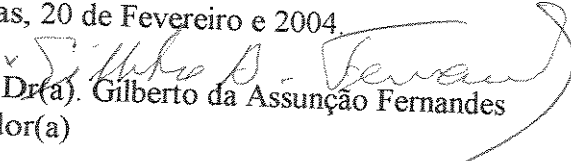


CÍNTIA HELOÍSA CORRÊA PILENSO

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Cintia Heloísa Corrêa Pilenso**.

Campinas, 20 de Fevereiro e 2004.

Prof(a). Dr(a).  Gilberto da Assunção Fernandes
Orientador(a)

**EFEITOS DA LESÃO DO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA
SOBRE A RESPOSTA A DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE
NO EIXO HIPOTÁLAMO - HIPÓFISE - ADRENAL**

CAMPINAS

2004

706760

CÍNTIA HELOÍSA CORRÊA PILENSO

***EFEITOS DA LESÃO DO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA
SOBRE A RESPOSTA A DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE
NO EIXO HIPOTÁLAMO - HIPÓFISE - ADRENAL***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto da Assunção Fernandes

CAMPINAS

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNIDMP
	P642e
V	EX
TOMBO BC/	59583
PROC.	6. 117-04
C	☐
D	☒
PREÇO	24,00
DATA	
Nº CPD	

B, b 2d 323363

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

P642e

Pilenso, Cíntia Heloísa Corrêa

Efeitos da lesão do núcleo central da amígdala sobre a resposta a diferentes tipos de estresse no eixo hipotálamo – hipófise - adrenal / Cíntia Heloísa Corrêa Pilenso. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Gilberto da Assunção Fernandes

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Corticosterona. 2. Estresse. 3. *Amígdala. I. Gilberto da Assunção Fernandes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof. Dr. Gilberto da Assunção Fernandes

Membros:

1. Profa. Dra. Margaret de Castro

2. Profa. Dra. Silvana Denofre Carvalho

3. Prof. Dr. Gilberto da Assunção Fernandes

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/02/2004

DEDICATÓRIA

À minha querida tia Lila, que não está mais aqui, mas sempre torceu e sei que continua torcendo por mim. Obrigada por ter me ensinado tantas coisas!

Aos meus queridos pais Júlio e Rosa, pelo apoio irrestrito que sempre me deram no decorrer do meu trabalho e em tudo que faço.

Ao meu namorado Gustavo, pelo amor, dedicação e compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis.

A Deus, pois sem sua força nada seria possível.

Ao meu orientador, Dr. Gilberto, obrigada por me receber em seu laboratório e pela oportunidade de aprender cada dia algo novo, pela sabedoria e exemplo de dedicação à pesquisa científica.

À Dra. Margaret de Castro, pela disponibilidade, paciência e dedicação na revisão de meu trabalho e pela preciosa ajuda na etapa final da dissertação.

À Dra. Silvana Denofre Carvalho, pela grande ajuda, boa vontade em me receber e pelas ótimas sugestões.

Aos queridos Roberto e Jamilson, do laboratório de Fisiologia e Cirurgia Experimental. Obrigada pela preciosa ajuda, bom humor e amizade, que tornaram os momentos lá vividos especialmente agradáveis.

À supervisora e amiga Laurione, pela paciência e ajuda imprescindível no exame de Qualificação e elaboração final da tese.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Fisiologia Clínica do HC, Rosa, David, Floriza, Dorival, Marlene, pela amizade, paciência e compreensão durante o desenvolvimento do trabalho.

Às minhas colegas de Mestrado Mariza, Renata e Silmara, pelo ótimo tempo de convivência e pela amizade.

Aos amigos Lisandra, Sandra, Regina, Alexandre, Valéria, Gisa, Hilda, Helen, Conceição, Cláudio e todos os outros companheiros de trabalho e plantões, obrigada pelo apoio e amizade.

À minha querida família e amigos, que sempre me apoiaram em todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que a realização deste trabalho fosse possível.

"Para ser grande, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê tudo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive"

(Fernando Pessoa)

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xv</i>
ABSTRACT.....	<i>xvii</i>
INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1 - Animais.....	28
2 - Grupos experimentais.....	28
3 - Procedimento cirúrgico.....	28
4 - Modelos de estresse.....	29
4a- Estresse psicológico.....	29
4b- Estresse físico.....	30
5 - Coleta de sangue.....	30
6 - Medidas realizadas.....	30
7 - Dosagem Hormonal.....	31
7a - Radioimunoensaio da Corticosterona.....	31
8 - Histologia.....	31

9 - Análise estatística.....	32
RESULTADOS.....	33
1 - Pesos corporais.....	34
1.1 - Animais com lesão bilateral do CeA.....	34
1.2 - Animais com cirurgia simulada.....	35
1.3 - Animais-controle.....	36
2 - Pesos das adrenais.....	37
2.1 - Animais com lesão bilateral do CeA.....	38
2.2 - Animais com cirurgia simulada.....	39
2.3 - Animais-controle.....	40
2.4 - Animais lesados e simulados submetidos ao estresse psicológico e físico; animais-controle.....	41
2.5 - Animais lesados, simulados e controles não submetidos a estresse.....	42
3 - Pesos das adeno-hipófises.....	42
3.1 - Animais com lesão bilateral do CeA.....	43
3.2 - Animais com cirurgia simulada.....	44
3.3 - Animais-controle.....	45
3.4 - Animais lesados e simulados submetidos ao estresse psicológico e físico; animais-controle.....	46
3.5 - Animais lesados, simulados e controles não submetidos a estresse.....	47

4 - Concentrações de corticosterona.....	47
4.1 - Animais com lesão bilateral do CeA.....	48
4.2 - Animais com cirurgia simulada.....	49
4.3 - Animais-controle.....	51
4.4 - Animais lesados, simulados e controles submetidos ao estresse psicológico.....	52
4.5 - Animais lesados, simulados e controles submetidos ao estresse físico.....	53
5 - Avaliação Histológica do Núcleo Central da Amígdala (CeA).....	54
DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXO.....	72

ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
Adab	peso absoluto das glândulas adrenais
Adr	peso relativo das glândulas adrenais
AHab	peso absoluto da glândula adeno-hipófise
AHr	peso relativo da glândula adeno-hipófise
Anova	análise de variância
C	ratos-controle
CeA	núcleo central da amígdala
CEMIB	Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Cort-A	concentração de corticosterona antes do estresse
Cort-D	concentração de corticosterona depois do estresse
CRF	fator liberador de corticotrofina
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
DP	desvio padrão da média
EPM	erro padrão da média
FSH	hormônio folículo estimulante
HGH	hormônio de crescimento

HPA	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
LB	ratos submetidos à lesão bilateral do CeA
LH	hormônio luteinizante
NPV	núcleo paraventricular do hipotálamo
Pcf	peso corporal final
Pci	peso corporal inicial
RIE	radioimunoensaio
SE	ratos não submetidos a estresse
SF	ratos submetidos a estresse físico
Sm	ratos simulados
SNC	sistema nervoso central
SP	ratos submetidos a estresse psicológico
X	média

Pág.

- Figura 1** - Corte sagital do cérebro de rato, evidenciando o local escolhido para a execução da lesão eletrolítica..... 55
- Figura 2** - Corte sagital do cérebro de rato, evidenciando o núcleo central da amígdala (CeA), bilateralmente..... 56

	<i>Pág.</i>
Gráfico 1 - Pesos corporais de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA.....	35
Gráfico 2 - Pesos corporais de ratos Wistar simulados.....	36
Gráfico 3 - Pesos corporais de ratos Wistar controles.....	37
Gráfico 4 - Pesos das adrenais de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA.....	38
Gráfico 5 - Pesos das adrenais de ratos Wistar simulados.....	39
Gráfico 6 - Pesos das adrenais de ratos Wistar controles.....	40
Gráfico 7 - Pesos das adrenais de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais.....	41
Gráfico 8 - Pesos das adrenais de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais.....	42
Gráfico 9 - Pesos das adeno-hipófises de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA.....	43
Gráfico 10 - Pesos das adeno-hipófises de ratos Wistar simulados.....	44
Gráfico 11 - Pesos das adeno-hipófises de ratos Wistar controles.....	45
Gráfico 12 - Pesos das adeno-hipófises de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais.....	46

Gráfico 13 -	Pesos das adeno-hipófises de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais.....	47
Gráfico 14 -	Concentrações de corticosterona de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA.....	49
Gráfico 15 -	Concentrações de corticosterona de ratos Wistar simulados.....	50
Gráfico 16 -	Concentrações de corticosterona de ratos Wistar controles.....	52
Gráfico 17 -	Concentrações de corticosterona de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais.....	53
Gráfico 18 -	Concentrações de corticosterona de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais.....	54

RESUMO

O núcleo central da amígdala (CeA) participa dos mecanismos que controlam a resposta ao estresse. A finalidade deste estudo foi avaliar os efeitos da lesão bilateral do CeA sobre a resposta a dois diferentes tipos de estresse: o estresse psicológico de contenção e o estresse físico, através da injeção intraperitoneal de salina hipertônica a 2%. Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso de 200 a 250g, distribuídos em três grupos: controle, simulado e lesado. Neste último, o CeA foi lesado bilateralmente por eletrocoagulação em um aparelho de estereotaxia. Após 14 dias de recuperação, os ratos foram novamente divididos em grupos: estresse psicológico, estresse físico e sem estresse. Ao final desses procedimentos, as amostras de sangue foram coletadas para posterior determinação dos níveis séricos de corticosterona e os animais foram sacrificados por decapitação. Em seguida, as adrenais e adeno-hipófises foram retiradas e pesadas. Os cérebros dos animais lesados foram submetidos à análise histológica para identificar a presença da lesão bilateral do CeA. Observou-se que os pesos corporais dos animais, assim como os pesos das glândulas, não mostraram alterações significativas, provavelmente devido à utilização de modelo de estresse agudo e não crônico. Entretanto, as concentrações de corticosterona, hormônio de estresse, mostraram-se significativamente menores nos ratos lesados que nos controles, nos animais que foram submetidos ao estresse físico. Assim, foi verificado que o estresse físico foi bloqueado pela lesão. Dessa forma, os resultados encontrados sugerem que a lesão bilateral do CeA altera o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e que a injeção intraperitoneal de salina hipertônica está relacionada com os mecanismos desencadeadores de estresse na amígdala.

ABSTRACT

The aim for this study was to investigate the role of central amygdaloid nucleus (CeA) in the modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) in response to physical and psychological stress. Wistar albino rats were lesioned in the CeA and submitted to psychological (immobilization) and physical stress (2% intraperitoneal saline), after 14 days of rest. Afterwards, the blood was collected for corticosterone analysis and the rats were decapitated. At the autopsy, pituitary and adrenals glands were removed, cleaned and weighed. The results showed no influence of the acute stress in gland weights. However, corticosterone levels diminished with bilateral lesions of the CeA in response to physical stress. The results suggest that CeA might be involved in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to physical stress.

INTRODUÇÃO

Em 1936, o cientista e médico austríaco Hans Selye apresentou, pela primeira vez em Biologia, o conceito de estresse. Selye notou que vários de seus pacientes, antes de apresentarem os sintomas típicos de uma determinada doença, mostravam um conjunto de alterações semelhantes, independentes da causa da enfermidade. Dessa forma, conceituou-se o estresse como uma síndrome geral de adaptação, um conjunto de reações sistêmicas que surge quando ocorre uma exposição do organismo a agentes estressores.

Estudando o fenômeno de modo sistemático, SELYE (1936) pesquisou os efeitos de um extrato químico e observou que seus ratos desenvolviam úlceras gastrointestinais, atrofia do timo e aumento das glândulas adrenais. Observou, ainda, que os animais do grupo-controle, que haviam recebido injeções de solução salina, também apresentaram alterações semelhantes e concluiu que tais alterações estavam relacionadas à aplicação de repetidas injeções. As mesmas reações sistêmicas ocorriam ao expor os animais ao frio, a patógenos, a toxinas ou ao barulho (SELYE, 1936; SAPOLSKY, 1990). Descreveu, então, a Síndrome Geral da Adaptação.

Esta síndrome, que representa uma reação geral e inespecífica do organismo a estímulos aversivos ou a situações desconhecidas, cuja finalidade seria a adaptação do animal à nova condição é o que chamamos de estresse, e o seu agente causador é definido como estímulo ou agente estressante ou estressor (PICKERING, 1981).

Apesar da importância significativa do estresse, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na sua patofisiologia continuam desconhecidos. Os glicocorticóides são responsáveis por mediar respostas autônomas, comportamentais e endócrinas relacionadas ao estresse (AL-MOHAISEN et al., 2000). A resposta endócrina ao estresse mais importante é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), levando à rápida secreção do hormônio adrenocorticotrófico pela adeno-hipófise e ao aumento de glicocorticóides circulantes, que são críticos para a adaptação ao estresse (AGUILERA, 1998).

Muitas estruturas cerebrais estão envolvidas na organização das respostas a estímulos estressantes (VAN DE KAR et al., 1991). Ao ser estimulado, o Sistema Límbico (principal sistema relacionado à modulação da atividade do HPA durante o estresse) age

sobre este eixo, alterando a secreção hipofisária de vários hormônios: adrenocorticotrófico (ACTH) (HOKFELT et al., 1983), hormônio de crescimento (HGH), luteinizante (LH), folículo-estimulante (FSH), prolactina (KRULISH et al., 1974; EUKER et al., 1975), além de ocorrerem alterações nos níveis de β -endorfina (KANT et al., 1983).

O estresse ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) como parte de uma resposta adaptativa ao estímulo estressante. Esta resposta é caracterizada principalmente pelo aumento imediato dos níveis circulantes dos glicocorticóides no sangue, seja em humanos ou em animais em experimentação. No rato, esta resposta se torna significativa em torno de três minutos, atingindo o pico de resposta em 30 minutos e voltando aos níveis normais em torno de 1-2 horas após estímulo.

A liberação dos glicocorticóides é regulada através de um sistema de "feedback" negativo. O estímulo estressor chega ao sistema nervoso central (SNC) a partir dos órgãos dos sentidos, e a resposta a este estímulo se dá a partir do hipotálamo, que estimula a glândula hipófise através da liberação de CRH (hormônio liberador de corticotrofina). Esta estimula as glândulas adrenais, através da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Para que ocorra um equilíbrio, os glicocorticóides exercem efeito inibitório diretamente sobre o hipotálamo e a hipófise.

O hormônio corticotrófico (CRH) é o principal coordenador da resposta endócrina, autônoma, comportamental e imune ao estresse. Este neuropeptídeo foi inicialmente caracterizado no sistema hipotálamo-hipofisário. Entretanto está largamente distribuído através do SNC e em múltiplos órgãos periféricos (ORTH, 1992), incluindo placenta, medula adrenal, pâncreas, pulmões, estômago, células imunológicas, sistema inflamatório (KARALIS et al., 1991; CROFFORD et al., 1992) e sistema límbico, principalmente amígdala (CRATTY et al., 1995). CRH é um dos mais importantes hormônios envolvidos na expressão dos vários componentes da resposta ao estresse (GRAY, 1993), estimulando a liberação de ACTH da adeno-hipófise e levando ao aumento de glicocorticóides plasmáticos (RIVIER et al., 1982). No hipotálamo de ratos, os sítios de ligação do CRH têm sido descritos no núcleo dorso medial, núcleo arqueado e área pré-óptica, onde parecem influenciar a regulação da secreção de gonadotrofinas e do

hormônio de crescimento. Por outro lado, a presença de receptores de CRH no núcleo paraventricular (NPV), a principal fonte hipotalâmica de CRH, não é muito clara. O NPV apresenta interconexões com outros núcleos hipotalâmicos, como a amígdala, locus cerúleo e o núcleo do trato solitário, e a ativação dos receptores do CRH nestas áreas parece influenciar a função do NPV. Recentemente, foi demonstrado que, frente à exposição a alguns paradigmas de estresse, tais como imobilização aguda ou repetida, estimulação osmótica por privação de água e injeção de salina hipertônica, há indução da expressão de RNA mensageiro (RNAm) no NPV de forma estresse específica (LUO et al., 1994).

A maior parte dos estímulos estressantes são divididos, em função da natureza dos estressores, em físicos e psicológicos (MC EWEN et al., 1993). São considerados como de natureza física o choque elétrico na cauda ou nos pés e a injeção intraperitoneal de salina hipertônica. Os de natureza psicológica são os estímulos induzidos pela natação e a imobilização por contenção (LIGHTMAN et al., 1993). O estresse é ainda dividido em agudo e crônico, dependendo do tempo de exposição ao estressor (HARBUSZ et al., 1992).

O estresse agudo é o que mais caracteristicamente influencia o eixo HPA, levando o núcleo de neurônios principais desta estrutura, o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), a expressar uma resposta básica comum a todos os tipos de estressores, que é a secreção aumentada de ACTH, que leva ao aumento de glicocorticóides. Das principais estruturas do sistema nervoso central (SNC) relacionadas com a modulação da atividade do eixo HPA durante o estresse psicológico, o sistema límbico é o que mais influencia esta atividade (GRAY, 1993).

O estresse agudo induz ativação neuronal em várias regiões cerebrais, incluindo o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), córtex cerebral e hipocampo (ARNOLD et al., 1992; CECATELLI et al., 1989; KONONEN et al., 1992; SCHREIBER et al., 1991; SHENG et al., 1990).

O estresse psicológico de imobilização ou contenção é o mais utilizado para estudos sobre respostas fisiológicas, bioquímicas e biológicas relacionadas ao estresse (AGUILERA et al., 1996; MARTI et al., 1997; MURPHY et al., 1995; ALEXANDROVÀ, 1994).

O medo e a ansiedade, modalidades comportamentais que induzem estresse psicológico, têm origem no núcleo central da amígdala (CeA) do complexo amigdalóide, principal estrutura límbica relacionada com a regulação do comportamento aversivo (GRAY, 1993).

Numerosos estudos têm demonstrado a importância da amígdala na expressão das mudanças autônomas, neuroendócrinas e comportamentais que ocorrem em resposta ao medo ou estímulos aversivos. Já foi mostrado que a destruição da amígdala reduz o medo e a ansiedade (GRAY, 1993). Desde o clássico trabalho de Kluver e Bucy, é sabido que lesões envolvendo a amígdala reduzem de forma acentuada a resposta emocional (KLUVER e BUCY, 1939). Estudos indicaram que o núcleo central da amígdala (CeA) é particularmente importante na mediação de respostas associadas a estressores de condicionamento ou aprendizado. Lesão bilateral do CeA impede ou bloqueia respostas comportamentais, autônomas e neuroendócrinas ao estresse. Estas respostas incluem alterações nos batimentos cardíacos, pressão sangüínea, defecação e secreção de corticosterona em várias espécies animais (BEAULIEU et al., 1986; SANANES e CAMPBELL, 1989; VAN DE KAR et al., 1991; VANDERWOLF et al., 1988; IWATA et al., 1987).

O CeA é ativado pelo estresse psicológico pela estimulação de neurônios produtores do fator de liberação de corticotrofina (CRF) que, através de circuitos neuronais que se interligam com o hipotálamo, atuam no NPV para que ocorra a resposta ao estresse do tipo psicológico (GRAY et al., 1989). Mas, além dessa interligação, esses neurônios estão em comunicação também com estruturas do tronco encefálico (núcleo do trato solitário) (WALLACE et al., 1992), responsáveis pela recepção das aferências viscerais para a geração do estresse físico (FLESHNER et al., 1995). Normalmente, a ativação do HPA se dá através do núcleo do trato solitário estimulado pelas aferências viscerais (GAYKEMA et al., 1995).

Estudos indicaram que a amígdala, especialmente o núcleo central da amígdala, tem receptores de CRH em grande quantidade (DE SOUZA et al., 1985), além de corpos celulares imunorreativos e terminais nervosos de CRH (CUMMINGS et al., 1983; JOSEPH e KNIGGE, 1983; MERCHENTHALER et al., 1982; SAKANAKA et al., 1987; SWANSON et al. 1983).

Já foi verificado em animais que injeções diárias de salina hipertônica resultaram em um aumento do RNAm de CRH (LIGHTMAN et al., 1993). Partindo desses dados e observando que esse tipo de estresse físico, o estresse osmótico, não foi ainda estudado em relação ao CeA nos mecanismos de ativação do HPA, nos propusemos a fazê-lo. Dessa forma, este estudo foi realizado através da lesão do CeA e os efeitos do estresse psicológico com os da injeção intraperitoneal de salina hipertônica sobre a resposta do HPA foram comparados, buscando resultados para esclarecer a relação da amígdala com o estresse físico.

OBJETIVOS

Em ratos-controle e em ratos submetidos à lesão bilateral do núcleo central da amígdala (CeA) por eletrocoagulação:

- I- Avaliar o efeito dos estresses físico e psicológico sobre os pesos das glândulas adrenais e adeno-hipófise.
- II- Avaliar a resposta dos estresses físico e psicológico no eixo HPA, utilizando a corticosterona plasmática como índice de resposta ao estresse.

MATERIAL E
MÉTODOS

1 - ANIMAIS

Ratos machos Wistar, pesando cerca de 200g, provenientes de linhagens do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB), foram utilizados para os experimentos. Uma semana antes do procedimento, os animais foram colocados em gaiolas individuais, com água e comida à vontade (ração sólida, Purina Nutriente Ltda) em uma sala com temperatura (23°C), luz (7:00 - 19:00 h) e umidade controladas.

Os animais foram manipulados de acordo com as normas da "Comissão de Ética na Experimentação Animal".

2 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em alguns grupos:

- a) Animais-controle basais
- b) Animais-controle submetidos ao estresse físico ou psicológico
- c) Animais com cirurgia simulada
- d) Animais com cirurgia simulada submetidos ao estresse físico ou psicológico
- e) Animais com lesão bilateral do CeA
- f) Animais com lesão bilateral do CeA submetidos ao estresse físico ou psicológico

3 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais, sob anestesia por tiopental sódico (Cristália), 1 g diluído em 40 ml de soro fisiológico e administrado via intraperitoneal na dose de 70 mg/Kg de peso corporal, foram submetidos à tricotomia do escalpo, para a realização da lesão bilateral do

CeA ou cirurgia simulada. Após fixar o animal no aparelho estereotáxico (modelo David Kopf), foi feita a assepsia e, em seguida, uma incisão longitudinal na pele, expondo a calota craniana e possibilitando a visualização do bregma (cruzamento das suturas sagital e coronal), ponto principal de referência para o seguimento das coordenadas estabelecidas. O atlas estereotáxico de PAXINOS e WATSON (1986) foi utilizado, e as coordenadas padronizadas para a localização do núcleo central da amígdala (CeA) foram: ântero-posterior - 2,3mm posterior ao bregma; lateral - 4mm à linha mediana (bilateralmente); vertical - 7,8 mm abaixo da duramáter.

A lesão bilateral do CeA foi feita por eletrocoagulação, através de eletrodo de níquel-cromo, de 0,2 mm de diâmetro, com 0,1 mm de ponta descoberta, introduzido nos locais a serem lesados, passando uma corrente elétrica de 1mA gerada por um lesionador durante 10 segundos.

Os animais submetidos à cirurgia simulada sofreram o mesmo procedimento, inclusive a introdução do eletrodo. No entanto, o lesionador não foi acionado para a passagem da corrente elétrica.

4 - MODELOS DE ESTRESSE

4a - Estresse psicológico:

Após 14 dias de recuperação do procedimento cirúrgico, os animais foram retirados de suas gaiolas, pesados e, antes que se completassem três minutos, foi realizada uma coleta de sangue pela cauda, através de uma pequena incisão com um bisturi. Em seguida, foram colocados em um tubo de PVC com 20,5 cm de comprimento e 5,0 cm de diâmetro e totalmente imobilizados durante 60 minutos. Procedeu-se, então, a uma nova coleta de sangue pela cauda e, imediatamente, os animais foram um a um decapitados.

4b - Estresse físico:

Após 14 dias de recuperação do procedimento cirúrgico, os animais foram retirados de suas gaiolas, pesados e, uma coleta de sangue foi realizada pela cauda em até três minutos. Posteriormente, foi injetada intraperitonealmente 1 ml de salina hipertônica a 2%. Após 30 minutos, uma nova coleta de sangue foi realizada pela cauda, e, imediatamente, os animais foram, um a um, decapitados.

5 - COLETA DE SANGUE

Realizaram-se duas coletas de sangue pela cauda, em tubos plásticos heparinizados, centrifugados a seguir por 15 minutos a 4°C e a 2000rpm. Após a centrifugação, o plasma foi aliquoteado em dois tubos Eppendorf (A, anterior ao estresse, e B, após o estresse), devidamente rotulados para corticosterona. Mesmo para os animais não submetidos a nenhum tipo de estresse fizemos as duas coletas, a primeira quando retirados das gaiolas e a segunda antes da decapitação.

Os tubos com os plasmas foram estocados a -20°C para dosagens posteriores.

6 - MEDIDAS REALIZADAS

As seguintes medidas foram feitas durante o experimento:

- Peso corporal: os animais foram pesados no dia da cirurgia e no dia do sacrifício
- Adrenais: retiradas após o sacrifício e pesadas
- Adeno-hipófises: retiradas após o sacrifício e pesadas

7 - DOSAGEM HORMONAL

As dosagens hormonais foram realizadas através de Radioimunoensaio (RIE), no Laboratório de Fisiologia Clínica Experimental, no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, da Unicamp - Campinas. Todas as amostras provenientes de um mesmo experimento foram determinadas em duplicata em um mesmo ensaio.

7a - Radioimunoensaio da Corticosterona

A corticosterona plasmática foi determinada pelo método de VECSEI et al. (1979), modificado, através de extração do esteróide por etanol. Foi utilizado um anticorpo anti-corticosterona (C-8784 - Sigma), preparado em coelhos, com o hormônio conjugado com albumina bovina. A especificidade do anticorpo foi testada através da reatividade cruzada com o cortisol (4,5%), 17OH-progesterona (1,8%) e dehidroepiandrosterona (<0,01%). Usou-se a corticosterona triciada [1,2,6,7-³H] (Amersham) como marcador. Na separação da fração livre da ligada, foi utilizada uma solução de carvão-dextran 0,5/0,05%.

A dose mínima detectável foi de 1,25 ng/ml. O coeficiente de variação intra e inter ensaios foram, respectivamente, 6,0% e 6,7%, ao nível de B/Bo igual 0,5 da curva-padrão.

8 - HISTOLOGIA

Os cérebros dos animais sacrificados foram removidos e congelados a -20°C, para a realização de cortes histológicos em criostato. Dessa forma, o local das lesões e a extensão das mesmas foram determinados pelo exame das lâminas em microscópio óptico (Carl Zeiss), utilizando a coloração Hematoxilina-Eosina.

9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística os seguintes procedimentos foram utilizados:

- Índices de dispersão em torno da média ($\bar{X}$) foram o desvio-padrão da média (DP) e o erro padrão da média (EPM). As figuras estão representadas em $\bar{X} \pm \text{EPM}$.
- Análise de variância (Anova) foi utilizada para comparação dos valores dentro do mesmo grupo experimental
- Teste de Tuckey foi utilizado para comparação dos valores entre grupos diferentes (animais-controle, com cirurgia simulada e com lesão bilateral no CeA)
- Teste-t não paramétrico foi utilizado para comparação entre dois grupos diferentes, por exemplo, animais com lesão bilateral do CeA que sofreram estresse físico e animais com lesão bilateral do CeA que sofreram estresse psicológico.

O nível de significância adotado para a rejeição da hipótese de nulidade foi de 5%. Entretanto, níveis de p menores que 0,05 foram anotados no texto. Para efeito de cálculo estatístico, todos os valores não detectáveis (abaixo do limite de sensibilidade para o respectivo ensaio) foram arbitrariamente considerados como o valor da sensibilidade do método (dose mínima detectável).

RESULTADOS

1 - PESOS CORPORAIS

Os animais foram pesados no dia do procedimento cirúrgico (mesmo os simulados e controles) e no dia do sacrifício (15 dias após o procedimento cirúrgico), para que fosse verificado se a lesão causaria uma alteração no ganho de peso corporal.

Os valores individuais em média e erro-padrão da média ($X \pm EPM$) dos pesos iniciais (P_{ci}) e pesos finais (P_{cf}), em g, dos animais lesados, simulados e controles, estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3 em anexo.

1.1 - Animais com lesão bilateral do CeA

O gráfico 1 apresenta os pesos corporais iniciais e finais dos animais com lesão bilateral do CeA (LB). Quando se compara os pesos iniciais e finais dos ratos que foram submetidos ao estresse psicológico (SP), observa-se que não houve diferença significativa entre eles. O mesmo pôde ser notado nos ratos que não foram submetidos a nenhum tipo de estresse (SE). No entanto, quando se observa os pesos iniciais e finais dos animais que foram submetidos ao estresse físico (SF), nota-se haver diferença significativa entre eles ($p < 0,05$).

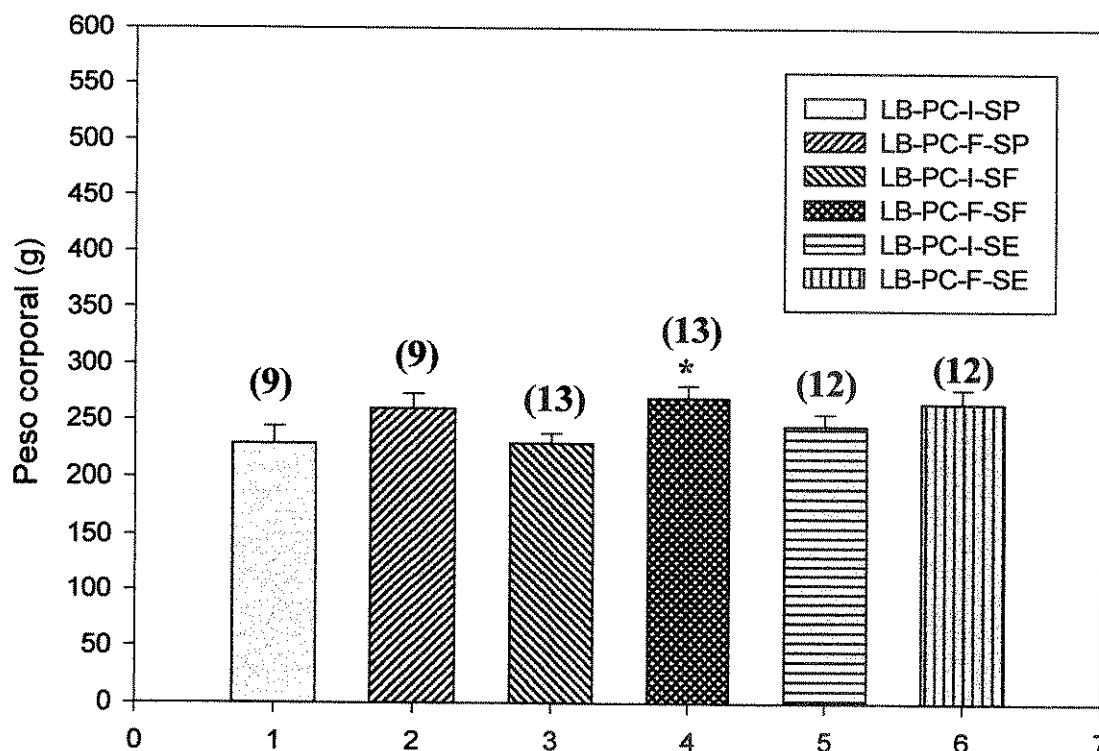


Gráfico 1 - Pesos corporais de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA

Pesos corporais iniciais (PC - I) e finais (PC-F) de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais submetidos à lesão bilateral (LB) do CeA

SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

* $p < 0,05$ LB-PC-I-SF x LB-PC-F-SF (Teste t)

1.2 - Animais com cirurgia simulada

O gráfico 2 apresenta os pesos corporais iniciais e finais dos animais submetidos a uma simulação da cirurgia, porém sem passagem de corrente elétrica (Sm). Quando se compara os pesos iniciais e finais dos ratos que sofreram estresse psicológico(SP), observa-se que não houve diferença significativa entre eles. No entanto, quando se observa os pesos iniciais e finais dos animais submetidos ao estresse físico(SF) e aqueles que não sofreram nenhum tipo de estresse (SE), nota-se haver diferença significativa entre eles ($p < 0,05$).

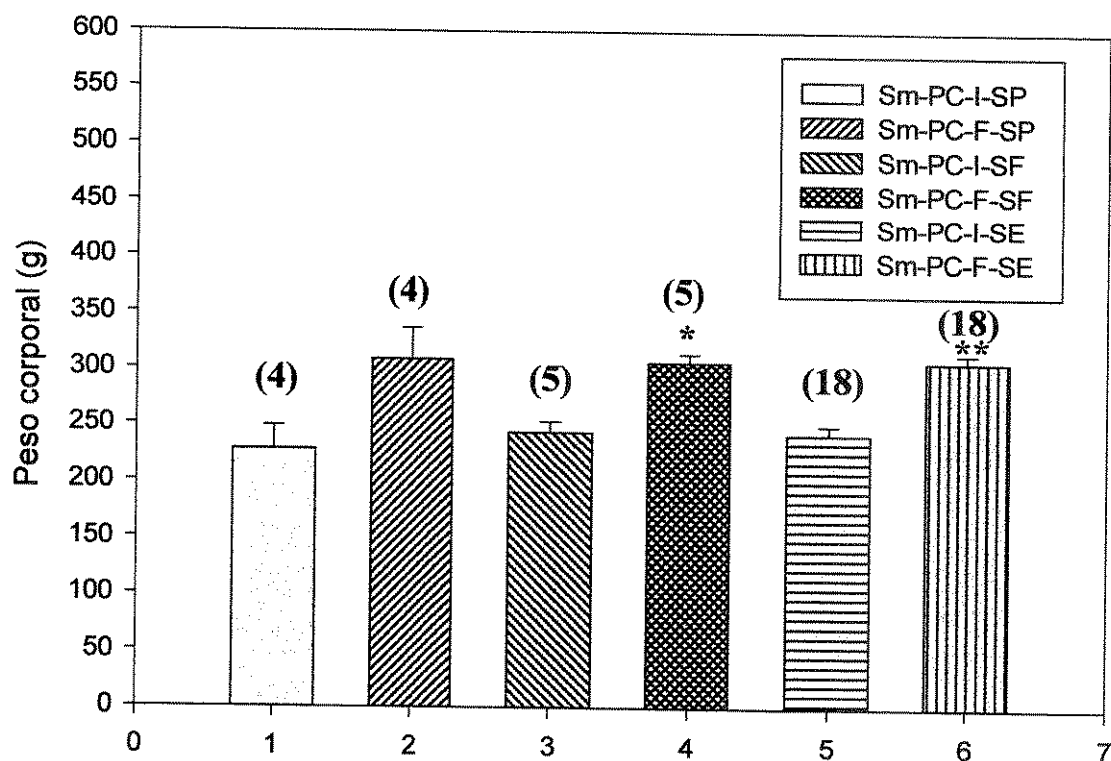


Gráfico 2 - Pesos corporais de ratos Wistar simulados

Pesos corporais iniciais (PC-I) e finais (PC-F) de ratos Wistar simulados (Sm) de diferentes grupos experimentais .

SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

* $p < 0,05$ Sm-PC-I-SF X Sm-PC-F-SF (Teste t);

** $p < 0,05$ Sm-PC-I-SE X Sm-PC-F-SE (Teste t)

1.3 - Animais-controle

O gráfico 3 apresenta os pesos corporais iniciais e finais dos animais-controle, que não sofreram nenhum processo cirúrgico (C). Quando se compara os pesos iniciais e finais dos ratos que foram submetidos ao estresse psicológico(SP), observa-se haver diferença significativa entre eles ($p < 0,05$). O mesmo pode ser notado com relação aos pesos iniciais e finais dos animais submetidos ao estresse físico(SF) e aqueles que não sofreram nenhum tipo de estresse (SE).

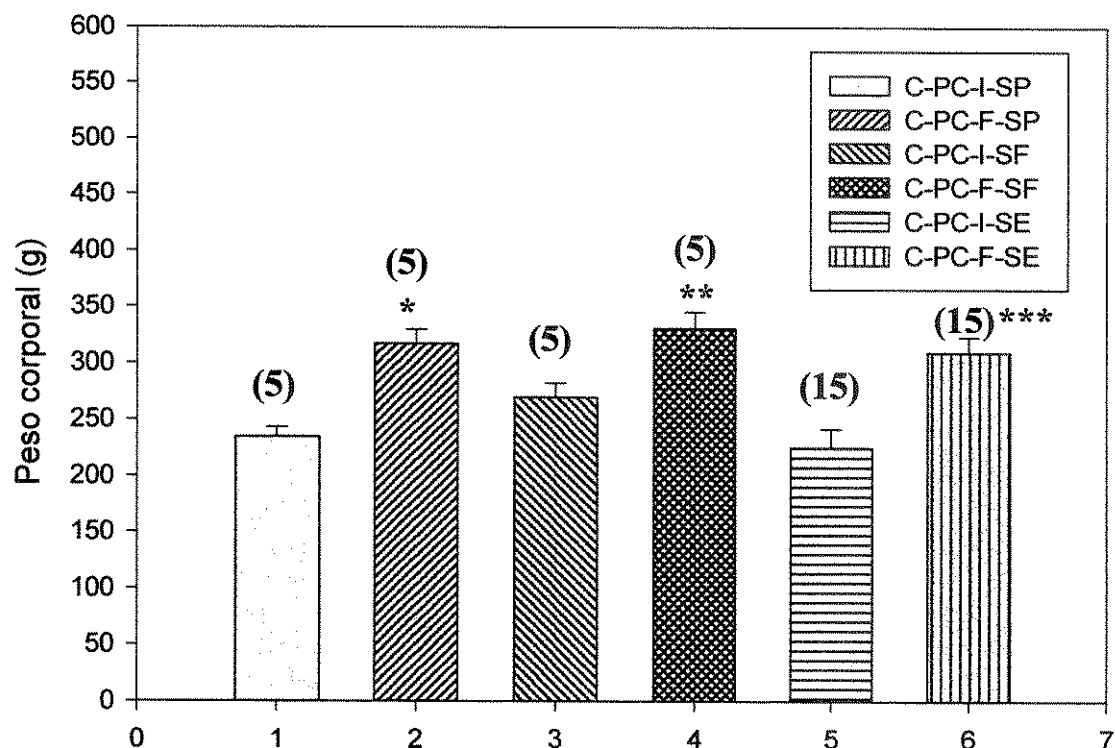


Gráfico 3 - Pesos corporais de ratos Wistar controles

Pesos corporais iniciais (PC-I) e finais (PC-F) de ratos Wistar controles (C) de diferentes grupos experimentais. SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

* $p < 0,05$ C-PC-I-SP X C-PC-F SP (Teste t);

** C-PC-I-SF X C-PC-F-SF (Teste t);

*** $p < 0,05$ C-PC-I-SE X C-PC-F-SE (Teste t)

2 - PESOS DAS ADRENAIS

Os valores individuais em média e erro-padrão da média ($\bar{X} \pm \text{EPM}$) dos pesos absolutos (Adab) e pesos relativos (Adr), em mg e mg/100g, dos animais lesados, simulados e controles estão apresentados nas tabelas 4, 5 e 6, em anexo.

2.1 - Animais com lesão bilateral do CeA

O gráfico 4 apresenta os pesos absolutos e relativos das adrenais dos animais com lesão bilateral do CeA (LB). Quando se compara os pesos absolutos das adrenais dos ratos submetidos ao estresse psicológico(SP), estresse físico (SF) e os que não sofreram nenhum tipo de estresse, observa-se que não houve diferença significativa entre eles. O mesmo pôde ser notado se se comparar os pesos relativos das glândulas dos diferentes grupos de animais lesados.

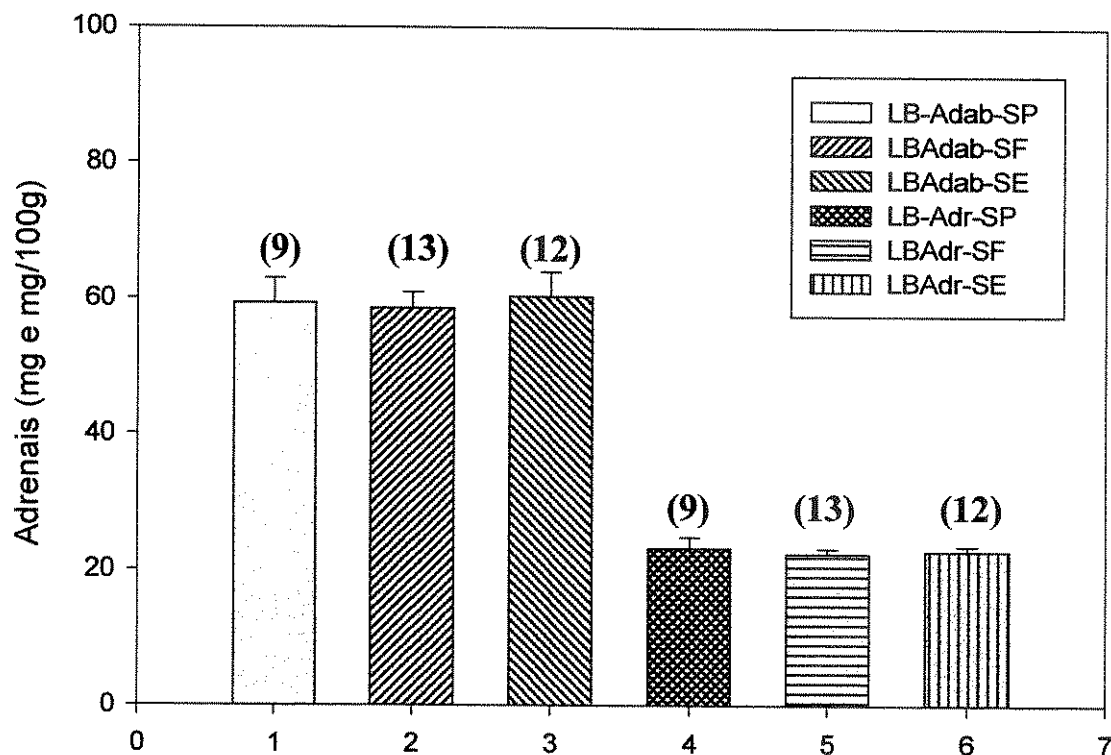


Gráfico 4 - Pesos das adrenais de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA

Pesos absolutos (ab) e relativos (r) das adrenais (Ad) de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais submetidos à lesão bilateral do CeA (LB)

SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

2.2 - Animais com cirurgia simulada

O gráfico 5 apresenta os pesos absolutos e relativos das adrenais dos animais submetidos a uma simulação da cirurgia, porém sem passagem de corrente elétrica (Sm). Quando se compara os pesos absolutos das adrenais dos ratos submetidos ao estresse psicológico(SP), estresse físico (SF) e os que não sofreram nenhum tipo de estresse, observa-se que não houve diferença significativa entre eles. O mesmo pôde ser notado ao se comparar os pesos relativos das glândulas dos diferentes grupos de animais simulados.

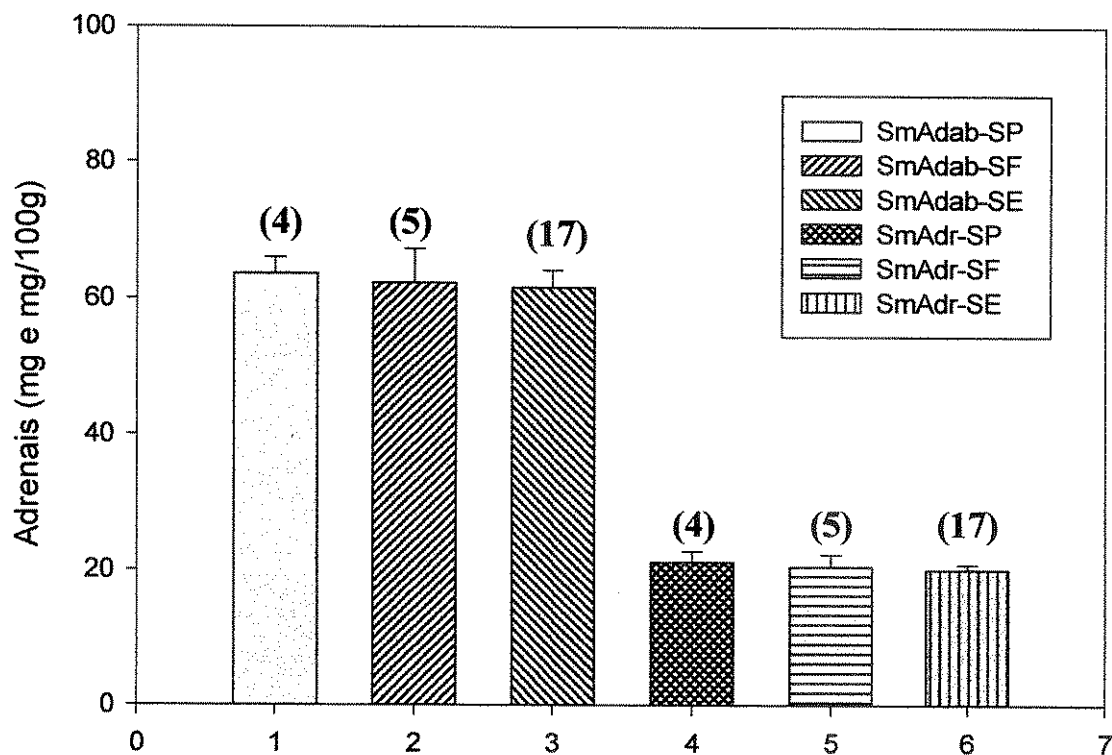


Gráfico 5 - Pesos das adrenais de ratos Wistar simulados

Pesos absolutos (ab) e relativos (r) das adrenais (Ad) de ratos

Wistar simulados (Sm) de diferentes grupos experimentais. SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

2.3 - Animais-controle

O gráfico 6 apresenta os pesos absolutos e relativos das adrenais dos animais-controle, que não sofreram nenhum processo cirúrgico (C). Quando se compara os pesos absolutos das adrenais dos ratos submetidos ao estresse psicológico(SP), estresse físico (SF) e os que não sofreram nenhum tipo de estresse, observa-se que houve diferença estatística significativa apenas entre os pesos absolutos das adrenais dos ratos que sofreram estresse físico e os que não foram submetidos a nenhum tipo de estresse ($p < 0,05$). Ao se comparar os pesos relativos das glândulas dos diferentes grupos de animais-controle, não houve diferença significativa.

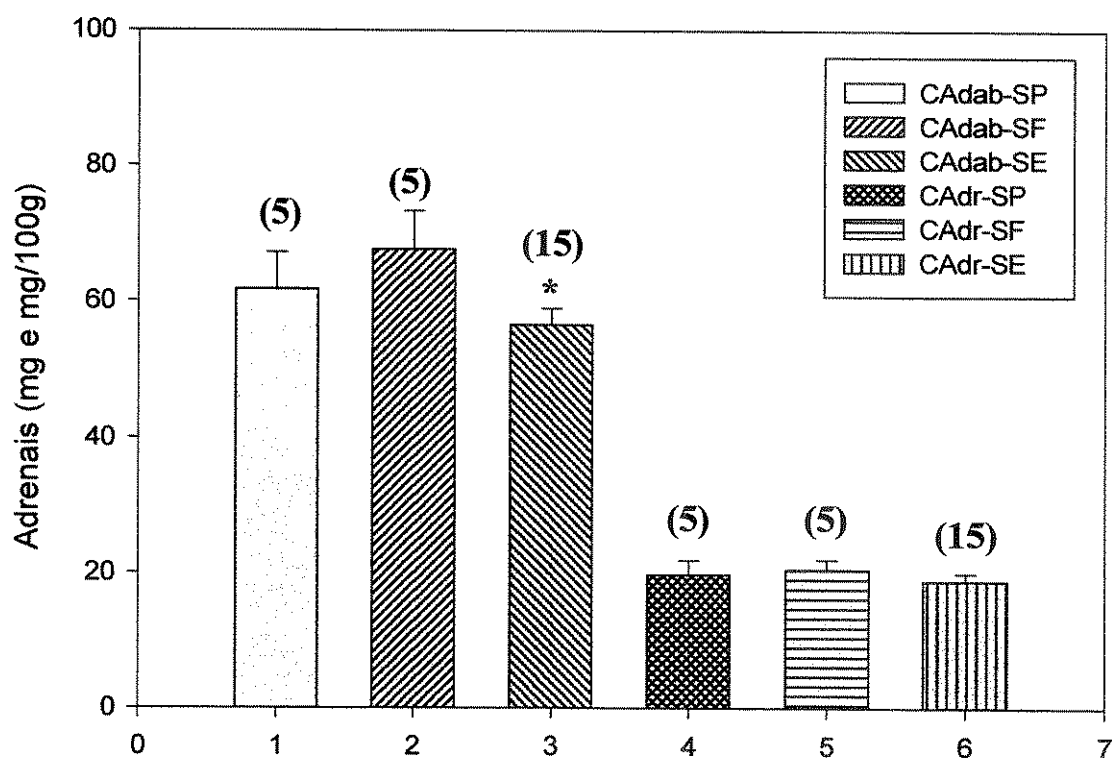


Gráfico 6 - Pesos das adrenais de ratos Wistar controles

Pesos absolutos (ab) e relativos (r) das adrenais (Ad) de ratos Wistar controles (C) de diferentes grupos experimentais

SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

* $p < 0,05$ CAdab-SF X CAdab-SE (Teste t)

2.4 - Animais lesados e simulados submetidos ao estresse psicológico e físico; animais- controle

O gráfico 7 apresenta os pesos relativos das adrenais de ratos lesados, simulados e controles submetidos ao estresse psicológico e ao estresse físico, comparando com os animais-controle que não foram submetidos a nenhum tipo de estresse. Pode-se observar que houve diferença estatística significativa apenas entre os pesos relativos das adrenais dos animais lesados que sofreram estresse psicológico e os animais-controle que não sofreram estresse ($p < 0,05$). Entre os demais grupos, não houve diferença.

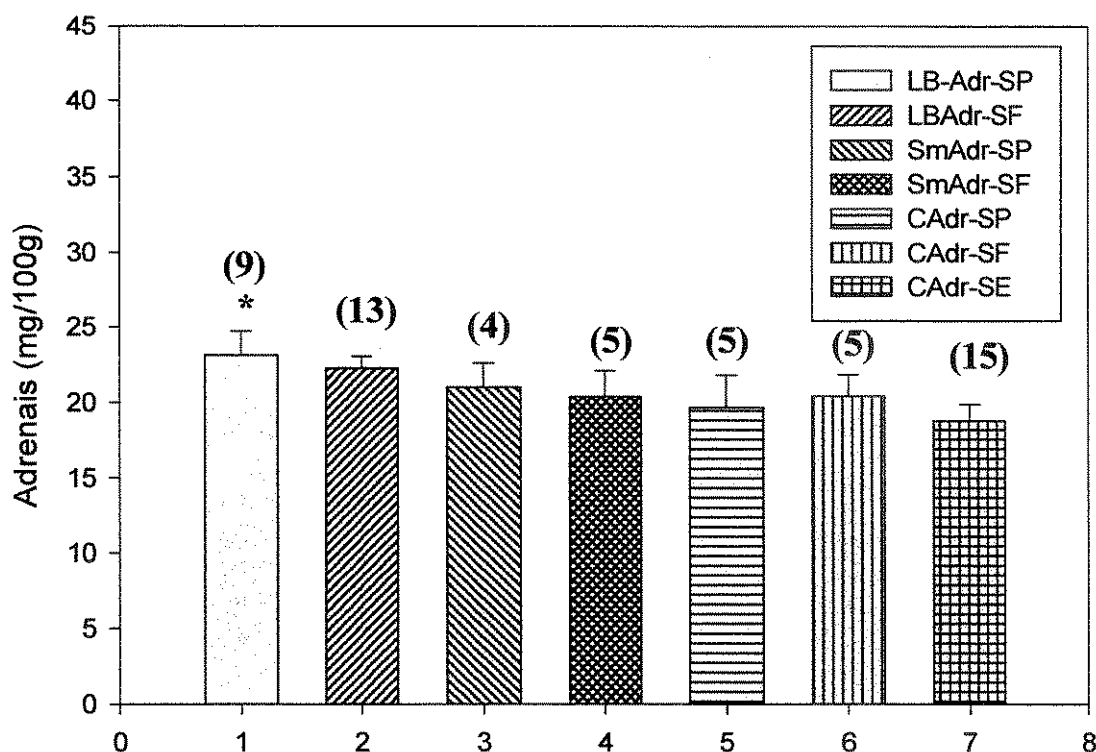


Gráfico 7 - Pesos das adrenais de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais

Pesos relativos (r) das adrenais (Ad) de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral (LB) do CeA, simulados (Sm) e controles (C) de diferentes grupos experimentais

SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

* $p < 0,05$ LB-Adr-SP X C-Adr-SE (Teste t)

2.5 - Animais lesados, simulados e controles não submetidos a estresse

O gráfico 8 apresenta os pesos relativos das adrenais de ratos lesados, simulados e controles não submetidos a nenhum tipo de estresse. Pode-se observar que houve diferença estatística significativa entre os pesos relativos das adrenais dos animais lesados e simulados e entre os pesos relativos das adrenais dos animais lesados e controles ($p < 0,05$), o mesmo não sendo observado entre os controles e simulados.

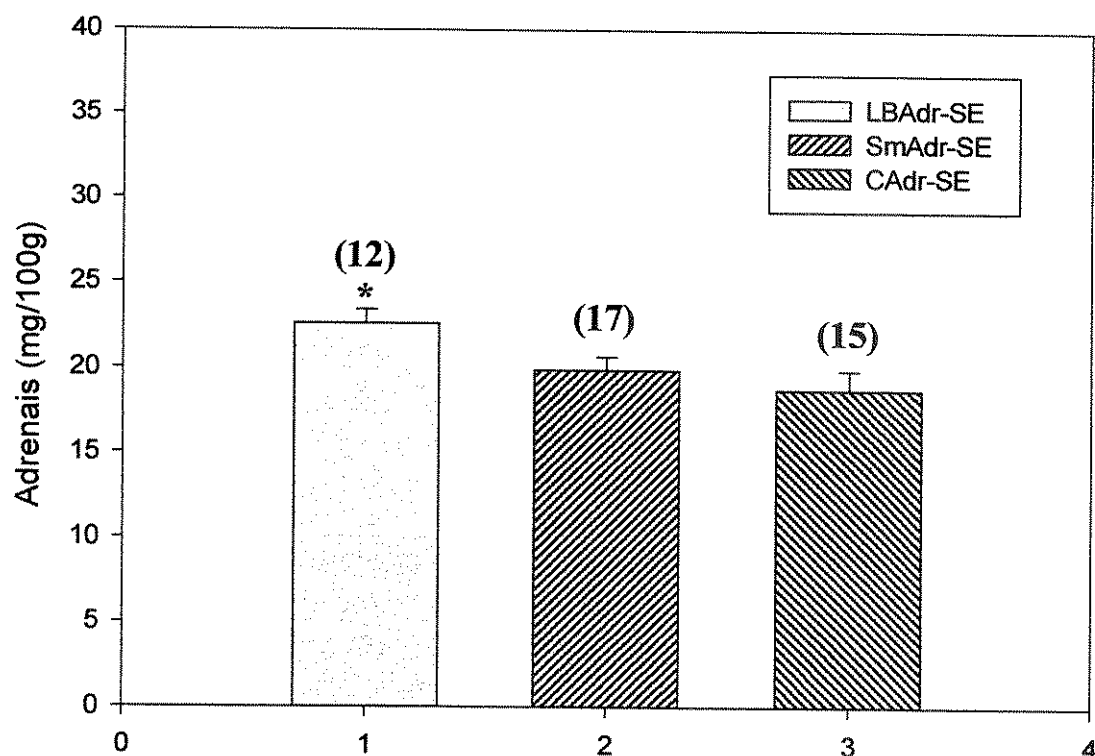


Gráfico 8 - Pesos das adrenais de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais

Pesos relativos (r) das adrenais (Ad) de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA (LB), simulados (Sm) e controles (C); SE: sem estresse

* $p < 0,05$ LBAdr-SE X SmAdr-SE; LBAdr-SE X CAdr-SE (Teste Tuckey)

3 - PESOS DAS ADENO-HIPÓFISES

Os valores individuais em média e erro padrão da média ($X \pm EPM$) dos pesos absolutos (AHab) e pesos relativos (AHR), em mg e mg/100g, dos animais lesados, simulados e controles, estão apresentados nas tabelas 7, 8 e 9, em anexo.

3.1 - Animais com lesão bilateral do CeA

O gráfico 9 apresenta os pesos absolutos e relativos das adeno-hipófises dos animais com lesão bilateral do CeA (LB). Quando se compara os pesos absolutos das adeno-hipófises dos ratos que foram submetidos ao estresse psicológico(SP), estresse físico (SF) e os que não sofreram nenhum tipo de estresse, observa-se que não houve diferença significativa entre eles. O mesmo pôde ser notado ao se comparar os pesos relativos das glândulas dos diferentes grupos de animais lesados.

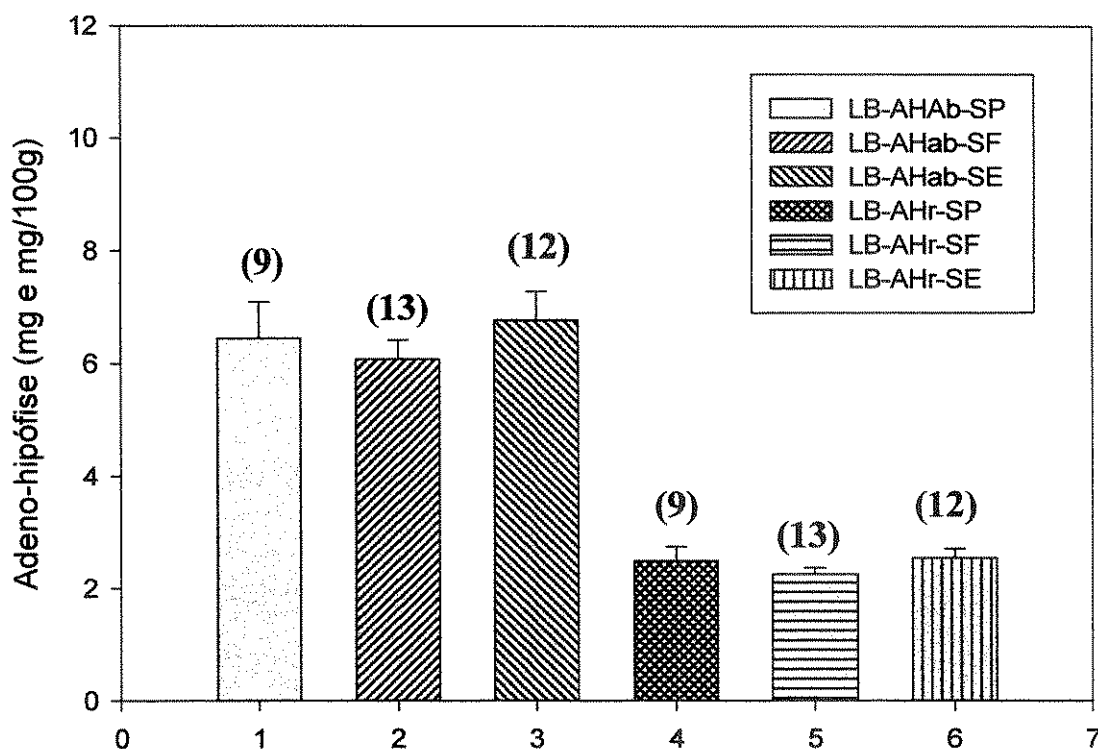


Gráfico 9 - Pesos das adeno-hipófises de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA

Pesos absolutos (ab) e relativos (r) das adeno-hipófises (AH) de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA (LB) de diferentes grupos experimentais. SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

3.3 - Animais-controle

O gráfico 11 apresenta os pesos absolutos e relativos das adeno-hipófises dos animais-controle, que não sofreram nenhum processo cirúrgico (C). Quando se compara os pesos absolutos das adeno-hipófises dos ratos submetidos ao estresse psicológico(SP), estresse físico (SF) e os que não foram submetidos a nenhum tipo de estresse, observa-se que não houve diferença significativa entre eles. O mesmo pôde ser notado ao compararmos os pesos relativos das glândulas dos diferentes grupos de animais-controle.

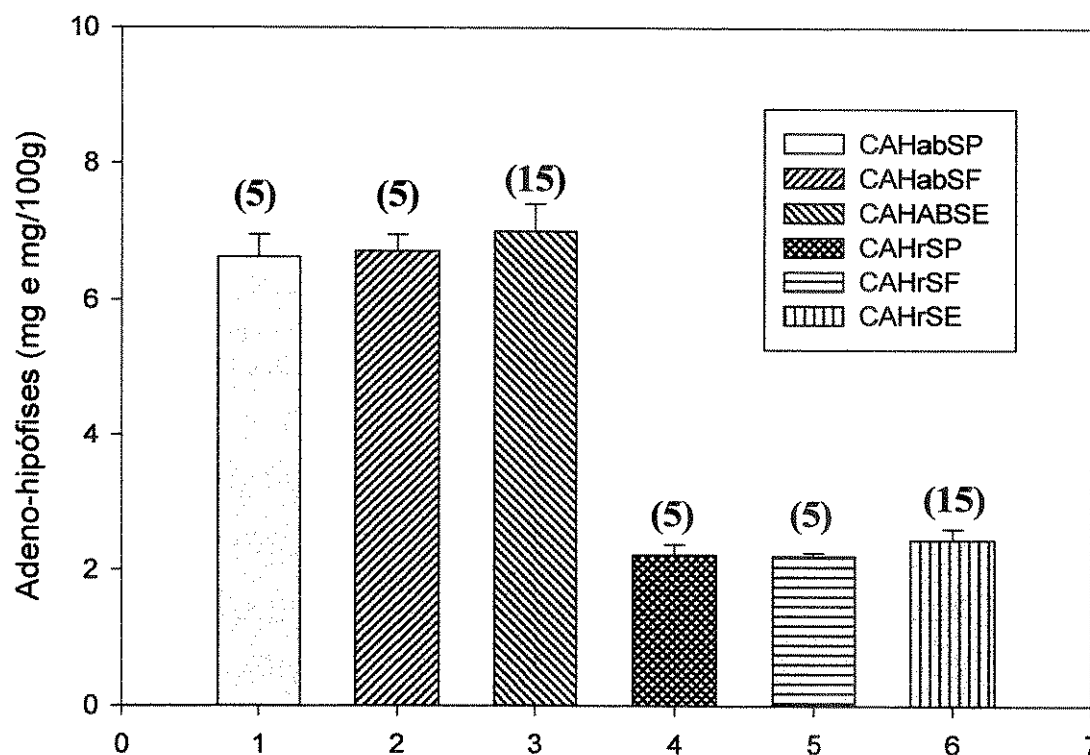


Gráfico 11 - Pesos das adeno-hipófises de ratos Wistar controles

Pesos absolutos (ab) e relativos (r) das adeno-hipófises (AH) de ratos Wistar controles de diferentes grupos experimentais.

SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

3.4 - Animais lesados e simulados submetidos ao estresse psicológico e físico; animais- controle

O gráfico 12 apresenta os pesos relativos das adeno-hipófises de ratos lesados, simulados e controles submetidos ao estresse psicológico e ao estresse físico, comparando com os animais controles que não sofreram nenhum tipo de estresse. Quando se compara os pesos relativos das glândulas dos diferentes grupos de animais nota-se que não houve diferença significativa entre eles.

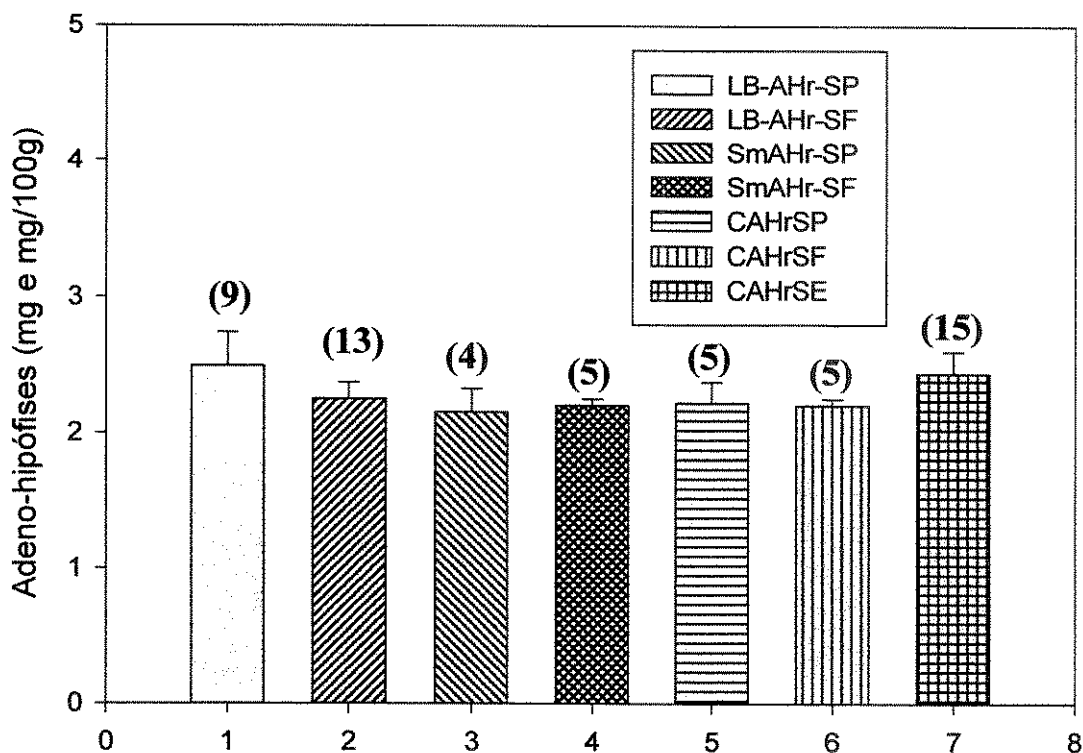


Gráfico 12 - Pesos das adeno-hipófises de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais

Pesos relativos (r) das adeno-hipófises (AH) de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA (LB), simulados (Sm) e controles (C) de diferentes grupos experimentais

SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

3.5 - Animais lesados, simulados e controles não submetidos a estresse

O gráfico 13 apresenta os pesos relativos das adeno-hipófises de ratos lesados, simulados e controles não submetidos a nenhum tipo de estresse. Pode-se observar que não houve diferença estatística significativa entre os pesos relativos das adrenais dos diferentes grupos de animais.

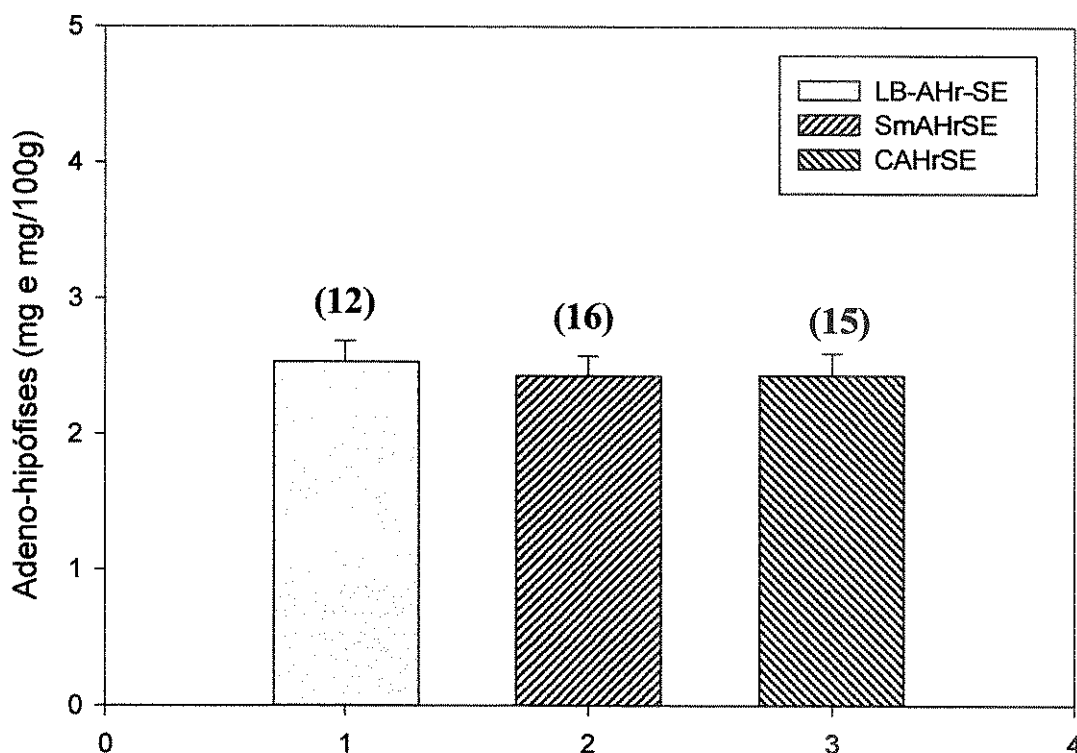


Gráfico 13 - Pesos das adeno-hipófises de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais

Pesos relativos (r) das adeno-hipófises (AH) de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA (LB), simulados (Sm) e controles (C).

SE: sem estresse; () número de animais

4 - CONCENTRAÇÕES DE CORTICOSTERONA

Os valores individuais em média e erro-padrão da média ($X \pm EPM$) das concentrações de corticosterona antes (Cort-A) e depois do estresse (Cort-D), em ng/ml, dos animais lesados, simulados e controles, estão apresentados nas tabelas 10, 11 e 12, em anexo.

4.1 - Animais com lesão bilateral do CeA

O gráfico 14 apresenta as concentrações de corticosterona antes (Cort-A) e depois do estresse (Cort-D) dos animais com lesão bilateral do CeA (LB). Quando se compara os valores antes e depois do estresse dos ratos submetidos ao estresse psicológico(SP), observa-se que houve diferença estatística significativa entre eles ($p<0,05$). O mesmo ocorreu nos animais submetidos ao estresse físico (SF) ($p<0,05$) e os que não sofreram nenhum tipo de estresse ($p<0,05$). Quando se compara as concentrações basais de corticosterona plasmática, verifica-se que não há diferença estatística entre os animais que foram submetidos ao estresse psicológico, os que sofreram estresse físico e os que não foram estressados. No entanto, as concentrações, após estímulo, apresentam diferenças entre os ratos que foram submetidos ao estresse psicológico e os animais que não sofreram estresse ($p<0,05$). Já entre os que sofreram estresse físico e os sem estresse não houve diferença, apenas uma tendência de aumento das concentrações de corticosterona nos animais submetidos ao estresse físico ($p=0,09$). Não houve diferença estatística significativa entre as concentrações de corticosterona pós-estímulo nos ratos que sofreram estresse psicológico e nos que sofreram estresse físico.

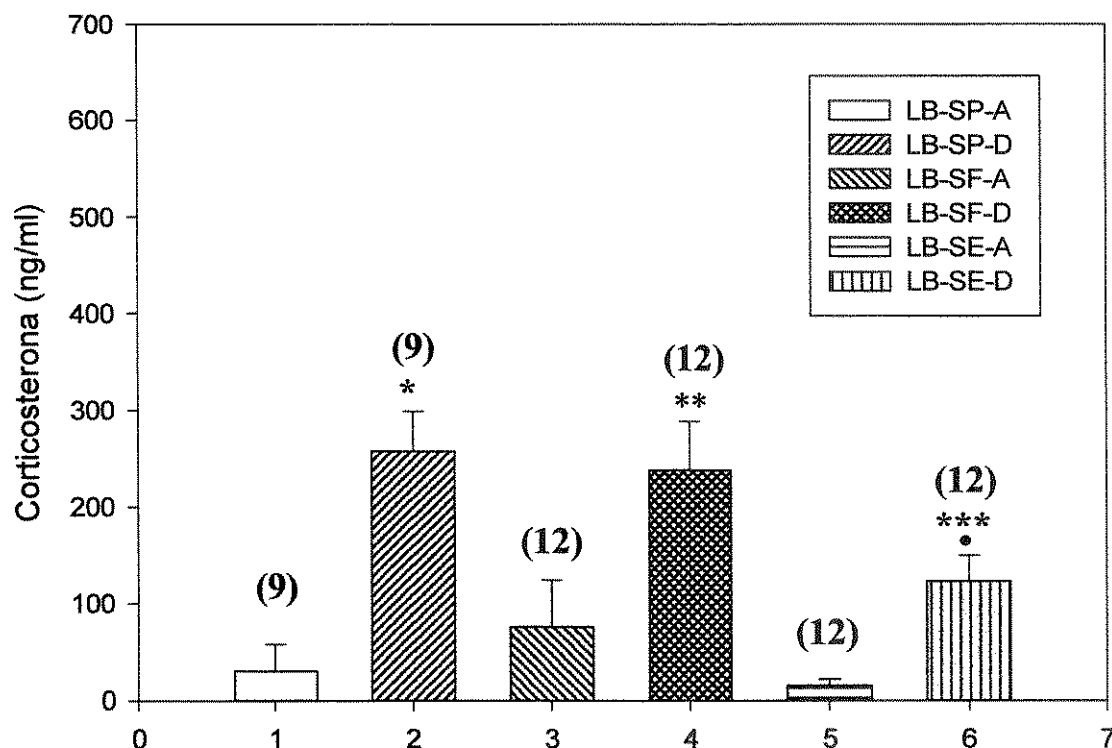


Gráfico 14 - Concentrações de corticosterona de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA

Concentrações de corticosterona antes (A) e depois (D) do estresse de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA (LB) de diferentes grupos experimentais. SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

* $p < 0,05$ LB-SP-A X LB-SP-D (Teste t); ** $p < 0,05$ LB-SF-A X LB-SF-D (Teste t); *** $P < 0,05$ LB-SE-A X LB-SE-D (Teste t);

• $p < 0,05$ LB-SP-D X LB-SE-D (Teste t)

4.2 - Animais com cirurgia simulada

O gráfico 15 apresenta as concentrações de corticosterona antes (Cort-A) e depois do estresse (Cort-D) dos animais submetidos a uma simulação da cirurgia, porém sem passagem de corrente elétrica (Sm). Quando se compara os valores antes e depois do estresse nos ratos submetidos ao estresse psicológico (SP), observa-se que houve diferença estatística significativa entre eles ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu nos animais submetidos ao

estresse físico ($p<0,05$) e os que não sofreram nenhum tipo de estresse ($p<0,05$). Quando se compara as concentrações basais de corticosterona plasmática, verifica-se que não há diferença estatística entre os animais que foram submetidos estresse psicológico, os que sofreram estresse físico e os que não foram estressados. No entanto, as concentrações após estímulo apresentam diferenças entre os ratos que foram submetidos ao estresse psicológico e os que sofreram estresse físico ($p<0,05$) e entre os que foram submetidos ao estresse físico e os que não foram estressados ($p<0,05$). Já entre os que sofreram estresse psicológico e os não estressados não houve diferença.

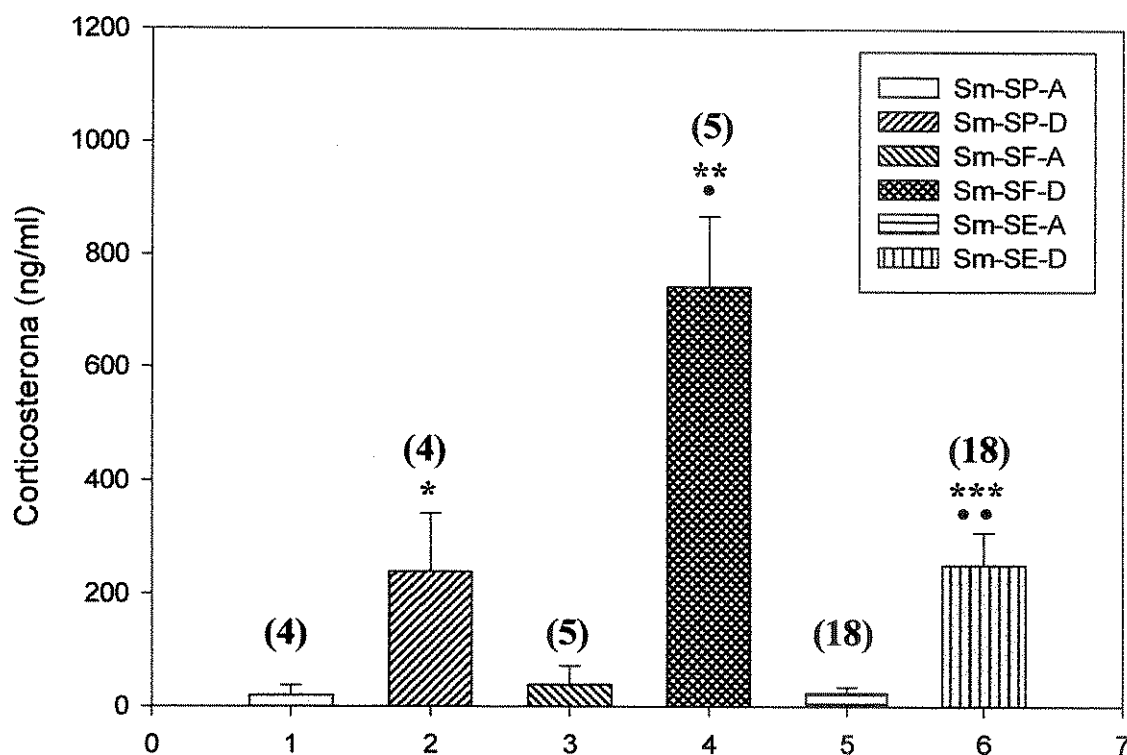


Gráfico 15 - Concentrações de corticosterona de ratos Wistar simulados

Concentrações de corticosterona antes (A) e depois (D) do estresse de ratos Wistar simulados (Sm) de diferentes grupos experimentais

SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

* $p<0,05$ Sm-SP-A X Sm-SP-D (Teste t); ** $p<0,05$ Sm-SF-A X Sm-SF-D (Teste t); *** $p<0,05$ Sm-SE-A X Sm-SE-D (Teste t)

• $p<0,05$ Sm-SP-D X Sm-SF-D (Teste t); • $p<0,05$ Sm-SF-D X Sm-SE-D (Teste t)

4.3 - Animais controles

O gráfico 16 apresenta as concentrações de corticosterona antes (Cort-A) e depois do estresse (Cort-D) dos animais-controle, que não sofreram nenhum processo cirúrgico (C). Quando se compara os valores antes e depois do estresse dos ratos que foram submetidos ao estresse psicológico (SP), observa-se que houve diferença estatística significativa entre eles ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu nos animais submetidos ao estresse físico (SF) ($p < 0,05$) e os que não sofreram nenhum tipo de estresse ($p < 0,05$). Quando se compara as concentrações basais de corticosterona plasmática, verifica-se que não há diferença estatística entre os animais que foram submetidos estresse psicológico, os que sofreram estresse físico e os que não foram estressados. No entanto, as concentrações após estímulo apresentam diferenças entre os ratos que foram submetidos ao estresse físico e os não estressados ($p < 0,05$). Entre os que foram submetidos ao estresse físico e os que sofreram estresse psicológico, não houve diferença significativa. Já entre os que sofreram estresse psicológico e os não estressados, há uma tendência de aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona dos animais submetidos ao estresse psicológico ($p = 0,1$).

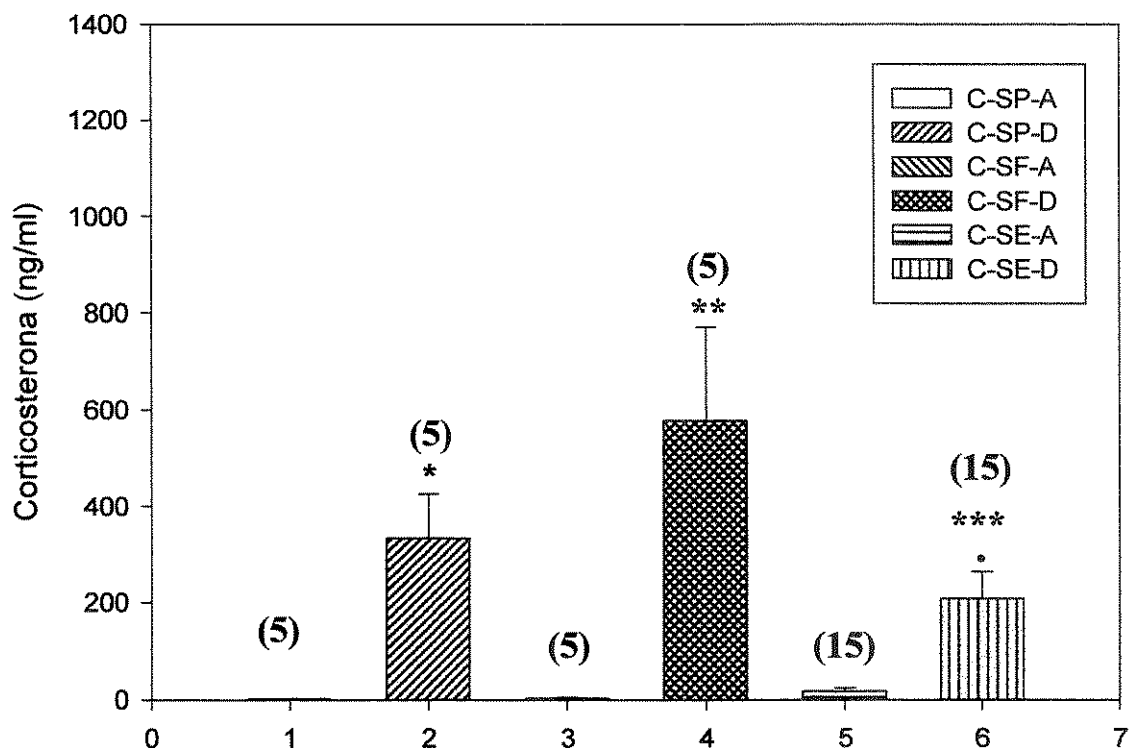


Gráfico 16 - Concentrações de corticosterona de ratos Wistar controles

Concentrações de corticosterona antes (A) e depois (D) do estresse de ratos Wistar controles de diferentes grupos experimentais. SP: estresse psicológico; SF: estresse físico; SE: sem estresse; () número de animais

* $p < 0,05$ C-SP-AXC-SP-D (Teste t); ** $p < 0,05$ C-SF-A X C-SF-D (Teste t);

*** $p < 0,05$ C-SE-AXC-SE-D (Teste t)

• $p < 0,05$ C-SF-DXC-SE-D (Teste t)

4.4 - Animais lesados, simulados e controles submetidos ao estresse psicológico

O gráfico 17 apresenta as concentrações de corticosterona plasmática depois do estresse psicológico (Cort-D) em animais lesados, simulados e controles. Quando se compara estes valores, observa-se que não há diferença estatística entre eles.

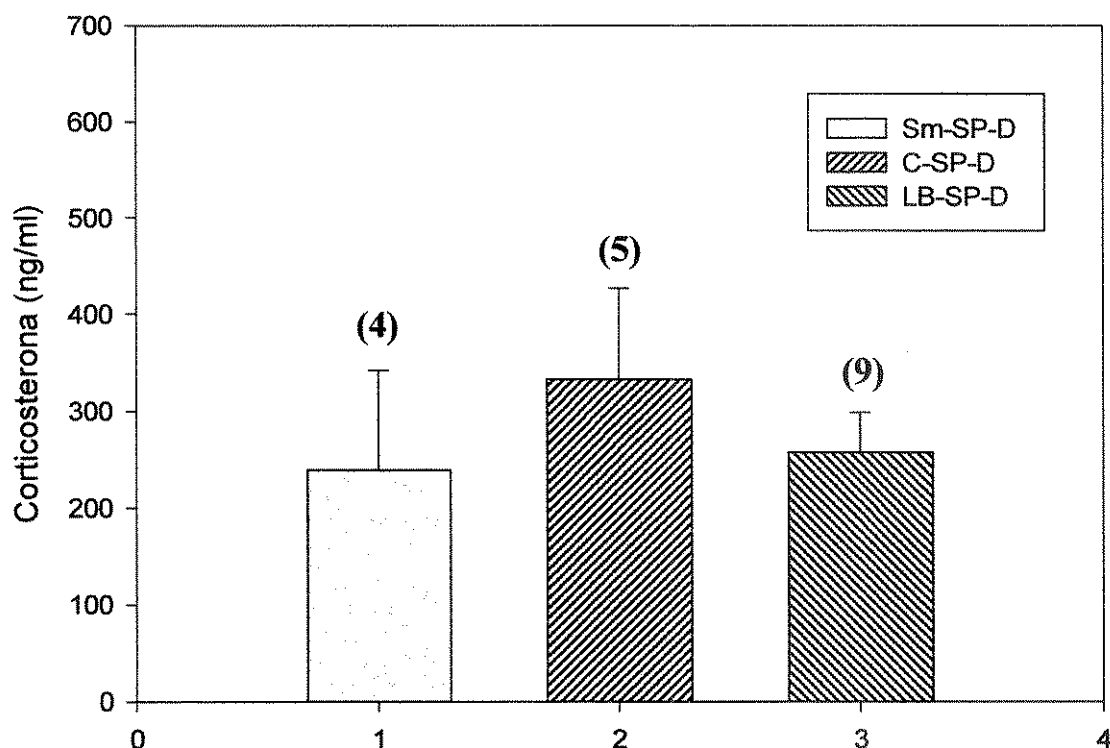


Gráfico 17 - Concentrações de corticosterona de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais

Concentrações de corticosterona depois (D) do estresse psicológico de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA (LB), simulados (Sm) e controles (C)

SP: estresse psicológico; () número de animais

4.5 - Animais lesados, simulados e controles submetidos ao estresse físico

O gráfico 18 apresenta as concentrações de corticosterona depois do estresse físico (Cort-D) em animais lesados, simulados e controles. Observou-se que há diferença estatística significativa com uma menor resposta da corticosterona plasmática nos ratos lesados quando comparada com os animais simulados ($p < 0,05$), e com os controles ($p < 0,05$). No entanto, não há diferença entre as concentrações de corticosterona nos animais simulados e controles.

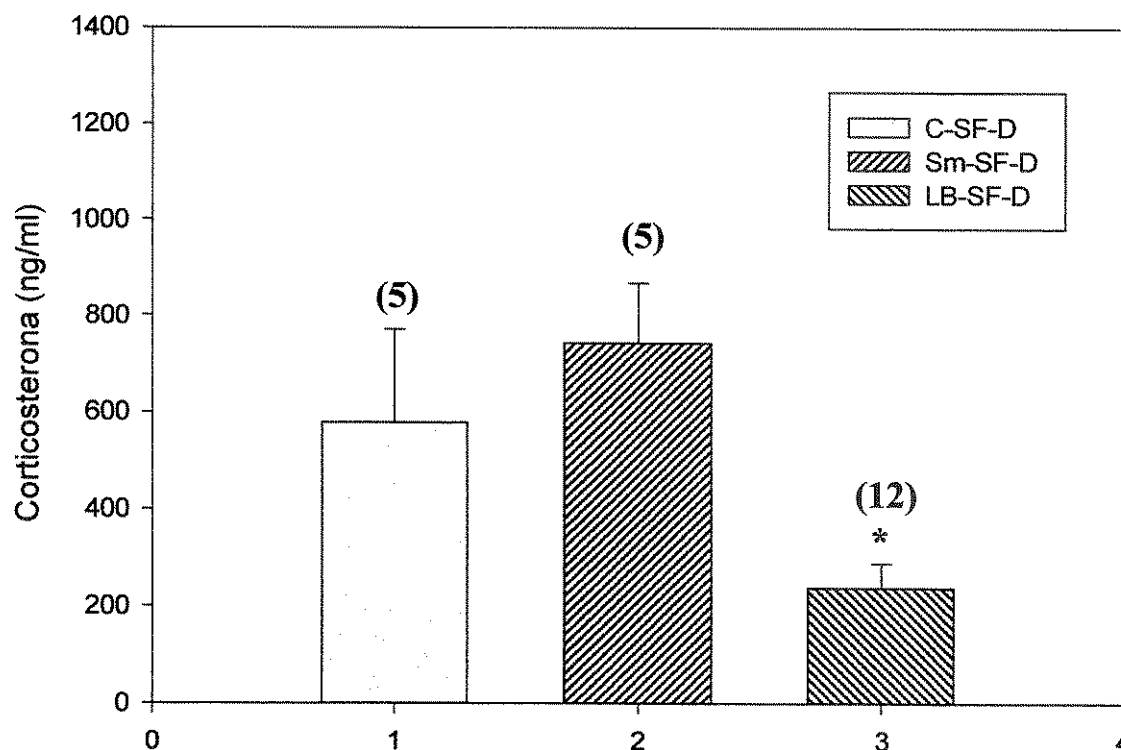


Gráfico 18 - Concentrações de corticosterona de ratos Wistar de diferentes grupos experimentais

Concentrações de corticosterona depois (D) do estresse físico de ratos Wistar submetidos à lesão bilateral do CeA (LB), simulados (Sm) e controles (C). SF: estresse físico; () número de animais

* $p < 0,05$ LB-SF-D X Sm-SF-D; LB-SF-D X C-SF-D (Teste t)

5 - Avaliação Histológica do Núcleo Central da Amígdala (CeA)

Para se lesar bilateralmente o núcleo central da amígdala, utilizou-se um atlas para cérebro de ratos (PAXINOS e WATSON, 1986), e as coordenadas encontradas foram:

- Bregma (ponto de referência): - 2,3 mm
- Lateral: 4 mm
- Vertical (Profundidade) : - 7,8 mm (a partir da duramáter)

As figuras a seguir mostram o local das coordenadas que foi utilizado, primeiro em foto e em seguida de forma esquemática:

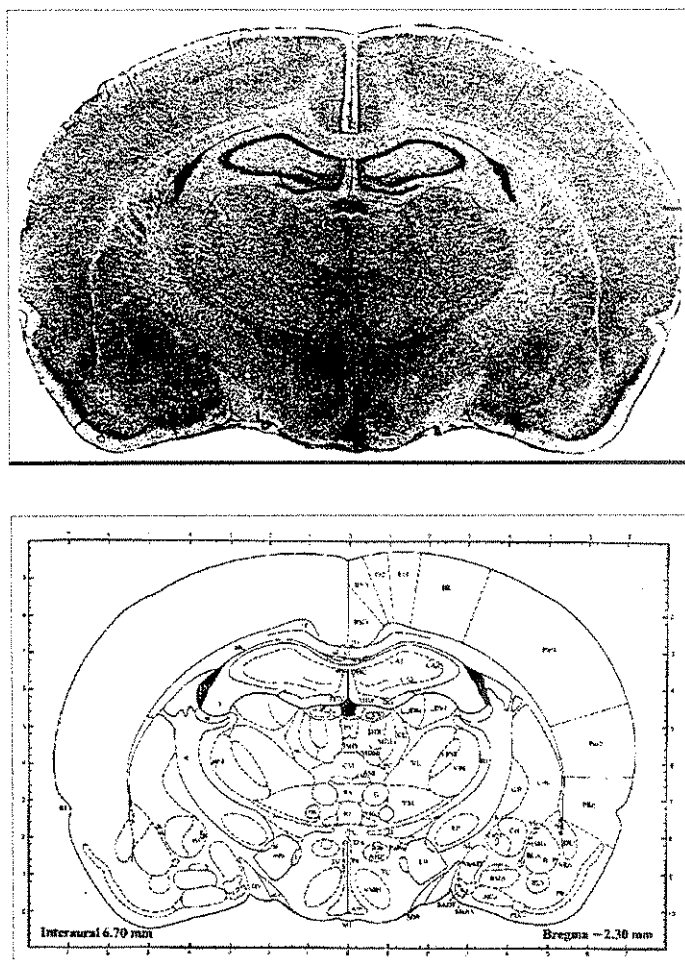


Figura 1 - Corte sagital do cérebro de rato, evidenciando o local escolhido para a execução da lesão eletrolítica.

As figuras abaixo mostram os locais onde foram feitas as lesões bilaterais do CeA, primeiro em foto e em seguida de forma esquemática:

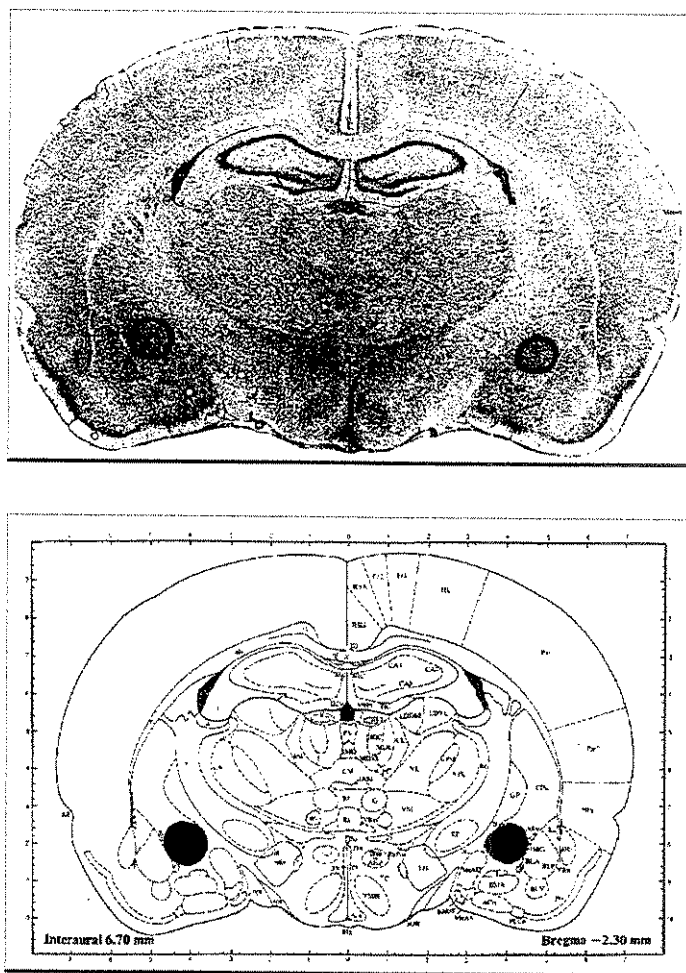


Figura 2 - Corte sagital do cérebro de rato, evidenciando o núcleo central da amígdala (CeA), bilateralmente.

Cabe ressaltar que apenas foram utilizados os animais em que foi observada em lâmina a lesão bilateral do CeA. Os ratos em que se observou em lâmina lesões unilaterais ou lesões em locais incorretos foram excluídos deste estudo.

DISCUSSÃO

A relação da amígdala com as respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais a agentes estressantes está bem estabelecida (GRAY, 1990). Estímulos elétricos no núcleo central da amígdala (CeA) aceleram a frequência cardíaca e a respiração e produzem respostas comportamentais afetivas. Por outro lado, lesões no CeA bloqueiam tanto a elevação na circulação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) causada pelo estresse de imobilização (BEAULIEU et al., 1986) como as respostas da corticosterona a estressores "psicológicos" (VAN DE KAR et al., 1991). A amígdala e, em particular, o núcleo central da amígdala (CeA), é a estrutura límbica-chave envolvida na expressão da ansiedade e o maior sítio para regulação das respostas autonômicas e endócrinas (ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal) ao estresse (DAVIS, 1992; DAVIS, 1997; SCHULKIN et al., 1994, VAN DE KAR et al., 1999). Entretanto, pouco se sabe sobre a sua relação com alguns agentes indutores de estresse físico, como a injeção intraperitoneal de salina hipertônica.

Neste trabalho, avaliou-se o peso corporal, o peso das adrenais, das adeno-hipófises e a resposta da corticosterona plasmática frente a estresse psicológico, de contenção, e físico, por injeção intraperitoneal de salina hipertônica, em animais submetidos à lesão do núcleo central da amígdala. A pesagem dos animais antes do processo cirúrgico e após 15 dias de recuperação teve como objetivo principal avaliar o ganho de peso dos animais submetidos à estereotaxia para a realização da lesão, bem como dos ratos submetidos à simulação da cirurgia, comparando com os ratos-controle, que não sofreram nenhum tipo de processo cirúrgico. Cabe ressaltar que, para a lesão bilateral do CeA, foram utilizadas as coordenadas pré-estabelecidas de PAXINOS e WATSON (1986), e foram excluídos deste estudo todos os animais que apresentaram lesões unilaterais ou lesões em locais incorretos. AL-MOHAISEN et al. (2000) observaram, comparando com animais-controle, que um estresse de imobilização repetido (crônico) resultou em uma diminuição do ganho de peso corporal de ratos. Após 30 dias de estresse, essa diminuição foi de quase 30%. Pôde-se notar que nesses resultados, utilizando estresse agudo, não houve alteração do peso corporal, indicando que o ganho de peso corporal é influenciado significativamente pelo estresse crônico, e não pelo agudo, como realizado neste trabalho. Adicionalmente, observou-se que o tipo de estresse (psicológico ou físico) não influenciou o ganho de peso. Era esperado neste estudo que todos os grupos de animais ganhassem

peso normalmente. Entretanto, pôde-se observar que nos animais lesados houve menor ganho de peso que nos simulados e controles, mostrando que os controles ganharam peso normalmente e os animais submetidos à lesão bilateral do CeA apresentaram um menor ganho de peso corporal. Este fato pode ser explicado devido à dor e irritabilidade ocasionados pelo processo cirúrgico, impossibilitando a busca pela comida. Além disso, segundo o atlas de PAXINOS e WATSON (1986), o CeA está localizado próximo a agrupamentos neuronais (núcleo medial da amígdala) que estão conectados por um feixe de axônios denominado trato amigdalofugal ventral a estruturas que controlam a fome (hipotálamo lateral) e a saciedade (núcleo ventromediano). É possível que algumas lesões não tenham atingido somente o CeA, mas alguns neurônios do núcleo medial da amígdala.

Desde que está bem estabelecido que estresse aumenta o peso das adrenais, avaliou-se neste trabalho este parâmetro, tanto em valor absoluto como relativo ao peso corporal de cada animal, em animais lesados, simulados e controles que não sofreram nenhum tipo de estresse. Observou-se haver um aumento significativo entre o peso relativo das adrenais do grupo lesado comparado ao simulado e ao controle, não havendo diferença entre os animais simulados e controles. Assim, concluiu-se que, provavelmente, o estresse cirúrgico foi o fator importante para o aumento das glândulas. Cabe salientar que o tipo de estresse agudo utilizado neste trabalho não influenciou os pesos das adrenais. Estudos anteriores mostraram que os pesos das adrenais são alterados após estresse crônico (BAUER et al., 2001; HASHIMOTO et al., 1988; FERNANDES et al., 2002).

Em relação aos pesos das adeno-hipófises, foi observado não haver diferença estatística significativa entre os pesos absolutos e entre os pesos relativos de todos os grupos analisados: lesados, simulados e controles. Dessa forma, observou-se que, como indicativo de resposta ao estresse cirúrgico, o peso das adrenais é um parâmetro mais sensível que o peso das adeno-hipófises. Cabe ressaltar que o parâmetro mais adequado para comparação entre os pesos das glândulas é o peso relativo, que compara o peso da glândula ao peso corporal do animal em estudo.

Os glicocorticóides têm um papel de grande importância nas respostas ao estresse em mamíferos. Vários trabalhos foram realizados para demonstrar a elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona em ratos após estresse agudo. Já foi observado ocorrer

um significativo aumento de corticosterona após estresse agudo de imobilização (AL-MOHAISEN et al., 2000; FERNANDES et al., 2002). Outro papel de fundamental importância dos glicocorticóides é o controle da regulação do eixo HPA através da retroalimentação (feedback) negativa. Este é, quantitativamente, o aspecto mais proeminente na regulação deste eixo. Está bem estabelecido que a injeção de glicocorticóides, segundos antes da administração de um estímulo adequado, inibe o aumento de ACTH no plasma. Após 10-12 minutos, a ação inibitória é demonstrável e este fenômeno é chamado feedback de resposta rápida. Uma a duas horas após, a liberação de ACTH está novamente supressa, sendo esta a fase inicial do feedback de resposta lenta ou de resposta intermediária. Uma terceira fase ocorre após 24 horas da administração do corticosteróide (KELLER-WOOD e DALLMAN, 1984).

A variação circadiana dos corticosteróides e do ACTH é uma importante característica do eixo adrenal em muitas espécies, incluindo o homem e o rato. Neste último, uma espécie de hábito noturno, os picos da concentração plasmática de corticosterona e ACTH ocorrem antes do escurecer (18:00 horas) e as concentrações mais baixas ocorrem pela manhã (8:00 - 11:00 horas), padrão este oposto ao encontrado no homem, que apresenta hábitos diurnos. Para se afastar qualquer alteração secundária à variação circadiana, os animais deste estudo foram decapitados entre 8:30 e 10:30.

Agentes estressantes causam um desequilíbrio no organismo. Dependendo de sua natureza e duração, eles podem induzir respostas que, geralmente, incluem um aumento de estímulo ao eixo HPA. Muitos modelos experimentais foram desenvolvidos para estudar os mecanismos de resposta do eixo HPA ao estresse agudo e crônico.

A ativação do eixo HPA é parte de uma resposta fisiológica normal ao estresse. Em resposta ao estresse, o RNAm da proteína c-fos dos neurônios parvocelulares da região medial do NPV respondem rapidamente em 15 minutos, atingindo um pico em 30 minutos e caindo aos níveis de controles em cerca de 90 minutos. (IMAKI et al., 1992). Devido a este fato, todas as coletas de sangue realizadas antes do estresse foram feitas em até três minutos da retirada dos animais de suas gaiolas, tempo insuficiente para que qualquer estímulo ambiental pudesse causar um aumento nas concentrações normais de corticosterona. Os níveis do RNAm de CRH permanecem aumentados até 120-180 minutos

após estímulo estressante. Foi caracterizada a resposta do RNAm do CRH frente a vários estressores físicos, incluindo choque nas patas e salina hipertônica intraperitoneal, assim como estressores psicológicos, como natação e imobilização. (LIGHTMAN et al., 1988; HARBUZ et al., 1989; HARBUZ et al., 1991) Com isso, ocorre, conseqüentemente, uma elevação dos níveis de ACTH e corticosterona.

Com relação às concentrações de corticosterona, índice mais preciso para quantificar a resposta ao estresse dos animais, observou-se que houve diferença significativa entre as concentrações de corticosterona antes (Cort-A) e depois do estresse (Cort-D) em todos os grupos. O grupo-controle, embora não tenha recebido tratamento de estresse físico ou psicológico, apresentou também resposta da corticosterona. Este resultado sugere que, provavelmente, as condições de experimentação não foram totalmente adequadas e estímulos ambientais estressantes estavam presentes durante os experimentos. Além disso, deve-se considerar o fato de se ter, mesmo nos animais-controle, realizado a técnica de coleta de sangue pela cauda, o que, provavelmente, causa estresse. Isso leva a pensar que se teria resultados mais satisfatórios se a técnica de coleta utilizada fosse pelo tronco, após a decapitação. Outro fator importante a ser discutido é a pesagem dos animais antes da coleta de sangue, o que pode ter sido outro fator de estresse. O ideal seria a pesagem um ou dois dias antes da coleta.

Um aspecto intrigante é o fato do grupo lesado também apresentar resposta da corticosterona ao estresse. Dados da literatura mostram que lesões no CeA bloqueiam a elevação de ACTH causada pelo estresse psicológico de contenção (BEAULIEU et al., 1986) e bloqueiam respostas da corticosterona a estressores "psicológicos". (VAN DE KAR et al., 1991). No entanto, já se conhece a existência de outras estruturas relacionadas com a resposta ao estresse agudo. DENOFRÉ-CARVALHO et al. (1997) verificaram que ratos lesados no núcleo dorsomediano não apresentaram a resposta esperada após esvaziamento gástrico, considerado um tipo de estresse agudo. Ratos estressados apresentavam um retardo no processo, o que não aconteceu nos animais lesados. Concluiu-se, então, que o núcleo dorsomediano está relacionado com a resposta ao estresse. Outra hipótese a ser levantada é o fato de que alguns animais do grupo lesado podem não ter tido o CeA lesado em sua totalidade, permanecendo ainda alguns

grupamentos neuronais ativos. Dessa forma, para uma análise final,dever-se-ia aumentar o número de ratos utilizado em cada grupo experimental. Entretanto, embora a resposta ao estresse psicológico tenha sido semelhante em todos os grupos, a resposta da corticosterona ao estresse físico foi menor que a encontrada nos animais do grupo-simulado e do grupo-controle, indicando que a lesão do núcleo central da amígdala bloqueou a resposta da corticosterona induzida pela injeção intraperitoneal de salina.

Esses dados fazem concluir que o estresse físico obtido através da injeção intraperitoneal de salina hipertônica está relacionado com as respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais da amígdala, em particular o núcleo central da amígdala.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- A lesão bilateral do núcleo central da amígdala (CeA) altera o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, modificando a resposta ao estresse do animal;
- A elevação da concentração de corticosterona nos animais com lesão no CeA foi bloqueada em resposta à injeção intraperitoneal de salina hipertônica, indicando que este agente estressor está relacionado com os mecanismos desencadeadores de resposta ao estresse na amígdala e no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, G.; KISS, A.; LU, A.; CAMACHO, C. Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. **Endocrine Res**, 22:433-443, 1996.

AGUILERA, G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. **Trends in Endocrinology and Metabolism (TEM)**, 9 (8):329-336, 1998.

ALEXANDROVÀ, M. Stress induced tyrosine amino-transferase activity via glucocorticoid receptor. **Horm. Metab. Res**, 26:97-99, 1994.

AL-MOHAISEN, M.; CARDOUNEL, A.; KALIMI, M. Repeated immobilization stress increases total cytosolic glucocorticoid receptor in rat liver. **Steroids**, 65: 8-15, 2000.

ARNOLD, F.J.L.; DE LUCAS BUENO, M.; SHIERS, H.; HANCOCK, D.C.; EVAN, G.I.; HERBERT, J. Expression of c-fos in regions of the basal limbic forebrain following intracerebroventricular corticotropin-releasing factor in unstressed and stressed male rats. **Neuroscience**, 51:377-390, 1992.

BAUER, M.E.; PERKS, P.; LIGHTMAN, S.L.; SHANKS, N. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. **Physiology & Behavior**, 73: 525-532, 2001.

BEAULIEU, S.; DI PAOLO, T.; BARDEN, N. Control of ACTH secretion by the central nucleus of the amygdala: Implication of the serotonergic system and its relevance to the glucocorticoid delayed feedback mechanism. **Neuroendocrinology**, 44:247-254, 1986.

CECCATELLI, S.; VILLAR, M.J.; GOLDSTEIN, M.; HÖKFELT, T. Expression of c-fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86:9569-9573, 1989.

CRATTY, M.S.; WARD, H.E.; JOHNSON, E.A.; AZZARO, A.J.; BIRKLE, D.L. Prenatal stress increases corticotropin-releasing factor (CRF) content and release in rat amygdala minces. **Brain Research**, 675: 297-302, 1995.

CROFFORD, L.J.; SANO, H.; KARALIS, K.; WEBSTER, E.L.; GOLDMUNTZ, E.A.; CHROUSOS, G.P. et al. Local secretion of corticotropin- releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. **J. Clin. Invest**, 90: 2555-2564, 1992.

CUMMINGS, S.; ELDE, R.; ELLS, J.; LINDALL, A. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. **J. Neurosci**, 3:1355-1368, 1983.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annu. Rev. Neurosci**, 15: 353-375, 1992.

DAVIS, M. Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosc**, 9: 382-402, 1997.

DENOFRE-CARVALHO, S.; COLLARES, E.F.; FERNANDES, G.A. Faster gastric emptying of a liquid meal in rats after hypothalamic dorsomedial nucleus lesion. **Braz. J. Med. Biol. Res**, 30: 1121-1127, 1997.

DE SOUZA, E.B.; INSEL, T.R.; PERRIN, M.H.; RIVIER, J.; VALE, W.; KUCHAR, M.J. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. **J. Neurosci**, 5:3189-3203, 1985.

EUKER, J.S.; MEITES, J.; RIEGIE, G.D. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. **Endocrinology**, 96:85-92, 1975.

FERNANDES, G.A.; PERKS, P.; COX, N.K.M.; LIGHTMAN, S.L.; INGRAM, C.D.; SHANKS, N. Habituation and cross-sensitization of stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity: effect of lesions in the paraventricular nucleus of the thalamus or bed nuclei of the stria terminalis. **Journal of Neuroendocrinology**, 14: 593-602, 2002.

FLESHNER, M.; GOEHLER, L.E.; HERMANN, J.; RELTON, J.K.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Interleukin-1 β induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. **Brain Res. Bull**, 37:605-610, 1995.

GAYKEMA, R.P.A.; DIJKSTRA, I.; TILDERS, F.J.H. Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. **Endocrinol**, 136:4717-4720, 1995.

GRAY, T.S.; CARNEY, M.E.; MAGNUSON, D.J. Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced ACTH release. **Neuroendocrinol**, 50: 433-446, 1989.

GRAY, T.S. The organization and possible function of amygdaloid corticotropin-releasing factor pathways. In *Corticotropin-Releasing Factor: Basic and Clinical Studies of a Neuropeptide*. E.B.De Souza & C.B.Nemeroff, **CRC Press** Boca Raton, FL., 53-68, 1990.

GRAY, T.S. Amygdaloid CRF pathways - Role in autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to stress. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, 697: 53-60, 1993.

HARBUZ, M.S. & S.L. LIGHTMAN. Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat. **J. Endocrinol**, 122: 705-711, 1989.

HARBUZ, M.S; J.A.RUSSELL, B.E.H.SUMNER, M.KAWATA & S.L.LIGHTMAN. Rapid changes in the content of proenkefalin A and corticotrophin releasing hormone mRNAs in the paraventricular nucleus during morphine withdrawal in urethane-anaesthetized rats. **Mol. Brain Res**, 9: 285-291, 1991.

HARBUZ, M.S.; LIGHTMAN, S.L. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. **J. Endocrinol**, 134: 327-339, 1992.

HASHIMOTO, K.; SUEMARU, S.; TAKAO, T.; SUGAWARA, M.; MAKINO, S.; OTA, Z. Corticotropin-releasing hormone and pituitary-adrenocortical responses in chronically stressed rats. **Regul. Pept**, 23: 117-126, 1988.

HOKFELT, T.; FAHRENKRUG, J.; TATEMOTO, K.; MUTT, V.; WERNER, S.; HULTING, A.L. et al. The PHI (PHI-27)/corticotropin-releasing factor/enkephalin immunoreactive hypothalamic neuron: possible morphological basis of integrated control of prolactin, corticotropin and growth hormone secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, 80: 895-898, 1983.

IMAKI, T.; SHIBASAKI, M.; HOTTA & H. DEMARA. Early induction of c-fos precedes increased expression of corticotrophin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress. **Endocrinology**, 131: 240-246, 1992.

IWATA, J.; CHIDA, K.; LE DOUX, J.E. Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central nucleus of amygdala in awake, but not anesthetized rats, resemble conditioned emotional responses. **Brain Res**, 418: 183-188, 1987.

JOSEPH, S.A.; KNIGGE, K.M. Corticotropin-releasing factor: immunocytochemical localization in rat brain. **Neurosci.Lett**, 35: 135-141, 1983.

KANT, G.J.; OUGUY, E.H.; PENNINGTON, L.L.; MEYERHOFF, J.L. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH, corticosterone and prolactin. **Life Sci**, 33: 2657-2663, 1983.

KARALIS, K.; SANO, H.; REDWINE, J.; LISTWAK, S.; WILDER, R.L.; CHROUSOS, G.P. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. **Science**, 254: 421-423, 1991.

KELLER-WOOD, M., DALLMAN, M. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. **Endocr. Rev**, 5:1-24, 1984.

KLUVER, H.; BUCY, P.C. Preliminary analysis of functions of the temporal lobe in monkeys. **Arch. Neurol. Psychiatry**, 42: 979-1000, 1939.

KONONEN, J.; HONKANIEMI, J.; ALHO, H.; KOISTINAHO, J.; IADAROLA, M.; PELTO-HUIKKO, M. Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic-pituitary axis after immobilization stress. **Endocrinology**, 130: 3041-3047, 1992.

KRULISH, L.; HEFCO, E.; ILLNER, P.; READ, C.B. The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. **Neuroendocrinology**, 16: 293-311, 1974.

LIGHTMAN, S.L. & W.S.YOUNG III. Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and proopiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. **J. Physiol.** 403: 511-523, 1988.

LIGHTMAN, S.L.; HARBUZ, M.; KNIGHT, R.A.; CHOWDREY, H.S. CRF mRNA in normal and stress conditions. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, 697: 28-38, 1993.

LUO, X., KISS, A., MAKARA, G., LOLAET, S.J., AGUILERA, G. Stress-specific regulation of releasing hormone receptor expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, 6: 689-696, 1994.

- MARTI, O.; MARTIN, M.; GAVALDA, A.; GIRALT, M.; HIDALGO, J.; HSU, B.R.; KUHN, R.; ANTONIO, A. Inhibition of corticosteroid-binding globulin caused by a severe stressor is apparently mediated by the adrenal but not by glucocorticoid receptors. **Endocrine**, 6: 159-164, 1997.
- MC EWEN, B.S.; STELLAR, E. Stress and the individual. **Arch. Intern. Med**, 153: 2093-2101, 1993.
- MERCHENTHALER, I.; VIGH, S.; PETRUSZ, P.; SCHALLY, A.V. Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. **Am. J. Anat**, 165: 385-396, 1982.
- MURPHY, H.M.; WIDEMAN, C.H.; ROW, J.P. Vasopressin, immobilization and the dexamethasone suppression test in rats. **Peptides**, 16: 437-440, 1995.
- ORTH, D.N. Corticotropin-releasing hormone in humans. **Endocr. Ver**, 13: 164-191, 1992.
- PAXINOS, G. ; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, 2ed., N.Y., 1986.
- PICKERING, A.D. The concept of biological stress. In: Stress and fish. Pickering Ed. **Academic Press**, N.Y., 1981.
- RIVIER, C.; BROWNSTEIN, M.; SPIESS, J.; RIVIER, J.; VALE, W. In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, β -endorphin and corticosterone. **Endocrinology**, 110: 272-278, 1982.
- SAKANAKA, M.; SHIBASAKI, T.; LEDERIS, K. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine method. **J. Comp. Neurol**, 260: 256-298, 1987.
- SANANES, C.B.; CAMPBELL, B.A. Role of the central nucleus of the amygdala in olfactory heart rat conditioning. **Behav. Neurosci**, 103: 519-525, 1989.
- SAPOLSKY, R.M. Stress in the wild. **Scientific American**, 106-113, Jan. 1990.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, 138(1): 32, 1936.

- SCHREIBER, S.S.; TOCCO, G.; SHORS, T.J.; THOMPSON, R.F. Activation of immediate early genes after acute stress. **Neuro Report**, 2: 7-20, 1991.
- SCHULKIN, J.; MCEWEN, B.S.; GOLD, P.W. Allostasis, amygdala and anticipatory angst. **Neurosci Biobehav Rev** 18: 389-396, 1994.
- SHENG, M.; GREENBERG, M.E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, 4: 447-485, 1990.
- SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E.; RIVIER, J.; VALE, W. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, 36: 165-186, 1983.
- VAN DE KAR, L.D.; PEICHOWSKI, R.A.; RITTENHOUSE, P.A.; GRAY, T.S. Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. **Neuroendocrinology**, 54: 89-95, 1991.
- VAN DE KAR, L.D.; RICHARDSON-MORTON, K.D.; RITTENHOUSE, P.A. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. **Methods Achieve Exp. Pathol**, 14: 133-173, 1991.
- VAN DE KAR, L.D.; BLAIR, M.L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion, **Front Neuroendocrinol**, 20: 1-48, 1999.
- VANDERWOLF, C.H.; KELLY, M.E.; KRAEMER, P.; STREATHER, A. Are emotion and motivation localized in the limbic system and nucleus accumbens? **Behav Brain Res**, 27: 45-58, 1988.
- VECSEI, P. Glucocorticoids: cortisol, corticosterone and compounds. In: Jaffe, B.M.; Berman, H.R. Methods of hormone radioimmunoassay. **Academic Press**, New York, 39: 767-792, 1979.
- WALLACE, D.M.; MAGNUSON, D.J.; GRAY, T.S. Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic and adrenergic cell groups in the rat. **Brain Res Bull**, 28: 447-454, 1992.

ANEXO

Tabela 1 - Valores individuais de pesos corporais iniciais (PC-I) e finais (PC-F) (g), em $X \pm DP \pm EPM$ dos animais lesados (LB) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	LB - PC-I -SP	LB - PC-F -SP	LB - PC-I -SF	LB - PC-F -SF	LB - PC-I -SE	LB - PC-F -SE
	190	256	245	210	205	255
	226	232	250	219	192	262
	233	285	190	255	270	334
	180	260	175	268	224	266
	176	265	280	361	225	234
	267	180	193	240	225	225
	325	272	238	320	238	195
	245	321	210	275	230	235
	218	274	240	270	255	256
			247	294	258	290
			230	238	294	300
			250	284	325	335
			238	275		
X	228,89	260,56	229,69	269,92	245,08	265,58
DP	47,16	38,58	29,49	40,78	37,68	42,70
EPM	14,82	12,12	7,86	10,87	10,41	11,80

Tabela 2 - Valores individuais de pesos corporais iniciais (PC-I) e finais (PC-F) (g), em $X \pm DP \pm EPM$ dos animais simulados (Sm) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	Sm- PC-I -SP	Sm - PC-F-SP	Sm - PC-I -SF	Sm - PC-F-SF	Sm - PC-I -SE	Sm- PC-F -SE
	165	239	270	310	235	316
	246	351	253	319	185	258
	256	358	215	280	168	275
	245	285	230	304	229	310
			250	318	220	286
					275	327
					242	319
					266	336
					239	305
					280	352
					255	325
					225	274
					245	305
					210	263
					248	305
					255	298
					278	320
					295	350
X	228	308,25	243,6	306,2	241,67	306,89
DP	42,29	56,68	21,38	15,88	32,85	27,47
EPM	18,31	24,54	8,55	6,35	7,52	6,29

Tabela 3 - Valores individuais de pesos corporais iniciais (PC-I) e finais (PC-F) (g), em $X \pm DP \pm EPM$ dos animais controles (C) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	C- PC-I -SP	C - PC-F -SP	C - PC-I -SF	C - PC-F -SF	C - PC-I -SE	C- PC-F -SE
	235	328	290	360	290	336
	260	352	285	343	270	345
	240	328	220	280	170	246
	210	282	280	316	259	351
	230	296	275	355	225	298
					310	371
					265	317
					250	378
					240	290
					305	383
					170	255
					130	250
					140	255
					120	233
					242	335
X	235	317,2	270	330,8	225,73	309,53
DP	18,03	27,99	28,50	33,12	63,86	52,20
EPM	7,21	11,19	11,40	13,25	15,93	13,02

Tabela 4 - Valores individuais de pesos absolutos (Adab) (mg)e relativos (Adr) (mg/100g), em $X \pm DP \pm EPM$ das adrenais dos animais lesados (LB) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	LB - Adab -SP	LB - Adr -SP	LB- Adab -SF	LB - Adr -SF	LB - Adab-SE	LB - Adr -SE
	48	18,7	45	21,4	63,4	24,9
	56,8	24,5	51	23,3	70	26,7
	51,4	18	52,8	20,7	69	20,7
	68,8	26,5	70	26,1	68,1	25,6
	62,8	23,7	60,4	16,7	46,8	20
	49,8	27,7	57,8	24,1	45,4	20,2
	82	30,2	65,8	20,6	42,4	21,7
	51,8	16,1	51,8	24,1	39,8	16,9
	62,4	22,8	66,4	24,59	62,6	24,45
			63,8	21,7	67,8	23,38
			52,8	22,18	73	24,33
			73,4	25,85	75,2	22,45
			49,8	18,11		
X	59,31	23,13	58,52	22,26	60,29	22,61
DP	11,01	4,74	8,79	2,82	12,90	2,82
EPM	3,46	1,49	2,34	0,75	3,56	0,78

Tabela 5 - Valores individuais de pesos absolutos (Adab) (mg) e relativos (Adr) (mg/100g), em $X \pm DP \pm EPM$ das adrenais dos animais simulados (Sm) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	Sm- Adab -SP	Sm - Adr -SP	Sm- Adab -SF	Sm - Adr -SF	Sm- Adab-SE	Sm - Adr -SE
	61,2	25,6	74,6	24,1	52,9	16,7
	64,4	18,4	70	21,9	72,4	28,1
	69,8	19,5	64,2	22,9	46,8	17
	58,8	20,6	55,6	18,3	61,4	19,8
			47	14,8	47,2	16,5
					75,8	23,2
					58,32	18,2
					61,2	18,2
					48,8	15
					59	16,8
					69,4	21,35
					60,4	22,1
					70,2	23
					53,8	20,5
					67,2	22
					81,2	20,4
					61,6	19,25
X	63,55	21,03	62,28	20,4	61,62	19,89
DP	4,76	3,18	11,10	3,81	10,05	3,26
EPM	2,06	1,38	4,44	1,52	2,36	0,77

Tabela 6 - Valores individuais de pesos absolutos (Adab) (mg) e relativos (Adr) (mg/100g), em $X \pm DP \pm EPM$ das adrenais dos animais controles (C) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	C- Adab -SP	C - Adr -SP	C- Adab -SF	C - Adr -SF	C- Adab-SE	C - Adr -SE
	48	14,6	80,8	22,4	67,8	20,2
	51,2	14,6	54,8	16	49,8	14,4
	78	23,8	53,6	19,1	42,4	17,2
	68,2	24,2	76,8	24,3	64,6	18,4
	62,8	21,2	72	20,3	42	14,1
					62,4	16,8
					50,4	15,9
					63,4	16,8
					50,8	17,5
					44,4	11,6
					65,2	25,6
					60,8	24,3
					66	25,9
					56,8	24,4
					60,2	17,9
X	61,64	19,68	67,6	20,42	56,47	18,73
DP	12,32	4,78	12,63	3,17	9,04	4,43
EPM	4,93	1,91	5,05	1,27	2,25	1,11

Tabela 7 - Valores individuais de pesos absolutos (AHab) (mg) e relativos (AHr) (mg/100g), em $X \pm DP \pm EPM$ das adeno-hipófises dos animais lesados (LB) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	LB -AHab -SP	LB - AHr -SP	LB -AHab -SF	LB - AHr -SF	LB - AHab-SE	LB - AHr -SE
	7,4	2,9	5,6	2,7	7,6	2,9
	5,2	2,2	4,8	2,2	5,4	2,1
	4	1,4	5	1,9	6,2	1,9
	6,2	2,4	7	2,6	9,7	3,7
	5,2	1,9	6,4	1,7	5,8	2,5
	5,8	3,2	5	2,1	5,8	2,6
	10,8	3,9	6,8	2,1	3,8	1,9
	7,2	2,2	7,4	2,7	4,8	2
	6,2	2,3	3,8	1,4	7,6	2,9
			6,8	2,3	8,8	3
			5	2,1	6,8	2,3
			7,4	2,6	8,8	2,6
			7,8	2,8		
X	6,44	2,49	6,06	2,25	6,76	2,53
DP	1,94	0,74	1,26	0,43	1,78	0,54
EPM	0,61	0,23	0,34	0,11	0,49	0,15

Tabela 8 - Valores individuais de pesos absolutos (AHab) (mg) e relativos (AHr) (mg/100g), em $X \pm DP \pm EPM$ das adeno-hipófises dos animais simulados (Sm) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	Sm-AHab -SP	Sm - AHr -SP	Sm -AHab -SF	Sm - AHr -SF	Sm- AHab-SE	Sm - AHr -SE
	6	2,5	6,8	2,2	6,9	2,2
	6	1,7	6,8	2,1	8	3,1
	7,4	2,1	5,8	2,1	6,8	2,5
	6,4	2,3	7	2,3	5,8	1,9
			7,2	2,3	6,2	2,2
					7,2	2,2
					5,4	1,7
					5,4	1,6
					3,8	1,3
					9,2	2,6
					8	2,5
					8,4	3,1
					9	3
					7,8	3
					9,4	3,1
					9,4	2,9
X	6,45	2,15	6,72	2,2	7,29	2,43
DP	0,66	0,34	0,54	0,1	1,66	0,59
EPM	0,29	0,15	0,22	0,04	0,40	0,14

Tabela 9 - Valores individuais de pesos absolutos (AHab) (mg) e relativos (AHR) (mg/100g), em $X \pm DP \pm EPM$ das adeno-hipófises dos animais controles (C) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	C-AHab -SP	C - AHR -SP	C -AHab -SF	C - AHR -SF	C- AHab-SE	C - AHR -SE
	7,4	2,5	6,8	2,2	6,9	2,2
	6	2,5	6,8	2,1	8	3,1
	6	1,7	5,8	2,1	6,8	2,5
	7,4	2,1	7	2,3	5,8	1,9
	6,4	2,3	7,2	2,3	6,2	2,2
					7,2	2,2
					5,4	1,7
					5,4	1,6
					3,8	1,3
					9,2	2,6
					8,4	3,3
					8	3,2
					7,2	2,8
					7	3
					9,8	2,9
X	6,64	2,22	6,72	2,2	7,01	2,43
DP	0,71	0,33	0,54	0,1	1,56	0,62
EPM	0,29	0,13	0,22	0,04	0,39	0,16

Tabela 10 - Valores individuais de corticosterona plasmática (ng/ml) antes (Cort-A) e após estresse (Cort-D), em $X \pm DP \pm EPM$ dos animais lesados (LB) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	LB-CortA -SP	LB -CortD-SP	LB-CortA -SF	LB-CortD -SF	LB-CortA-SE	LB-CortD -SE
	2,5	167,8	249,1	210,4	2,5	160,8
	1,8	145,8	560,3	429,5	2,5	197,5
	2,9	482,6	80	625	4,46	195,1
	2,5	240	2,5	230	2,5	2,5
	2,5	235	2,5	300	2,5	150
	250	150	2,5	180	2,5	2,5
	2,5	205	2,5	2,5	2,5	2,5
	2,5	455	1,25	175	70	230
	2,5	235	1,25	50	50	275
			1,25	375	1,25	105
			1,25	155	37,5	70
			1,25	130	1,25	82,5
X	29,97	257,36	75,47	238,53	14,96	122,78
DP	82,51	125,41	168,97	172,30	23,71	93,32
EPM	25,93	39,41	46,70	47,62	6,55	25,79

Tabela 11 - Valores individuais de corticosterona plasmática (ng/ml) antes (Cort-A) e após estresse (Cort-D), em $X \pm DP \pm EPM$ dos animais simulados (Sm) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	Sm-CortA -SP	Sm-CortD-SP	Sm-CortA -SF	Sm-CortD-SF	Sm-CortA-SE	Sm-CortD -SE
	72,5	343	6,9	840,9	2,5	728
	2,5	477,8	6,9	388,2	2,5	828
	1,8	80,6	6,9	622,2	2,5	269,3
	1,8	54,2	168,3	1147,8	2	2
			4,5	714,7	1,8	174,3
					2,9	308,1
					6,9	175,7
					6,9	189,6
					79,5	1,6
					4,5	517,9
					35	150
					1,25	425
					1,25	105
					1,25	42,5
					1,25	62,5
					140	175
					1,25	1,25
					135	350
X	19,65	238,9	38,7	742,76	23,79	250,32
DP	35,23	205,82	72,46	280,50	45,59	241,75
EPM	15,26	89,12	28,98	112,20	10,44	55,38

Tabela 12 - Valores individuais de corticosterona plasmática (ng/ml) antes (Cort-A) e após estresse (Cort-D), em $X \pm DP \pm EPM$ dos animais controles (C) submetidos ao estresse psicológico (SP), estresse físico (SF) e os não submetidos a estresse (SE).

ANIMAIS	C-CortA -SP	C-CortD-SP	C-CortA -SF	C-CortD-SF	C-CortA-SE	C-CortD -SE
	2,5	458,8	2,9	452,6	2,5	144,3
	2,5	641,8	6,9	1335,4	2,5	500,8
	2	199,2	1,6	322,9	2	189
	2	190,6	4,5	293,8	55,2	147
	1,8	177,7	4,5	484,4	1,8	60,3
					2,9	308,1
					2,9	2,9
					45,3	82,6
					1,6	91,7
					4,5	289,3
					75	50
					1,25	37,5
					1,25	1,25
					50	475
					1,25	750
X	2,16	333,62	4,08	577,82	16,66	208,65
DP	0,32	208,25	1,99	431,27	25,53	218,02
EPM	0,13	83,30	0,80	172,51	6,37	54,38