

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA



SILVANA DENOFRE CARVALHO

**"HABITUAÇÃO AO ESTRESSE EM RATOS COM LESÃO DO NÚCLEO
DORSOMEDIANO DO HIPOTÁLAMO"**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Silvana Denofre
Carvalho
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Funcional e Molecular na área de
Fisiologia.

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto D' Assunção Fernandes

A large, stylized handwritten signature of Gilberto D. Assunção Fernandes, which extends downwards and to the right, crossing over the date.

Campinas-SP
2002

UNIVERSIDADE Be
CHAMADA T/UNICAMP
C253h
EX
DMBO BCI 51151
ROC 16-837/02
DX
REÇO R\$ 11,00
ATA 01/10/02
CPD

CM00174657-B

313 1D 259905

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C253h

Carvalho, Silvana Denofre

Habituação ao estresse em ratos com lesão do núcleo dorsomediano do hipotálamo/Silvana Denofre Carvalho. --
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Gilberto D'Assunção Fernandes

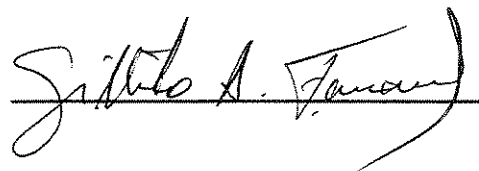
Tese(Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas . Instituto de Biologia.

1. Estresse. 2. Habituação. 3. Hipotálamo. I. Fernandes, Gilberto D'Assunção. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 09 de agosto de 2002.

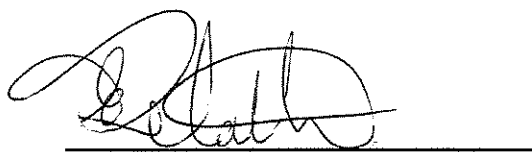
Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilberto D' Assunção Fernandes

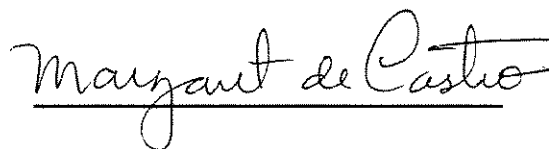


Prof. Dr. Edgard Ferro Collares

Prof. Dr. Edson Delattre



Profa. Dra. Margaret de Castro



Profa. Dra. Milva Maria Figueiredo De Martino



Prof. Dr. Francesco Langone



Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas

6609/2000

"A essência de toda vida espiritual é a emoção que existe dentro de você, é a sua atitude para com os outros. Se a sua motivação é pura e sincera, todo o resto vem por si. Você pode desenvolver essa atitude correta para com seus semelhantes baseando-se na bondade, no amor, no respeito e sobre tudo na clara percepção da singularidade de cada ser humano"

(Dalai – Lama)

À **Antonio, Aron e Afonso**, Seres humanos amados e
Imprescindíveis em minha vida...

dedico.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Gilberto D Assunção Fernandes, pela confiança e orientação, pela sabedoria e pelo exemplo de dedicação à pesquisa científica.

À Professora Dra. Margaret de Castro, pela ajuda, disponibilidade e sobre tudo pelo acolhimento no Laboratório de Endocrinologia dos Departamentos de Fisiologia e de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Aos Professores Drs Edson Delattre, Miguel Arcanjo Áreas e Milva Maria Figueiredo De Martino pelas sugestões na banca de qualificação.

Ao Professor Dr. José Antunes Rodrigues, do Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela gentileza em nos ceder anticorpo anti-corticosterona para as dosagens hormonais.

Ao Dr. William César Cavazana, pela ajuda e disponibilidade na discussão do projeto e pela amizade.

A Dra. Paula Virgínea Bottini, do Laboratório de Patologia Clínica (UNICAMP), pela dedicação na confecção das fotomicrografias.

Aos funcionários Ismael Vêncio, do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas (UNICAMP) e a Gisele Cloilde Ferreira do Laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (UNICAMP), pelo precioso auxílio técnico na execução e na coloração H.E. dos cortes histológicos.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiologia Clínica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (UNICAMP), em especial ao Roberto César Sthal e ao Jamilson Conceição Alves, pelo apoio técnico e amizade.

Aos Professores, funcionários e colegas do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela colaboração, convivência e amizade.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos docentes e colegas do Departamento de Enfermagem da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em especial a Profa. Dra. Irma de Oliveira e a Enfa. Tânia Maria Coelho Leite, pelo apoio, compreensão e estímulo que sempre me ofereceram.

Aos funcionários do Departamento de Enfermagem da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em especial ao Carlos Alberto Fidelis de Araújo, pela atenção, disponibilidade e responsabilidade com que editou este trabalho.

À minha querida família que sempre me apoiou em todos os momentos.

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

Lista de Figuras	x
Resumo	xii
Abstract.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Animais.....	13
3.2 Grupos Experimentais	13
3.2.1 Manipulação Cirúrgica	14
3.2.1.1 Lesão eletrolítica do Núcleo Dorsomediano do Hipotálamo (LNDM)	14
3.2.2 Coleta de Sangue.....	15
3.2.3 Dosagem Hormonal.....	16
3.2.3.1 Radioimunoensaio da Corticosterona	16
3.2.4 Mensuração do peso corporal	17
3.2.5 Modelo de Estresse.....	17
3.2.6 Controle da localização e extensão das lesões (Histologia)	17
3.2.7 Avaliação das estruturas hipotalâmicas circunvizinhas ao NDM	18
3.2.7.1 Corte coronal do local escolhido para as lesões do NDM	18
3.2.7.2 Corte coronal de uma lesão bilateral restrita ao NDM.....	19
3.2.7.3 Corte coronal de uma lesão bilateral do NDM comprometendo estruturas vizinhas	20
3.2.8 Análise Estatística	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Concentração Plasmática de Corticosterona (B).....	22
4.1.1 Experimento em condições basais:	22
4.1.2 Grupo Controle	23
4.1.3 Grupo com Cirurgia Simulada	25
4.1.4 Grupo com Lesão do NDM do hipotálamo.....	26

4.1.5 Grupo Controle, com Cirurgia Simulada e com Lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse durante 3 dias	27
4.1.6 Grupo Controle, com Cirurgia Simulada e com Lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse de 9 dias	28
4.1.7 Grupo Controle, com Cirurgia Simulada e com Lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse de 15 dias.	30
4.1.8 Grupo Controle, com Cirurgia Simulada e com Lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse de 3 dias, 9 dias e 15 dias.	31
4.2 Avaliação Histológica do NDM do hipotálamo	33
4.2.1 Corte histológico normal	33
4.2.2 Corte histológico das lesões.....	34
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
8. ANEXOS.....	56

Lista de figuras

Figura 1: Corte coronal do cérebro de rato, evidenciando o local escolhido para a execução da lesão eletrolítica.	18
Figura 2: Extensão de uma lesão do NDM do hipotálamo cuja lesão, se comportou de forma restrita ao NDM.	19
Figura 3: Extensão de uma lesão do NDM do hipotálamo cuja lesão, comprometeu áreas vizinhas a este núcleo.	20
Figura 4: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais controles, simulados e lesados mantidos em condições basais durante um período de 15 dias.....	23
Figura 5: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais controle basal e controle com sessões de estresse de 1, 3, 9 e 15 dias.....	24
Figura 6: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais com cirurgia simulada basal e cirurgia simulada com sessões de estresse de 3, 9 e 15 dias.	25
Figura 7+: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais com lesão do NDM do hipotálamo em condições basais e animais com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse de 3, 9 e 15 dias.	27
Figura 8: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse por 3 dias.....	28
Figura 9: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse por 9 dias.....	29

Figura 10: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse por 15 dias.....	30
Figura 11: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse por 3, 9 e 15 dias.	32
Figura 12: Fotomicrografia do núcleo dorsomediano do hipotálamo nos aumentos 25X (A) e 100X (B); Coloração hematoxilina eosina (H.E.).....	33
Figura 13: Fotomicrografia de uma lesão padrão do núcleo dorsomediano do hipotálamo nos aumentos 25X (A) e 100X (B); Coloração hematoxilina eosina (H.E.).	34

O Núcleo Dorsomediano do Hipotálamo (NDMH) participa dos mecanismos que controlam a resposta ao estresse. A finalidade deste estudo foi avaliar os efeitos da lesão eletrolítica do NDMH sobre o estresse (através da concentração sérica de corticosterona) e sua habituação, comparados à resposta basal no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Foram estudados 120 ratos Wistar machos, com peso médio de 280g, distribuídos em três grupos: controle, simulado e lesado. Neste, o NDMH foi lesado por eletrólise guiada por estereotaxia; o estímulo de estresse escolhido foi o da imobilização forçada. Após 15 dias de adaptação às intervenções, os três grupos foram igualmente submetidos a sessões de estresse de imobilização por períodos de três, nove e quinze dias consecutivos ininterruptos. Ao final de cada período, um grupo de animais era sacrificado por decapitação, e amostras de sangue eram colhidas para determinação dos níveis séricos de corticosterona. Os cérebros dos animais lesados foram submetidos a análise histológica para identificar a presença de lesão bilateral do NDMH e confirmar sua inclusão. Observou-se, neste grupo, que a concentração sérica de corticosterona aumentou significativamente em condições basais, sofrendo depois uma redução que se manteve praticamente constante durante os períodos de estresse de imobilização. Nossos resultados sugerem que a lesão eletrolítica do NDMH altera o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, modificando a resposta basal. Os ratos do grupo lesado não reconheceram os estímulos estressores, portanto o processo de habituação não foi desencadeado nestes animais.

Palavras chaves: estresse, habituação, hipotálamo, lesão, núcleo dorsomediano.

The dorsomedial hypothalamic nucleus (DMHN) participates in the mechanisms which control the stress response. The objective of this study was to evaluate the effects of the electrolytic lesion of DMHN on cortisone levels and on habituation to stress. The studied population was 120 rats (Wistar, UNICAMP) with average weight of 280g, divided in three groups: control, simulated and lesioned. The simulated group underwent brain surgery; the lesioned group was submitted to the same procedure, but received the electrolytic lesion guided by stereotaxy. After 15 days of adaptation, the three groups were equally submitted to uninterrupted sessions of stress through immobilization, for three, nine and fifteen consecutive days. After each session a sample of each group was sacrificed by decapitation, and blood samples were taken to determine cortisone levels. The brains of the lesioned rats underwent histological analysis in order to prove bilateral lesion of DMHN and confirm their inclusion. Results: the cortisone blood levels in lesioned rats increased significantly in basal conditions, decreasing afterwards to levels which remained unchanged through the periods of immobilization stress. Our results suggest that DMHN lesion alters the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, modifying the animal's basal response. The lesioned rats did not recognize the stressor stimuli; therefore the habituation process was not triggered.

Key words: stress, habituation, hypothalamus, lesion, dorsomedial nucleus.

INTRODUÇÃO

1

Em 1936, o cientista e médico austríaco Hans Selye apresentou, pela primeira vez em biologia, o conceito de estresse. Já no tempo de estudante, Selye notava que seus pacientes, antes de apresentarem os sintomas típicos de uma determinada doença, mostravam um conjunto de características muito semelhantes, independentes da causa da enfermidade. A partir desse fato, ele conceituou o estresse como uma síndrome geral de adaptação, ou seja, um conjunto de reações sistêmicas e não específicas que surgem quando ocorre uma exposição do organismo a agentes agressores.

Estudando o fenômeno de modo sistemático, **SELYE (1936)**, pesquisando os efeitos de um extrato químico, observou que seus animais (ratos), desenvolviam úlceras gastrointestinais, atrofia do sistema imune e aumento das glândulas adrenais. Ficou surpreso, quando observou que os animais do grupo controle que haviam recebido injeção de solução salina, apresentaram alterações semelhantes. Analisando estes resultados, Selye concluiu que tais alterações estavam relacionadas à aplicação das repetidas injeções. Encontrou o

mesmo resultado expondo animais ao frio, a patógenos, a toxinas ou ao ruído **(SELYE, 1936; SAPOLSKY, 1990)**. Com base nestes resultados, **SELYE (1936)** descreveu a Síndrome Geral da Adaptação.

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

Diferentes autores estudaram a natureza inespecífica da reação de estresse e observaram que a intensidade da resposta obtida varia com a qualidade e intensidade de agente estressante **(MASON, 1968a, 1968b; HENNESSY et al., 1979; HERD, 1991)**.

Fatores individuais tais como características genéticas **(MARPLE et al., 1972)**, sexo **(LESCOAT et al., 1970; ANISHCHENKO & GUDKOVA, 1992; PARÉ & REDEI, 1993)** e idade **(RIEGLE, 1973; BÁNKY et al., 1994)** também influenciam a reação de estresse. No entanto, o que parece ser o fator mais importante em todo o processo, é a percepção que o indivíduo tem do estímulo que lhe é apresentado. Esta percepção depende das experiências previamente vivenciadas pelo mesmo ou filogeneticamente adquiridas pela espécie, e da novidade ou previsibilidade do estímulo **(VOGEL & JENSH, 1988; GRIFFIN, 1989)**.

A reação de estresse pode ser dividida em 3 fases (SELYE, 1936; MEERSON, 1984):

- fase de alarme ou excitação, corresponde ao estresse agudo, quando há predomínio da resposta essencialmente nervosa. Nessa fase dá-se a ativação do Sistema Nervoso Simpático, o que significa uma liberação de grandes quantidades dos hormônios adrenalina e noradrenalina, é quando o organismo reconhece o estímulo como estressante, e caracteriza-se por aumento da capacidade orgânica em responder ao agente agressor.
- fase de resistência, corresponde ao estresse crônico, no qual o organismo habitua-se à presença do agente causador do estresse (estressor). O estímulo é mantido e a resposta nervosa dá lugar à resposta hormonal, entrando em evidência a glândula adrenal que passa a secretar o hormônio glicocorticóide (cortisol ou corticosterona, dependendo da espécie animal) a partir de estímulos vindos da glândula hipófise e do hipotálamo, no Sistema Nervoso Central (SNC). Nesta fase a capacidade de reação do animal diminui e o organismo desenvolve mecanismos adaptativos.
- fase de exaustão, que corresponde ao período pré-agônico, com presença de falência orgânica múltipla. Nessa fase, o organismo já perdeu a capacidade de adaptação frente a uma situação de estresse muito intensa ou prolongada, tornando-se o organismo

susceptível a distúrbios renais, cardiovasculares, gastrointestinais e ou imunológicos.

Embora a reação de estresse possa resultar em doenças, é ela que torna possível a sobrevivência e a adaptação dos seres vivos frente aos inúmeros estímulos ambientais a que estão constantemente expostos **(FRASER et al., 1975; CHROUSOS & GOLD, 1992)**.

Existe uma relação entre os estímulos ambientais, os fatores neuroendócrinos e reatividades imunológicas muito complexas devido as significativas diferenças genéticas e expressões fenotípicas da resposta imune **(MORLEY, 1987)**.

Segundo **COHEN (1987)** e **GRIFFIN (1989)**, o estresse agudo não exerce um efeito significativo na imunocompetência. É apenas o estresse crônico que causa um prejuízo da imunidade, compatível com o possível desenvolvimento da doença.

Sabemos que muitas estruturas cerebrais estão envolvidas na organização das respostas a estímulos estressantes **(VAN DE KAR et al., 1991)**. Ao ser estimulado, o Sistema Límbico age sobre o eixo hipotálamo-hipofisário alterando a secreção hipofisária dos hormônios adrenocorticotrófico **(HOKFELT et al., 1983)**, do crescimento, luteinizante, folículo-estimulante e de prolactina **(KRULICH et al., 1974; EUKER et al., 1975)**, além de ocorrerem alterações nos níveis de β -endorfina **(KANT et al., 1983)**.

A liberação do hormônio glicocorticóide é regulada por um sistema de “feedback”, que envolve vários níveis. Todo estímulo estressor chega ao SNC a partir dos órgãos dos sentidos e a resposta a esses estímulos se dá a partir do hipotálamo, o qual estimula a glândula hipófise que, por sua vez, estimula a glândula adrenal, através da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Para equilibrar todo esse processo, o hormônio glicocorticóide exerce efeito inibitório diretamente sobre o hipotálamo e a hipófise.

O hormônio corticotrófico (CRH) é o principal coordenador da resposta endócrina, autonômica, comportamental e imune ao estresse. Este peptídeo 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, além de células imunológicas e do sistema inflamatório (KARALIS et al., 1991; CROFFORD et al., 1992).

Segundo WYNN et al. (1986); CASTRO et al., (1994); (1996), em diferentes períodos após adrenalectomia ocorre uma interferência na capacidade da resposta hipofisária; em estudos *in vitro* houve uma diminuição transitória da secreção de ACTH, em condições basais e sob estímulo com CRH, provavelmente secundária à depleção dos estoques hipofisários de ACTH. Porém, nas fases mais tardias, mesmo havendo estoques de ACTH, houve uma hiporesponsividade dos corticotrofos ao CRH exógeno, indicando uma provável dessensibilização dos receptores do CRH a nível hipofisário. Um outro mecanismo que contribuiria para manutenção da secreção elevada de ACTH poderia ser a

presença de outros fatores neuronais ou humorais que não o CRH e seus receptores, como exemplo a vasopressina (AVP) e a ocitocina (OT).

A vasopressina hipofisária é considerada como um fraco secretagogo de hormônio ACTH, mas sendo liberada em situações de estresse atua sinergicamente ao CRH estimulando a liberação das corticotrofinas (**CIZZA et al., 1992**).

No sistema nervoso central o hipotálamo é a via final comum para a expressão comportamental neuroendócrina e autonômica do Sistema Límbico, além de participar no controle da maior parte das funções vegetativas do organismo (**POWLEY et al., 1980; KUPFERMAN, 1991a**).

Em cada área ou região hipotalâmica existem grupos de neurônios peptidérgicos que regulam vários tipos de funções orgânicas como: controle da temperatura corpórea, comportamento alimentar, comportamento da ingestão hídrica, comportamento de fuga ou ataque (**KUPFERMAN, 1991 a, 1991 b**).

A proximidade anatômica, as interconexões existentes entre o núcleo paraventricular (NPV) e o núcleo dorsomediano (NDM) do hipotálamo, devido à existência de uma intensa relação de natureza simpática entre estes núcleos (**SWANSON, 1978**) e os estudos de (**COLLARES-BUZATO et al., 1993**), que demonstraram que a lesão do NPV do hipotálamo bloqueia os efeitos do estresse no esvaziamento gástrico em ratos, estas observações levaram-nos a pensar que outros núcleos e centros poderiam também estarem envolvidos no circuito

neuronal da resposta ao estresse. Sendo assim, resolvemos estudar a participação do NDM do hipotálamo nos fenômenos relacionados ao estresse.

Em nossa dissertação de mestrado observamos que o NDM do hipotálamo quando lesado parece deixar de modular a resposta ao estresse, bloqueando algumas conexões, provavelmente de alta frequência (não colinérgicas - não adrenérgicas), fazendo com que predomine o efeito das conexões de baixa frequência (colinérgicas) (MEYER, 1987; DENOFRÉ-CARVALHO, 1994). Estudos subseqüentes levaram-nos a sugerir que em adição com o NDM do hipotálamo outros núcleos estão implicados na modulação do esvaziamento gástrico (DENOFRÉ-CARVALHO, 1997).

CIZZA (1992) relata que as catecolaminas, a angiotensina II, a vasopressina são secretagogos que, mesmo na presença de CRH, têm um papel importante na estimulação da secreção de ACTH, sob várias circunstâncias. Este autor utilizou a dosagem sérica de ACTH, β -endorfina e corticosterona como forma de avaliar a função hipófise - adrenal. Nas amostras de sangue colhidas no momento do sacrifício, de animais submetidos a estresse de contenção por períodos progressivamente mais longos, o ACTH teve sua concentração plasmática aumentada de duas a seis vezes nos primeiros 5 minutos de estresse, atingindo um pico entre 30 e 60 minutos que permaneceu elevado até o final das sessões de imobilização. As concentrações plasmáticas de β -endorfina e corticosterona se elevaram no início e permaneceram elevadas durante toda a sessão de estresse.

Segundo **GREENWOOD et al.(1995)**, injeções de antagonista do ácido gama amino butírico (GABA - neurotransmissor inibitório do SNC) no núcleo NDM do hipotálamo suprimiu as funções inibitórias sobre o núcleo, liberando-o e provocando assim, estimulação da motilidade intestinal, alterações cardiovasculares e mudanças comportamentais compatíveis como as que ocorrem na presença do estresse emocional.

BAUER et al. (2001) relatam que o estresse psicológico tem sido associado à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e amplificado por respostas imunológicas mediadas por células. Seu estudo confirma que o estresse agudo é associado a mudanças comportamentais específicas na função das respostas imunológicas mediadas por células, indicando que o estresse crônico é associado a respostas endócrinas e imunes adaptadas e que a exposição ao estressor rapidamente altera a sensibilidade dos esplenócitos aos glicocorticóides.

TAKEDA et al. (2000) relatam que a incompetência à adaptação ao estresse é o fator primário na causa de distúrbios como ansiedade e depressão. Evidências clínicas indicam que a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a disfunção de serotonina cerebral são fatores de risco associados a estes distúrbios. Para eles o acoplamento funcional dos receptores glicocorticóides - mineralocorticóides/glicocorticóides e os neurônios serotoninérgicos no cérebro podem desempenhar um papel significativo no reconhecimento dos estímulos de estresse e indução da adaptação ao estresse e a disfunção deste sistema de acoplamento pode ser relatada como fator desencadeante da ansiedade e depressão.

DAÍ et al. (1998) relatam que em muitos aspectos as projeções efetoras do NDM do hipotálamo humano lembram as projeções existentes no rato, indicando que a organização das projeções intra-hipotalâmicas do NDM do hipotálamo destas duas espécies são semelhantes.

O estresse não é uma doença, é uma reação natural do organismo, mas pode desencadear patologias quando ocasiona um desequilíbrio, já que fragiliza o organismo. Cada ser humano tem sua medida e acaba se adaptando ao volume de estresse no trabalho, nos estudos e no cotidiano.

BERNARDIS & BELLINGER (1998) fizeram uma revisão desde o início dos anos 70 sobre o papel do NDM do hipotálamo na homeostase neuroendócrina e autonômica, que ressaltamos a seguir:

1. Tanto o núcleo ventromediano (NVM) do hipotálamo como a área hipotalâmica lateral (AHL) projetam-se em direção ao NDM o qual por sua vez projeta-se para o núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo, colocando o NDM como um ponto nodal importante dos circuitos neuroendócrino e autonômico.
2. O NDM é composto de células e fibras contendo neuropeptídeo Y (NPY), e o estado nutricional (fome / realimentação) é refletido nos níveis de NPY presentes tanto no NVM como no NDM do hipotálamo.
3. O NDM está envolvido na via final da secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo NPV, na ação do sistema

nervoso simpático sobre a glândula adrenal, e na termogênese do tecido adiposo marrom.

4. O NDM é também parte de um "circuito do medo", regulando respostas cardiovasculares ao estresse tais como o fluxo sanguíneo no miocárdio e a taquicardia associada com a reação de defesa. Isto parece ser mediado por um mecanismo ligado ao ácido gama amino butírico (GABA).
5. Embora exibindo um crescimento pondero estatural reduzido, bem como hipofagia e hipodipsia, o rato com lesão do NDM tem composição corpórea normal, níveis normais de hormônios anabolizante e metabolismo intermediário dentro da normalidade, responde normalmente a numerosos desafios em termos endócrino, nutricional, de ausência de líquido intra e extra celular e de regulação de peso. O rato com lesão no NDM mostra eficiência normal na utilização do alimento, mas mostra uma resposta atenuada para o efeito estimulante da alimentação causado pela insulina.
6. As únicas anormalidades induzidas pela lesão são a hiperprolactinemia e a interrupção ou perturbação no ritmo circadiano da corticosterona. Apesar da hiperprolactinemia, os ratos com lesão do NDM são capazes de acasalamento e prenhez.

7. Efeitos antiidade produzidos pela lesão do NDM do hipotálamo são evidentes na prevenção da microalbuminúria e das lesões renais associadas à idade, bem como, na prevenção do declínio no fator I de crescimento ligado à insulina circulante.

Evidências recentes sugerem que o NDM, junto com o NVM e o núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, podem ser parte do circuito que é responsivo ao sinal de "feedback" oriundo do tecido adiposo pelo hormônio leptina. Os resultados acima e outros achados sugerem que o NDM tem papéis diversos nos processos reguladores fisiológicos **(BERNARDIS & BELLINGER, 1998)**.

Sendo assim, resolvemos analisar se a lesão bilateral do NDM do hipotálamo interfere na resposta basal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, frente a um agente estressor através da avaliação da concentração de corticosterona em condições basais e após diferentes períodos de estresse de imobilização e no processo de habituação destes animais.

OBJETIVOS 2

Em animais controles e em animais submetidos a diferentes períodos de estresse de imobilização (1, 3, 9 e 15 dias), com lesão do núcleo dorsomediano do hipotálamo ou em animais com cirurgia simulada:

- Avaliar o efeito da lesão do NDM do hipotálamo sobre a resposta basal no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, estimulada pelo estresse de imobilização,
- Avaliar a concentração sérica de corticosterona (B) nos grupos em estudo, em condições basais e após diferentes períodos de estresse de imobilização.
- Avaliar a habituação nos animais que tiveram o NDM do hipotálamo lesado.

MATERIAIS E MÉTODOS

3

3.1 Animais

Foram utilizados para os experimentos 120 ratos Wistar spf, machos, pesando cerca de 280g, provenientes de linhagens do Biotério Central da UNICAMP. Uma semana antes do procedimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo água e ração "*ad libitum*" (ração sólida, Purina Nutrientes Ltda).

O Biotério possui temperatura e ciclo fotoperiódico controlados, ficando a temperatura em torno de 24 - 26°C e ciclo claro/escuro de 12 horas.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos A, B e C:

a) Animais controles basais (grupo A1);

- b) Animais controles submetidos ao estresse por três dias consecutivos (grupo A2), por nove dias consecutivos (grupo A3) e por quinze dias consecutivos (grupo A4);
- c) Animais com cirurgia simulada (grupo B1);
- d) Animais com cirurgia simulada submetidos ao estresse por três dias consecutivos (grupo B2), por nove dias consecutivos (grupo B3) e por quinze dias consecutivos (grupo B4);
- e) Animais com lesão no Núcleo Dorsomediano do Hipotálamo (grupo C1);
- f) Animais com lesão no Núcleo Dorsomediano do Hipotálamo submetidos ao estresse por três dias consecutivos (grupo C2), por nove dias consecutivos (grupo C3) e por quinze dias consecutivos (grupo C4);

3.2.1 Manipulação Cirúrgica

Os animais que foram submetidos ao processo cirúrgico tiveram um período de quinze dias para a sua recuperação, antes de dar início as sessões de estresse.

3.2.1.1 Lesão eletrolítica do Núcleo Dorsomediano do Hipotálamo (LNDM)

Os animais a serem lesados foram anestesiados com tiopental sódico (Cristália), 1g diluído em 40ml de soro fisiológico e administrado via intraperitoneal na dose de 70mg/kg de peso corporal. Após anestesia, o animal era fixado no

aparelho extereotáxico (modelo David Kopf) e, após tricotomia e assepsia adequadas, fazia-se uma incisão longitudinal na pele, expondo a calota craniana onde foram feitas demarcações, de acordo com coordenadas estabelecidas, utilizando o atlas extereotáxico de **PAXINOS & WATSON (1986)**. As coordenadas utilizadas para localização do núcleo dorsomediano do hipotálamo foram: barra incisória 3,0mm abaixo do plano interauricular; 3,30mm posterior ao bregma, 0,6mm lateral a linha mediana (bilateralmente) e 9,0mm abaixo da superfície da calota craniana.

A lesão bilateral do NDM foi feita por eletrocoagulação, através de eletrodo de níquel-cromo, de 0,3mm de diâmetro, com 0,1mm de ponta descoberta introduzido nos locais a serem lesados, por onde passa uma corrente elétrica de 2mA, gerada por um lesionador durante 20 segundos. Os animais pertencentes ao grupo simulado (S) tiveram a introdução estereotáxica do eletrodo a 2,0mm abaixo da superfície da calota craniana, sem passagem de corrente. Ao final do procedimento, a incisão foi suturada com fio de poliéster/algodão. Estes animais ficaram em recuperação por um período de duas semanas quando então entraram nas sessões de estresse.

3.2.2 Coleta de Sangue

Os animais foram sacrificados por decapitação, entre 8:30 e 10:30 h, em vários períodos de tempo (3, 9 e 15 dias). Imediatamente após a decapitação o sangue do tronco foi colhido em tubos plásticos heparinizados, mantidos em gelo, até a centrifugação por 15 minutos, a 4°C e a 2000rpm. Após a centrifugação, o

plasma foi aliquotado em 2 tubos Eppendorf, devidamente rotulados para dosagem de corticosterona. Estes plasmas foram estocados a -70°C, para dosagens posteriores.

3.2.3 Dosagem Hormonal

As dosagens hormonais foram realizadas por Radioimunoensaio (RIE), sendo realizadas nos Laboratórios de Endocrinologia dos Departamentos de Fisiologia e de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. As amostras provenientes do mesmo experimento foram determinadas em duplicata, em um mesmo ensaio.

3.2.3.1 Radioimunoensaio da Corticosterona

A corticosterona plasmática foi determinada pelo método de **VECSEI et al. (1979)**, modificado, através de extração do esteróide por etanol. Utilizamos um anticorpo anticorticosterona (AB-cot-17984) preparado em coelhos, com o hormônio conjugado com albumina bovina, gentilmente cedido pelo Dr. José Antunes Rodrigues. A especificidade do anticorpo foi testada através da reatividade cruzada com o cortisol (1%), 17OH - progesterona (1%) e sulfato de deidroepiandrosterona (12%). A corticosterona [1,2-3(H)] (New England Nuclear) foi utilizada como marcador. Na separação da fração livre da ligada, utilizamos uma solução de carvão - dextran 0,5/0,05%.

A dose mínima detectável foi de 0,4 mais ou menos 0,1 µg/dl. O coeficiente de variação intra e inter ensaios foram, respectivamente, 4,8% e 6,7%, ao nível de β/β_0 igual 0,5 da curva padrão.

3.2.4 Mensuração do peso corporal

Os animais tiveram os pesos determinados no período da manhã, precedendo a primeira e a última sessão de estresse.

3.2.5 Modelo de Estresse

O modelo de estresse utilizado foi o de contenção. Os animais foram retirados de suas gaiolas e colocados em um tubo de PVC com as seguintes dimensões: 20,5cm de comprimento e 5,0 cm de diâmetro, ficando totalmente imobilizado durante 60 minutos. Após os períodos de dias estabelecidos para as sessões de estresse (3, 9 e 15 dias), os animais eram retirados dos tubos de PVC e imediatamente, um a um decapitado. A seguir o sangue do tronco foi colhido, centrifugado e o plasma obtido foi aliquoteado e estocado nas condições descritas acima, até a análise.

3.2.6 Controle da localização e extensão das lesões (Histologia)

Os cérebros dos animais sacrificados, foram removidos e fixados em n-hexano e submetidos a cortes histológicos no local da lesão para localização da mesma, isto ocorria no final da sessão de estresse. O local e extensão da lesão foram determinados pelo exame das lâminas no microscópio óptico (Carl Zeiss).

3.2.7.3 Corte coronal de uma lesão bilateral do NDM comprometendo estruturas vizinhas

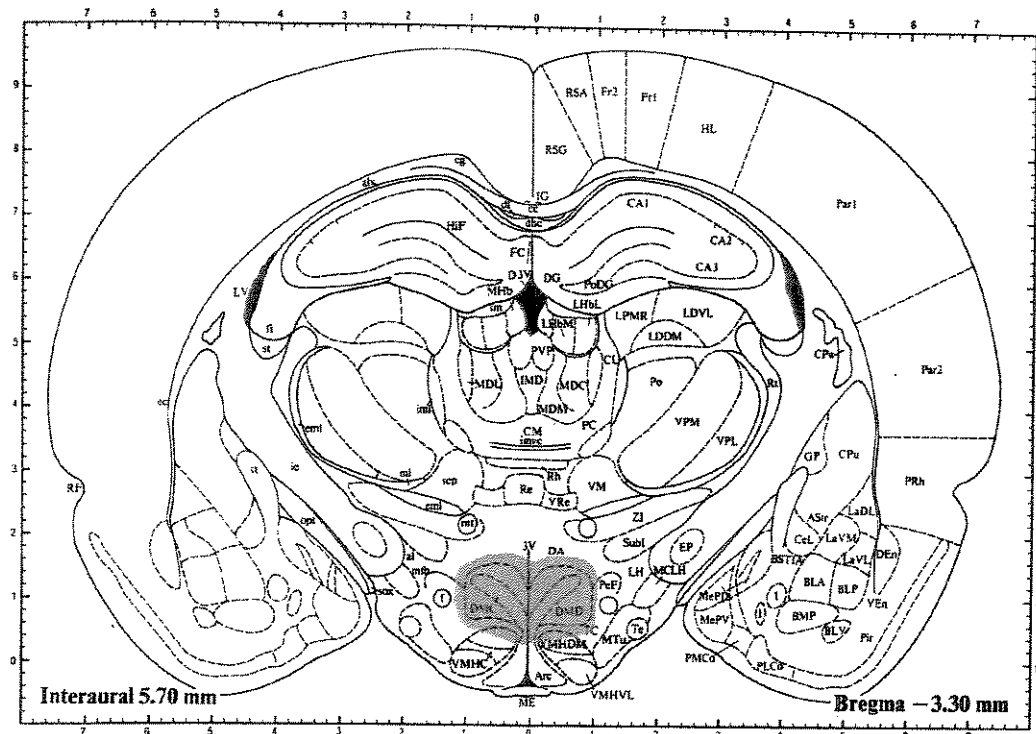


Figura 3: Extensão de uma lesão do NDM do hipotálamo cuja lesão, comprometeu áreas vizinhas a este núcleo.

Em 5 animais houve comprometimento parcial de regiões circunvizinhas como os núcleos ventromediano, perifornical e parte superior do núcleo arqueado.

Gostaríamos de ressaltar que as lâminas que apresentaram comprometimento das estruturas vizinhas ao NDM do hipotálamo, (animais correspondentes), foram excluídos do nosso estudo.

3.2.8 Análise Estatística

Para análise estatística foram utilizados os seguintes procedimentos:

- Índice 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, porém nos diferentes períodos estudados.
- Teste de Tukey foi utilizado para comparação dos valores entre grupos diferentes (animais controle, com cirurgia simulada e com lesões no NDM).

O nível de significância adotado para a rejeição da hipótese de nulidade foi de 5%.

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).

4.1 Concentração Plasmática de Corticosterona (B)

4.1.1 Experimento em condições basais:

Efeito temporal de diferentes períodos de estresse por contenção, nas concentrações plasmáticas de corticosterona em ratos submetidos a lesão eletrolítica do NDM do hipotálamo, cirurgia simulada e controle.

Os valores individuais em média e erro padrão da média de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) plasmáticos, em animais controles, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo, estão apresentados nas tabelas de 1 a 8 (em anexo).

A **tabela 1** apresenta concentração de corticosterona ($X \pm \text{EPM}$) dos animais controles, com cirurgia simulada e lesados. Esses dados estão apresentados na **figura 4**. Quando comparamos o grupo dos animais controles com o grupo dos animais com cirurgia simulada, observamos que não houve diferença significativa entre os valores de corticosterona, entretanto, quando

comparamos o grupo controle e o grupo de cirurgia simulada com o grupo dos animais lesados, notamos valores de corticosterona maiores nos animais cujo NDM do hipotálamo foi lesado, ocorrendo diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA $p < 0,05$).

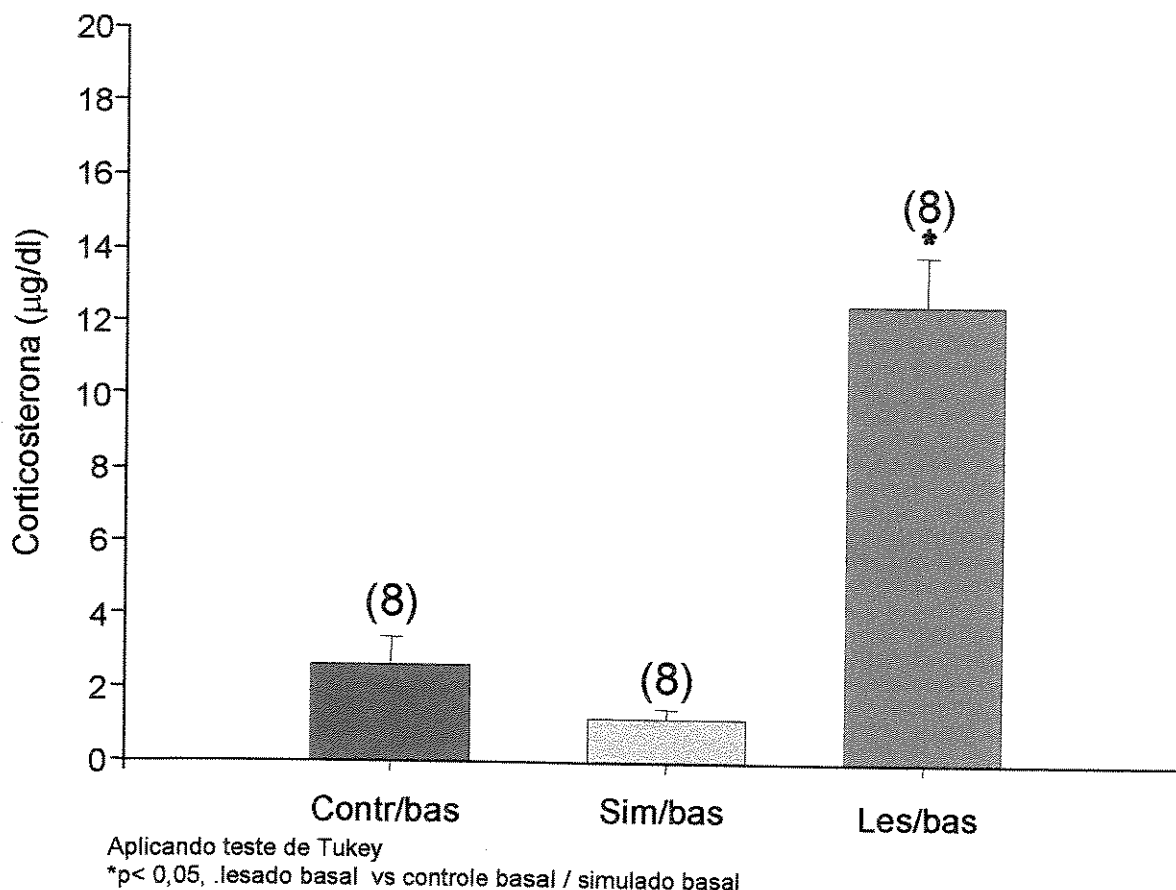


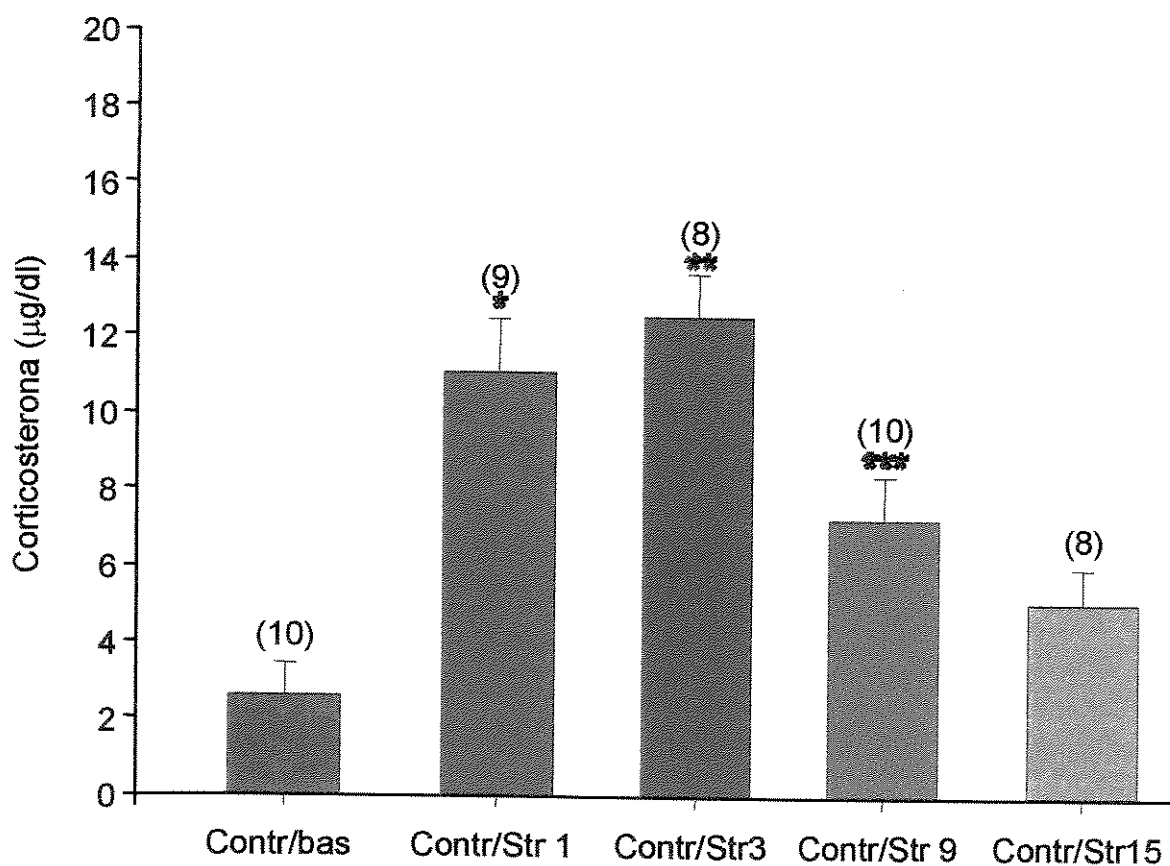
Figura 4: Níveis plasmáticos de corticosterona (µg/dl) em animais controles, simulados e lesados mantidos em condições basais durante um período de 15 dias.

4.1.2 Grupo Controle

Efeito temporal de diferentes períodos de estresse por contenção, nas concentrações plasmáticas de corticosterona, em animais controles submetidos a estresse por 60 minutos em períodos de 1 dia, 3 dias, 9 dias e 15 dias.

A **tabela 2**, apresenta os valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), a média e erro padrão da média dos animais controle e controle com estresse de 1 dia, 3 dias, 9 dias e 15 dias. Esses dados estão apresentados na **figura 5**.

Quando comparamos o grupo controle basal com os grupos controle submetidos ao estresse por 1 dia, 3 dias, 9 dias e 15 dias, observamos que houve diferença estatística significativa entre eles (Anova $p < 0,05$)



Aplicando o teste de Tukey

* $p < 0,05$. controle estresse de 1 dia vs controle basal;

** $p < 0,05$ controle estresse de 3 dias vs controle basal;

*** $p < 0,05$. controle estresse de 9 dias vs controle basal.

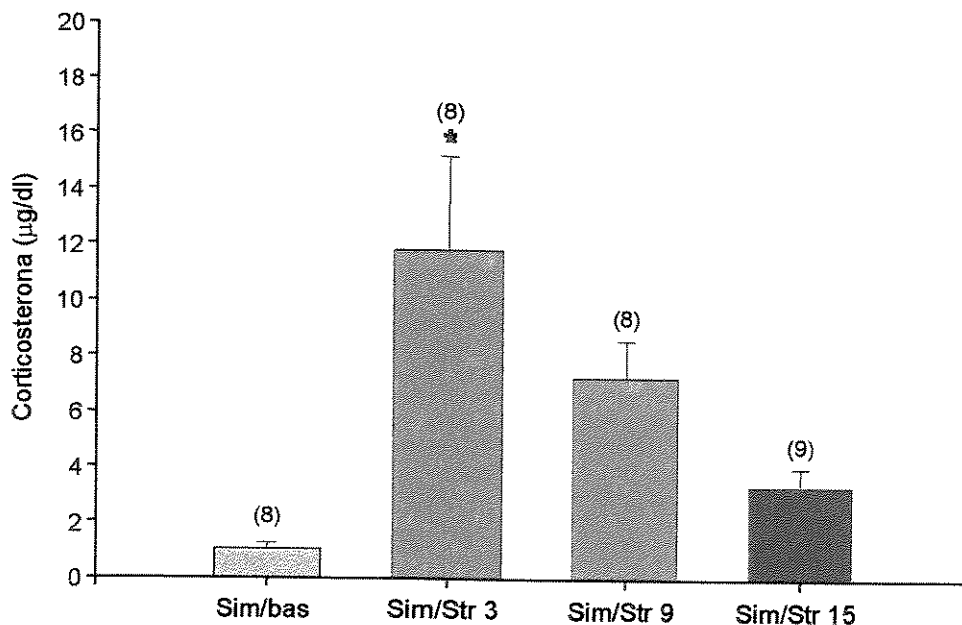
Figura 5: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais controle basal e controle com sessões de estresse de 1, 3, 9 e 15 dias

4.1.3 Grupo com Cirurgia Simulada

Efeito temporal de diferentes períodos de estresse por contenção, nas concentrações plasmáticas de corticosterona, em animais com cirurgia simulada submetidos a estresse de 60 minutos durante 3 dias, 9 dias e 15 dias.

A **tabela 3** apresenta os valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), a média e erro padrão da média dos animais submetidos a cirurgia simulada basal e animais submetidos a cirurgia simulada e estresse de 3 dias, 9 dias e 15 dias. Esses dados estão apresentados na **figura 6**.

Quando comparamos o grupo cirurgia simulada basal com os grupos cirurgia simulada submetidos ao estresse de 3 dias, 9 dias e 15 dias, observamos que houve diferença estatística significativa entre eles (Anova $p < 0,05$)



Aplicando o teste de Tukey

* $p < 0,05$ simulado estressado 3 dias vs simulado basal /simulado estressado 15 dias.

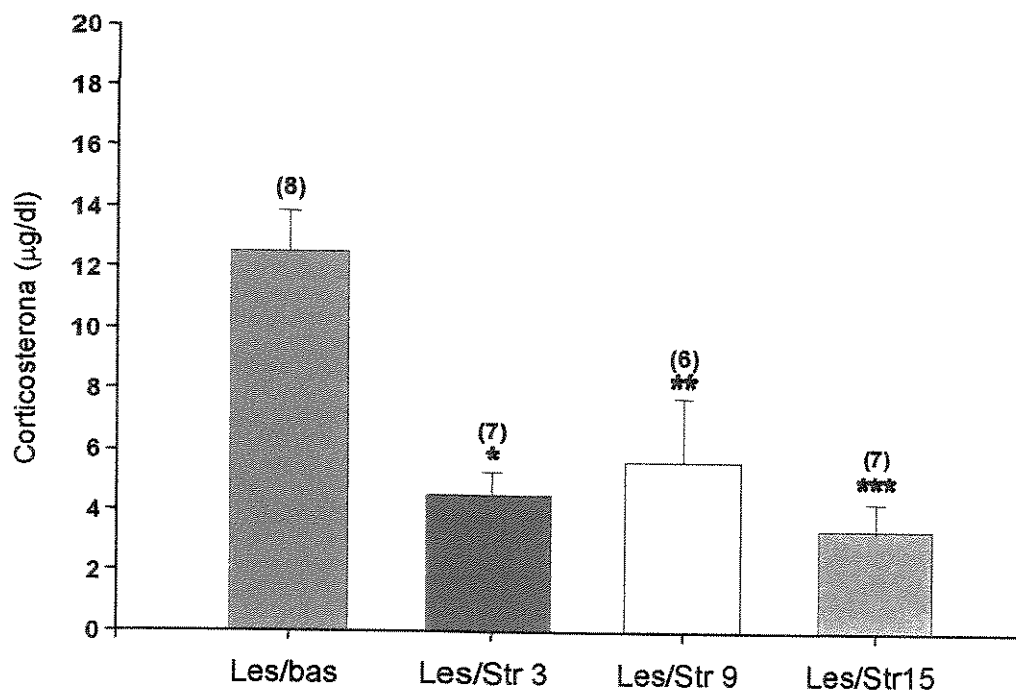
Figura 6: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais com cirurgia simulada basal e cirurgia simulada com sessões de estresse de 3, 9 e 15 dias.

4.1.4 Grupo com Lesão do NDM do hipotálamo

Efeito temporal de diferentes períodos de estresse por contenção, nas concentrações plasmáticas de corticosterona, em animais com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a estresse de 60 minutos por períodos de 3 dias, 9 dias e 15 dias.

A **tabela 4** apresenta os valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), a média e erro padrão da média dos animais com lesão do NDM do hipotálamo em condições basais e submetidos a estresse de 3 dias, 9 dias e 15 dias. Esses dados estão apresentados na **figura 7**.

Quando comparamos o grupo lesado basal com os grupos lesados submetidos ao estresse por 3 dias, 9 dias e 15 dias, observamos que houve diferença estatística significativa entre eles (Anova $p < 0,05$).



Aplicando o teste de Tukey

* $p < 0,05$, lesado estressado 3 dias vs lesado basal ;

** $p < 0,05$ lesado estressado 9 dias vs lesado basal ;

*** $p < 0,05$, lesado estressado 15 dias vs lesado basal.

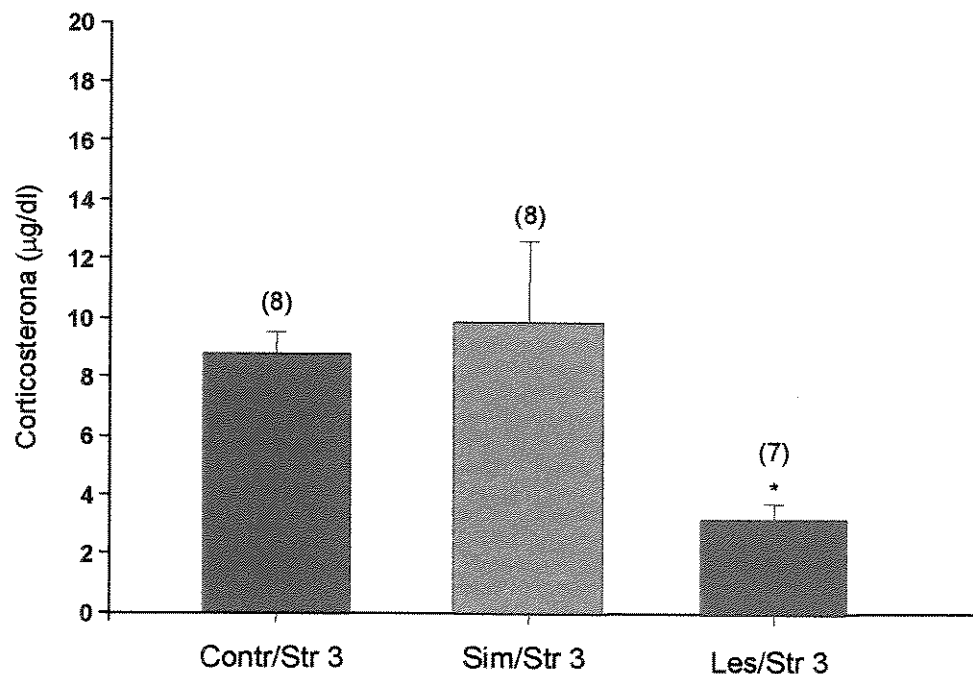
Figura 7: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais com lesão do NDM do hipotálamo em condições basais e animais com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse de 3, 9 e 15 dias.

4.1.5 Grupo Controle, com Cirurgia Simulada e com Lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse durante 3 dias

Efeito temporal de estresse por contenção, nas concentrações plasmáticas de corticosterona, em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a estresse de 60 minutos durante 3 dias.

A **tabela 5** apresenta os valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), a média e erro padrão da média dos animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse por 3 dias. Esses dados estão apresentados na **figura 8**.

Quando comparamos o grupo controle com o grupo cirurgia simulada submetidos ao estresse por 3 dias, observamos que não houve diferença estatística significativa entre eles mas, quando comparamos o grupo controle e o grupo simulado com o grupo com lesão do NDM do hipotálamo submetidos ao estresse por 3 dias, observamos que houve diferença estatística significativa entre eles (Anova $p < 0,05$).



Aplicando o teste de Tukey

* $p < 0,05$. lesado estressado 3 dias vs controle estressado 3 dias / simulado estressado 3 dias.

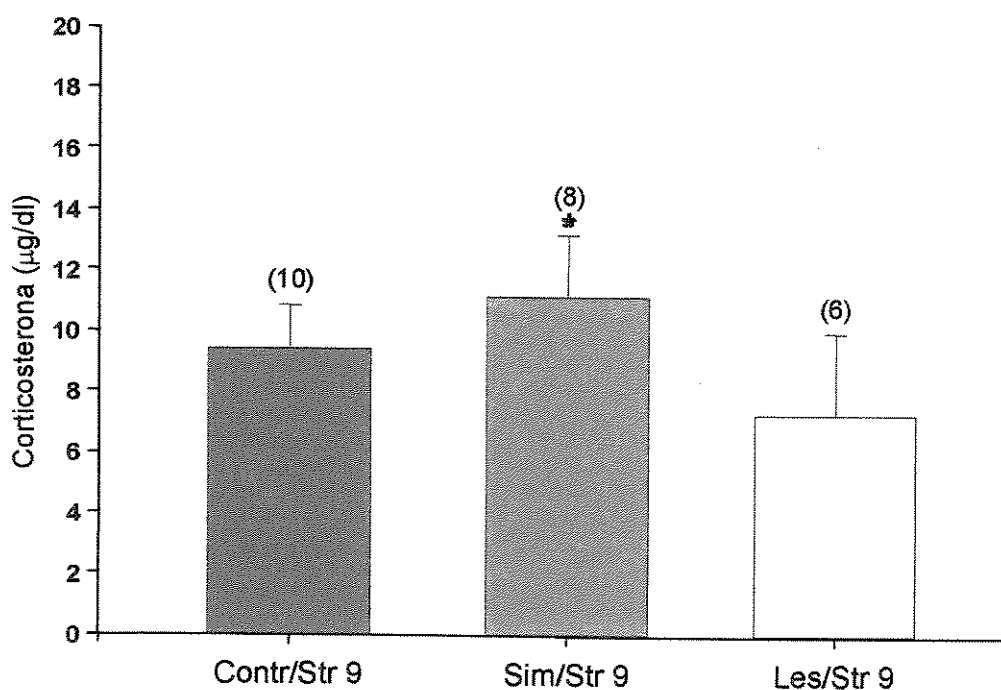
Figura 8: Níveis plasmáticos de corticosterona (µg/dl) em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse por 3 dias.

4.1.6 Grupo Controle, com Cirurgia Simulada e com Lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse de 9 dias

Efeito temporal de estresse por contenção, nas concentrações plasmáticas de corticosterona, em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a estresse de 60 minutos durante 9 dias.

A **tabela 6** apresenta os valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), a média e erro padrão da média dos animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse de 9 dias. Esses dados estão apresentados na **figura 9**.

Quando comparamos o grupo controle com o grupo lesado submetidos ao estresse por 9 dias, observamos que não houve diferença estatística significativa entre eles mas, quando comparamos o grupo controle e o grupo lesado com o grupo simulado submetidos ao estresse por 9 dias observamos que houve diferença estatística significativa entre (Anova $p < 0,05$).



Aplicando o teste de Tukey

* $p < 0,05$ simulado estressado 9 dias vs controle estressado 9 dias / .lesado estressado 9 dias.

Figura 9: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse por 9 dias.

4.1.7 Grupo Controle, com Cirurgia Simulada e com Lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse de 15 dias.

Efeito temporal de estresse por contenção, nas concentrações plasmáticas de corticosterona, em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a estresse de 60 minutos durante 15 dias.

A **tabela 7** apresenta os valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), a média e erro padrão da média dos animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse de 15 dias. Esses dados estão apresentados na **figura 10**.

Quando comparamos o grupo controle com o grupo cirurgia simulada e o grupo com lesão do NDM do hipotálamo submetidos ao estresse por 15 dias, observamos que não houve diferença estatística significativa entre eles (Anova).

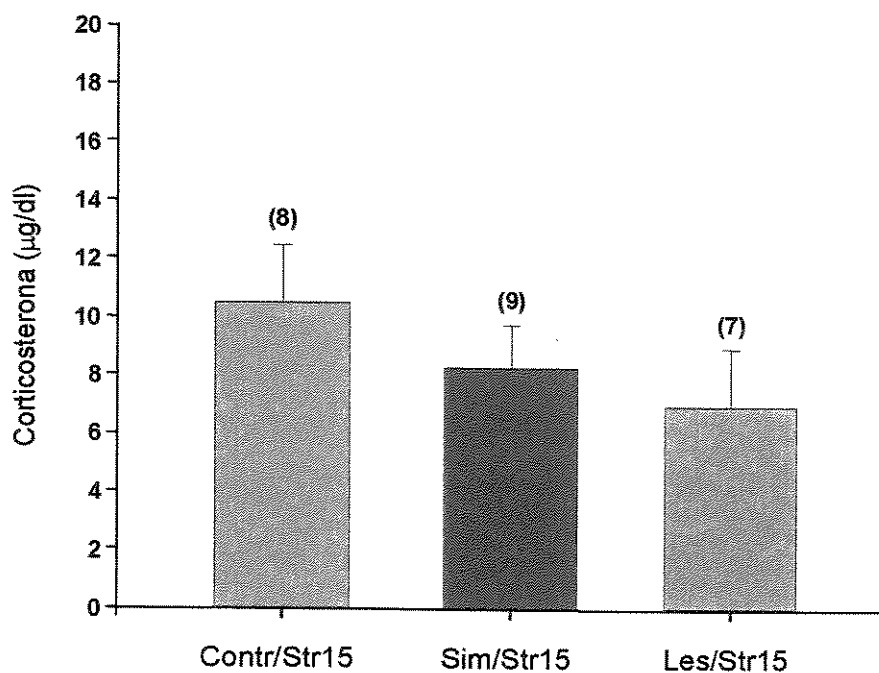


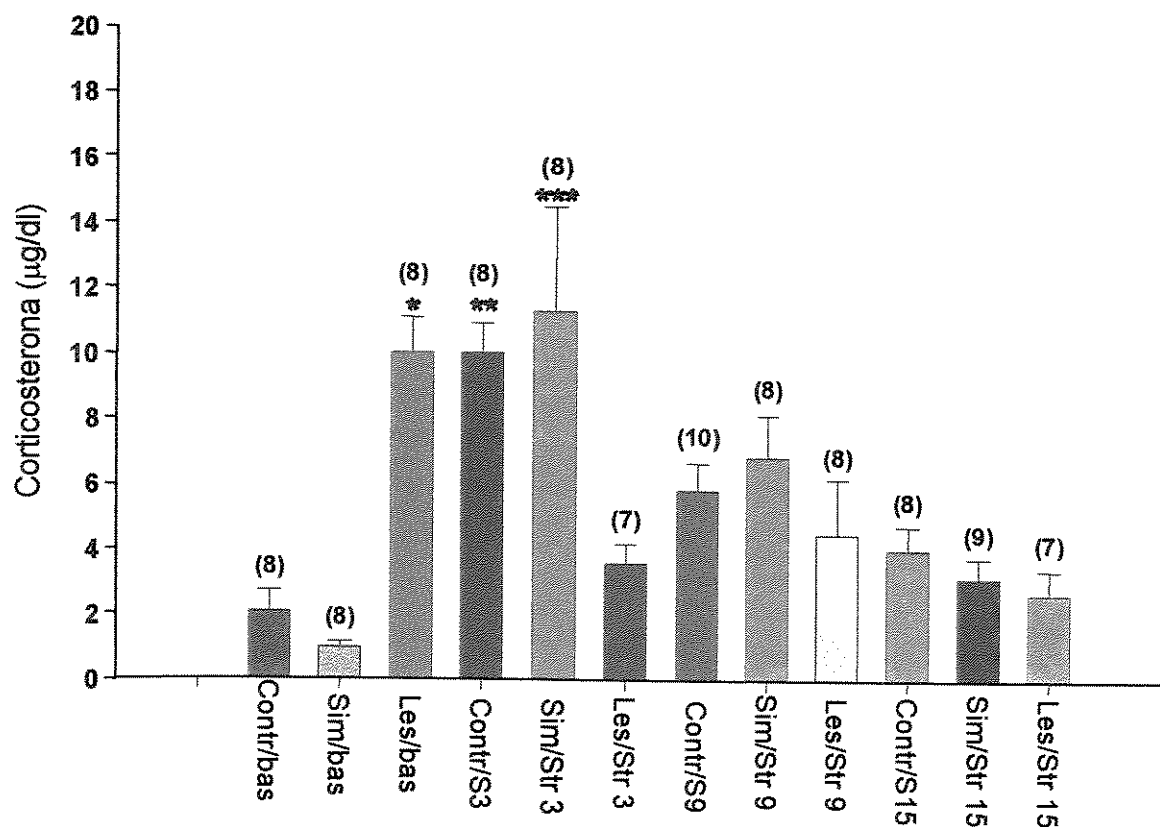
Figura 10: Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse por 15 dias.

4.1.8 Grupo Controle, com Cirurgia Simulada e com Lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse de 3 dias, 9 dias e 15 dias.

Efeito temporal de estresse por contenção, nas concentrações plasmáticas de corticosterona, em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a estresse de 60 minutos durante 3 dias, 9 dias e 15 dias.

A **tabela 8** apresenta os valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), a média e erro padrão da média dos animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse por 3 dias, 9 dias e 15 dias. Esses dados estão apresentados na **figura 11**.

Quando comparamos o grupo controle com o grupo cirurgia simulada e com o grupo lesado submetidos ao estresse por 3, 9 e 15 dias observamos que houve diferença estatística significativa entre eles (Anova $p < 0,05$). O grau de significância está presente quando comparamos os animais dos grupos controle basal, cirurgia simulada basal com os animais do grupo controle estressado por 3 dias; controle basal, cirurgia simulada basal com os animais do grupo cirurgia simulada estressado por 3 dias; cirurgia simulada estressado por 3 dias com o grupo dos animais lesados estressados por 3 dias; cirurgia simulada estressado por 3 dias com o grupo dos animais lesados estressados por 9 dias; cirurgia simulada estressado por 3 dias com o grupo dos animais lesados estressados por 15 dias; lesado basal com os animais dos grupos controle, cirurgia simulada e lesados estressados por 15 dias.



Aplicando teste de Tukey

* $p < 0,05$ lesado basal vs controle basal / simulado basal;

** $p < 0,05$ controle estressado 3 dias vs controle basal / simulado basal;

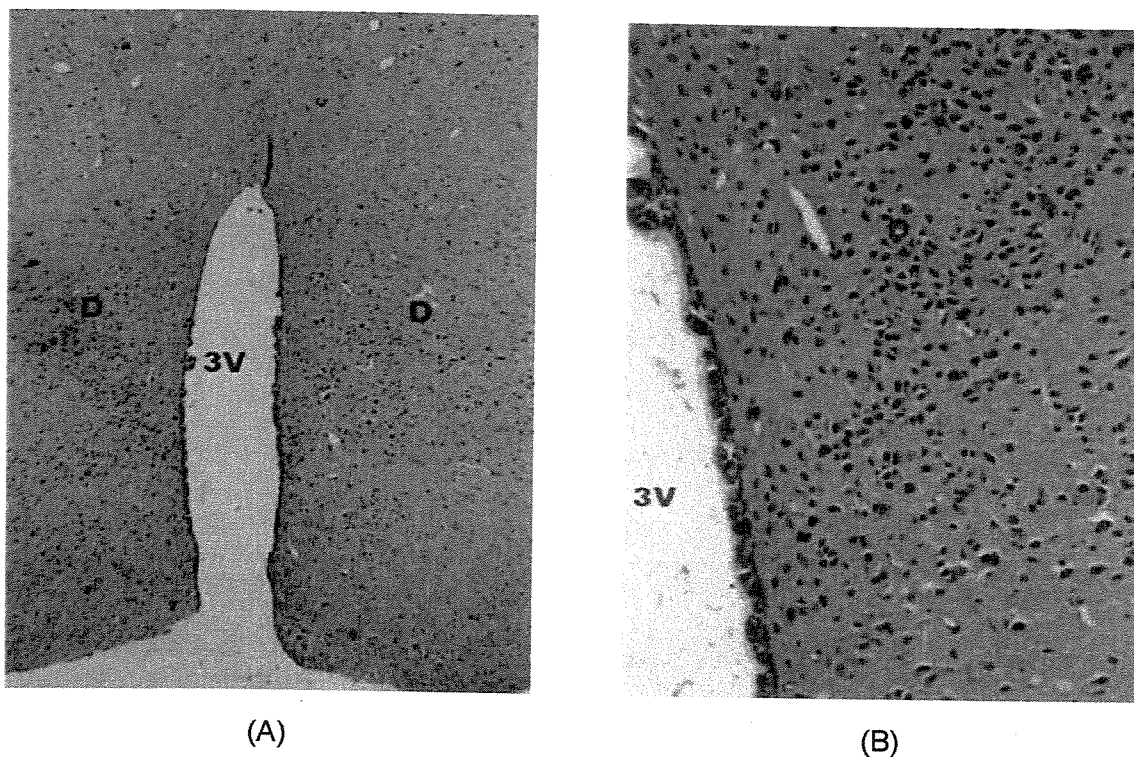
*** $p < 0,05$ simulado estressado 3 dias vs controle basal / simulado basal.

Figura 11: Níveis plasmáticos de corticosterona (µg/dl) em animais controle, cirurgia simulada e com lesão do NDM do hipotálamo submetidos a sessões de estresse por 3, 9 e 15 dias.

4.2 Avaliação Histológica do NDM do hipotálamo

4.2.1 Corte histológico normal

A figura 12 mostra um corte histológico normal do núcleo dorsomediano (NDM) do hipotálamo

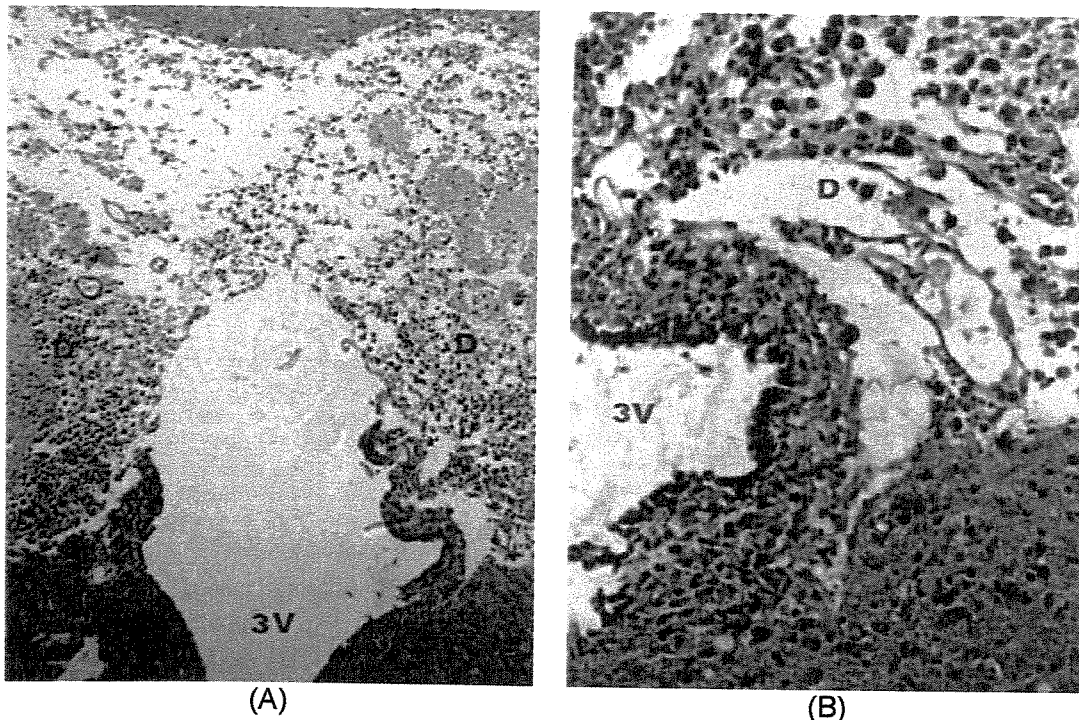


Legendas: (D) região dorsomediana do hipotálamo (3V) 3º ventrículo

Figura 12: Fotomicrografia do núcleo dorsomediano do hipotálamo nos aumentos 25X (A) e 100X (B); Coloração hematoxilina eosina (H.E.).

4.2.2 Corte histológico das lesões

A **figura 13** mostra um corte histológico da destruição bilateral do NDM do hipotálamo de ratos Wistar, machos.



Legendas: (D) região dorsomediana do hipotálamo, (3V) 3º ventrículo.

Figura 13: Fotomicrografia de uma lesão padrão do núcleo dorsomediano do hipotálamo nos aumentos 25X (A) e 100X (B); Coloração hematoxilina eosina (H.E.).

Feita a comparação entre os grupos através da análise de variância Anova, esta nos mostrou que existe diferença entre os grupos considerados.

Ao observarmos o grupo controle vimos que houve uma queda significativa dos níveis séricos de corticosterona a partir do nono dia consecutivo de exposição ao estresse de contenção (**fig. 5**). Com o grupo dos animais simulado também ocorreu a partir do nono dia de estresse uma queda significativa nos níveis de corticosterona sérica (**fig. 6**). Interpretamos esta queda dos níveis séricos de corticosterona nestes grupos como o início da habituação diante do estresse de imobilização.

Ao analisarmos a habituação nos grupos em estudo, vimos que tanto no grupo controle quanto no grupo simulado esta se caracterizou por uma queda gradativa dos níveis séricos de corticosterona a partir do nono dia de sessões de estresse. Entretanto, no grupo lesado (**fig.7**) isto não ocorreu, houve uma diminuição abrupta nos níveis de corticosterona a partir do terceiro dia das sessões de estresse. Poderíamos avaliar esta diminuição como uma

potencialização à habituação para este grupo; porém, quando analisamos os níveis séricos de corticosterona nas aferições após o terceiro, nono e décimo quinto dia de sessões de estresse, não encontramos diferença significativa entre os períodos, descaracterizando o que entendemos por processo de habituação (**fig. 7**). Assim, interpretamos que ao lesarmos o NDM do hipotálamo, os animais passaram a não reconhecer mais os fatores estressores como tal e, portanto, passaram também a não responder metabolicamente ao estresse, o que se caracterizou por um nível constante de corticosterona sérica entre os períodos de estresse.

Ressaltamos ainda que o grupo lesado manteve um nível de corticosterona constante, porém discretamente acima do grupo controle em seu estado basal. Isto sugere que provavelmente os estímulos estressores foram reconhecidos por vias alternativas independentes do NDM do hipotálamo, mas estas vias devem ter um papel secundário, porque na presença do NDM do hipotálamo íntegro, a produção de corticosterona foi potencializada. Uma possível explicação do fenômeno observado é que a relação simpática entre o NDM e o NPV agiria amplificando o sinal de estresse para o NPV, com a lesão do NDM provavelmente este efeito desaparece, levando o eixo a responder com níveis inferiores, mantendo níveis baixos de corticosterona durante todos os períodos de estresse.

Segundo **INGLEFIELD et al. (1994)**, o NDM do hipotálamo é importante para a regulação das respostas cardiovasculares associadas aos desafios emocionais. Esta região tem sido identificada como um componente do circuito

neural envolvida com o medo e ansiedade, sem evidências de que após a lesão deste núcleo, este efeito seria perdido. Os autores realizaram a destruição química do NDM do hipotálamo pelo ácido ibotênico (IBO) e estudaram o impacto sobre as respostas espontâneas e inatas aos estressores. Concluíram que a lesão bilateral do NDM pode ter resultado em uma liberação das respostas normalmente suprimidas para os medos inatos e estímulos de desafios. Nossos resultados evidenciaram este efeito, pois os animais do grupo lesado reagiram às sessões de estresse de contenção, sem alterações metabólicas indicativas de estresse, o que foi comprovado pelos níveis reduzidos de corticosterona sérica.

Em condições basais a ausência do NDM impede a interação com o NPV que deve estar sujeito a modulação por outros centros e núcleos. Por este motivo, a ausência do NDM facilita a ativação do NPV por estes centros e núcleos em repouso. (fig. 04)

KVETNANSKY et al. (1977) dosaram a norepinefrina (NE) e dopamina (DA) em dezessete núcleos hipotalâmicos individuais e três outras regiões cerebrais após o estresse de imobilização agudo e de repetição. Após os primeiros vinte minutos de imobilização os níveis de NE diminuíram nos núcleos ventromediano e supra óptico e a DA diminuiu no núcleo arqueado, houve aumento de NE e DA no NDM. A imobilização repetida (40 vezes) produziu aumento de NE no NDM, NVM e núcleos supra óptico e paraventricular (NPV) e eminência media. A DA aumenta no NDM e NPV. As mudanças nos níveis de concentração de NE e DA em alguns núcleos hipotalâmicos individuais após a influência do estresse indicam que as catecolaminas poderiam estar envolvidas na

regulação de alguns processos neuroendócrinos que são ativados durante o estresse, principalmente a liberação de ACTH. Em nosso estudo o estresse de contenção pode ter aumentado os níveis de catecolaminas cujo efeito indireto foi o aumento da secreção de corticosterona nos grupos controle e simulado e a lesão do NDM bloqueou este efeito provavelmente pela destruição dos receptores para catecolaminas presentes no NDM lesado (fig. 7).

DIMICCO et al. (1996) sugerem que a ativação de neurônios na região do NDM do hipotálamo leva a alterações cardiovasculares estresse induzidas e que a atividade destes neurônios pode ser determinada pelo balanço entre a quantidade de receptores GABA inibidores e receptores amino ácidos excitatórios.

Os ajustes cardiovasculares e metabólicos durante situações de estresse envolvem a participação dos sistemas simpático-adrenal e hipotálamo-hipófise-adrenocortical, que interagem em vários níveis. **KVETNANSKY et al. (1993)** observaram que os glicocorticóides endógenos reprimem as respostas do ciclo das catecolaminas: síntese, liberação, recaptção e metabolismo nos nervos periféricos, sugestivo neste modelo de estresse de imobilização. Após a lesão do NDM do hipotálamo os níveis de corticosterona se mantiveram estáveis, em um patamar abaixo dos níveis dos animais controle e cirurgia simulada. Acreditamos que possa ter havido uma elevação dos níveis de catecolaminas nos nervos periféricos dos animais do grupo lesado, entretanto apenas um outro estudo poderá avaliar estas alterações.

SALIM (1987) relatou que o estresse ativa o hipotálamo de ratos causando uma descarga adrenérgica com a liberação de um estímulo alfa-adrenergico que atinge o estômago pela via adrenérgica hipotálamo-vagal. Seus dados mostram que o estresse prolongado em ratos estimula a secreção gástrica e produz úlcera duodenal; em outro estudo **SALIM (1987)** observou que a duração do estresse no rato determina a natureza da lesão gástrica produzida. **SALIM (1988)** também observou que a manutenção do estresse produz úlcera gástrica crônica. Para nós, a lesão do NDM do hipotálamo bloqueou as respostas dos animais ao estresse de contenção, o que nos leva a supor que tenha havido proteção da mucosa gástrica nos animais do grupo lesado em relação ao risco de surgimento de úlceras de estresse, embora isto não tenha sido objetivo de nosso estudo.

Para **GREENWOOD & DIMICCO (1995)**, o bloqueio dos receptores de ácido gama-amino-butírico (GABA) no NDM do hipotálamo induz alterações comportamentais e cardiovasculares semelhantes àsquelas produzidas pelo estresse emocional. Assim, a liberação dos neurônios do NDM do hipotálamo pelo antagonista do GABA bicuculina, aumentam a motilidade jejunal das vias colinérgicas vagais e não vagais e das vias não colinérgicas. Em estudo anteriores **DENOFRE-CARVALHO et al.(1994)** observaram que a lesão do NDM do hipotálamo acelerou o esvaziamento gástrico de ratos machos.

KEIM & SHEKHAR (1996) testaram o bloqueador bicuculina dos receptores para GABA aplicado através de micro-injeções no NDM do hipotálamo para elucidar as mudanças nos níveis plasmáticos de hormônio

adrenocorticotrófico e corticosterona. Concluíram que o sistema de inibição mediado pelos receptores tônicos do GABA regula uma resposta coordenada fisiológica e neuroendócrina no NDM do hipotálamo e que estas respostas não se devem à difusão do bicuculina para os núcleos paraventriculares de ratos.

BEAULIEU et al. (1987) relatam que seus estudos confirmam a hipótese de um papel inibitório do sistema dopaminérgico no núcleo amigdalóide central em relação à secreção de ACTH. Seus estudos também indicam que o controle da secreção de ACTH em resposta ao estresse de contenção, os sistemas noradrenérgicos e dopaminérgicos atuam de maneira antagônica em certas estruturas cerebrais como as áreas hipotalâmicas anterior e lateral e no núcleo amigdalóide cerebral.

ODA et al. (1988) relataram que as alterações no endotélio microvascular sob a condição de estresse de restrição contribuíram para a formação de úlceras de estresse e ocorreram devido a hiperestimulação dos nervos colinérgicos e pela modificação da degranulação de mastócitos. Destas observações, concluímos que o estresse têm como via final diversos efetores e que o efeito do estresse em diversos órgãos decorrem do desequilíbrio entre os mecanismos de agressão e adaptação

LI et al. (1996) avaliaram os neurônios catecolinérgicos dos núcleos do trato solitário e ventro lateral da medula que se dirigem ao núcleo paraventricular do hipotálamo como mediadores das respostas neuroendócrinas hipotalâmicas. Concluíram que o choque aplicado nos pés dos animais ativaram os neurônios

medulares aminérgicos como uma consequência secundária ao estresse mediado por uma via descendente transeccionada pela ablação. A ativação dos neurônios medulares aminérgicos não é necessariamente preditiva de um envolvimento deste grupo de células na resposta visceromotora hipotalâmica a um agente agressor e embora haja similaridades entre os neurônios eferentes hipotalâmicos e seus aferentes que podem ser ativados por estresse de diferentes tipos, mecanismos distintos medeiam as respostas hipotalâmicas adaptativas em cada caso.

Para **CULMAN et al. (1984)**, a imobilização aguda de ratos aumentam a concentração de serotonina nas eminência média, NVM e NDM do hipotálamo. A imobilização repetida aumenta a concentração de serotonina no NDM após sete dias consecutivos de imobilização e na eminência média após quarenta dias consecutivos de exposição à imobilização. As mudanças na concentração de serotonina em alguns núcleos hipotalâmicos de ratos, após a primeira exposição ao estresse, indicam o envolvimento da serotonina na ativação do sistema hipófise-adrenal bem como em outras reações neuroendócrinas iniciadas no hipotálamo durante o estresse agudo. Com base nestes resultados, os autores presumem que o papel do sistema serotoninérgico na regulação da resposta pituitária – adrenocortical, durante o estresse de repetição em ratos, ainda não está bem estabelecida.

BEAULIEU et al.(1986), procurando explicar os motivos pelos quais há diminuição da secreção de ACTH nos animais com lesão do núcleo amigdalóide cerebral (NAC), observaram que a lesão do NAC ocasionou diminuição da

atividade seroto/aminérgica , em relação ao controle, nos núcleos hipotalâmicos paraventriculares, áreas hipotalâmicas anteriores, e dorsomediana e também um decréscimo abaixo dos níveis de controle no NVM do hipotálamo. Entretanto a atividade serotoninérgica se manteve elevada nas áreas ricas em receptores para glicocorticóides da amígdala, chamada de núcleos das áreas amigdalóides mediana, área cortical e amigdalóide basal. Estes resultados sugerem que o complexo amigdalóide participa do controle do "feedback" negativo dos glicocorticóides em relação a secreção de ACTH numa via interativa com o sistema serotoninérgico.

BEAULIEU et al.(1987) obtiveram uma diminuição significativa da secreção de ACTH em resposta ao estresse de contenção em ratos submetidos a lesão bilateral do núcleo amigdalóide cerebral (NAC). Estes autores relatam que o estresse aumenta a atividade noradrenérgica no NAC e nas áreas hipotalâmicas anteriores e lateral. O estresse também diminui a atividade dopaminérgica no NAC, núcleo cortical da amígdala, NDM e núcleo ventromediano (NVM) do hipotálamo e na área tegmental ventral. Seus resultados sugerem a hipótese de haver um papel inibitório do sistema dopaminérgico sobre o NAC que se reflete na secreção de ACTH. Provavelmente a inibição deste sistema dopaminérgico pela lesão do NDM do hipotálamo realizado em nossa pesquisa, contribuiu para a diminuição da produção de corticosterona nos animais lesados, submetidos ao estresse de contenção. (fig. 7)

MCEWEN (1998) relatou que a adaptação face mudanças potencialmente estressantes envolve a ativação dos mecanismos neural,

neuroendócrino e neuroendócrino – imunológico. A estes mecanismos dá-se o nome de “alostase” ou estabilidade a mudanças e é um componente essencial para a manutenção da homeostase. Quando estes sistemas são ativados e desativados de maneira eficiente e pouco freqüente o organismo é capaz de cooperar efetivamente para reagir a mudanças que poderiam comprometer sua sobrevivência.

DOBRAKOVOVA et al. (1987) sugerem que os estímulos individuais estudados (exposição a vocalização e exposição ao cheiro de sangue de animais decapitados) não ativam as respostas neuroendócrinas por si mesmos. Entretanto eles sensibilizam o sistema simpato adrenal para uma resposta melhorada a um novo estressor pela mudança do tônus emocional devido a mudanças na excitabilidade do sistema nervoso central (SNC).

TSUDA et al. (1987) estudaram a habilidade de ratos em administrar um agente estressor ou inativá-lo. Concluíram que o grau de controle que um organismo tem sobre um agente estressor modula o impacto causado por este agente no estado psicológico e neuroquímico dos animais, e que a noradrenalina cerebral está implicada no processo de aprendizado onde um organismo consegue competir contra um agressor.

AGUILERA et al. (2000), nos dizem que além do papel da vasopressina na conservação da água, esta regula a secreção pituitária de ACTH por potencializar os efeitos estimulatórios do hormônio liberador da corticotrofina (CRH). Seus estudos sugerem que a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-

adrenal pela vasopressina é fundamental para manter a falta de respostas à corticotrofina na presença de altos níveis de glicocorticóides circulantes, durante o estresse crônico.

Nosso estudo vem ressaltar o papel do NDM do hipotálamo na resposta ao estresse crônico, demonstrando a importância deste núcleo na extinção ou não do estímulo estressante, ou seja, contribuindo provavelmente com o mecanismo de habituação do animal para que ele não entre na fase de exaustão. É necessário que o animal se adapte ao agente estressor para não morrer, nestas circunstâncias o mecanismo de habituação pode ter um papel principal na integridade do sistema imunológico. Provavelmente, mecanismos metabólicos também estão ligados aos mecanismos de estresse devido à necessidade de substratos energéticos para a sobrevivência dos animais em situações de estresse.

CONCLUSÕES

6

- A lesão do NDM do hipotálamo altera o eixo hipotálamo – hipófise – adrenal, modificando a resposta basal do animal.
- A concentração de corticosterona no grupo dos animais lesados aumentou significativamente em condições basais e depois sofreu uma redução que praticamente se manteve constante durante os períodos de estresse de imobilização.
- Os animais do grupo lesado não reconheceram os estímulos estressores e, portanto, o processo de habituação não foi desencadeado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7

AGUILERA, G. & RABADAN – DIEHL, C. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic – pituitary – adrenal axis: implication for stress adaptation. *Regul – Pept.* Dec. 22; 96 (1 – 2): 23 – 29, 2000.

ANISHCHENKO, T. G. & GUDKOVA, E. V. Sex differences in sensitivity of albino rats to adrenalin. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 113 (6): 769 – 771, 1992.

BANKY, Z.; NAGY, G. M.; HALASZ, B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology*, 59: 63 – 71, 1994.

BAUER, M.E.; PERKS, P.; LIGHTMAN, S.L.; SHANKS, N. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiol. Behav.* Jul; 73 (4): 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 negative feedback mechanism. *Neuroendocrinology*, 44 (2): 247 – 254, 1986.

BEAULIEU, S.; DI PAOLO, T.; COTE, J. BARDEN, N. Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology*, Jan; 45 (1): 37 – 46, 1987.

BERNARDIS, L.L. & BELLINGER, L.L. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* Sep, 218 (4): 284 – 306, 1998.

CASTRO, M.; FIGUEIREDO, F.; MOREIRA, A. C. Time-Course of hypothalamic CRH and pituitary ACTH contents, and pituitary responsiveness to CRH stimulation after bilateral adrenalectomy. *Horm. Met. Res.* 27: 10 – 15, 1994.

CASTRO, M.; MOREIRA, A. C. Regulation of corticotropin-releasing hormone secretion by ACTH at different times after adrenalectomy. *Braz. J. Med. BIOL. Res.*, 29: 1573 – 1578, 1996

CIZZA, G.; KVETNANSKY, R.; MOAZZEZ, A.; TAYMANS, S. E.; CHROUSOS, G. P. AND GOLD, P. W. Effects of different intervals of immobilization on in vitro secretion of CRH. In: *Stress Neuroendocrine and Molecular Approaches*. Gordon and Breach Science Publishers S. A., New York, USA. Vol. 1, p. 457-465, 1992.

CHROUSOS, G.P. & GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. *JAMA*, 267 (9): 1244 – 1252, 1992.

COHEN, J.J. Methodological issues in behavioural immunology. *Immunol. Today*, 8: 33, 1987.

COLLARES – BUZATO, C.B.; COLLARES, E.F. & FERNANDES, G.A. Effect of paraventricular nucleus lesion and cold restraint stress on gastric emptying of a liquid meal in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26; 1009 – 1014, 1993.

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

CULMAN, J.; KISS, A.; KVETNANSKY, R. Serotonin and tryptophan hydroxylase in isolated hypothalamic and brain stem nuclei of rats exposed to acute and repeated immobilization stress. *Exp. Clin. Endocrinol.* Mar, 83 (1): 28 – 36, 1984.

DAÍ, J. P.; VAN DER VLIET, J.; SWAAB, D. F.; BUIJS, R. M. Postmortem anterograde tracing of intrahypothalamic projections of the human dorsomedial nucleus of the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, Nov. 9; 401: (1) 16 – 33, 1998.

DENOFRE-CARVALHO, S. Estudo do efeito da lesão no Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo sobre a glicemia e o esvaziamento gástrico em ratos machos. Tese de Mestrado defendida pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, Dezembro de 1994, Campinas.

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.

DIMICCO, J.A.; STOTZ – POTTER, E. H.; MONROE, A. J.; MORIN, S. M. Role of the dorsomedial hypothalamus in the cardiovascular response to stress. *Clin.Exp. Pharmacol Physiol.*, Feb;23 (2): 171 – 176, 1996.

DOBRAKOVOVA, M.; KVETNANSKY, R.; JEZOVA, D.; VANZOEST, I.; VIGAS, M. Specificity of stress reactions in rats is influenced by various psychoemotional stimuli. 639 – 651, 1987.

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

FRASER, D.; RITCHIE, J. S. D.; FRASER, A. F. The term "stress" in a veterinary context. *Br. Vet. J.*, 131: 653 - 662, 1975.

GREENWOOD, B. AND DIMICCO, J.A. Activation of the hypothalamic dorsomedial nucleus stimulates intestinal motility in rats. *Am. Physiological Society*, 6524-6521, 1995.

GRIFFIN, J. F.T. Stress and Immunity: a unifying concept. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 20:263-312, 1989.

HENNESSY, M. B.; HEYBACH, J. P.; VERNIKOS, J.; LEVINE, S. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. *Physiol. Behav.*, 22: 821 – 825, 1979.

HERD, J. A. Cardiovascular response to stress. *Physiol. Rev.*, 71 (1): 305 – 330, 1991.

HOKFELT, T.; FAHRENKRUG, J.; TATEMOTO, K.; MUTT, V.; WERNER, S.; HULTING, A. L.; TRERENIUS, L. & CHANG, K.J. 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.

INGLEFIELD, J. R.; SCHWARZKOPF, S. B.; KELLOGG, C. K. Alterations in behavioral responses to stressors following excitotoxin lesions of dorsomedial hypothalamic regions. *Brain Res.*, Jan 7; 633 (1 – 2): 151 – 161, 1994.

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.

KEIM, S. R. & SHEKHAR, A. The effects of GABAA receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterona secretion in male rats. *Brain Res.*, Nov 11; 739 (1 - 2): 46 - 51, 1996.

KRULICH, 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 evolution. *Neuroendocrinology*, 16: 293-311, 1974.

KUPFERMAN, J. - Hypothalamus an Limbic System: Motivation. In: KANDEL, R. E.; SCHUARTZ, H. J. & JESSEL, M. T. *Principies of Neural Science*, 1991a.

KUPFERMAN, J. - Hypothalamus and Limbic System: Peptidergic Neurons, Homeostases and Emotional Behavior. In: KANDEL, R. E.; SCHUARTZ, H. J. & JESSEL, M. T. *Principies of Neural Science*, 1991b.

KVETNANSKY, R.; PALKOVITS, M.; MITRO, A.; TORDA, T.; MIKULAJ, L. Catecholamines in individual hypothalamic nuclei of acutely and repeatedly stressed rats. *Neuroendocrinology*, 23 (5): 257 – 267, 1977.

KVETNANSKY, R.; FUKUHARA, K.; PACAK, K.; CIZZA, G.; GOLDSTEIN, D. S.; KOPIN, I. J. Endogenous glucocorticoids restrain catecholamine synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. *Endocrinology*, 133 (3): 1411 – 1419, 1993.

LESCOAT, G.; JEGO, P.; BERAUD, B.; MANIEY, J. Influence de sexe sur les modalites de response de l'axe hypothalamo – hypophyso – surrenalien aux

aggressions emotionelles et somatiques chez le rat. *C. R. Soc. Biol.*, 164: 2106 – 2113, 1970.

LI, H. Y.; ERICSSON, A.; SAWCHENKO, P. E. Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Mar 19, 93 (6): 2359 – 2364, 1996.

MARPLE, D. N.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; BLAKE, W. H.; JUDGE, M. D. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. *J. Anim. Sci.*, 35 (3): 576 – 579, 1972.

MASON, J. W. A review of psychoendocrine research on the pituitary – adrenal cortical system. *Psychosom. Med.*, 30: 576 – 607, 1968a.

MASON, J. W. A review of psychoendocrine research on the pituitary – adrenal cortical system. *Psychosom. Med.*, 30: 631 – 653, 1968b

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad. Sci.*, May 1; 840: 33 – 44, 1998.

MEERSON, F. Z. - Adaptation, stress and prophylaxis, Germany, *Springer - Verlag Berlin Heidelber*, p.329, 1984.

MEYER, J. H. - Motility of the stomach and gastroduodenal junction. In: JOHONSON, R. L. -Physiology of the Gastrointestinal Tract. 2 ed. p. 613-629, 1987.

MORLEY, J. E.; KAY, N. E.; SOLOMEN, G.F. & PLOTNIKOFF, N. P. Neuropeptides: conductors of the immune orchestra. *Life Sciences*, 41: 527, 1987.

ODA, M.; NAKAMURA, M.; HONDA, K.; KOMATSU, H.; KANEKO, K.; AZUMA, T. Alterations in gastric mucosal microvascular endothelium in a stressed condition relevance to gastric ulcerogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 242: 161-175, 1988.

ORTH, D. N. Corticotropin-releasing hormone in humans. *Endocr. Rev.* 13: 164 – 191, 1992.

PARÉ, W. P. & REDEI, E. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol. Behav.*, 54: 1179 – 1185, 1993.

PAXINOS, G. & WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Australia, *Academic Press.*, 2ed., 1986.

PICKERING, A. D. - The concept of biological stress. In: Stress and fish. *Pickering Ed. Academic Press*, New York, 1981.

POWLEY, T. L.; OPSOHL, C. A.; COX, J. S. & WEINGARTEN, H. P. - The role the hypothalamus in energy balance. In: MORGANE, P. J. & PANKSEPP, J. Handbook of the Hypothalamus, edited by New York, Raven; Vol.III, p. 211-298, 1980. SELYE, H. - A Syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, 138 (1): 32, 1980.

RIEGLE, G. D. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology*, 11: 1 – 10, 1973.

SALIM, A. S. Stress, the adrenergic hypothalamovagal pathway, and the aetiology of chronic duodenal ulceration. *J. Psychosom. Res.*, 31 (2): 231 – 237, 1987.

SALIM, A. S. The hypothalamus and gastric mucosal injuries: origin of stress-induced injury ? *J. Psychiatr. Res.*, 22 (1): 35 – 42, 1988.

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.

SWANSON, L.W. The hypothalamus. In: Bjorklund A. Hokfelt T. & Swanson L.W. (Editors); *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. V Elsevier, Amsterdam, 1978.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Formation mechanisms of stress adaptation: role of functional coupling of glucocorticoids and brain serotonergic nervous system. *Nihon – Shinkei – Yakurigaku – Zasshi*. Aug; 20 (3): 83 – 91, 2000.

TSUDA, A.; IDA, Y.; TSUJIMARU, S.; SATOH, H.; NISHIMURA, H.; TANAKA, M. Stressor controllability and brain noradrenaline turnover in rats. *Yakubutsu – Seishin – Kodo*. Sep.; 7 (3): 363 – 374, 1987.

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.

VECSEI, P. Glucocorticoids: corticoid, corticosterone and compounds. In: Jaffe B.M., Berhman H. R. Methods of hormone radioimmunoassay. *New York, Academic Press*, 39: 767-792. 1979.

VOGEL, W. H. & JENSH, R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. *Neurosc. Lett.*, 87: 183 - 188, 1988.

WYNN, P. C.; HAUGER, R. L.; HOLMES, M. C.; MILAN, M. A.; CATT, K. J.; AGUILERA, G. Brain and pituitary receptors for corticotropin releasing factor: localization and differential regulation after adrenalectomy. *Peptides*, 5: 1077 – 1084, 1986.

Tabela 1: Valores individuais de corticosterona (B) plasmática ($\mu\text{g/dl}$) ,em $\bar{X} \pm \text{DP}$ $\pm$ EPM dos animais Controle, com Cirurgia Simulada e com Lesão do núcleo dorsomediano do Hipotálamo, em condições basais.

Animais	Controle	Cirurgia Simulada	Lesado
1	0,7	1,6	14,0
2	3,8	1,9	11,8
3	3,8	1,9	7,4
4	1,4	2,2	11,3
5	1,8	0,6	11,8
6	7,2	0,5	16,7
7	1,0	0,4	18,6
8	1,2	0,6	8,2
N	8	8	8
X	2,613	1,213	12,475
DP	2,212	0,755	3,855
EPM	0,782	0,267	1,363

Tabela 2: Valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), em $X \pm DP \pm \text{EPM}$, dos animais Controle, Controle com estresse de contenção de 1 hora/dia durante 1 dia, 3 dias, 9 dias e 15 dias.

Condição Animais	Basal	St 1 dia	St 3 dias	St 9 dias	St 15 dias
1	0,7	13,1	9,2	9,5	6,4
2	3,8	14,0	12,2	12,0	6,5
3	3,8	7,9	14,9	11,0	1,8
4	1,4	5,9	6,2	3,2	1,2
5	1,8	8,3	14,5	5,0	7,7
6	7,2	11,2	14,0	8,8	3,4
7	1,0	14,6	14,9	2,0	8,2
8	1,2	18,2	14,0	3,8	5,0
9		6,0		7,9	
10				9,4	
N	8	9	8	10	8
X	2,613	11,022	12,400	7,260	5,025
DP	2,212	4,274	3,111	3,497	2,645
EPM	0,782	1,425	1,100	1,106	0,933

Tabela 3: Valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), em $X \pm DP \pm \text{EPM}$, dos animais com cirurgia simulada, cirurgia simulada com estresse de contenção de 1 hora/dia durante 3 dias, 9 dias e 15 dias.

Condição Animais	Basal	St 3 dias	St 9 dias	St 15 dias
1	1,6	40,0	11,1	2,8
2	1,9	8,4	13,0	5,2
3	1,9	8,6	7,7	3,6
4	2,2	17,8	3,3	1,9
5	0,6	4,5	3,6	4,5
6	0,5	11,0	15,8	2,1
7	0,4	7,5	8,9	2,3
8	0,6	14,8	5,2	4,8
9				8,6
N	8	8	8	9
X	1,213	14,075	8,575	3,978
DP	0,755	11,295	4,520	2,121
EPM	0,267	3,993	1,598	0,707

Tabela 6: Valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), em $X \pm DP \pm \text{EPM}$, dos animais controle, cirurgia simulada e com lesão do núcleo dorsomediano do hipotálamo e estresse de contenção de 1 hora/dia durante 9 dias.

Condição Animais	Controle St 9 dias	Cirurgia Simulada St 9 dias	Lesão do NDMH St 9 dias
1	9,5	11,1	0,6
2	12,0	13,0	9,6
3	11,0	7,7	5,2
4	3,2	3,3	13,8
5	5,0	3,6	2,1
6	8,8	15,8	2,5
7	2,0	8,9	
8	3,8	5,2	
9	7,9		
10	9,4		
N	10	8	6
X	7,260	8,575	5,633
DP	3,497	4,520	5,104
EPM	1,106	1,598	2,084

Tabela 7: Valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), em $X \pm DP \pm \text{EPM}$, dos animais controle, cirurgia simulada e com lesão do núcleo dorsomediano do hipotálamo e estresse de contenção de 1 hora/dia durante 15 dias.

Condição Animais	Controle St 15 dias	Cirurgia Simulada St 15 dias	Lesão do NDMH St 15 dias
1	6,4	2,8	1,9
2	6,5	5,2	3,0
3	1,8	3,6	3,7
4	1,2	1,9	1,5
5	7,7	4,5	8,8
6	3,4	2,1	2,2
7	8,2	2,3	2,3
8	5,0	4,8	
9		8,6	
N	8	9	7
X	5,025	3,978	3,343
DP	2,645	2,121	2,513
EPM	0,935	0,707	0,950

Tabela 8: Valores individuais de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dl}$), em $X \pm DP \pm EPM$, dos animais controle, cirurgia simulada e com lesão do núcleo dorsomediano do hipotálamo e estresse de contenção de 1 hora/dia durante 3 dias, 9 dias e 15 dias.

Condição Animais	Controle basal	Cirurgia Simulada Basal	Lesão do NDMH Basal	Controle St 3 dias	Cirurgia Simulada St 3 dias	Lesão do NDMH St 3 dias	Controle St 9 dias	Cirurgia Simulada St 9 dias	Lesão do NDMH St 9 dias	Controle St 15 dias	Cirurgia Simulada St 15 dias	Lesão do NDMH St 15 dias
1	0,7	1,6	14,0	9,2	40,0	7,5	9,5	11,1	0,6	6,4	2,8	1,9
2	3,8	1,9	11,8	12,2	8,4	5,1	12,0	13,0	9,6	6,5	5,2	3,0
3	3,8	1,9	7,4	14,9	8,6	4,6	11,0	7,7	5,2	1,8	3,6	3,7
4	1,4	2,2	11,3	6,2	17,8	3,0	3,2	3,3	13,8	1,2	1,9	1,5
5	1,8	0,6	11,8	14,5	4,5	6,6	5,0	3,6	2,1	7,7	4,5	8,8
6	7,2	0,5	16,7	14,0	11,0	1,7	8,8	15,8	2,5	3,4	2,1	2,2
7	1,0	0,4	18,6	14,9	7,5	2,9	2,0	8,9		8,2	2,3	2,3
8	1,2	0,6	8,2	14,0	14,8		3,8	5,2		5,0	4,8	
9							7,9				8,6	
10							9,4					
N	8	8	8	8	8	7	10	8	6	8	9	7
X	2,613	1,213	12,475	12,400	14,075	4,486	7,260	8,575	5,633	5,025	3,978	3,343
DP	2,212	0,755	3,855	3,111	11,295	2,099	3,497	4,520	5,104	2,645	2,121	2,513
EPM	0,782	0,267	1,363	1,100	3,993	0,793	1,106	1,598	2,084	0,935	0,707	0,950