

SARAH WEHLE GEHRES

**DERROTA SOCIAL E SEUS EFEITOS SOBRE NÍVEIS SÉRICOS
DE IGF-1 E CORTICOSTERONA EM RATOS WISTAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosa Maria M. de
Almeida

Co-orientador: Msc. Mailton Vasconcelos

PORTO ALEGRE

2014

Agradecimentos

A oportunidade de aprendizado que me foi dada pela minha orientadora Rosa de Almeida. Todo o apoio, amizade e ensinamentos do meu co-orientador Mailton Vasconcelos, e das colegas Carolina Chatain e Bárbara Guahyba. A convivência e aprendizado com meus primeiros mentores no LPNeC, Letícia Schmidt, Jonatas Passos e Charles Ferreira. Se eu posso me chamar de pesquisadora hoje é por causa de todos vocês.

A todo o pessoal da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, por estarem sempre disponíveis para ajudar e oferecer conselhos, e por cuidarem dos nossos ratinhos quando não podíamos. Ao pessoal do Banco de Sangue do HCPA, pela enorme influência positiva na minha formação profissional nos últimos seis meses.

Ao pessoal do Laboratório de Psiquiatria Molecular, obrigada por todo o apoio e disponibilidade. Esse trabalho não poderia ter sido realizado sem vocês.

Sempre e de novo, agradeço por todo o amor da minha família, que aguentaram todos esses finais de semestre, me deram força pra continuar, e acreditaram em mim desde antes de eu entender o que isso significava. Mesmo as brigas e discussões foram o que me levaram a estar aqui hoje.

Ao meu namorado, por se recusar a levar minhas crises de raiva ou ansiedade a sério, e sempre saber o que dizer. Obrigada por tornar os últimos anos mais leves e divertidos, obrigada por me ensinar que também é preciso ter tempo para respirar.

Aos colegas de faculdade, essa estrada teria sido insuportavelmente chata sem vocês. Obrigada por todo apoio, amizade, desabafos e risadas ao longo desses últimos 5 anos. Amo vocês.

À UFRGS e ao HCPA pela infraestrutura utilizada durante a minha formação. Ao CNPQ e Propesq UFRGS pelo apoio financeiro necessário.

A todos os professores, que certamente deixaram suas marcas no meu aprendizado, pequenas ou grandes.

Muito Obrigada!

Sumário

RESUMO	4
LISTA DE ABREVIACÕES	5
1. INTRODUÇÃO GERAL	6
1.1 Resposta ao Estresse.....	6
1.2 Estresse social	7
1.3 Exposição única à derrota social	8
1.4 Exposição repetida à derrota social	8
1.5 Exposição intermitente à derrota social.....	8
1.6 Exposição crônica à derrota social	9
1.7 Estilos de <i> coping </i>	9
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivos específicos.....	10
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
RESUMO	12
ABSTRACT	12
Introdução	14
Materiais e Métodos	17
Animais	17
Laqueadura tubária de fêmeas.....	17
Teste do comportamento agressivo do residente.....	17
Grupo Controle.....	18
Episódios intermitentes e breves de derrota social.....	18
Análise dos comportamentos agressivo-defensivos	18
Considerações éticas	20
Resultados	21
Discussão.....	25
Referências.....	28
4. CONCLUSÃO	31
5. PERSPECTIVAS	32
REFERÊNCIAS	35

RESUMO

O estresse social é um tipo de estresse comum a todas as espécies superiores de mamíferos. Através do protocolo de derrota social, podemos estudar os efeitos comportamentais e fisiológicos deste estresse, controlando qual animal é o agressor e qual o derrotado. Este protocolo possui valor etológico significativo, e pode ser aplicado com diferentes intensidades e frequências: exposição única, exposição crônica, exposição aguda (ou intermitente), ou exposição repetida. A derrota social começa com um rato *Wistar*, abrigado em uma caixa grande com uma fêmea esterilizada, treinado para brigar com machos menores colocados dentro de seu território após a retirada da fêmea. Os animais menores, chamados intrusos, são colocados dentro da caixa do residente protegidos por sua própria caixa por dez minutos, na fase chamada Pré-Confrontação. Após esse tempo, o intruso é colocado em contato direto com o residente na fase de Confrontação. Essa fase termina quando o residente força o intruso a assumir uma postura submissa (deitado no substrato de barriga para cima), ou cinco minutos após a primeira mordida do residente. Em termos de comportamento, exposições únicas levam a sintomas depressivos, como menor mobilidade nos testes de campo aberto e nado forçado. Uma exposição repetida também aumenta sintomas depressivos, bem como comportamentos do tipo ansioso (*self grooming* e avaliação de risco). A exposição aguda tem efeitos similares em sintomas depressivos e ansiosos, como maior imobilidade no campo aberto, menor preferência por soluções açucaradas, desinteresse sexual, entre outros. A exposição crônica leva a anedonia, além de modificações no sistema nervoso central. Este estudo está focado na relação entre os comportamentos apresentados pelos intrusos durante a derrota social e os níveis de IGF-1 e corticosterona dosados no soro destes animais. Os comportamentos foram analisados e três categorias de escores foram montadas a partir dessa análise: escore de exploração social, escore ofensivo e escore defensivo. Nossos resultados mostram que não só o grupo controle apresentou níveis mais altos de corticosterona do que o grupo estressado, como também a relação desses níveis com um escore agressivo mais alto, e ao mesmo tempo, escores de exploração social mais baixos. Além disso, a dosagem de IGF-1 não mostrou diferenças entre o grupo estressado e o grupo controle, o que indica que este fator de crescimento pode não estar diretamente relacionado com o estresse.

LISTA DE ABREVIACÕES

5-HT: serotonina

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

BDNF: *brain derived neurotrophic factor*

HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal

IGF-1: *insulin-like growth factor 1*

SAM: simpato-adreno-medular

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Resposta ao Estresse

Estresse pode ser definido como um desafio ao equilíbrio homeostático do indivíduo, podendo se dar através de um evento ambiental ou social, imediato ou futuro, que resulta em uma cascata de respostas neuronais, imunológicas e autonômicas, que tem por objetivo reequilibrar o organismo (Miczek, Yap, & Covington III, 2008). A resposta ao estresse funciona primariamente por duas vias: o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, e o eixo Simpato-Adreno-Medular (Figura 1). Primeiramente, o estímulo estressante é percebido pelo cérebro, e o hipotálamo dá início à cascata de sinalização.

Pelo eixo HPA, o hipotálamo libera CRH (hormônio liberador de corticotrofina), que vai agir sobre a glândula pituitária, fazendo com que ela libere ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), entre outros hormônios. O ACTH vai agir sobre o córtex da glândula adrenal, que vai liberar glicocorticóides na corrente sanguínea. Pelo eixo SAM, o hipotálamo envia um sinal diretamente para a medula da glândula adrenal através do sistema simpático. A medula da adrenal produz catecolaminas, como adrenalina e noradrenalina, que também são liberadas na corrente sanguínea. Cada via é ativada dependendo do tipo de estressor percebido, e da resposta necessária (Sternberg, 2006).

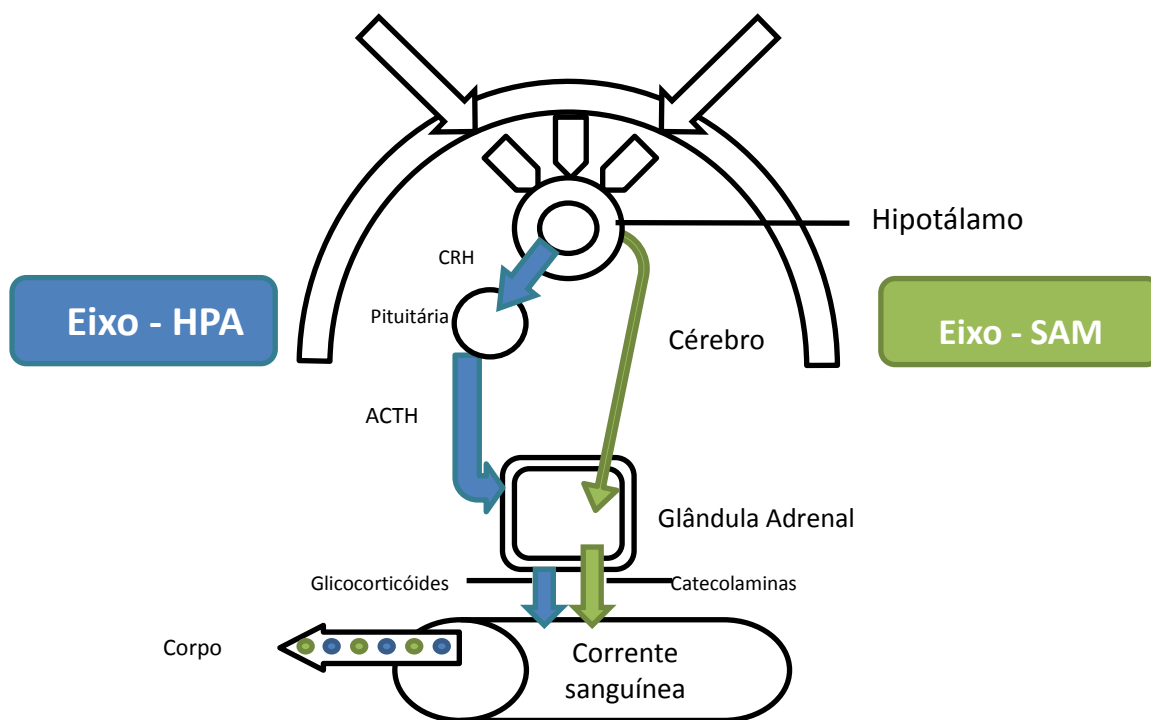


Figura 1: Vias de resposta ao estresse.

1.2 Estresse social

O estresse social é um tipo de evento estressor comum na vida de quase todas as espécies com algum tipo de organização social, especialmente mamíferos (Blanchard et al., 2001; Miczek, Yap, & Covington III, 2008). Modelos animais de estresse social incluem exposições únicas, crônicas, intermitentes ou contínuas de um indivíduo a outro coespecífico. As interações podem variar de acordo com a espécie, sexo, idade, histórico individual e ambiente (Blanchard et al., 2001). Dentro desses modelos, dois fatores podem ser decisivos para o status social: a frequência e intensidade das interações agonísticas e a sensação de controle sobre a situação (Raab et al., 1986).

Com o protocolo de derrota social com ratos sendo um paradigma intruso-residente, é possível medir o número de interações, bem como controlar qual animal é o agressor e qual é o derrotado. Essa confrontação intraespecífica entre machos é etologicamente relevante, e pode ser utilizada para elucidar adaptações fisiológicas e comportamentais ao estresse (Paul et al., 2011). Este modelo consiste na exposição de um indivíduo experimental a um macho agressivo e dominante. Miczek e colegas (Miczek, 1979; Tornatzky & Miczek, 1993; 1994) desenvolveram e caracterizaram esse protocolo. Antes do início dos experimentos, machos adultos são selecionados para viver em caixas grandes com uma fêmea esterilizada como companheira. Após um período de adaptação para estabelecimento do território, pode-se iniciar o protocolo, que é dividido em três fases: Pré-Confrontação, Confrontação, e Pós-Confrontação, esta última sendo opcional. Antes da Pré-Confrontação, as fêmeas são retiradas da caixa, e recolocadas após o final da última etapa (Miczek, 1979).

Na primeira fase, o intruso, um macho adulto que vive abrigado em uma caixa bem menor que a do residente, é colocado, ainda dentro de sua caixa, no território do residente. Assim, ele é exposto ao animal maior, que sente seu território sendo invadido. Não há contato físico entre os animais nesta etapa, que dura 10 minutos. Para a fase de Confrontação, a caixa do intruso é retirada de dentro da caixa do residente, e os animais são colocados em contato direto. Esta etapa pode ser encerrada de três maneiras diferentes: se o residente não apresentar nenhum tipo de comportamento agressivo (i.e. não morder nem forçar o outro a se submeter), ela termina após 10 minutos; se o residente morder, mas não submeter, são contados cinco minutos após a primeira mordida para retirar o intruso; ou, se o residente mostrar sua dominância forçando o intruso a se submeter por pelo menos 6 segundos, a etapa é encerrada. A fase de Pós-Confrontação segue os mesmos passos da primeira fase.

Pode-se dividir a derrota social em três categorias, dependendo da frequência dos confrontos: exposição única, exposição repetida (dois ou mais conflitos diários), exposição

intermitente ou aguda (pequeno número de conflitos em dias não consecutivos), e exposição crônica, na qual o intruso reside na mesma caixa que o agressor com uma barreira que impede o contato físico, mas permite o contato visual e olfativo. Cada uma dessas categorias acarreta em mudanças comportamentais, algumas muito semelhantes, outras distintas.

1.3 Exposição única à derrota social

Animais expostos a um único episódio de derrota social exibem vocalizações em uma faixa considerada aversiva (20 kHz) (Burgdorf, Kroes, Beinfeld, Panksepp, & Moskal, 2010), além de sintomas depressivos, como menor mobilidade no *Open Field* e em testes de nado forçado (Marini et al., 2006).

A nível molecular, esses indivíduos apresentam quantidades elevadas de corticosterona, ACTH e CRH (Marini et al., 2006; Razzoli, Carboni, & Arban, 2009; Funk, Li, & Lê, 2006). Burgdorf et al. (2006) demonstraram uma alteração na expressão de IGF-1 no cérebro de ratos logo após um episódio de derrota social.

1.4 Exposição repetida à derrota social

Ratos expostos a dois, ou mais, episódios de derrota social diários, apresentam mais vocalizações aversivas na faixa de 20kHz; mais comportamentos de *coping* reativo (Kroes, Burgdorf, Otto, Panksepp, & Moskal, 2007; Paul et al., 2011); mais comportamentos do tipo ansioso (*self grooming*, locomoção elevada em ambientes desconhecidos, avaliação de risco) (Razzoli et al., 2009; Razzoli et al., 2007; Carboni et al., 2006); e mais comportamentos do tipo depressivo, como diminuição da atividade geral e sociabilidade no teste de interação social, diminuição na preferência por solução açucarada e diminuição no comportamento reprodutivo (Furay, McDevitt, Miczek, & Neumaier, 2011; Razzoli et al., 2009).

Como biomarcadores, esses animais também apresentam níveis elevados de corticosterona e ACTH no sangue (Razzoli et al., 2007), bem como alterações em outras moléculas neurotróficas, como BDNF e FGF (fator de crescimento de fibroblastos) (Duclot & Kabbaj, 2013; Turner, Calvo, Frost, Akil, & Watson, 2008).

1.5 Exposição intermitente à derrota social

Esse tipo de exposição, também chamado de aguda, leva os indivíduos a apresentarem comportamento social diminuído, maior latência e menor frequência de se submeter durante um confronto (Buwalda, Stubbendorff, Zickert, & Koolhaas, 2013); também apresentaram sintomas

do tipo depressivo e ansioso, como desinteresse sexual (Nocjar, Zhang, Feng, & Panksepp, 2012), maior imobilidade no teste de campo aberto, e menor preferência por soluções adocicadas (Olivares et al., 2012). Em nível molecular, esses ratos também apresentam níveis mais baixos de hormônios da tireóide, regulados pelo eixo HPA (Olivares et al., 2012), bem como alterações em fatores neurotróficos como BDNF (Fanous et al., 2011; Miczek et al., 2011).

1.6 Exposição crônica à derrota social

Ratos expostos a protocolos de derrota social contínua apresentam aumento nos comportamentos submissivos (Buwalda et al., 2013); sintomas do tipo depressivo como anedonia, diminuição da preferência por solução açucarada, e diminuição do comportamento exploratório (Kanarik et al., 2011; Miczek et al., 2011; Chen et al., 2012). Além disso, esses animais mostram níveis claramente mais altos de corticosterona, diminuição de metabólitos de 5-HT, e supressão de BDNF em algumas áreas cerebrais (Miczek et al., 2011; Chen et al., 2012; Grunewald et al., 2012).

1.7 Estilos de *coping*

Estilos de *coping* são conceitos muito úteis quando se trata de compreender a capacidade adaptativa individual frente a doenças relacionadas com estresse. Estilo de *coping* pode ser definido como um conjunto coeso de comportamentos e respostas fisiológicas frente a um evento estressor, que é característico de um grupo de indivíduos. Apesar da grande variedade de formas de apresentação, bem como os inúmeros fatores envolvidos, tem sido feito um esforço para classificar esses estilos (Koolhaas et al., 1999).

O *coping* proativo é similar à resposta de luta-ou-fuga, caracterizada por agressividade e controle de território. Animais com esta característica desenvolvem estratégias para evitar estressores rapidamente, e são, em geral, mais agressivos e mais rígidos em seus padrões de comportamento. Esses comportamentos são acompanhados de baixa atividade do eixo HPA, como evidenciado por baixos níveis séricos de corticosterona, e uma maior resposta por parte do sistema simpático, por meio de um aumento das catecolaminas circulantes (Koolhaas et al., 1999). Já o *coping* reativo é uma resposta com baixos níveis de agressividade, em que o animal passa muito tempo imóvel. Animais reativos tendem a desenvolver estratégias mais flexíveis, e apenas reagem em situações extremas. Esses comportamentos são acompanhados de uma alta regulação do eixo HPA, e baixa ativação do sistema simpático (Koolhaas et al., 1999).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi de compreender as respostas fisiológicas e comportamentais de ratos Wistar machos expostos a um protocolo de derrota social intermitente.

2.1 Objetivos específicos

- a) avaliar os níveis de corticosterona sérica;
- b) avaliar os níveis de IGF-1 sérico;
- c) computar escores comportamentais.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

A DERROTA SOCIAL E SEUS EFEITOS SOBRE NÍVEIS SÉRICOS DE IGF-1 E CORTICOSTERONA EM RATOS WISTAR

Sarah W. Gehres^{a*}, Mailton Vasconcellos^{a*}, Carolina Chatain^{a*}, Bárbara Guahyba^{b*},
Rosa Maria M. de Almeida^{a*}

a UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

b FADERGS - Faculdade de Desenvolvimento do Rio Grande do Sul

* Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências e Comportamento – LPNeC
UFRGS

RESUMO

Derrota social é o resultado de uma confrontação intraespecífica de ratos machos, sendo etologicamente relevante, e podendo ser utilizada em estudos para a compreensão das adaptações fisiológicas e comportamentais ao estresse. Neste trabalho foram utilizados três grupos de ratos Wistar machos adultos. Um grupo de animais, chamados de residentes, que foram treinados para ser agressivos, e residiam em caixas de acrílico transparente de 46x71x46cm pareados com fêmeas laqueadas; outro, submetido ao protocolo de derrota social, chamado de intruso ou derrotado, e um grupo controle. O protocolo consiste de três fases: Pré-Confrontação, Confrontação, e Pós-Confrontação. O comportamento do grupo intruso foi observado durante a fase de Confrontação, e três escores foram montados a partir dessas observações: escore de exploração social, escore ofensivo e defensivo. Este estudo está focado na relação entre os escores montados, e os níveis de IGF-1 e corticosterona dosados no soro dos animais. Foram utilizados kits comerciais de ELISA para fazer as medidas moleculares. Nossos resultados mostram que o grupo controle apresentou níveis mais altos de corticosterona do que o grupo derrotado. Neste grupo, existe uma relação entre níveis mais altos de corticosterona com um escore agressivo mais alto, e ao mesmo tempo, um escore de exploração social mais baixo. Além disso, a dosagem de IGF-1 não mostrou diferenças entre o grupo estressado e o grupo controle, o que indica que este fator de crescimento pode não estar diretamente relacionado com o estresse.

ABSTRACT

Social defeat is the result of an intraspecific confrontation between male rats, having great ethological relevance, and being of use in studies that seek to understand the physiological and behavioral adaptations to stress. For this paper, three groups of adult male Wistar rats were used. One group of animals trained to be aggressive, who resided in transparent acrylic boxes, measuring 46x71x46cm, with a sterilized female; another, who underwent the social defeat protocol, called intruder or defeated, and a control group. The protocol consists of three phases: Pre-Confrontation, Confrontation and Post-Confrontation. The behavior of the intruder group was observed during the Confrontation phase, and three separate scores were built on those observations: offensive score, defensive score, and social exploration score. This study focusses on the relation between the assembled scores and the levels of IGF-1 and corticosterone dosed on the rats's serum. Comercial ELISA kits were used to measure these substances. Our results show that the control group presented higher levels of corticosterone than the defeated group. Also, within the defeated group, higher levels of corticosterone were associated with higher offensive scores, and lower social exploration scores. The measurements of IGF-1 show no

statistical differences between the defeated group and the control group, which indicates that, peripherally, this growth factor may not be directly related to the adaptations to stress.

Introdução

Estresse pode ser definido como um desafio ao equilíbrio homeostático do indivíduo, podendo se dar através de um evento ambiental ou social, imediato ou futuro, que resulta em uma cascata de respostas neuronais, imunológicas e autonômicas, que tem por objetivo reequilibrar o organismo. O estresse social é particularmente relevante em espécies que dependem do cuidado parental e organização social durante a vida, tendo efeitos duradouros e significativos (Miczek, Yap, & Covington III, 2008).

Neste contexto, existe o protocolo de derrota social, que consiste em uma confrontação intraespecífica de ratos ou camundongos machos, sendo etologicamente relevante, e podendo ser utilizado em estudos que buscam elucidar as adaptações fisiológicas e comportamentais ao estresse (Paul et al., 2011). A literatura mostra que roedores expostos a um único episódio de derrota social apresentam alterações em respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais (Raab et al., 1986), incluindo aumento de comportamentos de medo e do tipo ansioso (Razzoli et al., 2006). Ratos expostos a episódios repetidos de derrota social também respondem com aumento de comportamentos do tipo ansioso (Kinn et al., 2008; Paul et al., 2011), reorganização dendrítica (Kole, Costoli, Koolhaas, & Fuchs, 2004), redução de ingestão de alimentos e ganho de peso corporal (Meerlo, Overkamp, Daan, Van Den Hoofdakker RH, & Koolhaas, 1996) e padrões de sono alterados (Kinn et al., 2008).

Este trabalho está focado particularmente nos efeitos do estresse social sobre o sistema endócrino, que se iniciam de maneira similar a respostas a outros tipos de estresse, com a ativação do sistema simpático, que leva a taquicardia, aumento de pressão arterial e temperatura corporal. Além disso, este tipo de estresse também leva a um aumento na atividade do eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal), essencial para que o indivíduo possa lidar com o evento estressor, pois a liberação de glicocorticoides ativa o metabolismo energético e o sistema imune, tendo, portanto, um papel restaurador e protetor (Miczek et al., 2008). A liberação destes hormônios também pode ocorrer como resposta antecipatória a um estressor iminente ou persistente (Pardon, Kendall, Pérez-Diaz, Duxon, & Marsden, 2004). O prolongamento dessa atividade também acarreta em consequências fisiopatológicas diversas (McEwen, 2008).

Estilos de *coping* são conceitos muito úteis quando se trata de compreender a capacidade adaptativa individual frente a doenças relacionadas com estresse. Estilo de *coping* pode ser definido como um conjunto coeso de comportamentos e respostas fisiológicas frente a um evento estressor, que é característico de um grupo de indivíduos. Apesar da grande variedade de formas de apresentação, bem como os inúmeros fatores envolvidos, tem sido feito um esforço para classificar esses estilos (Koolhaas et al., 1999).

O *coping* proativo é similar à resposta de luta-ou-fuga, caracterizada por agressividade e controle de território. Animais com essa característica desenvolvem estratégias para evitar estressores rapidamente, e são, em geral, mais agressivos e mais rígidos em seus padrões de comportamento. Estes comportamentos são acompanhados de baixa atividade do eixo HPA, como evidenciado por baixos níveis séricos de corticosterona, e uma maior resposta por parte do sistema simpático, por meio de um aumento nas catecolaminas circulantes (Koolhaas et al., 1999). Já o *coping* reativo é uma resposta com baixos níveis de agressividade, em que o animal passa muito tempo imóvel. Animais reativos tendem a desenvolver estratégias mais flexíveis e apenas reagem em situações extremas. Estes comportamentos são acompanhados de uma alta regulação do eixo HPA e baixa ativação do sistema simpático (Koolhaas et al., 1999).

Em indivíduos adultos, a exposição intermitente a episódios de estresse por derrota social resulta em uma sensibilização comportamental e neural, levando a respostas comparativamente maiores por parte dos sistemas simpático e glicocorticoide, enquanto o estresse durar (Bartolomucci et al., 2003; Covington et al., 2005; Sgoifo et al., 2005; Tornatzky & Miczek, 1994). A ativação do eixo HPA é geralmente medida através dos níveis de hormônios corticosteroides em plasma, saliva, ou, com menor frequência, fezes (Blanchard et al. 2001).

O hipocampo faz parte da integração entre o sistema límbico e o eixo HPA, e tem um papel ativo na regulação da resposta ao estresse (Fuchs, Flugge, & Czeh, 2006). Mudanças morfológicas e moleculares nesta estrutura têm sido documentadas após muitos tipos de estresse, incluindo o social (McEwen, 2002). Ratos intrusos, após um ou dois episódios de derrota, rapidamente demonstram retração dendrítica na árvore apical, que pode passar para os dendritos basais mais tarde (Kole et al., 2004). Apesar de a maior parte dos resultados envolvendo remodelação dendrítica no hipocampo ter sido obtida após estresse crônico, conflitos breves também são capazes de causar uma reorganização de redes neuronais durante várias semanas após exposição aguda ao estresse (Fuchs et al., 2006).

O IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) é um fator neurotrófico e há muito se sabe que ele promove a sobrevivência de neurônios. Sob estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, IGF-1 promove a sobrevivência de neurônios no cerebelo e em certas áreas do hipocampo de ratos (Heck, Lezoualc'h, Engert, & Behl, 1999; Wilkins, Chandran, & Compston, 2001). Um aumento na captação de IGF-1 da corrente sanguínea para áreas cerebrais específicas em ratos foi relacionado com neurogênese, também no hipocampo (Trejo, Carro, & Torres-Alemán, 2001).

É possível que altos níveis de glicocorticoides inibam a neurogênese, parcialmente através de uma via mediada por IGF-1 (Anderson, Åberg, Nilsson, & Eriksson, 2002).

Atualmente, a associação entre IGF-1 e neurogênese hipocampal em adultos está clara: esses dados estão largamente correlacionados, porém mais estudos ainda são necessários para elucidar a extensão da modulação por parte do IGF-1 neste processo.

Os trabalhos mencionados acima mostram a variedade de abordagens que podem guiar o estudo dos efeitos do estresse no indivíduo. A significância deste estudo está no uso de um protocolo de estresse social etologicamente válido para medir adaptações fisiológicas e comportamentais, e seus efeitos no modo como os animais lidam com um evento estressor.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados um total de 34 ratos Wistar neste estudo, 7 fêmeas e 27 machos, a partir de 70 dias de idade. Eles foram abrigados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde foram mantidos em alojamentos com temperatura controlada entre 20 e 22°C, umidade relativa do ar entre 40 e 60% e ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e comida à vontade. Os animais foram separados nos seguintes grupos:

a) Residentes: sete machos foram pareados com sete fêmeas, e residiram aos pares em caixas de acrílico com dimensões de 46x71x46cm durante todo o período dos experimentos.

b) Intrusos: 10 machos, abrigados individualmente em caixas de acrílico de 15x20x25cm. Foram expostos aos residentes durante o protocolo de derrota social.

c) Controles: 10 machos, abrigados em caixas idênticas às dos intrusos.

Laqueadura tubária de fêmeas

A laqueadura das fêmeas foi realizada seguindo os procedimentos descritos em Remie (2000). Inicialmente, as áreas a serem incididas, na região posterior dorsal das fêmeas, foram depiladas e desinfetadas. Depois de anestesiadas com xilazina (10 mg/kg de peso vivo) e quetamina (100 mg/kg de peso vivo) por administração intraperitoneal, as ratas foram posicionadas ventralmente e foi verificada a eficácia dos anestésicos antes de iniciado o procedimento.

Os animais foram observados até a completa recuperação anestésica, mantidos em incubadora com aquecimento e fornecimento de O₂ 100%. A analgesia imediata após o procedimento foi feita com dose única de Dipirona (500 mg/kg i.p).

Teste do comportamento agressivo do residente

Os sete indivíduos que foram selecionados para o grupo residente, tiveram seu comportamento agressivo analisado para confirmar sua confiabilidade. Este comportamento é determinado pela exibição de piloereção e postura de dominância em situação de confronto. Após um período de 45 dias de treino, composto de sessões de teste com intervalos de 48 h, apenas aqueles animais que apresentaram latência e número de mordidas com baixa variação em sessões recentes foram utilizados como residentes no protocolo de derrota social.

Grupo Controle

Os animais do grupo ND (não derrotados) foram manipulados e expostos a uma nova caixa pelo mesmo tempo que o grupo de intrusos ao qual correspondem. Eles eram da mesma linhagem e idade que os animais do grupo intruso.

Episódios intermitentes e breves de derrota social

A derrota social consiste na confrontação entre dois ratos machos. A fêmea foi retirada da caixa do residente cerca de uma hora antes da realização do protocolo, que se divide em três fases: Pré-Confrontação, Confrontação, e Pós-Confrontação.

Durante a fase de Pré-Confrontação, o intruso foi colocado na caixa do residente, protegido dentro de sua própria caixa, durante 10 minutos. Terminado esse tempo, iniciou-se a fase de Confrontação, na qual o intruso foi recolocado na caixa do residente sem proteção. Essa fase se encerrava quando o intruso apresentava postura de submissão supinada durante 6 segundos consecutivos, ou 5 minutos após a primeira mordida do residente. Passado esse tempo, o intruso era recolocado na sua caixa para a última fase, na qual ele permanecia protegido por mais 10 minutos dentro da caixa do residente. Cada animal do grupo intruso passou por esse protocolo quatro vezes, com 72 horas de intervalo ao longo de 10 dias.

Análise dos comportamentos agressivo-defensivos

As confrontações foram gravadas por 25 minutos. Um observador treinado e cego quanto ao tratamento aplicado, analisou os comportamentos da primeira e última sessões, da fases de confrontação como visto em (J.M. Koolhaas, Schuurman, & Wiepkema, 1980; J.M. Koolhaas et al., 2013). O software utilizado foi o RATOS (elaborado pelo próprio grupo de pesquisa em 2013) e um nível de confiabilidade intraobservador foi atingido (Coeficiente de Correlação Intraclasse $r = 0,92$). Os dados considerados relevantes para computar os escores comportamentais foram de latência, frequência e duração. Os comportamentos utilizados para montar o escore ofensivo (postura *upright*, ataque *clinch*, e submeter), o escore defensivo (postura submissa, fuga, *freezing*, postura *upright*) e de exploração social (investigar, *sniffing* genital, e social *grooming*) estão descritos na tabela abaixo (Tabela 1), e foram baseados em no trabalho de Koolhaas e colaboradores (2013).

Tabela 1: Definições de comportamentos agonísticos observados em intrusos machos durante fase de confrontação da derrota social.

Comportamento	Descrição
Ataque <i>clinch</i>	Cambalhotas, pulos e mordidas por parte de ambos os animais, muito próximos fisicamente;
Fuga <i>Freezing</i>	Fugir do oponente; Intruso se agacha com as costas arqueadas, ocasionalmente com piloereção; não se movimenta exceto para respirar e analisar o ambiente em volta, movendo apenas a cabeça;
Keep down Afastar-se	Segurar o oponente contra o substrato; Qualquer movimento que aumente a distância entre os dois animais;
Rearing	Ficar em postura bípede, sobre as patas traseiras;
Cheirar ambiente	Movimentos rápidos com os bigodes e nariz sobre o substrato, sem locomoção;
Cheirar genitais	Cheirar a região anogenital do oponente;
Investigar	Movimentos de cheirar direcionados ao pelo do oponente, exceto na região anogenital;
Grooming social	Fazer <i>grooming</i> no oponente, ocasionalmente puxando o pelo ou mordiscando (<i>grooming</i> agressivo);
Postura submissa	Deitar de costas com a barriga exposta ao oponente como resultado de um <i>keep down</i> ; podem haver movimentos de chute com as patas traseiras;
Postura upright	<i>Rearing</i> em reação a aproximação do oponente, voltados um em direção ao outro; podem segurar o pelo do peito ou das patas frontais do outro. O macho dominante geralmente apresenta piloereção; ambos podem ter os olhos semi-cerrados;

Definições baseadas em Koolhaas et al. (1980; 2013)

Coleta de amostras

24 horas após o término do protocolo de derrota social, os grupos de animais intrusos e controle foram anestesiados (10mg/kg de xilazina e 100mg/kg de quetamina, via intraperitoneal). Esses animais foram eutanasiados por exsanguinação após a anestesia, e 4ml de sangue foram coletados através de punção em tubos sem anticoagulante. Estes tubos foram centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm a uma temperatura de 4°C. O soro foi então separado em eppendorfs e armazenado a -80°C até o momento da realização dos testes. Não foi possível coletar sangue de um dos animais do grupo controle.

Determinação dos níveis de corticosterona e IGF-1

Os níveis de corticosterona foram determinados por um ensaio imunoenzimático competitivo (ELISA competitivo), com um kit comercial da marca Enzo Life-Sciences. O ensaio foi executado conforme as instruções do fabricante.

Os níveis de IGF-1 foram determinados por ELISA direto, com um kit comercial da marca Boster Immunoleader. O ensaio foi executado conforme as instruções do fabricante.

Análises Estatísticas

Foi utilizado o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição das amostras. As inferências estatísticas para os resultados dos testes ELISA foram feitas utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney, e as correlações com os comportamentos foram feitas através da correlação de Pearson. As estratégias de *coping* foram analisadas utilizando Análise de Agrupamento (*Cluster*), as comparações entre escores comportamentais foram realizadas utilizando teste T de Student. O software utilizado foi SPSS versão 18 para Windows.

Considerações éticas

Os procedimentos para confrontação social foram de mínima intensidade. O comportamento agressivo observado é típico da espécie, não sendo induzido por lesão ou administração de droga anteriormente no animal residente. Nenhum efeito adverso, estressor ou desconfortante é de maior intensidade que os enfrentados por animais comumente armazenados em grupos. Nestes grupos a ocorrência de agressão é um comportamento previsto. Os procedimentos foram acompanhados pelo veterinário responsável pela Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os procedimentos seguiram as recomendações da Resolução Normativa N. 12 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA) e da Resolução normativa N. 13 (Diretrizes da Prática de Eutanásia), ambas publicadas em 2013 pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), da Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008 e do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 2011).

Resultados

Dosagem de IGF-1 sérico

Não houve diferença significativa entre as medianas do grupo controle (N= 9) e do grupo estressado (N= 10), como visto na figura 1. No grupo controle, a mediana foi de 3,15 ng/mL (mínimo = 2,82; máximo = 3,49). No grupo intruso, a mediana foi de 3,44 ng/mL (mínimo = 2,65; máximo = 6,17).

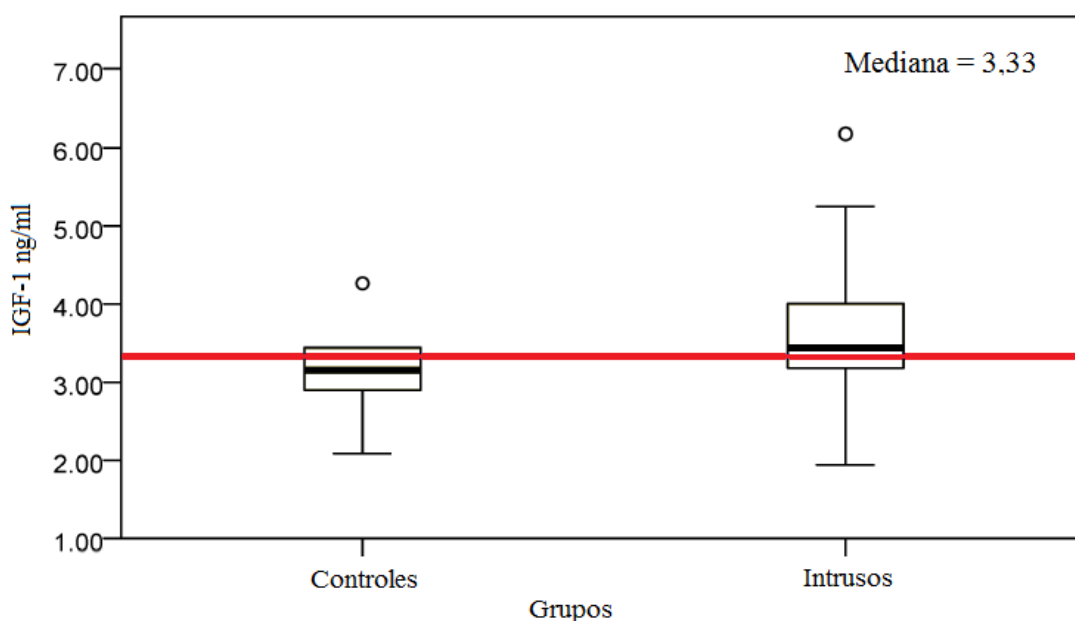


Figura 1: Dosagem de IGF-1 nos grupos controle e intruso. Dados obtidos a partir do teste Mann-Whitney para amostras independentes, com intervalo de confiança de 95%.

Dosagem de corticosterona sérica

O grupo controle (N= 9) apresentou maiores níveis de corticosterona, com uma mediana maior do que o grupo estressado (N= 10), sendo esta diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney U= 6,343; $p < 0,05$ teste bilateral). No grupo controle, a mediana foi de 49,44 ng/mL (mínimo = 16,31; máximo = 128,92). Já no grupo intruso, a mediana foi de 31,82 ng/mL (mínimo = 8,14; máximo = 61,37), como visto na figura 2.

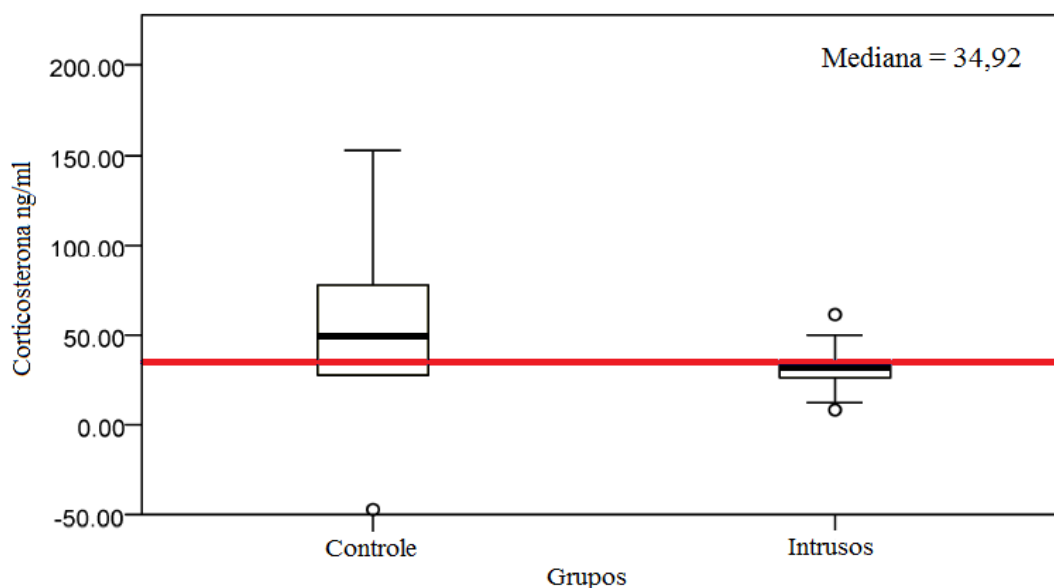


Figura 2: Dosagem de corticosterona nos grupos controle e intruso. Dados obtidos a partir do teste Mann-Whitney para amostras independentes, com intervalo de confiança de 95%.

Observação dos comportamentos

A observação dos comportamentos da primeira e última sessões revelou que a média de mordidas sofrida pelos intrusos foi de duas (variando de 0 a 8). Em 28 das 40 sessões observadas ocorreu derrota por submissão e, como descrito anteriormente, as sessões em que o intruso não se submeteu foram terminadas 5 minutos após a primeira mordida do residente (duração média das sessões foi de 6 ± 4 min.).

Os comportamentos utilizados para calcular os escores comportamentais são apresentados na tabela 2, bem como os escores finais. Existe uma relação forte dentro das medidas do próprio comportamento (i.e. frequência e duração), e com o tempo de duração da sessão ($r = 0,667 - 0,989$, $p < 0,05$). A análise de agrupamentos das primeiras sessões revelou dois grupos distintos, um apresentando *coping* ativo e outro apresentando *coping* proativo. As diferenças se mostraram significativas entre os escores comportamentais ofensivo ($t(18) = 10,488$, $p < .0001$) e defensivo ($t(4,375) = 5,242$, $p < .05$). Contudo, essa diferença não se repetiu na quarta sessão.

Escores comportamentais e dosagens moleculares

Os escores comportamentais foram corrigidos para o tempo de duração da sessão (multiplicou-se o valor do escore pelo tempo de duração da confrontação). Os níveis mais altos de corticosterona correlacionaram-se a escore ofensivo mais alto na primeira sessão ($r = .677$, $p < .05$), e escore social mais baixo na última sessão ($r = -.681$, $p < .05$).

Tabela 2: Características comportamentais de intrusos com *coping* proativo e reativo

	Primeira sessão SD				Quarta Sessão SD	
	<i>Coping</i> proativo		<i>Coping</i> reativo		Frequência	Duração ^a
	Frequência	Duração ^a	Frequência	Duração ^a		
Latência de submissão	---	155,40 ±274,62	---	105,27 ±121,73	---	146,40 ±149,61
Submissão	0,4 ±0,55	1,40 ±1,95	1,07 ±0,96	5,20 ±5,68	1,95 ±2,11	6,50 ±5,93
Ataque <i>clinch</i>	1,20 ±1,79	4,40 ±9,84	1,73 ±1,53	0,53 ±0,92	2,60 ±3,47	0,85 ±1,09
Fuga	4,80 ±3,83	1,20 ±2,17	3,27 ±6,13	1,13 ±2,23	0,60 ±1,54	0,75 ±1,45
<i>Freezing</i>	0,80 ±1,79	4,60 ±10,29	0,73 ±1,91	8,47 ±28,78	0,05 ±0,22	17,10 ±58,44
<i>Keep down</i>	0,40 ±0,89	3,40 ±7,60	0,07 ±0,26	0,07 ±0,26	24,80 ±15,01	0,05 ±0,22
Afastar-se	36,60 ±8,85	33,60 ±7,89	29,40 ±15,45	25,40 ±13,17	18,55 ±16,76	22,35 ±13,65
<i>Rearing</i>	23,40 ±4,98	36,80 ±10,57	18,73 ±13,05	32,40 ±25,11	18,65 ±19,38	34,50 ±37,16
Cheirar ambiente	28,00 ±17,22	67,20 ±50,34	24,47 ±18,59	59,47 ±56,32	0,60 ±1,39	36,70 ±51,88
Cheirar genitais	0,80 ±1,10	0,40 ±0,55	0,53 ±0,92	0,27 ±0,59	1,75 ±1,68	0,75 ±2,67
Investigar	4,60 ±3,29	6,40 ±4,93	3,40 ±4,22	4,40 ±3,94	0,00 ±0,00	2,80 ±3,07
<i>Grooming</i> social	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,07 ±0,26	0,07 ±0,26	10,25 ±8,01	0,00 ±0,00
Postura <i>upright</i>	43,80 ±12,44	102,40 ±79,08	11,07 ±8,43	13,93 ±14,13	1,95 ±2,11	15,25 ±14,58

Nota: valores expressos em média e desvio padrão;

^a duração expressa em segundos;

	Intrusos			Controles
	Primeira sessão SD		Quarta Sessão SD	
	Animais Agressivos	Animais não Agressivos		
Escore Ofensivo^a:	45,40±11,46**	12,87±8,04	12,25±7,51	---
Escore Exploração Social^a:	28,80±17,40	25,07±18,71	19,25±20,26	---
Escore Defensivo^a:	109,60±79,60*	28,73±30,46	39,60±59,94	---
IGF-1^b:	---	---	3,44 (2,65-6,17)	3,15 (2,82-3,49)
Corticoesterona^b:	---	---	31,82 (8,14-61,37)*	49,44 (16,31-128,92)

^aValores expressos em média e desvio padrão (M ± DP);

^bValores expressos em ng/mL; mediana (mínimo - máximo);

*p<0,05

**P<0,001

Discussão

O objetivo do nosso estudo era determinar a relação entre a exposição ao estresse social, por meio de um protocolo de derrota social, e o sistema endócrino. Escolhemos medir corticosterona por seu papel essencial dentro do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, cuja regulação da resposta ao estresse social ainda deve ser explorada. O IGF-1 já mostrou ser alterado por este tipo de estresse (Burgdorf et al., 2006), mas apenas em medidas centrais, não periféricas. Uma vez que este é um modelo de estresse psicológico, escolhemos avaliar os comportamentos apresentados pelos animais, e estudar a possível influência de estilos de *coping* nas respostas fisiológicas.

Mostramos que existe uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis de corticosterona dos ratos do grupo controle e do grupo intruso, mesmo que ela tenha sido inversa ao esperado. Existe também uma relação entre estes mesmos níveis e os escores de comportamento agressivo (positiva) e de exploração social (negativa). A ausência de diferença significativa entre os grupos controle e intruso na quantidade de IGF-1 circulante pode indicar que esse fator de crescimento não é diretamente afetado pelo estresse.

Dosagem de IGF-1 sérica

Os níveis de IGF-1 encontrados em nossas medidas parecem estar de acordo com a literatura (X. Xia et al., 2013; S. J. Kim et al., 2013) no que se refere a valores encontrados com testes de ELISA. No soro, 95% deste fator de crescimento encontram-se ligado a um complexo com a IGFBP-3 (*Insulin-like growth factor binding protein 3*). Por isso ele é mais frequentemente dosado em preparados de tecido, tanto cerebral quanto muscular (J. Tirapegui et al., 2012; Burgdorf et al., 2010).

O estudo de Burgdorf e colaboradores buscou elucidar os mecanismos por trás dos estados positivos que auxiliam na resiliência de indivíduos contra depressão e ansiedade. Através de medições de vocalizações, foi constatado que comportamentos de brincadeira *rough-and-tumble* geram vocalizações hedônicas (faixa dos 50 kHz) (estabelecido por Burgdorf & Panksepp, 2006), enquanto que o protocolo de derrota social diminuía essas vocalizações. A quantidade de IGF-1 foi dosada no cérebro de ratos após sessões de derrota social e após sessões de brincadeira, e demonstrou-se que os níveis centrais de IGF se encontram mais elevados no segundo grupo. Essas informações, aliadas com dados da literatura que mostram que injeções de IGF-1 auxiliam na diminuição de sintomas depressivos (Stouthart et al., 2003; Lasaite et al., 2004), sugerem que esse fator de crescimento está envolvido na geração de estados positivos no cérebro. No nosso estudo não houve alteração nos valores do IGF-1 no

grupo de intrusos comparados aos controles. Este resultado sugere que IGF-1 periférico livre na corrente sanguínea talvez não esteja envolvido diretamente na resposta ao estresse.

Dosagem de Corticosterona sérica

As catecolaminas e os glicocorticoides são grupos de moléculas extensivamente estudadas em modelos de estresse (McEwan, 2008). A secreção de corticosterona é primariamente regulada pelo eixo HPA, e existe um *feedback* negativo exercido por parte do hormônio circulante sobre receptores de glicocorticoides (Chen et al., 2012). Esse mecanismo é influenciado por vários outros hormônios do estresse, tais como CRH, ACTH, vasopressina, e também, é claro, pela modalidade do estresse (moderado ou intenso, agudo ou crônico) (Pace & Spencer, 2005).

Não foi feita uma linha de base de corticosterona para este estudo, portanto os níveis de corticosterona se relacionam apenas com a manipulação final dos animais. Os dados encontrados neste estudo mostram níveis de corticosterona significativamente mais elevados no grupo controle em comparação com o grupo que sofreu derrota social. Isto não era o esperado, pois a literatura sugere que não há habituação para esse tipo de estresse (Covington III & Miczek, 2005; Barnum et al., 2007). Contudo, uma possível explicação é que o protocolo de estresse tenha levado a uma disfunção do eixo HPA nos intrusos, que pode ter levado a uma falha de regulação desta via.

Correlações entre comportamento e medidas moleculares

Os escores comportamentais deste estudo foram feitos com base no trabalho de Koolhaas e colegas (1980; 2013). Os estudos originais baseiam os escores em observações completas do comportamento dos animais numa interação intruso-residente, e os agrupavam em cinco categorias: ofensivo, exploração social, exploração não-social, inatividade e *grooming* (De Boehr & Koolhaas, 2003). Ao utilizar apenas três categorias, como no presente estudo, podemos observar um equilíbrio entre os escores; quanto mais tempo um animal passa realizando um determinado tipo de comportamento, menos tempo ele passará realizando outra categoria de escore. Isso é evidenciado pela relação positiva entre os níveis de corticosterona e o maior tempo gasto com comportamentos agressivos e pela relação negativa com o tempo gasto em comportamentos do tipo exploração social. O porquê de essas diferenças terem se apresentado de forma significativa em sessões diferentes (respectivamente, primeira e última) ainda não foi elucidado.

Por meio destes dados podemos concluir que o estresse social intermitente possui um efeito profundo sobre as diferenças individuais, chegando ao ponto de nivelar padrões de comportamento ao longo do tempo. Esses comportamentos estão relacionados à quantidade de corticosterona no sangue, que é um indicador de regulação do eixo HPA, e que essa regulação também é afetada pelo tipo de estresse sofrido pelo indivíduo. Nossos dados também indicam que o IGF-1 circulante não está diretamente relacionado com o estresse.

Referências

- Anderson, M. F., Åberg, M. A. ., Nilsson, M., & Eriksson, P. S. (2002). Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain. *Developmental Brain Research*, *134*(1–2), 115–122. doi:10.1016/S0165-3806(02)00277-8
- Barnum, C. J., Blandino Jr., P., & Deak, T. (2007). Adaptation in the corticosterone and hyperthermic responses to stress following repeated stressor exposure. *Journal of Neuroendocrinology*, *19*(8), 632–642. doi:10.1111/j.1365-2826.2007.01571.x
- Bartolomucci, A., Palanza, P., Costoli, T., Savani, E., Laviola, G., Parmigiani, S., & Sgoifo, A. (2003). Chronic psychosocial stress persistently alters autonomic function and physical activity in mice. *Physiology & Behavior*, *80*(1), 57–67. doi:10.1016/S0031-9384(03)00209-9
- Blanchard, R. J., McKittrick, C. R., & Blanchard, D. C. (2001). Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior*, *73*(3), 261–271. doi:10.1016/S0031-9384(01)00449-8
- Burgdorf J., Panksepp J. (2006). The neurobiology of positive emotions. *Neuroscience Biobehavior Review* *30*:173–187.
- Chen, P., Fan, Y., Li, Y., Sun, Z., Bisette, G., & Zhu, M.-Y. (2012). Chronic social defeat up-regulates expression of norepinephrine transporter in rat brains. *Neurochemistry International*, *60*(1), 9–20. doi:10.1016/j.neuint.2011.11.003.
- Covington 3rd, H., & Miczek, K. (2005). Intense cocaine self-administration after episodic social defeat stress, but not after aggressive behavior: dissociation from corticosterone activation. *Psychopharmacology*, *183*(3), 331–340. doi:10.1007/s00213-005-0190-5
- De Boer, S. F., van der Vegt, B. J., & Koolhaas, J. M. (2003). Individual variation in aggression of feral rodent strains: a standard for the genetics of aggression and violence? *Behavior Genetics*, *33*(5), 485–501. doi:10.1023/A:1025766415159
- Fuchs, E., Flugge, G., & Czeh, B. (2006). Remodeling of neuronal networks by stress. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, *11*, 2746–2758.
- Heck, S., Lezoualc'h, F., Engert, S., & Behl, C. (1999). Insulin-like Growth Factor-1-mediated Neuroprotection against Oxidative Stress Is Associated with Activation of Nuclear Factor κ B. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(14), 9828–9835. doi:10.1074/jbc.274.14.9828
- Julio Tirapegui, Sandra Maria Lima Ribeiro, Ivanir Santana de Oliveira Pires and Marcelo Macedo Rogero. Effects of Two Different Levels of Dietary Protein on Body Composition and Protein Nutritional Status of Growing Rats. *Nutrients* 2012, *4*, 1328-1337; doi:10.3390/nu4091328
- Kinn, A. M., Grønli, J., Fiske, E., Kuipers, S., Ursin, R., Murison, R., & Portas, C. M. (2008). A double exposure to social defeat induces sub-chronic effects on sleep and open field behaviour in rats. *Physiology & Behavior*, *95*(4), 553–561. doi:10.1016/j.physbeh.2008.07.031

- Kole, M. H. P., Costoli, T., Koolhaas, J. M., & Fuchs, E. (2004). Bidirectional shift in the cornu ammonis 3 pyramidal dendritic organization following brief stress. *Neuroscience*, 125(2), 337–347. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.02.014
- Koolhaas, J., Korte, S., de Boer, S. F., Van Der Vegt, B., Van Reenen, C., Hopster, H., Blokhuis, H. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(7), 925–935. doi:10.1016/S0149-7634(99)00026-3
- Koolhaas, J. M., Coppens, C. M., de Boer, S. F., Buwalda, B., Meerlo, P., & Timmermans, P. J. A. (2013). The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (77). doi:10.3791/4367
- Koolhaas, J. M., Schuurman, T., & Wiepkema, P. R. (1980). The organization of intraspecific agonistic behaviour in the rat. *Progress in Neurobiology*, 15(3), 247–268.
- Lasaitė L., Bunevicius R., Lasiene D., Lasas L. (2004). Psychological functioning after growth hormone therapy in adult growth hormone deficient patients: endocrine and body composition correlates. *Medicina (Kaunas)* 40:740–744.
- McEwen, B. S. (2002). The neurobiology and neuroendocrinology of stress: Implications for post-traumatic stress disorder from a basic science perspective. *Psychiatric Clinics of North America*, 25(2), 469–494. doi:10.1016/S0193-953X(01)00009-0
- McEwen, B. S. (2008). Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology*, 583(2–3), 174–185. doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.071
- Meerlo, Overkamp, Daan, Van Den Hoofdakker RH, & Koolhaas. (1996). Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 1(1), 21–32.
- Miczek, K. A., Yap, J. J., & Covington III, H. E. (2008). Social stress, therapeutics and drug abuse: Preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacology & Therapeutics*, 120(2), 102–128. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.07.006
- Pace, T. W. W., & Spencer, R. L. (2005). Disruption of mineralocorticoid receptor function increases corticosterone responding to a mild, but not moderate, psychological stressor. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 288(6), E1082–1088. doi:10.1152/ajpendo.00521.2004
- Pardon, M.-C., Kendall, D. A., Pérez-Díaz, F., Duxon, M. S., & Marsden, C. A. (2004). Repeated sensory contact with aggressive mice rapidly leads to an anticipatory increase in core body temperature and physical activity that precedes the onset of aversive responding. *European Journal of Neuroscience*, 20(4), 1033–1050. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03549.x
- Paul, E. D., Hale, M. W., Lukkes, J. L., Valentine, M. J., Sarchet, D. M., & Lowry, C. A. (2011). Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Physiology & Behavior*, 104(2), 272–282. doi:10.1016/j.physbeh.2011.01.006
- Raab, A., Dantzer, R., Michaud, B., Mormede, P., Taghzouti, K., Simon, H., & Le Moal, M. (1986). Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and

aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. *Physiology & Behavior*, 36(2), 223–228. doi:10.1016/0031-9384(86)90007-7

Razzoli, M., Roncari, E., Guidi, A., Carboni, L., Arban, R., Gerrard, P., & Bacchi, F. (2006). Conditioning properties of social subordination in rats: Behavioral and biochemical correlates of anxiety. *Hormones and Behavior*, 50(2), 245–251. doi:10.1016/j.yhbeh.2006.03.007

Remie, R. (2000). Chapter 27 - Experimental Surgery. In Georg J Krinke (Ed.), *The Laboratory Rat* (pp. 523–568). London: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124264007500662>

Stouthart PJ, Deijen JB, Roffel M, Delemarre-van de Waal HA (2003) Quality of life of growth hormone (GH) deficient young adults during discontinuation and restart of GH therapy. *Psychoneuroendocrinology* 28:612–626.

Sgoifo, A., Costoli, T., Meerlo, P., Buwalda, B., Pico'-Alfonso, M. A., De Boer, S., ... Koolhaas, J. (2005). Individual differences in cardiovascular response to social challenge. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(1), 59–66. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.07.001

Soo-Jeong Kim, Anes Ju, Seul-Gi Lim, Dai-Jin Kim Chronic alcohol consumption, type 2 diabetes mellitus, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and growth hormone (GH) in ethanol-treated diabetic rats. *Life Sciences* 93 (2013) 778–782

Tornatzky, W., & Miczek, K. A. (1994). Behavioral and autonomic responses to intermittent social stress: differential protection by clonidine and metoprolol. *Psychopharmacology*, 116(3), 346–356. doi:10.1007/BF02245339

Trejo, J. L., Carro, E., & Torres-Alemán, I. (2001). Circulating Insulin-Like Growth Factor I Mediates Exercise-Induced Increases in the Number of New Neurons in the Adult Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 21(5), 1628–1634.

Xia X, Wang X, Li Q, Li N, Li J (2013) Essential Amino Acid Enriched High-Protein Enteral Nutrition Modulates Insulin-Like Growth Factor-1 System Function in a Rat Model of Trauma-Hemorrhagic Shock. *PLoS ONE* 8(10): e77823. doi:10.1371/journal.pone.0077823.

Wilkins, A., Chandran, S., & Compston, A. (2001). A role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. *Glia*, 36(1), 48–57. doi:10.1002/glia.1094

4. CONCLUSÃO

Com este trabalho, concluímos que o protocolo de derrota social afeta profundamente o modo como indivíduos respondem ao estresse, como indicado pelo desaparecimento das diferenças entre os estilos de *coping* ao longo das sessões. Os escores comportamentais revelam que quanto mais tempo os animais passaram realizando comportamentos do tipo agressivo, menos tempo eles passaram realizando exploração social, e ambos encontram-se relacionados com a quantidade de corticosterona circulante.

Apesar de surpreendente, o fato de que o grupo controle apresentou uma quantidade significativamente maior de corticosterona do que o grupo intruso sugere que o estresse sofrido pelos animais pode ter sido suficiente para causar uma desregulação do eixo HPA, responsável por controlar a quantidade desse e de vários outros hormônios na corrente sanguínea, incluindo hormônios relacionados com a resposta ao estresse, como ACTH e CRH.

A ausência de diferença significativa entre os dois grupos no que se refere à quantidade de IGF-1 é um indicativo de que esse fator de crescimento não está diretamente relacionado com a resposta ao estresse.

Durante a realização deste trabalho, o grupo também estabeleceu e padronizou o treinamento dos residentes para desenvolver comportamento agressivo, e assim, garantir que não ocorressem encontros em que o intruso não sofresse um estresse por derrota, o que é possível quando se lida com uma linhagem mais dócil como a Wistar (Koolhaas et al., 2013).

5. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para esta linha de pesquisa nós temos a realização de um *challenge* com CRH, para investigar o efeito do protocolo sobre o eixo HPA em um nível mais alto de regulação; uma avaliação de linha de base de corticosterona para averiguar o efeito de diferenças individuais; e a dosagem de IGF-1 a nível central para eliminar a interferência da IGFBP-3. Além disso, o grupo também pretende executar uma versão de exposição crônica a derrota social.

REFERÊNCIAS

- Blanchard, R. J., McKittrick, C. R., & Blanchard, D. C. (2001). Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior*, *73*(3), 261–271. doi:10.1016/S0031-9384(01)00449-8
- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Beinfeld, M. C., Panksepp, J., & Moskal, J. R. (2010). Uncovering the molecular basis of positive affect using rough-and-tumble play in rats: a role for insulin-like growth factor I. *Neuroscience*, *168*(3), 769–777. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.03.045
- Buwalda, B., Stubbendorff, C., Zickert, N., & Koolhaas, J. M. (2013). Adolescent social stress does not necessarily lead to a compromised adaptive capacity during adulthood: A study on the consequences of social stress in rats. *Neuroscience*, *249*, 258–270. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.050
- Carboni, L., Piubelli, C., Pozzato, C., Astner, H., Arban, R., Righetti, P. G., Domenici, E. (2006). Proteomic analysis of rat hippocampus after repeated psychosocial stress. *Neuroscience*, *137*(4), 1237–1246. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.10.045
- Covington 3rd, H., & Miczek, K. (2005). Intense cocaine self-administration after episodic social defeat stress, but not after aggressive behavior: dissociation from corticosterone activation. *Psychopharmacology*, *183*(3), 331–340. doi:10.1007/s00213-005-0190-5
- Duclot, F., & Kabbaj, M. (2013). Individual differences in novelty seeking predict subsequent vulnerability to social defeat through a differential epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor expression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(27), 11048–11060.
- Fanous, S., Terwilliger, E. F., Hammer Jr., R. P., & Nikulina, E. M. (2011). Viral depletion of VTA BDNF in rats modulates social behavior, consequences of intermittent social defeat stress, and long-term weight regulation. *Neuroscience Letters*, *502*(3), 192–196. doi:10.1016/j.neulet.2011.07.043
- Funk, D., Li, Z., & Lê, A. D. (2006). Effects of environmental and pharmacological stressors on c-fos and corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain: Relationship to the reinstatement of alcohol seeking. *Neuroscience*, *138*(1), 235–243. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.10.062
- Furay, A. R., McDevitt, R. A., Miczek, K. A., & Neumaier, J. F. (2011). 5-HT1B mRNA expression after chronic social stress. *Behavioural Brain Research*, *224*(2), 350–357. doi:10.1016/j.bbr.2011.06.016
- Grunewald, M., Johnson, S., Lu, D., Wang, Z., Lomber, G., Albert, P. R., Ou, X.-M. (2012). Mechanistic role for a novel glucocorticoid-klf11 (tieg2) protein pathway in stress-induced monoamine oxidase a expression. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(29), 24195–24206. doi:10.1074/jbc.M112.373936
- Kanarik, M., Alttoa, A., Matrov, D., Kõiv, K., Sharp, T., Panksepp, J., & Harro, J. (2011). Brain responses to chronic social defeat stress: effects on regional oxidative metabolism as a function of a hedonic trait, and gene expression in susceptible and resilient rats. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *21*(1), 92–107. doi:10.1016/j.euroneuro.2010.06.015

- Koolhaas, J., Korte, S., de Boer, S. F., Van Der Vegt, B., Van Reenen, C., Hopster, H., Blokhuis, H. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *23*(7), 925–935. doi:10.1016/S0149-7634(99)00026-3
- Kroes, R. A., Burgdorf, J., Otto, N. J., Panksepp, J., & Moskal, J. R. (2007). Social defeat, a paradigm of depression in rats that elicits 22-khz vocalizations, preferentially activates the cholinergic signaling pathway in the periaqueductal gray. *Behavioural Brain Research*, *182*(2), 290–300. doi:10.1016/j.bbr.2007.03.022
- Marini, F., Pozzato, C., Andreatta, V., Jansson, B., Arban, R., Domenici, E., & Carboni, L. (2006). Single exposure to social defeat increases corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus. *Brain Research*, *1067*(1), 25–35. doi:10.1016/j.brainres.2005.10.002
- Miczek, K. A. (1979). A new test for aggression in rats without aversive stimulation: Differential effects of d-amphetamine and cocaine. *Psychopharmacology*, *60*(3), 253–259. doi:10.1007/BF00426664
- Miczek, K. A., Yap, J. J., & Covington III, H. E. (2008). Social stress, therapeutics and drug abuse: Preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacology & Therapeutics*, *120*(2), 102–128. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.07.006
- Miczek, K. A., Nikulina, E. M., Shimamoto, A., & Covington, H. E. (2011). Escalated or suppressed cocaine reward, tegmental BDNF and accumbal dopamine due to episodic vs. continuous social stress in rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(27), 9848–9857. doi:10.1523/JNEUROSCI.0637-11.2011
- Nocjar, C., Zhang, J., Feng, P., & Panksepp, J. (2012). The social defeat animal model of depression shows diminished levels of orexin in mesocortical regions of the dopamine system, and of dynorphin and orexin in the hypothalamus. *Neuroscience*, *218*, 138–153. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.033
- Olivares, E. L., Silva-Almeida, C., Pestana, F. M., Sonoda-Côrtes, R., Araujo, I. G., Rodrigues, N. C., Rocha, F. F. (2012). Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. *Neuropharmacology*, *62*(1), 446–456. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.035
- Paul, E. D., Hale, M. W., Lukkes, J. L., Valentine, M. J., Sarchet, D. M., & Lowry, C. A. (2011). Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Physiology & Behavior*, *104*(2), 272–282. doi:10.1016/j.physbeh.2011.01.006
- Raab, A., Dantzer, R., Michaud, B., Mormede, P., Taghzouti, K., Simon, H., & Le Moal, M. (1986). Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. *Physiology & Behavior*, *36*(2), 223–228. doi:10.1016/0031-9384(86)90007-7
- Razzoli, M., Carboni, L., & Arban, R. (2009). Alterations of behavioral and endocrinological reactivity induced by 3 brief social defeats in rats: Relevance to human psychopathology. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(9), 1405–1416. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.04.018

- Razzoli, M., Carboni, L., Guidi, A., Gerrard, P., & Arban, R. (2007). Social defeat-induced contextual conditioning differentially imprints behavioral and adrenal reactivity: A time-course study in the rat. *Physiology & Behavior*, *92*(4), 734–740. doi:10.1016/j.physbeh.2007.05.063
- Sternberg, E. M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, *6*(4), 318–328. doi:10.1038/nri1810
- Tornatzky, W., & Miczek, K. A. (1993). Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiology & Behavior*, *53*(5), 983–993. doi:10.1016/0031-9384(93)90278-N
- Tornatzky, W., & Miczek, K. A. (1994). Behavioral and autonomic responses to intermittent social stress: differential protection by clonidine and metoprolol. *Psychopharmacology*, *116*(3), 346–356. doi:10.1007/BF02245339
- Turner, C. A., Calvo, N., Frost, D. O., Akil, H., & Watson, S. J. (2008). The fibroblast growth factor system is downregulated following social defeat. *Neuroscience Letters*, *430*(2), 147–150. doi:10.1016/j.neulet.2007.10.041