31	15
14	1,00
	0,97 ± 0,15	1,22 ± 0,21	
p		0,002	

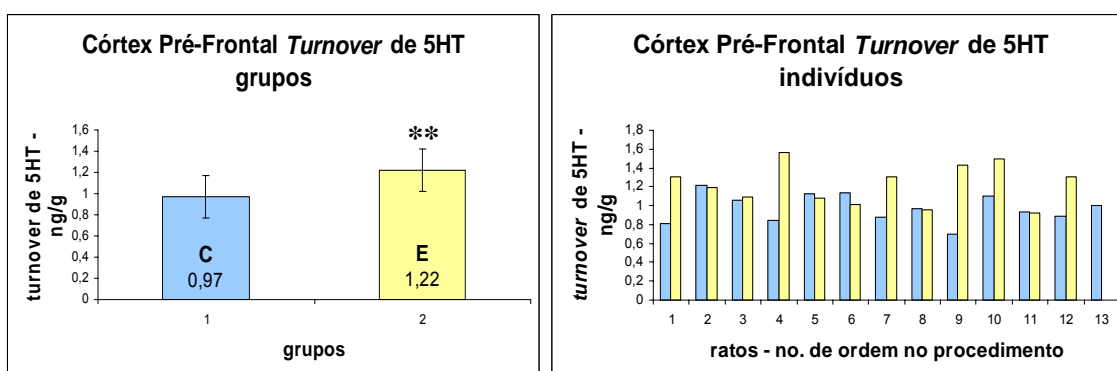


Figura 39 – Efeitos de um estresse por confrontação social sobre o *turnover* de serotonina no córtex pré-frontal de ratos. À esquerda, média ± DP dos resultados de 18 animais do grupo. À direita, os dados individuais dos animais do grupo controle (cinza escuro) e experimental (cinza claro), com seus números de ordem abaixo de cada coluna (** = $p \leq 0,05$)