

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Alterações dos níveis de proteína S100B no
líquor de ratos Wistar expostos a gato**

Regina Margis

Orientador

Prof. Dr. Flávio Kapczinski

Co-orientador

Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL COMO REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM BIOQUÍMICA

Porto Alegre, 2003

MENSAGEM

“Há um dom acima de todos os outros que torna o homem único entre os animais [...] o imenso prazer de exercer e aprimorar sua habilidade [...]. A descoberta é uma dupla relação de análise e sínteses juntas. Como análise, ela sonda à procura do que existe [...] Como síntese, une as partes de maneira que a mente criativa transcenda o esqueleto simples fornecido pela natureza”

JACOB BRONOWSKI
The ascent of man (1973)

II

DEDICATÓRIA

De maneira geral, dedico este trabalho àqueles que de alguma forma ou outra buscam a verdadeira paz entre os homens; àqueles que sabem amar sem cobrar algo em troca, àqueles que gostam e se esforçam em ensinar e possibilitam que os outros também cresçam. A estes dedico todo meu respeito e consideração.

Desta forma, dedico este trabalho a três pessoas muito importantes que apresentam estas características: meus pais e meu marido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por jamais medirem esforços para me auxiliar e por, desde muito cedo, me estimularem a estudar e a questionar.

Ao meu irmão agradeço por ser um exemplo de dedicação ao trabalho científico.

Um especial obrigado ao Ricardo que sempre esteve ao meu lado, propiciando que os meus planos se tornassem realidade e me estimulando a seguir em busca dos meus sonhos...deste apoio eu jamais esquecerei.

Ao Flávio, meu orientador, agradeço por ter me oferecido diferentes oportunidades de aperfeiçoamento profissional e ter acreditado neste trabalho quando ainda era um projeto.

Ao CA, faltam palavras para agradecer pelas oportunidades e ensinamentos, mas acima de tudo obrigado por ter sempre se mostrado disposto a me ajudar.

Fran: muito obrigada!

Enfim, os meus agradecimentos às minhas colegas do laboratório do CA e a todos que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

MENSAGEM.....	II
DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
SUMÁRIO.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1INTRODUÇÃO.....	1
1.1Estresse.....	1
1.1.1Modelo animal de estresse: aspectos gerais.....	2
1.1.2Modelo de exposição do rato ao predador natural.....	3
1.1.2.1Modelo de exposição ao odor do predador.....	3
1.1.2.2Modelo de exposição ao predador.....	5
1.1.3Estresse e neurotransmissores.....	6
1.1.4Estresse e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....	9
1.2Proteína S100B.....	15
1.2.1Funções intracelulares da proteína S100B.....	16
1.2.2Funções extracelulares da proteína S100B.....	17
1.2.3Proteína S100B e transtornos neuropsiquiátricos.....	18

2OBJETIVOS.....	20
3MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1Desenho experimental.....	21
3.2Amostra.....	21
3.3Gaiola.....	21
3.4Labirinto em cruz elevado.....	23
3.5Etapas do procedimento para exposição ao predador natural.....	24
3.5.1Preparo em relação aos ratos.....	24
3.5.2Preparo em relação ao gato.....	24
3.5.3Procedimentos de exposição ao predador.....	25
3.6Teste do labirinto em cruz elevado.....	28
3.7Obtenção do material biológico: líquor, sangue, córtex e hipocampo dos ratos.....	29
3.7.1Líquor.....	29
3.7.2Sangue.....	29
3.7.3Córtex e hipocampo.....	29
3.8Quantificação de S100B no líquor pelo método de ELISA.....	30
3.9Quantificação de proteínas em córtex e hipocampo.....	31
3.10Dosagem de corticoesterona.....	31
3.11Análise dos dados.....	32
4RESULTADOS.....	34
4.1Comportamento de ratos Wistar na exposição ao predador.....	34
4.2Comportamento no labirinto em cruz elevado.....	36

4.3	Determinação da concentração de S100B por ensaios imunquímicos no líquor de ratos Wistar.....	39
4.4	Nível de S100B em fatia de córtex de rato Wistar	41
4.5	Nível de S100B em fatia de hipocampo de rato Wistar.....	42
4.6	Níveis de corticoesterona no soro de ratos Wistar.....	43
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÕES.....	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
	ANEXO.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	22
Fotografia da gaiola	
Figura 2.....	23
Fotografia do labirinto em cruz elevado	
Figura 3.....	38
Porcentagem do tempo de permanência dos ratos no braço aberto do teste do labirinto em cruz elevado	
Figura 4.....	40
Níveis de S100B no líquido dos ratos Wistar expostos e não expostos ao predador	
Figura 5.....	44
Níveis de corticoesterona do soro de ratos Wistar 1 hora após a exposição ou não ao predador	
Figura 6.....	44
Níveis de corticoesterona do soro de ratos Wistar 24 horas após a exposição ou não ao predador	

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH: hormônio adrenocorticotrófico
- AP-7: ácido 7-amino-phosphono-heptanoico
- AVP: arginina vasopressina
- 5-HT: 5-hidroxitriptamina
- CCK: colecistocinina
- CRF: fator liberador de corticotrofina
- DA: dopamina
- DHEA: dehidroepiandrosterona
- DSM: manual estatístico e diagnóstico
- ERK: cinase regulada por sinais extracelulares
- GABA: ácido gama-aminobutírico
- GFAP: proteína ácida glial fibrilar
- HHA: hipotálamo-hipófise-adrenal
- LHPA: límbico-hipotálamo-pituitária-adrenal
- LTP: potenciação de longa duração
- NA: noradrenalina
- NF-KB: fator nuclear kappa-beta
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- PKC: proteína cinase C
- PVN: núcleo paraventricular
- RAGE: receptor de produtos de glicação final

RNA_m: ácido ribonucleico -mensageiro

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

TEPT: transtorno de estresse pós-traumático

TMT: 2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolína

RESUMO

O estresse ao predador é um modelo de estresse psicogênico, sendo que a resposta de medo do rato ao gato consiste numa resposta inata. O estresse pode evocar respostas comportamentais e neurofisiológicas. A S100B consiste numa proteína ligante de cálcio secretada por astrócitos que tem sido relacionada a ações neurotróficas e neurotóxicas. O estudo objetivou avaliar o comportamento do rato na exposição ao gato, o comportamento do rato no labirinto em cruz elevado, avaliar os níveis de proteína S100B no líquido e quantificar a proteína S100B em fatias de hipocampo e córtex uma hora e vinte e quatro horas após a exposição protegida do rato ao gato. Foram utilizados 40 ratos Wistar machos com 70 dias de vida, sendo subdivididos em 4 grupos; 10 ratos expostos ao gato (E1h) por 5 minutos e outros 10 ratos não expostos (C1h) ao gato cujo material foi colhido uma hora após. Dos outros 20 ratos (E24h e C24h) foi coletado o material 24 horas após a exposição. Os ratos expostos ao gato (E1h e E24h) permaneceram, durante a exposição ao gato, maior tempo paralisados em relação aos ratos não expostos. Os ratos expostos ao gato (E1h e E24h) permaneceram menor tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação aos ratos não expostos ao gato (C1h e C24h). Foi demonstrada uma significativa redução dos níveis de S100B ($p < 0,05$) no líquido após 24 horas da exposição ao gato em relação aos ratos Wistar não expostos; sem alteração percebida nos níveis de S100B nas fatias de córtex e hipocampo.

ABSTRACT

Predator stress is a kind of psychogenic stress; and the afraid provoked by predator exposure is innate. Stress can evoke behavioral and neurophysiological answers. S100B is a calcium binding protein, it is secreted by astrocytes and has been related with neurotrophic and neurotoxic action. The study aimed measure rat reaction when it was exposed to a cat, measure rat's behavior in plus-maze test, evaluate S100B protein levels in cerebral spinal fluid (CSF) and in hippocampal and cortical slices at 1st and 24th hour after cat exposure. Forty male Wistar rats, 70 days of age, was divided in four groups. Ten rats were exposed to a cat (E1h) during five minutes and another ten rats (C1h) were not exposed; their cerebral spinal fluid, blood, hippocampus and brain were removed one hour after cat exposure and from another twenty rats (E24h, C24h) 24 hours after exposure. Rats exposed to cat (E1h and E24h groups) showed freezing lasting more time than another (C1h and C24h groups). E1h and E24h groups stayed less time in plus-maze open arms than C1h and C24h groups. It was observed that after 24 hours, rats exposed to a cat (E24h) showed S100B protein levels reduction ($p < 0,05$) in cerebral spinal fluid; without S100B changes in hippocampal and cortical slices.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estresse

A vida é mantida devido à existência de um complexo equilíbrio dinâmico, denominado homeostase, que é constantemente ameaçado por eventos externos ou internos, denominados estressores (Chrousos, 1998). Assim, o estresse pode ser entendido como um estado que ameaça a homeostase. A resposta frente ao estresse ocorre tanto em Sistema Nervoso Central como Periférico, consistindo num complexo sistema de informações que são integradas a partir de uma diversidade de sinais (Chrousos, 1992). A resposta ao estresse envolve a percepção do estressor ou de um estímulo que provoque estresse e o processamento e a tradução desta informação para respostas neuro-hormonais, neurobiológicas e comportamentais (Nutt, 2000).

O circuito neural envolvido na resposta ao estresse inclui diferentes estruturas e substâncias, entre elas o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, norepinefrina, dopamina, serotonina. Estas interagem com estruturas cerebrais relacionadas com memória, incluindo hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (Vermetten e Bremner, 2002). A resposta ao estresse é extremamente importante para o organismo vivo; entretanto a reação adaptativa para o retorno ao equilíbrio pode ser inadequada ou excessiva e prolongada, podendo gerar alterações desencadeadoras de situações patológicas (Chrousos, 1998).

1.1.1 Modelo animal de estresse: aspectos gerais

Determinados comportamentos, em ratos no cativeiro, estão relacionados a um aumento da atividade exploratória do animal, é uma atitude que visa ampliar as informações sobre o ambiente que o cerca, como correr em círculos, cheirar, movimentar as vibrissas, direcionar-se para um estímulo específico ou levantar-se sobre as patas posteriores (Nahas, 1999).

O comportamento dos animais pode ser observado expondo-os a provas comportamentais tais como a exposição em campo aberto ou o labirinto em cruz elevado. Este último corresponde a uma prova de comportamento onde é possível calcular-se a proporção do tempo que o animal permanece nos diferentes braços da cruz (abertos ou fechados) e o comportamento do animal nestes espaços avaliando-se a locomoção, a atividade exploratória, o medo e a ansiedade do animal.

O animal exposto a um novo estímulo pode apresentar respostas diversas, tais como: ataque, fuga, ou paralisação (*freezing*). Estas respostas dependem da espécie do animal envolvido, do estímulo provocado e da ocorrência de experiência prévia semelhante (Blanchard, 1989; Adamec et al, 1998; Hayley et al, 2000; Vermetten e Bremner, 2002). Dentre as reações observadas, a paralisação (*freezing*) e a defecação têm sido relacionadas à resposta de medo. Estudos com ratos Wistar evidenciaram que tanto a ambulação quanto a defecação aumentam com a idade, sendo que a defecação diminui a partir da exposição repetida à determinada situação (Nahas, 1999).

As situações geradoras de estresse são muito variadas e provocam diversas respostas e por conseqüência podem alterar o comportamento do indivíduo. Diferentes modelos de estresse podem ser aplicados ao rato, com predominância de componentes psicogênicos ou neurogênicos (Glue et al, 1993), cuja utilização pode variar de acordo com a proposta do estudo. Exemplos de modelos utilizados são o estresse provocado por imobilização do animal, a exposição ao frio (associado ou não ao estresse de imobilização), o choque elétrico, a exposição ao ruído, o exercício forçado, o isolamento social, a exposição a diferentes odores e a exposição ao predador natural (por exemplo, o gato). O tempo e a frequência de exposição a estes estressores varia consideravelmente com o objetivo desejado, sendo que os diferentes modelos podem ser associados.

Tem sido proposto que uma das diferenças entre estressores como o choque elétrico ou os relacionados ao medo condicionado e à exposição ao gato é que o último consiste numa ameaça à vida enquanto que os dois primeiros não necessariamente ameaçam a vida (Adamec e Shallow, 1993).

1.1.2 Modelo de exposição do rato ao predador natural

1.1.2.1 Modelo de exposição ao odor do predador

Ratos expostos a um pedaço de pano impregnado com o odor de gato apresentaram um menor número de busca de contatos com o pano e também um menor tempo em contato com o pano; em contrapartida, apresentaram um aumento no tempo de comportamento defensivo. A exposição ao odor de sangue provocou comportamento semelhante, porém menos marcante e também

apresentaram maior tentativa de buscar refúgio, o que consiste num comportamento defensivo. A exposição ao odor de desinfetante modificou apenas o tempo de contato com a roupa (Zangrossi e File, 1992_a).

Outro modelo que tem sido utilizado é a exposição dos ratos ao composto 2,5-dihidro-2,4,5- trimetiliazolina (TMT) que foi isolado das fezes da raposa, um predador natural de ratos. Ao comparar-se o comportamento de ratos Wistar expostos ao odor do gato (presente numa coleira de pano utilizado pelo gato) com os ratos expostos ao TMT foi observado que apenas os expostos ao odor do gato apresentaram retraimento para sua caixa e menor atividade motora (McGregor et al., 2002). Os ratos expostos à coleira de pano previamente vestida por gato apresentaram aumento sustentado da pressão arterial (superior a 15mmHg), mas sem alteração na frequência de batimentos cardíacos (Dilenberg e Mcgregor, 2001).

A exposição ao odor de gato provocou uma resposta ansiogênica no labirinto em cruz elevado (Zangrossi e File, 1992_a; Mc Gregor et al., 2002) e na interação social na primeira hora, mas isto não foi observado após 24h da exposição. Foi constatado que os efeitos poderiam ser bloqueados com a administração de clordiazepóxido (fármaco do grupo dos benzodiazepínicos) (Zangrossi e File, 1992_b).

Adamec e cols (1998) propuseram que a exposição ao odor do gato não é suficiente para induzir um persistente e significativo aumento do comportamento ansioso no rato.

1.1.2.2 Modelo de exposição ao predador

Blachard e Blanchard foram os primeiros a avaliarem a resposta da exposição de ratos domésticos e selvagens a predadores felinos. Exposição breve ao gato ou ao odor do gato aumentava o comportamento defensivo por muitas horas após a ameaça ser removida (Blanchard e Blanchard, 1989). Estas reações foram observadas em roedores que nunca haviam sido expostos a gatos, sugerindo um reconhecimento inato da ameaça provocada pelo predador – gato.

Utilizando ratos machos Hooded foi observado efeitos duradouros do comportamento ansioso dos ratos, iniciando de 30 (trinta) minutos a 1 (uma) hora após o estresse pela exposição ao predador e persistindo por pelo menos 3 (três) semanas (Adamec et al, 1998), sendo constatado um aumento do comportamento ansioso no teste do labirinto em cruz elevado (Adamec e Shallow, 1993). Não foram observadas diferenças no número de bolos fecais deixados no labirinto em cruz elevado pelos ratos expostos ao predador, em relação aos ratos controle. Também foi observado que os ratos expostos ao gato apresentavam uma elevada resposta de susto incondicionado e retardo na habituação a este estímulo (Adamec e Shallow, 1993).

Blanchard (1990) descreveu diferentes comportamentos defensivos de ratos quando expostos ao predador. Também foi demonstrada uma relação replicável entre o comportamento do gato e o comportamento (defensivo e ansioso) do rato uma semana após a exposição (Adamec et al., 1998).

1.1.3 Estresse e neurotransmissores

A exposição a estressores neurogênicos (como o choque elétrico ou o nado forçado) leva a alterações neuroquímicas centrais, incluindo aumentada utilização de noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) nos sítios hipotalâmico e límbico (Hayley et al, 2000).

Também os estressores psicogênicos, como exposição ao predador ou a indícios da presença do predador, provocam aumento da utilização de norepinefrina, notado pelo acúmulo de metabólito da noradrenalina o 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) no locus cerúleos, no hipocampo, no córtex pré-frontal e na amígdala central. Foi constatado que os estressores psicogênicos levam a variações comportamentais e neuroendócrinas (Adamec e Shallow, 1993), assim como alterações de dopamina no sítio mesolímbico. Na situação de exposição do rato ao furão (predador) foi observado um aumento da utilização de noradrenalina e de dopamina no núcleo paraventricular e no córtex pré-frontal respectivamente.

Observa-se que em situações de estresse agudo ocorre uma elevada taxa de síntese de novo (*turnover*) de noradrenalina e um aumento na resposta dos neurônios do *locus ceruleus* ao estresse repetido. Em situações de estresse crônico ocorre uma depleção de noradrenalina. Cabe destacar o papel da noradrenalina no SNC aumentando o metabolismo da glicose e a estimulação no sistema do fator liberador de corticotropina. Os sintomas comportamentais relacionados à noradrenalina frente a uma situação de estresse incluem ansiedade, medo, hipervigilância, hiperexcitabilidade, irritabilidade, alteração na atenção e na consolidação da memória (Vermetten e Bremner, 2002).

Na resposta ao estresse, envolvendo a dopamina, as regiões cerebrais principalmente envolvidas são o córtex pré-frontal e o núcleo accumbens. Foi observado que em situações de estresse agudo e crônico ocorre um aumento na liberação e no metabolismo de dopamina (Vermetten e Bremner, 2002).

A relação da serotonina com respostas ao estresse pode ser feita através dos receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ e seus subtipos e com as principais regiões cerebrais envolvidas: o córtex pré-frontal, o núcleo accumbens, a amígdala, o hipotálamo, o locus ceruleus e o hipocampo. Em situações de estresse agudo tem sido constatado um aumento no metabolismo de serotonina enquanto que em situações de estresse crônico observa-se redução e modificações na densidade dos receptores. A serotonina está envolvida em sintomas relacionados à ansiedade, controle do humor, percepção e aprendizado, indução do sono, regulação da ingestão alimentar e controle da agressão (Vermetten e Bremner, 2002).

O estresse aumenta a liberação de aminoácido excitatório neuronal (Moghaddam, 1993). Em modelo animal uma forma de plasticidade neural dependente de N-metil-D-aspartato (NMDA) tem sido considerada importante na aquisição do estímulo potencializado pelo medo (Davis et al., 1993; Mindy et al., 1990). Foi descrito um comportamento ansioso após a exposição do rato ao gato e que o aumento deste comportamento pôde ser bloqueado por administração sistêmica, 30 minutos antes da exposição, de ácido 7-amino-phosphono-heptanoico (AP-7) que consiste num bloqueador competitivo do receptor NMDA ou pela administração de MK-801 que bloqueia de forma não-competitiva o receptor NMDA; o mesmo efeito não foi observado quando o bloqueio foi

realizado depois da exposição (Adamec, 1997_b). Os autores observaram que a administração de MK-801, mas não do AP7, promoveu aproximação do rato ao gato durante a exposição; eles sugeriram que este menor medo poderia estar relacionado a alguma ação ansiolítica do MK-801, sendo este efeito eliminado quando previamente era injetado prazosin (antagonista de receptor adrenérgico pós-sináptico). O prazosin não interferiu com o bloqueio do aumento do comportamento ansioso decorrente da exposição. Estes achados mostraram-se favoráveis à idéia de que os receptores NMDA estão envolvidos na iniciação, mas não na manutenção das mudanças neurais mediadoras do aumento persistente da ansiedade após estresse severo (Adamec et al., 1999).

Também foi observado que o bloqueio do receptor NMDA previne a atrofia dos dendritos apicais dos neurônios da região CA3 no hipocampo quando da exposição do rato a uma situação estressora. A atrofia destes dendritos pode contribuir para algum comprometimento, como o comprometimento cognitivo. Convém ressaltar o importante papel do hipocampo frente ao aprendizado e memória e a sua vulnerabilidade em situações geradoras de estresse.

A colecistocinina (CCK), neuropeptídeo que possui propriedades ansiogênicas, também está envolvida no comportamento ansioso do rato frente à exposição ao predador felino. A colecistocinina (CCK4/CCK8) tem elevada liberação em situações de estresse agudo e crônico. A CCK modula atividade de opióide e dopamina e apresenta efeito estimulatório em hipocampo (Vermetten e Bremner, 2002). O bloqueio de receptores CCK_B, mas não CCK_A, nos 30 minutos anteriores ou posteriores da exposição do rato ao predador evita o aumento prolongado do comportamento ansioso do rato (Adamec et al., 1997). Acrescenta-

se a isto o fato da liberação de CCK ser facilitada pelo NMDA (Bandopadhyay e de Belleruche, 1991). O CCK pode agir modulando os efeitos do sistema NMDA relacionado ao estresse traumático. Foi demonstrado que CCK prolonga a potenciação de longa duração (LTP) dependente de NMDA no sistema límbico (Malenka e Nicoll, 1993). Estas mudanças podem embasar as alterações comportamentais que seguem a exposição ao predador. Tem sido sugerida a hipótese que LTP dependente de NMDA na amígdala poderia embasar mudanças persistentes no afeto de ratos expostos a gatos. Foi proposto que o bloqueio de receptores NMDA evita o estabelecimento da memória relacionada ao medo em roedores (Davis et al, 1994).

Em relação ao papel do ácido gama-aminobutírico (GABA), sabe-se que o estresse aumenta a taxa de síntese de novo (*turnover*) do GABA no córtex pré-frontal (Losada, 1988). Foi relatada a ocorrência de alterações nos receptores benzodiazepínicos relacionados à exposição do rato ao odor de gato (File et al., 1993_a; File et al., 1993_b). Ressalta-se que as benzodiazepinas potencializam e prolongam as ações sinápticas do neurotransmissor inibitório GABA e que os receptores benzodiazepínicos estão distribuídos no cérebro, com elevada concentração na substância cinzenta cortical

1.1.4 Estresse e Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

Estruturas cerebrais límbica e hipotalâmica integram informações neuroendócrinas, autonômicas, emocionais e cognitivas e determinam a magnitude e duração da resposta a experiências estressoras no campo neuronal, hormonal e comportamental. Na resposta à situação estressora é fundamental a

ativação do sistema límbico-hipotálamo-pituitária-adrenal (LHPA), sendo os hormônios glicocorticóides importantes efetores deste sistema (Chrousos, 1998).

O circuito neuroquímico central responsável pela ativação do sistema de resposta ao estresse tem sido muito estudado. Existem diversos sítios de interação entre os vários componentes do sistema. Frente a um evento provocador de estresse é iniciada uma cascata de atividade bioquímica. Num estágio inicial, neuropeptídeos cerebrais como o fator liberador de corticotropina (CRF), arginina vasopressina (AVP), entre outros, são liberados no hipotálamo. O CRF é um importante regulador do eixo hipófise-adrenal. Os receptores de CRF também são encontrados em diversos sítios cerebrais extra-hipotalâmicos. Um subgrupo de neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular sintetiza e secreta tanto CRF quanto AVP e outro subgrupo secreta apenas AVP. Durante o estresse a proporção relativa do subgrupo que secreta ambos neuropeptídeos aumenta significativamente. A secreção de CRF pelo núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo promove a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise. O ACTH atua nas adrenais promovendo a liberação de glicocorticóides (cortisol, corticoesterona) (Chrousos e Gold, 1992).

A atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é controlada através de um mecanismo de *feedback* do cortisol na hipófise, hipotálamo e outros locais - sítios que contenham uma grande concentração de receptores de glicocorticóides (Jacobson e Sapolsky, 1991). O eixo HHA apresenta interação funcional com o sistema nervoso noradrenérgico (*locus ceruleus* e projeções dos neurônios cerebrais noradrenérgicos) (Vermetten e Bremner, 2002). O CRF e a noradrenalina estimulam-se mutuamente. Existe uma auto-regulação deste

sistema, através de fibras colaterais, inibindo a secreção de CRF e de catecolamina via receptores pré-sinápticos de CRF e receptores alfa-2 noradrenérgicos, respectivamente. As vias noradrenérgicas ascendentes projetam-se para o núcleo paraventricular e exercem efeito excitatório no eixo HHA; enquanto que os glicocorticóides inibem a ativação da síntese de catecolaminas no PVN induzida pelo estresse.

O *locus ceruleus* e projeções dos neurônios cerebrais noradrenérgicos assim como o CRF e todo sistema envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal estimulam-se mutuamente e respondem de maneira similar aos mensageiros no meio neuroquímico. Ambos sistemas têm em comum o fato de serem inibidos por agentes opióides e ácido gama aminobutírico e estimulados por agentes serotoninérgicos e colinérgicos (Chrousos, 1998).

Na resposta adaptativa frente a uma situação provocadora de estresse é fundamental o papel da ativação do sistema límbico-hipotálamo-pituitária-adrenal (LHPA); sendo os hormônios glicocorticóides importantes efetores deste sistema. O córtex da adrenal secreta diversos hormônios esteroidais; entre eles o cortisol, a dehidroepiandrosterona (DHEA), a corticoesterona – principal glicocorticoide nos ratos. Assim, os corticóides são secretados pela adrenal sendo regulados particularmente por fatores do meio como um pico no início da fase ativa do dia (manhã nos humanos; noite para os ratos) e por situações de estresse. O estresse, principalmente quando é agudo, imprevisível ou incontrolável, está associado com aumentados níveis de corticóides no sangue (Selye, 1978).

A fração livre dos corticóides (não ligada à globulina) pela sua estrutura lipofílica atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica; assim

aproximadamente 5% entra no cérebro e líquido (Guazzo et al., 1996). Normalmente existe um equilíbrio dinâmico entre a fração livre do corticóide e a fração ligada à globulina. No entanto, em situações como o estresse a capacidade de ligação é excedida ocorrendo um aumento importante da fração livre do corticóide e conseqüentemente um aumento da entrada no cérebro.

Diversos trabalhos apontam os esteróides adrenais como responsáveis pela transmissão de informação das glândulas adrenais à formação hipocampal. Os receptores de esteróides adrenais estão expressos em neurônios hipocampais e intermedeiam diferentes efeitos quanto à excitabilidade neuronal, neuroquímica e plasticidade estrutural na formação hipocampal (Mc Ewen, 1999). Nos ratos os receptores de glicocorticóides apresentam uma afinidade 10 vezes menor que os receptores de mineralocorticóides e assim não são saturados até os corticóides atingirem os níveis característicos de estresse (de Kloet, 1991). Os glicocorticóides (GC) são moduladores da fisiologia celular (de Kloet, 1991; Jöels e de Kloet, 1992), tanto influenciando a transcrição gênica como alterando a atividade elétrica de células excitáveis; assim os GCs são importantes nas respostas adaptativas frente ao estresse (Munck et al, 1984).

Alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) foram identificadas nos ratos após a exposição a gato. Os ratos Hooded apresentaram elevação dos níveis de corticoesterona e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) sem modificações significativas no fator liberador de corticotropina (CRF) e na arginina vasopressina (AVP), tanto em núcleo paraventricular como na eminência mediana do hipotálamo. Também não foram observadas modificações no núcleo central da amígdala, no *locus ceruleus*, no núcleo talâmico paraventricular, no hipocampo ou

no núcleo *accumbens*. Os autores sugeriram que o CRF inalterado na amígdala central poder-se-ia dever ao fato do *turnover* do CRF ser muito rápido e que devido a isto não tenha sido detectada uma alteração no nível de CRF pelo método aplicado; entretanto, colocaram como alternativa a esta explicação a possibilidade do estresse ao predador envolver outros mecanismos no núcleo central que não o sistema relacionado ao fator liberador de corticotropina (Adamec et al, 1998).

Os estudos dos efeitos frente à exposição ao predador também foram realizados com ratos Wistar (Adamec, 1997), não tendo sido observada alteração dos níveis de corticoesterona no período de 3 semanas, como ocorrido entre os ratos Hooded. Os autores sugeriram que tal diferença poderia estar relacionada à ansiedade basal dos ratos Hooded ser mais elevada, sendo que uma ansiedade basal maior poderia alterar a resposta do rato frente inclusive ao próprio procedimento de coletar o sangue.

Os glicocorticóides podem provocar diferentes efeitos no cérebro, sobretudo alterações em hipocampo (Fuchs e Flügge, 1998). Inibem a atividade do sistema LHPA e elevados níveis de GC são descritos como gatilho para a morte neuronal (Sapolsky, 1996). Em ratos, o estresse de imobilização repetido ou o tratamento diário com corticoesterona induziu a atrofia reversível de dendritos dos neurônios piramidais de CA3 no hipocampo (Magariños e McEwen, 1995) apontando que elevados níveis de esteróides adrenais secretados durante situações estressoras podem estar envolvidos no gatilho de alterações morfológicas. Também foi observado que o bloqueio farmacológico da

corticoesterona na resposta ao estresse previne a atrofia induzida pelo estresse (Magariños e McEwen, 1995).

Também foi demonstrado que os glicocorticóides agem sinergisticamente com os aminoácidos excitatórios (Krugers et al., 1992). A recaptação de glutamato pelas células da glia, pode ser comprometida por mecanismos dependentes de corticóide. Análogos de glutamato podem provocar danos em neurônios pelo aumento intracelular dos níveis de cálcio e isto é acentuado pelos corticóides (Chou et al., 1994). O tratamento de ratos com fenitoína (agente que bloqueia a liberação de aminoácido excitatório e bloqueia sua ação em canais de cálcio tipo T) reduziu os níveis de corticoesterona e a atrofia, induzidas pelo estresse, de dendritos dos neurônios piramidais da região CA3 no hipocampo. Na maioria das regiões cerebrais os neurônios são produzidos apenas em determinados períodos do desenvolvimento; no entanto os neurônios granulares do giro denteado continuam a ser produzidos na idade adulta (Kaplan e Hinds, 1977). Foi demonstrada uma supressão desta produção de neurônios em ratos adultos pelos esteróides adrenais e estímulos excitatórios, incluindo receptores NMDA (Cameron et al., 1995). Durante as situações estressoras pode ser observado um aumento dos níveis de glicocorticóides circulantes e estímulo excitatório mediado por glutamato; desta forma é possível que situações estressoras modulem a produção de neurônios granulares no giro denteado de animais adultos (Gálea et al., 1996).

Tanapat e cols (2001) observaram que ratos Sprague-Dawley (machos adultos) expostos ao composto 2,5-dihidro-2,4,5- trimetiltiazolina (TMT), situação que eleva os níveis de corticoesterona circulante semelhante ao encontrado em

outros modelos de estresse como subordinação e imobilização, provocou diminuição da proliferação celular pelo aumento dos níveis de hormônios adrenais resultando numa diminuição transitória do número de neurônios granulares maduros gerados na idade adulta; no entanto a adrenalectomia evitou este efeito, sugerindo a necessidade de ação dos hormônios adrenais neste processo.

1.2 Proteína S100B

Em 1965, Moore isolou uma fração purificada de cérebro bovino, a qual acreditou conter proteínas específicas do cérebro. Esta fração foi denominada S100, pois se mostrava solúvel em solução 100% saturada de sulfato de amônio em pH neutro.

— Posteriormente, foi demonstrado que esta fração S100 consistia em duas proteínas distintas, mas estritamente relacionadas S100B e S100A1, com massa molecular de aproximadamente 10.000 Da e que as mesmas não eram específicas do cérebro. Na mesma época foi descrito que S100B e S100A1 eram proteínas ligantes de Ca^{+2} do tipo “*EF-hand*”, estruturalmente relacionadas às conhecidas proteínas ligantes de cálcio do tipo “*EF-hand*” tal como a calmodulina, troponina C e parvalbumina. A proteína S100 é caracterizada por dois motivos ligantes de cálcio do tipo *EF-hand* com afinidades diferentes, uma maior afinidade no sítio C-terminal e uma muito menor afinidade no sítio N-terminal (Donato, 1986). Alguns membros da família S100 também se ligam ao Zn^{+2} com relativa alta afinidade (Zimmer et al, 1995).

Em mamíferos a proteína S100B é mais abundante em células glias do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), sendo considerada uma proteína marcadora de astrócitos. Também é expressa por melanócitos, condrócitos e adipócitos (Donato, 1999).

1.2.1 Funções intracelulares da proteína S100B

A proteína S100B atua regulando a dinâmica do citoesqueleto, a atividade enzimática, a fosforilação de proteínas e a homeostase do cálcio; tem sido sugerido que esta ação deva-se à regulação pela S100B de proteínas efetoras que controlam níveis de cálcio citosólico (Donato, 2001).

Foi proposto que a proteína S100 esteja relacionada à regulação da forma da célula provavelmente envolvendo os três componentes do citoesqueleto citoplasmático - microtúbulos, filamentos intermediários e filamentos de actina. A S100B inibe a polimerização nos microtúbulos, entre outros achados permite creditar à proteína a função de regular a morfologia celular e a dinâmica do citoesqueleto (Donato, 1999).

Tem sido descrito que S100 esteja relacionada à regulação no metabolismo energético por interagir com a frutose-1,6-bifosfato aldolase, glicogênio fosforilase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase e estimular a fosfoglicomutase (Landar et al, 1996).

Outra enzima regulada pela S100B é a Ndr, uma proteína cinase nuclear importante na regulação da divisão celular e morfologia celular de maneira cálcio dependente. A interação S100B/Ndr deve ter importância fisiológica (Millward et al, 1998) já que a S100B tem sido implicada na regulação do ciclo celular.

A S100B inibe a fosforilação de algumas proteínas e esta inibição é devida à interação direta da proteína com substratos de cinases, bloqueando o acesso destas a seus substratos (Donato, 2001). Tem sido sugerido que proteínas S100 (inclusive S100B) talvez tenham um papel na transdução de sinal, particularmente ligando a elevação da concentração do cálcio citosólico ao estado de fosforilação de diferentes proteínas alvo. Desta forma, a habilidade da S100B em modular a fosforilação proteica pode representar um meio de regular passos específicos nas vias de sinalização (Donato, 2001). Dentre as proteínas cuja fosforilação está inibida estão a neuromodulina (ou GAP-43), a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e a vimentina. A fosforilação da GAP-43 pela proteína cinase C (PKC) é reduzida na presença de S100 purificada, sugerindo que esta proteína possa desempenhar função na plasticidade sináptica e extensão de neuritos (Sheu et al, 1994).

1.2.2 Funções extracelulares da S100B

A S100B é secretada por astrócitos (Van Eldik et al, 1987). As culturas primárias de astrócitos têm a secreção estimulada em condições de ausência de soro (Pinto et al, 2000).

A forma extracelular de S100B têm efeitos importantes na extensão de neuritos de neurônios primários. No cérebro de adultos, S100B exerce um papel na plasticidade neuronal e na potenciação de longo prazo. Em 1993, Haring e cols descreveram que no cérebro a expressão de S100B era diretamente relacionada ao nível de serotonina (5-HT).

A ação extracelular da proteína S100B é dependente da concentração, podendo exercer efeitos tróficos ou tóxicos. Em concentração nanomolar exerce efeitos neurotróficos, estimulando a extensão de neuritos (Kligman e Marshak, 1985) e aumentando a sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento (Van Eldik et al, 1991) e após lesão (Barger et al, 1995). Uma liberação aumentada foi observada em cultura de astrócitos após a ativação de receptores adenosina A1 com 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina ou do receptor metabotrópico de glutamato (mGlu3) com este efeito finalizando em 10h na presença de ativadores dos receptores (Ciccarelli et al, 1999). A ação extracelular de S100B inclui um aumento na concentração de cálcio pela abertura dos canais de cálcio voltagem dependentes pela depleção da reservas internas de cálcio e uma modulação da atividade da adenilato ciclase.

Estudos recentes indicam que a atividade trófica ocorre pela ligação da S100B ao *Receptor for Advanced Glycation End products* (RAGE), ativação da ERK (Gonçalves et al, 2000), translocação nuclear de NF-KB e regulação do fator anti-apoptótico Bcl-2 nos neurônios alvo (Alexanian e Bamburg, 1999; Huttunen et al, 2000).

1.2.3 A proteína S100B e transtornos neuropsiquiátricos

A proteína S100B em concentrações micromolares pode exercer efeitos neurotóxicos (Huttunen et al, 2000; Hu et al, 1997). Diferentes estudos têm avaliado o potencial papel da proteína S100B como marcador bioquímico periférico de ativação ou injúria glial; incluindo gliose reativa, morte astrocítica e/ou disfunção de barreira hemato-encefálica .

Camundongos transgênicos que expressam elevadas concentrações de S100B apresentam alterações comportamentais além de apresentar uma alta densidade de dendritos no hipocampo durante períodos precoces do desenvolvimento pós-natal e uma significativa perda de dendritos ao completarem um ano de idade (Whitaker-Azmitia et al, 1997) sugerindo uma ação deletéria da proteína quando em elevadas concentrações.

Níveis aumentados de S100B no líquido e/ou no soro têm sido descritos em patologias de curso agudo ou crônico tais como: traumatismo craniano (Ingebrigtsen et al, 1999), acidente vascular cerebral (Wunderlich et al, 1999), doença de Alzheimer (Sheng et al, 1996), esquizofrenia (Lara et al, 2001), lúpus eritematoso sistêmico (Portela et al, 2002), síndrome de Down (Griffin et al, 1989). Isto sugere que a S100B possa ter alguma função na patogênese destas doenças.

Entretanto, faltam relatos dos níveis intra e extracelulares em situações de estresse.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

2.1.1 Determinar uma série de padrões de alterações comportamentais e de parâmetros bioquímicos associados à exposição de ratos a gato.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar o comportamento no labirinto em cruz elevado de ratos Wistar expostos ao predador natural (gato) em comparação a ratos Wistar não expostos.

2.2.2 Comparar os níveis da proteína S100B no líquor de ratos expostos a gato em relação a ratos não expostos.

2.2.3 Quantificar a proteína S100B em fatias de córtex e hipocampo de ratos expostos ao gato em comparação a ratos não expostos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre aprovou este estudo nos seus aspectos éticos e metodológicos. O desenho experimental empregado foi o de grupos paralelos. Foram estudados quatro grupos (C1h, E1h, C24h, E24h) com dez ratos em cada grupo. A exposição dos animais e a coleta do material foram realizadas conforme os procedimentos abaixo descritos.

3.2 Amostra

Foram utilizados 40 (quarenta) ratos Wistar machos adultos com 70 dias com peso variando de 259 a 341 grama, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).

3.3 Gaiola

A exposição dos ratos ocorreu em ambiente com formato de gaiola retangular. A gaiola possui 70 centímetros de comprimento, 50 centímetros de altura e 30 centímetros de largura, fabricada em acrílico cristal transparente de 8mm de espessura, estruturada em cantoneiras de alumínio, duas portas de acrílico (para entrada do gato e outra para entrada do rato), apresentando uma

divisória interna e tampa superior em tela; assim esta tela interna divide os compartimentos internos; sendo que o destinado ao rato possui 20 centímetros de comprimento, 50 centímetros de altura e 30 centímetros de largura (Figura1).

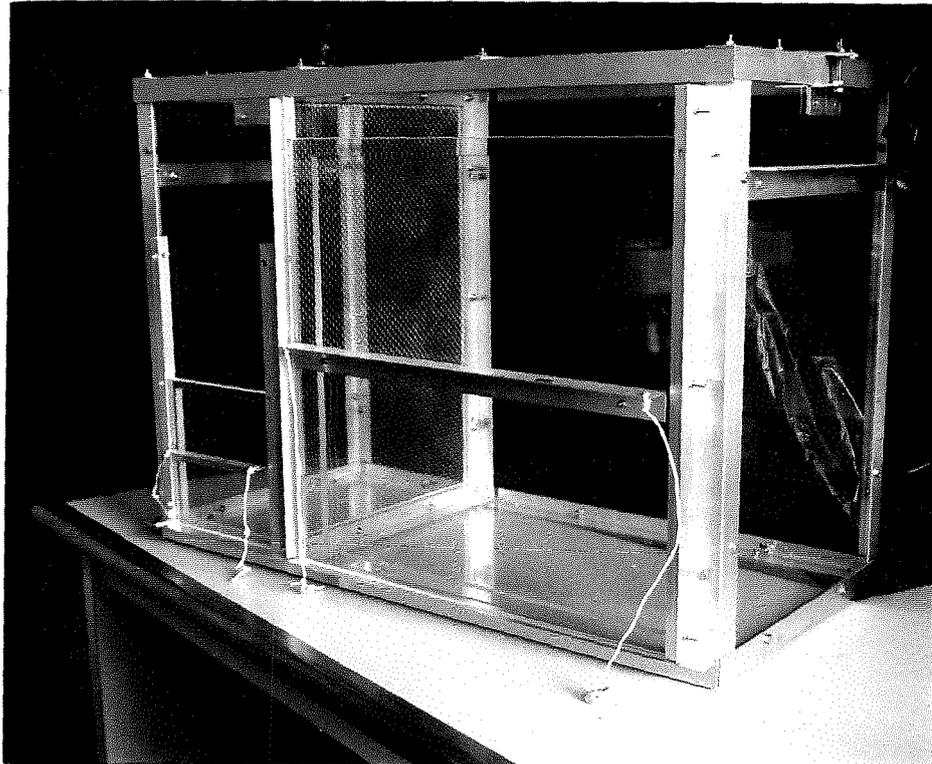


Figura 1: Fotografia da gaiola que possui 70 centímetros de comprimento, 50 centímetros de altura e 30 centímetros de largura, fabricada em acrílico cristal transparente de 8mm de espessura, estruturada em cantoneiras de alumínio. Apresenta duas portas de acrílico, uma tampa superior e uma divisória interna em tela. O menor espaço interno possui 20 centímetros de comprimento, 50 centímetros de altura e 30 centímetros de largura.

3.4 Labirinto em cruz elevado

Estrutura de madeira em formato de cruz com dois braços abertos e dois braços fechados na sua extensão lateral. A estrutura fica elevada aproximadamente 80 centímetros do solo, ela apresenta 1 metro de comprimento por 10 centímetros de largura. Tem dois braços que são fechados lateralmente numa altura de 23 centímetros (Figura 2).

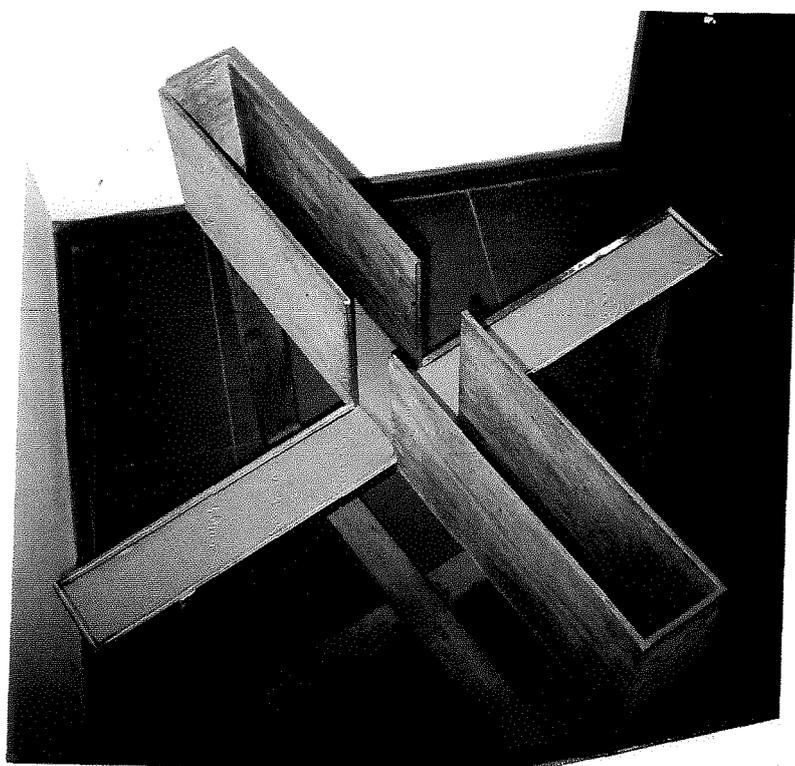


Figura 2: Labirinto em cruz elevado. A estrutura apresenta 1 metro de comprimento e braços com 10 cm de largura. Os braços fechados lateralmente, numa altura de 23 cm apresentam as mesmas dimensões dos braços abertos.

3.5 Etapas do procedimento para exposição ao predador natural

3.5.1 Preparo em relação aos ratos

Os 40 ratos foram levados ao Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre 14 dias antes de ser realizado o experimento. Os animais foram divididos em 8 caixas contendo 5 animais cada, respeitando as normas de ambiente mínimo recomendado para animais de laboratório (animais com massa entre 200 e 300 gramas é permitido até 8 ratos por caixa, sendo que apresentando massa entre 300 e 400 gramas é permitido até 6 ratos por caixa, segundo *Guide for the Care and Use of Experimental Animals – 1985*).

Os animais permaneceram nesta ambiente sendo controlada temperatura ambiente em 23°C, assim como respeitado o ciclo claro e escuro a cada 12 horas, com livre acesso à ração e água. O peso dos animais era avaliado em dias alternados, sendo que no último dia a ser avaliado o peso antes do experimento foram feitas marcas nas caudas dos animais para poder diferenciá-los dentro de cada subgrupo.

3.5.2 Preparo em relação ao gato

Um gato macho com peso de 2,4 Kg foi levado para o local do experimento três dias antes de ser iniciado o experimento para habituar-se à sala e à gaiola. Foi permitido ao gato reconhecer o ambiente (gaiola) por 1 hora, sendo após retirado e encaminhado para seu local de origem.

Foi tomado o devido cuidado para realizar adequada limpeza da gaiola após a presença do gato e a mesma foi arejada ao longo dos três dias que antecederam o experimento.

3.5.3 Procedimentos de exposição ao predador

Os experimentos foram realizados no período da manhã (das 8 horas e 30 min até as 12 horas e 30 min). A cada dia foram realizados os procedimentos conforme descrito abaixo.

No primeiro dia as caixas foram aleatoriamente numeradas de 1 a 8, sendo então estipulado que as caixas 1 e 2 compreenderiam aos ratos controle de 24h, denominado como subgrupo C24h, ou seja, animais expostos cujo material (líquor, soro, córtex e hipocampo) seria coletado 24h após a exposição ao ambiente (gaiola). Caixas 3 e 4 corresponderiam ao subgrupo denominado como E24h, em outras palavras, os 10 ratos que o material seria coletado 24h após a exposição ao gato. Caixas 5 e 6 compreenderiam ao subgrupo controle de 1 hora, denominado como C1h, que consistia em ratos expostos individualmente à gaiola e cujo material seria coletado 1 hora após a exposição à gaiola; enquanto que as caixas 7 e 8 corresponderiam ao subgrupo E1h, que consistia nos ratos expostos ao gato sendo o material coletado 1h após a exposição.

No primeiro dia as caixas 1 e 2 foram separadas do restante e a cada 20 minutos era retirado um animal da sua caixa de origem e colocado numa caixa utilizada para o transporte dos ratos entre as salas.

A caixa para transporte entre as salas foi confeccionada em papelão com 30cm de comprimento, 10cm de largura e 15cm de altura com abertura de 1,5cm

na face superior permitindo adequada ventilação. No fundo da caixa havia um dispositivo que permitia que o rato pudesse ser deslizado pela caixa delicadamente para ser retirado da mesma. Devido a esta caixa foi permitido que o rato visualizasse o gato apenas no ambiente do experimento (na gaiola), pois ao ingressar na sala onde estava o gato dentro da gaiola o rato ainda estava nesta caixa fechada.

Os 10 ratos expostos neste primeiro dia correspondiam ao subgrupo identificado como C24h. Assim, o rato número 1 foi retirado da sua caixa e colocado na caixa de transporte, descrita acima, sendo levado para a sala de exposição; o tempo gasto nesta etapa não ultrapassava 30 segundos. Na sala de exposição havia a gaiola do experimento sobre uma mesa e uma filmadora posicionada há 1,5m da gaiola, o ambiente da sala de exposição foi mantido inalterado nos 5 dias do experimento. Chegando em frente da porta para o rato da gaiola abria-se a caixa de transporte na sua extremidade, que correspondia às dimensões da abertura na gaiola, e o rato era deslizado delicadamente para dentro do compartimento destinado ao rato dentro da gaiola. O rato era mantido na gaiola ao longo de 5 minutos e após, retirado. Todo o período desde a entrada até a saída do rato da gaiola foi filmado para adequada avaliação, posterior, do comportamento do mesmo. Finalizado os 5 minutos dentro da gaiola o rato era colocado novamente dentro da caixa de transporte e levado para uma terceira sala onde era colocado numa caixa em que ficava isolado por 50 minutos. Transcorridos 50 minutos era colocado na caixa que iria compartilhar com os outros 4 ratos do seu subgrupo. O mesmo procedimento foi realizado para os outros 9 ratos do grupo C24h.

No segundo dia, os ratos do grupo C24h (das caixas 1 e 2) 10 minutos antes de cada rato completar 24 horas da exposição à gaiola, assim com intervalo de 20 minutos entre os animais, cada rato era levado para uma quarta sala onde era realizado teste do labirinto em cruz elevado, descrita a forma de avaliação abaixo. Assim que era finalizado este teste o rato era levado para uma quinta sala onde era anestesiado e coletado o material conforme descrito abaixo.

Também no segundo dia, afastado dos procedimentos descritos acima, os ratos das caixas 3 e 4, correspondendo ao grupo identificado como E24h , foram expostos ao gato. O procedimento realizado para cada rato foi semelhante ao exposto acima para o grupo C24h, respeitando o intervalo de tempo, tendo como única e importante diferença a presença do gato no compartimento destinado ao gato na gaiola. Ressalta-se que no intervalo entre as exposições dos ratos era oferecida água para o gato.

No terceiro dia os animais das caixas 3 e 4 foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado 10 minutos antes de completar 24h da exposição ao gato e ao completar 24h transcorridas da exposição ao gato cada animal era anestesiado e realizada a coleta do material como detalhado abaixo. Ao final desta manhã foi tomado o cuidado de ser realizada adequada limpeza da gaiola e aeração.

No quarto dia do experimento foram utilizados os animais das caixas 5 e 6, correspondendo ao subgrupo C1h. O rato número 21 foi retirado da sua caixa e colocado na caixa de transporte sendo levado para a sala de exposição, que se mantinha idêntico aos dias anteriores. Em frente à porta para o acesso do rato à gaiola abria-se a caixa de transporte na sua extremidade e o rato era deslizado

delicadamente para dentro do compartimento destinado ao rato na gaiola. O rato era mantido na gaiola ao longo de 5 minutos e após, retirado. Finalizados os 5 minutos dentro da gaiola, o rato era colocado novamente dentro da caixa de transporte e levado para uma terceira sala onde era colocado numa caixa de espera, por 50 minutos. Transcorrido este tempo cada rato era levado para uma quarta sala onde era realizado teste do labirinto em cruz elevado e logo após para uma quinta sala onde era anestesiado e coletado o material conforme descrito posteriormente.

No quinto dia foram utilizados os animais das caixas 7 e 8, correspondendo ao subgrupo denominado como E1h; sendo feito o mesmo procedimento que o descrito para os ratos das caixas 5 e 6, no entanto com a presença do gato na gaiola do experimento.

3.6 Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado foi realizado em sala separada, iluminada por uma luz vermelha sendo o rato colocado na região de intersecção dos braços da cruz e a partir de então era cronometrado, num intervalo de 5 minutos, o tempo em que o rato permanecia nos braços abertos e o tempo que permanecia nos braços fechados do labirinto em cruz elevado. Também sendo anotado o número de entradas nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados, assim como o número de *groomings* e *rearings*.

3.7 Obtenção de material biológico: líquido, sangue, córtex e hipocampo dos ratos

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50ml/Kg), via intraperitoneal, e fixados no estereotáxico.

3.7.1 Líquor

O volume de 50µL de líquido foi extraído através de punção da cisterna magna com microseringa. A amostra foi congelada e armazenada em temperatura de 70°C negativos até o momento da realização da dosagem de S100B, intervalo inferior a 14 dias.

3.7.2 Sangue

Uma amostra de 1ml de sangue foi obtida de cada um dos ratos através de punção intracardíaca (agulha 25x7mm). A amostra foi centrifugada por 3 minutos a 2500rpm, sendo que o soro foi armazenado a -70°C para posterior quantificação de corticoesterona.

3.7.3 Córtex e hipocampo

Os animais, ainda anestesiados, foram sacrificados por decapitação com uso de guilhotina sendo rapidamente removido o encéfalo o qual foi colocado sobre uma placa de Petri invertida sobre o gelo. A placa estava recoberta com papel filtro embebido em solução Krebs-Ringer. A seguir com auxílio do material cirúrgico e pincéis foram removidas as estruturas de interesse: uma fatia do

córtex cerebral e uma fatia do hipocampo e após as estruturas separadas foram congeladas e mantidas à -70°C .

3.8 Quantificação de S100B no líquido pelo método de ELISA

A amostra do líquido foi diluída 4 vezes em PBS contendo albumina 0,2%. A solução PBS é constituída por $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1M; KH_2PO_4 0,1M e NaCl 50mM em pH 7,4. Após realizada a diluição 50 μL foram aplicados em placa de ELISA.

As placas ELISA de 96 poços haviam sido incubadas por uma noite com anticorpo para S100B (9,5 $\mu\text{g/ml}$) diluído em tampão carbonato. Então, os poços foram lavados por três vezes com solução de lavagem que consiste em Tween-20 0,05% e albumina bovina 0,1% em PBS e após foram bloqueados com 100 μL de albumina bovina 2% em PBS durante uma hora com posterior lavagem com a solução de lavagem acima descrita. Sendo então adicionado 50 μL de tampão barbital-cálcio que consiste em tampão barbital/sódio-barbital (Sigma) 60mM (pH 8,6) com CaCl_2 0,2mM. Uma vez realizado este preparo foram aplicadas as amostras na placa de ELISA.

A placa foi incubada por três horas a 37°C e após sofreu nova lavagem como descrito acima.

O segundo anticorpo anti-S100B foi diluído 1:1000 em tampão barbital-cálcio e incubado a temperatura ambiente por uma hora. Decorrido este tempo foi realizada uma nova lavagem. Foram adicionados 100 μL do substrato da peroxidase O-fenilenodiamina (um tablete de *Fast - OPD* dissolvido em água) e a placa foi mantida no escuro por trinta minutos. Após a reação de cor foi

interrompida com 50µL de HCl 3N. O produto desta reação apresentava cor sendo a absorbância desta medida num comprimento de onda de 492nm utilizando um leitor de placas de 96 poços.

3.9 Quantificação de proteínas em córtex e hipocampo

A cada fatia de córtex e hipocampo foram adicionados 500 µL de PBS com 1mM de EGTA e 1mM de PMSF sendo então homogeneizada com microseringa. Desta amostra foram retirados 10 µl para dosagem de proteínas, sendo que a dosagem de proteínas foi realizada segundo o método de Petersen (Petersen, 1977) utilizando albumina bovina (Sigma) como padrão. Outros 10 µL foram diluídos em 990 µl de albumina 0,2% em PBS (diluição final 1:100). Desta solução final foram aplicados 50 µl na placa de ELISA.

3.10 Dosagem de corticoesterona

Foi realizada a dosagem da corticoesterona presente no soro através de radioimunoensaio (ImmuChem™ Double Antibody Corticoesterone 125 I RIA Kit, ICN Pharmaceuticals, Inc; lote número: RCBK0212A).

No dia da dosagem os reagentes, que estavam sendo mantidos congelados, foram colocados na sala em temperatura ambiente para posterior uso. O soro do rato foi diluído em 1:200 com diluente de esteróide a partir de 10µL da amostra para 2mL. Foi adicionado 0,3mL do diluente de esteróide nos tubos 1 e 2 (tubos NSB) e 0,1mL do diluente de esteróide nos tubos 3 e 4. Colocou-se 0,1mL de calibrador de corticoesterona nos tubos de número 5 à

número 16. De acordo com a orientação fornecida pelo fabricante a concentração do calibrador é expressa como soro equivalente e tem já incluído o fator de diluição; podendo-se ler os valores diretamente a partir da curva de calibração.

Então foi adicionado 0,1mL do controle diluído (1:200) e do soro do rato diluído (1:200) nos tubos de 17 até o fim. Após foi adicionado 0,2mL de corticoesterona marcada com I^{125} em todos os tubos (sendo que o traçador I^{125} foi adicionado antes do anti-soro). Após adicionou-se 0,2mL de anti-corticoesterona do tubo 3 em diante. Uma vez realizadas estas adições cada tubo foi turbilhonado brevemente para possibilitar uma mistura dos componentes adicionados em cada tubo. Após foi deixado o material incubando por 2 horas em temperatura ambiente (23°C). Após o período de incubação, foi adicionado 0,5mL da solução precipitante em cada tubo e, novamente, cada tubo foi turbilhonado. Então os tubos do ensaio foram colocados numa centrífuga refrigerada por 15 minutos a 1000xg. Após foi deixado decantar o sobrenadante, tendo-se o cuidado de “secar” com papel absorvente a extremidade do tubo antes de virá-lo para cima. Por fim foi contado o precipitado pelo contador gamma.

3.11 Análise dos dados

O comportamento dos ratos e do gato no momento de exposição na gaiola foi avaliado qualitativamente sendo realizada descrição do comportamento.

As medidas realizadas no labirinto em cruz elevado avaliando o número de entradas nos braços abertos, o número de entradas nos braços fechados, o número de *groomings*, o número de *rearings*, assim como o tempo total em braço

aberto e o tempo total em braço fechado foi avaliado pelo teste Duncan, alfa: 0,05.

A análise entre os dados obtidos dos níveis de corticoesterona no soro dos ratos, assim como a análise dos dados dos níveis de S100B no líquido e a análise dos dados obtidos da quantificação de S100B em hipocampo e córtex foi realizada pelo teste Duncan, alfa: 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Comportamento de ratos Wistar na exposição ao predador

No experimento, com a observação do comportamento dos ratos na gaiola durante a exposição, verificou-se que os ratos expostos ao predador apresentaram maior tempo total na posição de congelamento ou paralisia, quando comparados aos ratos não expostos ao gato. Percebendo-se uma correlação das situações em que o gato aproximava-se da tela, ou movimentava-se ativamente no seu compartimento, com o desenvolvimento do estado de paralisia ou *freezing* nos ratos. O inverso também pôde ser notado nas situações em que o gato permaneceu imóvel, em momentos de exposição dos ratos de número 13, 16, 19, 34, 39 e 40, não foi observada a posição de congelamento (Tabela 1).

No caso específico do experimento realizado com o rato de número 39, observou-se que enquanto o gato encontrava-se deitado e de olhos fechados (início do experimento) o rato explorava ativamente o seu compartimento da gaiola. No momento em que o gato abriu os olhos e espreguiçou-se, o rato pulou e a partir de então assumiu a posição de congelamento (Tabela 1).

Rato	Grupo do rato	Número de "grooming"	Tempo total paralisado	Número de pulos	Saída espontânea da caixa	Comportamento do gato
1	C24h	-	-	-	Não	-
2	C24h	1	-	-	Não	-
3	C24h	-	-	-	Não	-
4	C24h	2	-	-	Não	-
5	C24h	1	-	-	Não	-
6	C24h	-	-	-	Não	-
7	C24h	-	-	-	Não	-
8	C24h	-	-	1*	Não	-
9	C24h	-	-	-	Não	-
10	C24h	-	-	-	Não	-
11	E24h	-	1min 36s	18	Sim	Emite som e ativo
12	E24h	-	1min 37s	12	Sim	Emite som e ativo
13	E24h	-	-	-	Não	Observa
14	E24h	3	51s	4	Sim	Observa
15	E24h	-	1min 53s	3	Sim	Observa
16	E24h	4	-	-	Não	Observa
17	E24h	-	3min 40s	-	Sim	Ativo
18	E24h	-	54s	-	Não	Observa deitado
19	E24h	2	33s	-	Sim	Observa
20	E24h	-	3min 55s	-	Sim	Ativo
21	C1h	1	30s	-	Não	-
22	C1h	-	-	-	Não	-
23	C1h	-	-	-	Não	-
24	C1h	2	-	-	Não	-
25	C1h	-	-	-	Não	-
26	C1h	-	-	-	Não	-
27	C1h	1	-	-	Não	-
28	C1h	-	-	-	Não	-
29	C1h	-	-	-	Não	-
30	C1h	-	-	-	Não	-
31	E1h	-	3min 22s	-	Sim	Ativo
32	E1h	-	3min 40s	4	Não	Ativo
33	E1h	-	3min 02s	4	Sim	Ativo
34	E1h	-	1min 10s	2	Sim	Observa deitado
35	E1h	2	2min 34s	-	Sim	Lava-se
36	E1h	-	3min 58s	7	Sim	Lava-se
37	E1h	-	3min 46s	1	Sim	Ativo e lava-se
38	E1h	-	2min	-	Sim	Lava-se e deita
39	E1h	-	1min 12s	1**	Sim	Deitado e após sentado
40	E1h	-	37s	-	Sim	Deitado

Tabela 1: Comportamento de ratos Wistar durante exposição ao predador. *ao ser apresentada a caixa de transporte para sair da gaiola; **pulo momento que o gato inicia movimento; -:nada observado; min:minuto; s: segundos.

4.2 Comportamento no labirinto em cruz elevado.

Os ratos Wistar não expostos ao gato e submetidos ao labirinto em cruz elevado 1 hora após a exposição à gaiola, correspondendo aos 10 ratos do grupo C1h, permaneceram em média 120,2 segundos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado enquanto que os 10 ratos do grupo exposto ao gato e submetidos após 1 hora ao labirinto em cruz elevado ficaram em média 61,6 segundos. Esta diferença também é percebida após 24 horas da exposição, sendo que os 10 ratos do grupo C24h permaneceram em média 128,7 segundos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e os 10 ratos do grupo E24h permaneceram em média 89,2 segundos de um total de cinco minutos no labirinto em cruz elevado (tabela 2).

A figura 3 demonstra em porcentagem o tempo dos ratos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado; sendo a diferença entre a média dos grupos expostos e não expostos ao gato quanto ao tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no intervalo de 1 hora.

Foi observada maior frequência de *groomings* (anexo 1) durante a realização do teste nos ratos dos subgrupos expostos ao gato (E1h e E24h) em relação aos ratos não expostos ao predador que correspondiam aos grupos C1h e C24h ($p < 0,05$).

Grupos	Média do tempo em braço aberto (segundos)	Desvio padrão
C1h	120,2	52,3
E1h	61,6	48,6
C24h	128,7	45,5
E24h	89,2	54,8

Tabela 2: Média e desvio padrão do tempo (em segundos) do rato no braço aberto do labirinto em cruz elevado (LCE). C1h: ratos submetidos ao LCE 1 hora após a exposição à gaiola do experimento (n:10); E1h: ratos submetidos ao LCE 1 hora após a exposição ao gato (n:10); C24h: ratos submetidos ao LCE 24 horas após a exposição à gaiola do experimento (n:10); E24h: ratos submetidos ao LCE 24 horas após a exposição ao gato (n:10).

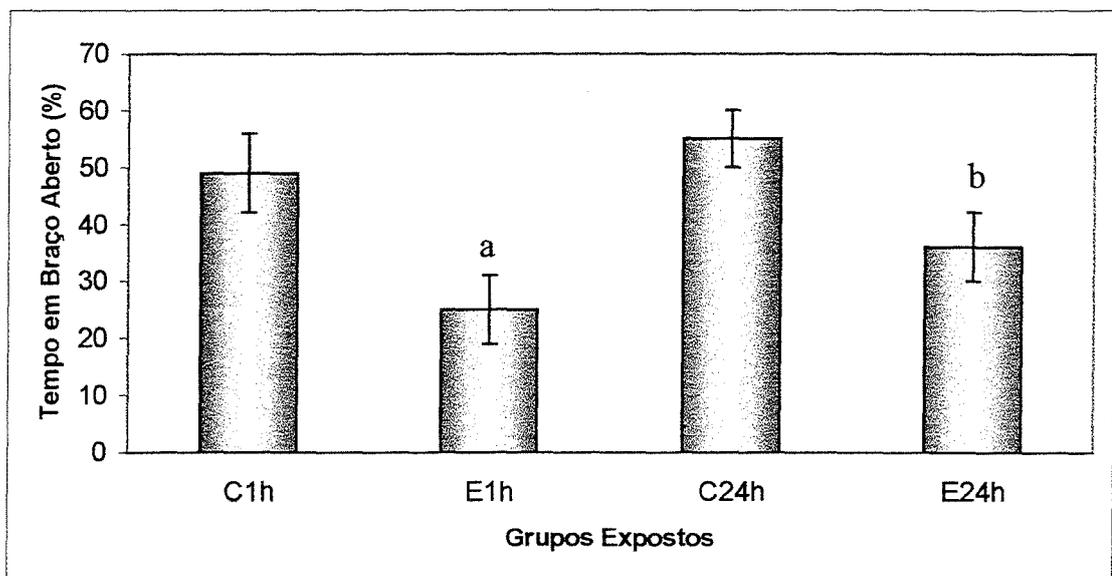


Figura 3: Porcentagem do tempo de permanência dos ratos nos braços abertos do teste do labirinto em cruz elevado (LCE). C1h: ratos submetidos ao LCE 1 hora após a exposição à gaiola do experimento (n: 10); E1h: ratos submetidos ao LCE 1 hora após a exposição ao gato (n: 10); C24h: ratos submetidos ao LCE 24 horas após a exposição à gaiola do experimento (n: 10); E24h: ratos submetidos ao LCE 24 horas após a exposição ao gato (n:10). a: E1h em relação ao C1h (p: 0,02); b: E24h em relação ao C24h (p:0,09).

4.3. Determinação da concentração de S100B por ensaios imunológicos no líquido de ratos Wistar

A concentração da proteína S100B foi expressa em ng/ml de líquido. A média dos níveis da proteína S100B no líquido de ratos 1 hora após a exposição ao predador por 5 minutos foi de 1,45ng/ml, sendo que nos ratos não expostos ao gato (C1h) a média foi de 0,99ng/ml, sendo observado uma tendência ($p=0,06$) a um maior nível da proteína S100B em líquido de ratos 1 hora após a exposição ao predador natural por 5 minutos em relação aos não expostos.

No grupo de ratos expostos ao gato em que o líquido foi coletado 24h após a exposição (E24h) foi encontrada uma média de proteína S100B de 0,69ng/ml, e no grupo não exposto ao gato a média da proteína S100B no líquido 24 horas após, foi de 1,11ng/ml. A diferença entre os dois grupos, expostos ao predador e não expostos ao predador quando avaliados 24h horas após o evento estressor, é estatisticamente significativa ($p<0,05$). Assim como a diferença das médias entre o grupo exposto em 1h e 24h também se mostra estatisticamente significativa ($p<0,01$) (Figura 4).

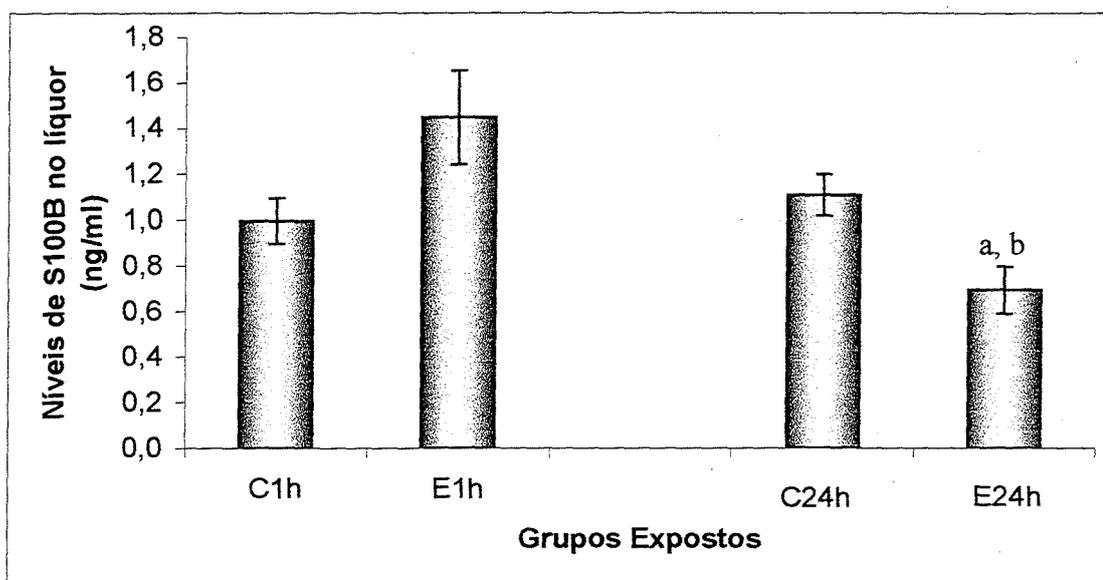


Figura 4: Níveis de S100B no líquor dos ratos Wistar expostos e não expostos ao predador. C1h: líquor obtido de ratos 1 hora após a exposição à gaiola do experimento (n:10); E1h: líquor de ratos 1 hora após a exposição ao gato (n: 10); C24h: líquor obtido 24 horas após a exposição à gaiola do experimento (n:10); E24h: líquor de ratos 24 horas após a exposição ao gato (n: 10). a: estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo C24h; b: estatisticamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao grupo E1h.

4.4 Nível de S100B em fatia de córtex de rato Wistar

Não foi observada diferença significativa entre os grupos de ratos avaliados no que se refere à quantificação de proteína S100B expressa em ng/mg de proteína total nas fatias de córtex (Tabela 3).

Grupo	Média de Proteína S100B (ng/mg)	Desvio Padrão
C1h	1,53	0,14
E1h	1,42	0,16
C24h	1,47	0,22
E24h	1,44	0,17

Tabela 3: Média da quantificação de proteína S100B em fatia de córtex de ratos Wistar. C1h: amostra de córtex cerebral de ratos obtida 1 hora após a exposição à gaiola do experimento (n: 10); E1h: amostra obtida de ratos 1 hora após a exposição ao gato (n: 10); C24h: amostra de córtex cerebral obtida 24 horas após a exposição à gaiola do experimento (n: 10); E24h: amostra de córtex cerebral de ratos 24 horas após a exposição ao gato (n: 10)

4.5 Nível de S100B em fatia de hipocampo de rato Wistar

Não foi observada diferença significativa entre os grupos de ratos avaliados no que se refere à quantificação de proteína S100B expressa em ng/mg de proteína total nas fatias de hipocampo (Tabela 4).

Grupo	Média de Proteína S100B (ng/mg)	Desvio Padrão
C1h	1,40	0,14
E1h	1,48	0,19
C24h	1,44	0,17
E24h	1,33	0,13

Tabela 4: Média da quantificação de proteína S100b em fatia de hipocampo de ratos Wistar. C1h: amostra de hipocampo de ratos obtida 1hora após a exposição à gaiola do experimento (n:10); E1h: amostra de hipocampo 1 hora após a exposição ao gato (N:10); C24h: amostra de hipocampo obtida 24 horas após a exposição à gaiola do experimento (n:10); E24h: amostra de hipocampo 24 horas após a exposição ao gato (n:10).

4.6.Níveis de corticoesterona no soro de ratos Wistar

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as médias dos diferentes grupos avaliados em relação à concentração de corticoesterona no soro de ratos Wistar 1h e 24h após a exposição ao predador natural em comparação aos grupos não expostos ao predador .

Foi observada uma flutuação nos níveis de corticoesterona entre os animais do mesmo subgrupo variando com o momento de coleta. As figuras 5 e 6 apresentam graficamente esta flutuação, destacando que cada animal e seu controle foram avaliados em dias diferentes, mas no mesmo horário; possibilitando uma avaliação de acordo com o ritmo circadiano.

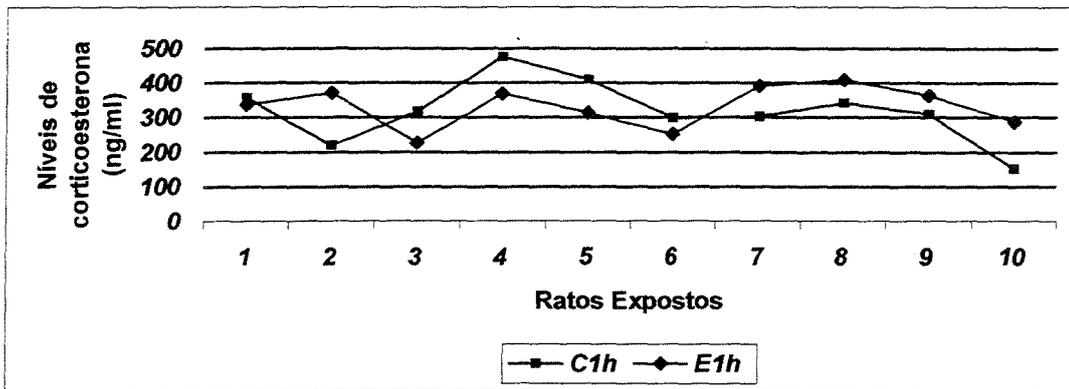


Figura 5: Níveis de corticoesterona do soro de ratos Wistar 1 hora após a exposição (E1h) ou não ao predador (C1h). Cada ponto no gráfico corresponde a um rato.

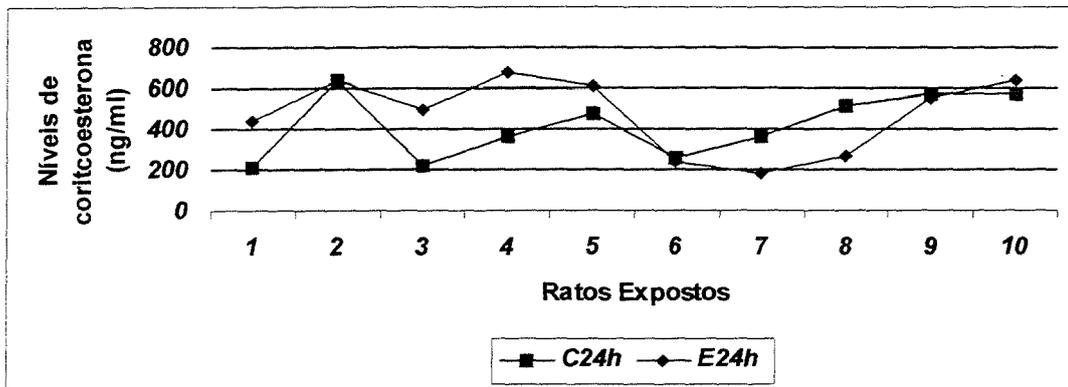


Figura 6: Níveis de corticoesterona do soro de ratos Wistar 24 horas após a exposição (E24h) ou não ao predador (C24h). Cada ponto no gráfico corresponde a um rato.

5 DISCUSSÃO

Inúmeros estudos têm sido realizados com a proteína S100B, no entanto ainda existem dúvidas sobre o efeito das situações provocadoras de estresse nos níveis desta proteína no líquido.

Em uma situação de estresse ocorrem diferentes respostas tanto no nível celular como comportamental. As respostas frente a situações estressoras podem ser devidas ao papel de neurotransmissores, de sinais de membrana, de alterações nas vias de transdução de sinais, entre outras, consistindo num somatório de efeitos que levam a uma determinada resposta do organismo. Os estudos com modelos *in vivo* possibilitam que estes e outros fatores interajam de modo a provocar uma resposta a determinado evento, ou substância, mais próxima aos fenômenos que ocorrem nos seres humanos.

Dados estatísticos mostram que uma em cada quatro pessoas expostas a eventos traumáticos graves, tais como combate militar, ser tomado como refém ou ser vítima de estupro, pode desenvolver como resposta ao estresse o transtorno psiquiátrico denominado Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) (Breslau, 2001).

O Transtorno de Estresse Pós-Traumático é um transtorno de ansiedade que, de acordo com os critérios do Manual Estatístico e Diagnóstico (DSM-IV-TR^{RM}, 2000), ocorre em indivíduos que frente a um evento traumático apresentam uma sensação de intenso medo ou impotência e apresentam por período superior a quatro semanas sintomas de revivência involuntária e intrusiva relacionados ao

evento como recordações aflitivas do evento, *flashbacks*, pesadelos; também ocorrem os sintomas evitativos e atordoamento e os sintomas de hiperexcitabilidade como as reações de sobressalto, insônia, raiva, manter-se em estado de hipervigilância. Foi demonstrado que os indivíduos com TEPT apresentam baixos níveis de cortisol sérico (Boscarino, 1996) e salivar (Goenjian et al, 1996) e apresentam um maior número de receptores para glicocorticóides em linfócitos em relação aos indivíduos sem TEPT, número que pode ser reduzido com tratamento com dexametasona (Yehuda et al, 1995). De modo geral, estes indivíduos apresentam uma disfunção serotoninérgica e tem sido sugerida uma hiperatividade glutamatérgica relacionada a uma redução dos receptores gabaérgicos; assim como um aumento da atividade dopaminérgica e elevada resposta catecolaminérgica (Nutt, 2000). De fato, neste transtorno podem ser observados diferentes efeitos de neurotransmissores envolvidos na resposta ao estresse, como o papel da noradrenalina que tem sido relacionada a uma resposta de ansiedade, hiperexcitabilidade e irritabilidade, ou a serotonina que também está envolvida com ansiedade, agressividade, percepção e aprendizado (Katz et al, 1996), assim também o papel do glutamato, cujo receptor NMDA está relacionado com a iniciação das mudanças neurais mediadoras do aumento persistente da ansiedade após o estresse severo.

Cabe ainda destacar que muitos dos indivíduos com TEPT apresentam redução de volume de hipocampo (Sapolsky, 2000; Pitman et al, 2001). O TEPT foi o primeiro transtorno psiquiátrico a ser associado com atrofia hipocampal (Spedding, 2003).

Adamec e cols (1997) propuseram como modelo animal do TEPT a exposição do animal ao seu predador natural. Constataram que a exposição por cinco minutos do rato ao gato (sem lesão física sofrida pelo rato) provocava um comportamento ansioso no rato. A exposição ao gato, neste contexto, passa a ser relevante, pois consiste numa ameaça à vida e um estresse inescapável. Ressalta-se ainda que a exposição ao predador por si não exige o aprendizado da condição como sendo ameaçadora, pois a reação de medo frente ao predador é inata (Blanchard e Blanchard, 1989). O aumento da resposta de sobressalto, descrita para indivíduos com TEPT, também foi observada em ratos expostos a gatos assim como também foi observado retardo na habituação de estímulo nestes animais (Adamec e Shallow, 1997). E ainda abordando alterações estruturais relacionadas à exposição a indícios do predador foi descrito que ratos adultos após exposição ao odor de raposa (estímulo aversivo natural) apresentaram supressão da proliferação celular no giro denteado associada à descarga excitatória aumentada e elevados níveis circulantes de esteróides adrenais (Gálea et al., 1996).

Como já comentado por Adamec (1993), o rato não precisa ser tocado pelo gato para apresentar aumento do comportamento ansioso sendo interessante ressaltar a relação entre o comportamento do gato e do rato. No presente trabalho, nas situações em que o gato mantinha-se ativo (movimentando-se ou emitindo sons), os ratos permaneciam predominantemente paralisados com evidente reação de medo e menor atividade exploratória, enquanto que nos momentos em que o gato deitava-se ficando de olhos fechados os ratos apresentaram comportamento semelhante aos ratos não expostos ao gato quanto

à atividade exploratória e tempo que permaneciam paralisados. Estas observações são compatíveis com os dados descritos anteriormente quanto às diferentes reações do rato frente ao comportamento do predador (Blanchard, 1989).

Além de ser observado o comportamento do rato e do gato no momento da exposição foi avaliado o comportamento do rato no labirinto em cruz elevado, sendo demonstrado que os ratos expostos ao gato permaneceram menor tempo, em relação aos ratos não expostos ao gato, nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Desta forma, tanto pela observação do rato no momento da exposição ao predador quanto no comportamento quando exposto ao labirinto em cruz elevado observa-se indicativos de aumento de comportamento correlacionado a maior ansiedade por parte do rato frente à exposição ao predador.

Em relação aos parâmetros bioquímicos avaliados na resposta ao estresse observou-se uma semelhança na flutuação dos níveis de corticoesterona para cada grupo exposto e seu controle em relação ao momento da coleta; deve-se levar em consideração as flutuações hormonais normais dos níveis de corticoesterona em relação ao horário que foi realizada a coleta, assim como a exposição. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a média dos níveis de corticoesterona dos quatro grupos de rato estudados. Este resultado pode estar relacionado ao que foi sugerido por Adamec em 1997 no que se refere aos ratos Wistar serem menos ansiosos; de fato Adamec (1997) já havia referido que os ratos Wistar não apresentaram uma resposta elevada de corticoesterona frente a situações de estresse de exposição ao predador, em

comparação a resposta com ratos Hooded. Outra possível explicação para este dado, pode estar relacionada ao *turnover* da corticoesterona e que devido a isto não tenha sido detectada a alteração desta variável nos dois momentos de coleta, uma hora e vinte e quatro horas após a exposição.

Associada a estas alterações as situações geradoras de estresse provocam respostas no Sistema Nervoso Central (SNC). Considerando-se que a unidade funcional do cérebro não consiste apenas no neurônio, mas sim no complexo neurônio - glia é importante avaliar-se o papel dos astrócitos, tipo celular predominante na glia, frente a um evento estressor, sobretudo ao serem consideradas as diversas funções dos astrócitos.

Os astrócitos estão relacionados a diversas funções, dentre as quais a captação de glutamato da fenda sináptica, reduzindo o nível extracelular do glutamato, protegendo os neurônios da morte celular, como demonstrado em culturas celulares mistas *in vitro* (Niels, 2001). Correlacionando com situações de estresse, diferentes estudos têm demonstrado o aumento da atividade do aminoácido excitatório (glutamato) em situações de estresse, assim como a toxicidade relacionada aos elevados níveis de glutamato no cérebro, tornando-se importante a regulação destes níveis. Destaca-se que pela captação de glutamato os astrócitos podem proteger os neurônios de um potencial dano excitotóxico. Outra função importante dos astrócitos consiste na conversão de glutamato em glutamina, pela ação da glutamina sintetase (Pfrieger, 1997), sendo que esta enzima pode ser induzida pelo glicocorticóide (Shirasawa e Yamanouchi, 1999). Sob alta concentração, o glutamato pode ativar receptores glutamatérgicos em

astrócitos levando a aumento da concentração de cálcio intracelular o que pode gerar danos celulares.

Desta forma, diferentes alterações na fisiologia celular, frente a situações de estresse, podem estar envolvidas em maior ou menor grau com as funções desempenhadas pelas células da glia. Destaca-se o fato de existirem receptores de glicocorticóides nos astrócitos (Bohn et al, 1991) e que elevados níveis de glicocorticóides inibem a captação de glicose pelos astrócitos hipocampais (Tombaugh e Sapolsky, 1993). Também foi demonstrado que a dexametasona aplicada a cultura de astrócitos hipocampais possibilitou a regulação em pelo menos três fatores neurotróficos derivados dos astrócitos, dentre os quais a proteína S100B (Niu et al, 1997).

Estudos *in vitro* têm buscado criar diferentes situações provocadoras de maior ou menor expressão de S100B; no entanto, ainda não estão suficientemente esclarecidos os mecanismos envolvidos na liberação de S100B pelos astrócitos. Em 1987, Suzuki e cols observaram, em cultura de células de astroglioma, que a indução da liberação de S100 pelo ACTH variava de acordo com a dose administrada à cultura. Eles também constataram que a liberação de S100 não foi induzida pelo fragmento ACTH₁₋₂₄, mas pelo fragmento ACTH₁₈₋₃₉, sendo assim a metade C-terminal do ACTH relacionada à liberação de S100.

Foi observada uma liberação de S100B pelas células gliais induzida por agonistas 5-HT_{1A} (Whitaker-Azmitia, 1990). Assim como demonstrado que elevadas concentrações de glutamato em meio privado de soro diminui a secreção de S100B pelos astrócitos hipocampais (Gonçalves et al, 2002). Estas situações poderiam ocorrer em resposta a eventos de estresse, ao serem

consideradas as alterações, previamente descritas, que ocorrem, por exemplo, com a serotonina e o glutamato na resposta a evento estressor. Muitos dos estudos citados previamente apresentam dados avaliados *in vitro*; assim, destaca-se a importância do presente estudo que avalia as alterações *in vivo* desencadeadas por um evento estressor que não necessita aprendizado, como a exposição ao predador natural.

As alterações observadas neste estudo são nos níveis de S100B em líquido, o que é importante, pois esta proteína também pode ser secretada por melanócitos, condrócitos e adipócitos; assim, a medida de S100B no líquido possibilita que se atribua, com maior segurança a origem glial da proteína S100B identificada.

Assim, considerando as funções neurotróficas dos astrócitos destaca-se a síntese e liberação de fatores neurotróficos e citocinas, tal como o fator de crescimento neural (*nerve growth factor*: NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*: BDNF), a neurotrofina-3, entre outros.

Ao considerar-se o papel do estresse e da proteína S100B, avaliados no presente estudo, e correlacioná-los ao BDNF é percebido que diferentes estudos já descreveram o efeito do estresse sobre o BDNF. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um membro da família do fator de crescimento neural (NGF) e, assim como outras neurotrofinas, exerce um papel importante no crescimento e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento e também contribui para sobrevivência, função e plasticidade dos neurônios em cérebros adultos (Lewin e Barde, 1996).

Também tem sido observado o papel do BDNF na resposta ao estresse (Duman et al, 1997). Estresse por imobilização aguda ou repetitiva diminuiu o ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de BDNF no hipocampo; medido pela hibridização *in situ* (Smith et al, 1995). A exposição ao estresse incondicionado de choque nas patas, assim como a re-exposição a indícios previamente associados ao choque, diminuíram o RNAm do BDNF no giro denteado do hipocampo de ratos adultos (Rasmusson e Duman, 2002). Também foi observado que a administração de corticoesterona diminuiu BDNF em giro denteado.

A redução na expressão de BDNF tem sido sugerida como estando envolvida com o achado de atrofia de neurônios hipocampais, observada em animais expostos a experimentos sob estresse (Duma et al, 1997), sendo que este achado de atrofia hipocampal é também observado em transtornos psiquiátricos como em indivíduos que apresentam TEPT; sendo que um modelo animal sugerido para estudo deste transtorno é a exposição do animal ao seu predador natural.

Avaliando os achados acima citados, referentes a situações estressoras, os diferentes neurotransmissores envolvidos na resposta ao estresse, o papel dos fatores neurotróficos como BDNF, destacado por outros autores, e a proteína S100B, no presente estudo, é possível sugerir-se uma possível interação entre os diferentes fatores tróficos envolvendo as células gliais na resposta ao estresse. Quanto à interação, sobretudo envolvendo as vias de transdução de sinais, sabe-se que o BDNF (aplicado em culturas) estimula a secreção de S100B (Nishi et al,

2000) e que S100B e BDNF interagem exercendo efeitos complementares na maturação neuronal através de uma ação seqüencial.

No modelo de estresse, aqui demonstrado, foi observada uma redução nos níveis de S100B no líquor 24 horas após a exposição de ratos a gato. Considerando que se trata de um modelo de estresse, pode ser sugerido que esta redução possa ser resultante de uma menor expressão de BDNF, tal como demonstrado em outros modelos de estresse, e que isto tenha provocado uma menor expressão de S100B levando assim a uma menor secreção desta proteína no líquor.

Ao ser considerada a tendência a aumento dos níveis de S100B dosados uma hora após a exposição e a redução significativa 24 horas após a exposição ao gato depara-se com uma apresentação bifásica da secreção de S100B. Resultado semelhante, quanto à secreção bifásica, foi observado pela ação da dexametasona nos níveis de RNAm de S100B em cultura de astrócitos de hipocampo de rato sendo constatado um aumento nas primeiras 24 horas seguido por um significativo declínio (Niu et al, 1997).

No presente estudo apesar da variação do conteúdo liquorico de S100B não foi observado variação intracelular do conteúdo da proteína nas fatias de hipocampo e córtex cerebral avaliadas.

Frente às alterações nos níveis de S100B observadas neste estudo e que o modelo de exposição do rato ao gato pode ser proposto como modelo animal para o TEPT passa a ser de interesse a avaliação dos níveis de S100B em indivíduos com TEPT sobretudo ao considerar-se que indivíduos com diferentes condições psiquiátricas tais como esquizofrenia (Lara et al, 2001), depressão

(Schroeter et al, 2002) apresentaram alterações nos níveis séricos de S100B. A avaliação da proteína S100B, quer por suas ações neurotróficas ou neurotóxicas, poderia auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia do TEPT e possibilitar uma melhor compreensão das diferentes respostas e possíveis comprometimentos relacionados a exposição a trauma grave.

6 CONCLUSÕES

6.1 Ratos Wistar expostos por 5 minutos a gato, em ambiente protegido, variaram o seu comportamento (*freezing*) relacionado ao comportamento/atividade do gato.

6.2 Ratos Wistar expostos a gato por 5 minutos apresentaram menor tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação aos ratos Wistar não expostos ao gato.

6.3 Ratos Wistar expostos a gato por 5 minutos apresentaram menor quantidade de proteína S100B no líquor em relação aos ratos Wistar não expostos ao gato 24 horas após a exposição.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC R.E., STARK-ADAMEC C., LIVINGSTON K.E. (1980) The development of predatory aggression and defense in the domestic cat (*Felis catus*) Behavioral and Neural Biology 03: 389-409.

ADAMEC R.E., SHALLOW T. (1993) Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. Physiol Behav 54: 101-109.

ADAMEC A. (1997_a) Transmitter systems involved in neuroplasticity increased anxiety and defense following traumatic stress. Neuroscience Biobehavior Rev 21(6):755-765.

ADAMEC R.E., SHALLOW T., BUDGELL J. (1997_b) Blockade of β but not α receptors before and after the stress predator exposure prevents lasting increases in anxiety-like behavior: implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. Behav Neurosci 111(2): 435-449.

ADAMEC R., KENT P., ANISMAN H., SHALLOW T., MERALI Z. (1998) Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals – implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23: 301-318.

ADAMEC R.E., BURTON P., SHALLOW T., BUDGELL J. (1999) NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety like-behavior produced by the stress of predator exposure – implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Physiology & Behavior* 65 (4/5): 723-737.

AHLEMEYER B, BEIER H, SEMKOYA I, SCHAPPER C, KRIEGLSTEIN J. S-100B protects cultured neurons against glutamate and staurosporine – induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT1A-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Research* 2000; 858:121-128.

ALEXANIAN A.R., BAMBURG J.R. (1999) Neuronal survival activity of S100B is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activation of NKL-KB. *FASEB Journal* 13:1611-1620

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. (2000) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders (DSM-IV-TR)*. Washington (DC): American Psychiatric Association.

BANDOPADHYAY R.; DE BELLEROCHE J. (1991) Regulation of CCK release in cerebral cortex by N-methyl-D-aspartate receptors: sensitivity to APV, MK-801, kynurenate, magnesium and zinc ions. *Neuropeptides* 18: 159-163.

BARGER S.W., VAN ELDIK L.J., MATTSON M.P. (1995) S100B protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation *Brain Research* 677:167-170.

BLANCHARD R.J. (1989) Blanchard DC. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* 103:70-82

BLANCHARD R.J.; BLANCHARD D.C.; RODGERS J.K., WEISS S.M. (1990) The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci. Biobehav Rev* 14:463-472.

BOHN M.C., HOWARD E., VIELKIND U., KROZOWSKI Z. (1991) Glial cells express both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors *J Steroid Biochem* 40: 105-111.

BOSCARINO J.A. (1996) PTSD, exposure to combat, and lower plasma cortisol among Vietnam Veterans: findings and clinical implications. *J Clin Consult Psychol* 64:191-201.

BRESLAU N. (2001) The epidemiology of posttraumatic stress disorder: what is the extent of the problem? *J Clin Psychiatry* 62 (17): 16-22.

CAMERON H.Á., McEWEEN B.S., GOULD E. (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15; 4687-4692.

CHOU Y.C., LIN W.J., SAPOLSKY R.M. (1994) Glucocorticoids increase extracellular [3H]D-aspartate overflow in hippocampal cultures during cyanide-induced ischemia. *Brain Res* 654:8-14.

CHROUSOS G.P., GOLD P.W. (1992) The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis *JAMA* 267:1244-1252.

CHROUSOS G.P. (1998) Stressors, stress, and neuroendocrine integration of adaptative response. In: Csermely P. *Stress of life from molecules to man*. Annals of the New York Acad Sciences v.851. New York p. 311-335.

CICARELLI R., IORIO P.DI, BATTAGLIA B.G., D'ALIMONTE I., D'ONOFRIO M., NICOLETTI F, CACIAGLI F. (1999) Activation of A1 adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100B protein from cultured astrocytes. *Glia* 27:257-281.

DAVIS M., FALLS W.A., CAMPEAU S., KIM M. (1993) Fear potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Research* 58:175-198.

DAVIS M., RAINNIE D., CASSEL M. (1994) Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety *Trends Neurosci* 17: 208-214.

DE KLOET E.R. (1991) Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Front Neuroendocrinol.* 12:95-104.

DILENBERG R.A., MCGREGOR I.S. (2001) Defensive behavior in rats toward predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):597-609.

DONATO R. (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta* 1450:191-231. Review article.

DONATO R. (2001) S100: a multigenic family of calcium modulated proteins of the EH-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem & Cell Biol* 33: 637-668.

DUMAN R.S., HENINGER G.R., NESTLER E.J. (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54: 597-606.

FILE S.E., ZANGROSSI JR H., ANDREWS N. (1993) Social interaction and elevated plus-maze tests: changes in release and uptake of 5-HT and GABA. *Neuropharmacology* 32:217-221.

FILE S.E., ZANGROSSI JR H., ANDREWS N. (1993). Novel involvement and cat odor change GABA and 5-HT release and uptake in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 931-934.

FUCHS E., FLÜGGE G. (1998) Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23:295-300.

GALEA L.A.M., TANAPAT P., GOULD E. (1996) Exposure to predator odor suppresses cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats via a cholinergic mechanism. *Soc Neurosci Abstr.* 22:1196.

GLUE P., NUTT D.; COUPLAND N. (1993) Stress and psychiatric disorder: reconciling social and biological approaches. In: Stanford S.C., Salmon P. *Stress from synapse to syndrome.* Academic Press, London. p. 53-73.

GOENJIAN A.K., YEHUDA R., PYNOS R.S., et al. Basal cortisol and dexamethasone suppression of cortisol among adolescents after the 1988 earthquake in Armenia. *Am J Psychiatry* 153:929-934.

GONÇALVES D., KARL J., LEITE M., ROTTA L., SALBEGO C., ROCHA E., WOLFCHUK S., GONÇALVES C.A. (2002) High glutamate decreases S100b secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *NeuroReport* 13: 1-3.

GRIFFIN W.S.T., STANLEY L.C., LING C., WHITE L., McLEOD W., PERROT L.J. WHITE III C.L., ARAOZ C. (1989) Brain interleukin 1 and S100 immunoreactivity are elevated in Down's syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7611-7615.

GUAZZO E.P., KIRKPATRICK P.J., GOODVER I.M., SHIERS H.M., HERBERT J. (1996) Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate (DHEAS) in the cerebrospinal fluid of man: relation to blood levels and the effects of age. *J Clin Endocrin Metab* 81:3951-3960.

HARING J.H., HAGAN A., OLSON J., RODGERS B. (1993) Hippocampal serotonin levels influence the expression of S100B detected by immunocytochemistry *Brain Research* 631:119-123.

HAYLEY S., BOROWSKI T., MERALI Z., ANISMAN H. (2000) central monoamine activity in genetically distinct strains of mice following a psychogenic stressor: effects of predator exposure. *Brain Research* 892: 293-300.

HERBERT J. (1998) Neurosteroids, brain damage, and mental illness. *Experimental Gerontology* 33(7/8):713-727.

HU J., FERREIRA A., VAN ELDIK L.J. (1997) S100B induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes *J Neurochem* 69:2294-3301.

HUTTUNEN H.J., KUJA-PANULA J., SORCI G., AGNELETTI A.L., DONATO R., RAUVALA H. (2000) Corregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 protein through RAGE activation *J Biol Chem* 267: 14998-1504.

INGEBRIGTSEN T., WATERLOO K., JACOBSEN E.A., LANGBAKK B., ROMMER B. (1999) Traumatic brain damage in minor head injury: relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioural outcome. *Neurosurgery* 45:468-475.

JACCOBSON L., SAPOLSKY R.M. (1991) The roles of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinol Rev.* 12: 118-134.

JOËLS M., DE KLOET E.R. (1992) Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci.* 15: 25-30.

KAPLAN M.S., HINDS J.W. (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197: 1092-1094.

KATZ L., FLEISHER W., KJERNISTED K., MILANESES P. (1996) A review of the psychobiology and pharmacotherapy of posttraumatic stress disorder. *Can J Psychiatry* 41: 233-238.

KLIGMAN D., MARSHAK D.R. (1985) Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7136-7139.

KRUGERS H.J., KOOLHAAS J.M., BOHUS B., KORF J. (1992) A single social stress experience alters glutamate receptor-binding in rat hippocampal CA3 area. *Neurosci Lett* 154:73-77.

LANDAR A., CADDEL G., CHESSHER J. ZIMMER D.B. (1996) Identification of an S100a1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium* 20:279-285.

LARA D.R., GAMA C.S., BELMONTE-DE-ABREU P., PORTELA L.V.C., GONÇALVES C.A., FONSECA M., et al. (2001) Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res* 35: 11-14.

LEWIN G.R., BARDE Y-A. (1996) Physiology of the neurotrophins *Annu RevNeurosci* 19: 289-317.

MAGARINÓS A.M., MCEWEN B.S. (1995) Stress induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory aminoacid receptors. *Neuroscience* 69:89-98

MALENKA R.C., NICOLL R.A. (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: Multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 16:521-527.

MCEWEEN B.S. (1999) Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 105-122.

MCGREGOR I.S., SCHRAMA L., AMBERMOOM P., DILENBERG R.A. (2002) Not all "predator odours" are equal: cat odour but not 2,4,5, trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviour in rat. *Behavioural Brain Research* 129:1-16.

MINDY J.D., MISERENDINO M.J.D., SANANES C.B., MELIA K.R., DAVIS M. (1990) Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345:716-718.

MILLWARD T.A., HEIZMANN C.W., SCHÄFFER B.W., HEMMINGS B.A. (1998) Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins EMBO J 17:5913-5922.

MOGHADDAM B. (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. Journal of Neurochemistry 60:1650-1657.

MOORE BW. (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system Biochem Biophys Res Commun 19: 739-744.

MUNCK A., GUYRE P., HOLBROCK N. (1984) Physiological functions of glucocorticoids during stress and their regulation to pharmacological actions. Endocr 5:25-46.

NAHAS T.R. (1999) O teste do campo aberto. *In*: Xavier G.F. Técnicas para o estudo do sistema nervoso. Ed Plêiade, São Paulo p.197-204.

NIELS D. (2001) Glutamate uptake. Progress in Neurobiology 65(1):1-105.

NISHI M., WHITAKER-AZMITIA P.M., AZMITIA E.C. (1996) Enhanced synaptophysin immunoreactivity in rat hippocampal culture by 5-HT_{1A} agonist, S100b, and corticosteroid receptor agonists. Synapse 23:1-9.

NISHI M., KAWATA M., AZMITIA E.C. (2000) Trophic interactions between brain-derived neurotrophic factor and S100B on cultured serotonergic neurons Brain Research 868:113-118.

NIU H., HINKLE D.A., WISE P.M. (1997) Dexamethasone regulates basic fibroblast growth factor, nerve growth factor and S100b expression in cultured hippocampal astrocytes Mol Brain Res 51: 97-105.

NUTT D.J. (2000) The psychobiology of posttraumatic stress disorder J Clin Psychiatry 61(5):24-29.

OTERO LOSADA M.E. (1988) Changes in central GABAergic function following acute and repeated stress. Br J Pharmacol 93: 483-490.

PETERSON GL. (1977) A simplification of the protein assay method of lowry et al. Which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356.

PINTO S.S., GOTTFRIED C., MENDEZ A., GONÇALVES D., KARL J., GONÇALVES C.A., WOFCHUK S., RODNIGHT R. (2000) Immunoreactivity and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology FEBS Lett. 486:203-207.

PITMAN R.K., SHIN L.M., RAUCH S.L. Investigating the pathogenesis of posttraumatic stress disorder with neuroimaging.(2001) J Clin Psychiatry; 62(17):47-54.

PORTELA L.V., BRENOL J.C., WALZ R., BIANCHIN M., TORT A.B., CANABARRO U.P., et al. (2002) Serum S100B levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation. Clin Diagn Lab Immunol 9:164-166.

RASMUSSEN A.M., SHI L., DUMAN R. (2002) Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. Neuropsychopharmacology 27:133-142.

SAPOLSKY R.M. (1996) Stress, glucocorticoid, damage to the nervous system: Current state of confusion. 1:1-19.

SAPOLSKY R.M. (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. Arch Gen Psychiatry 57:925-935.

SCHROETER M.L., ABDUL-KHALIQ H., DIEFENBACHER A., BLASIG I.E. (2002) S100B is increased in mood disorders and may be reduced by antidepressive treatment. Neuroreport 13:1675-1678.

SHENG J.G., MRAK R.E., ROVNAGHI C., KOZLOWSKA E., VAN ELDIK I.J., GRIFFIN W.S. (1996) Human brain S100B and S100B mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17: 359-363.

SHEU F.S., AZMITIA E.C., MARSHAK D.R., PARKER P.J., ROUTTENBERG A. (1994) Glial-derived S100B protein selectively inhibits recombinant beta protein kinase C (PKC) phosphorylation of neuron-specific protein F1/GAP-43. *Brain Res Mol* 21:62-66.

SMITH M.A., MAKINO S., KIM S-Y., KYETNANSKY R. (1995) Stress increases brain derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 136:3743-3750.

SOUTHWICK S.M., KRYSTAL J.H., BREMNER J.D., et al. (1997) Noradrenergic and serotonergic function in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 54: 749-758.

SPEEDING M., NEAU I., HARSING I. (2003) Brain plasticity and pathology in psychiatric disease: sites of action for potential therapy. *Current Opinion in Pharmacology* 3:33-40.

SUZUKI F., KATO K., KATO T., OGASAWARA N. (1987) S-100 protein in clonal astrogloma cells is released by adrenocorticotropic hormone and corticotropin-like intermediate-lobe peptide. *Journal of Neurochemistry* 49:1557-1563.

TANAPAT P., HASTINGS N.B., RYDEL T.A., GALEA L.A.M., GOULD, E. (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone dependent mechanism. *The Journal of Comparative Neurology* 437: 496-504.

VAN ELDIK L.J., ZIMMER D.B. (1987) Secretion of S100 from rat C6 glioma cells *Brain Res* 436;367-370.

VAN ELDIK L.J., CHRISTIE-POPE B., BOLIN L.M., SHOOTER E.M., WHETSELL JR W.O. (1991). Neurotrophic activity of S100B in cultured dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res* 542: 280-285.

VERMETTEN E., BREMNER D. (2002) Circuits and systems in stress. I preclinical studies. *Depress and Anxiety* 15;126-147.

WHITAKER-AZMITIA P.M., MURPHY R., AZMITIA E.C (1989). Stimulation of astroglial 5-HT-1A receptors releases the serotonergic growth factor, protein S100B and alters astroglial morphology. *Brain Res* 497 : 80-86.

WHITAKER-AZMITIA P.M., MURPHY R., AZMITIA E.C. (1990). S100 protein is released from astroglial cells by stimulation of 5-HT 1A receptors. *Brain Res* 528: 155-158.

WHITAKER-AZMITIA P.M., WINGATE M., BORELLA A., GERLAI R., RODER J., AZMITIA E.C. (1997) Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S100B show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome *Brain Res* 776:51-60.

WIESMANN M., WANDINGER K.P., MISSLER U., ECKHOFF D., ROTHERMUNDT M., AROLT V., KIRCHNER H. (1999) Elevated plasma levels of S100B protein in Schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 45: 1508-1511.

WUNDERLICH M.T., EBERT A.D., KRATZ T., GOERTLER M., et al. (1999) Early behavioural outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190-1195.

YEHUDA R., BOISONEAU D., LOWY M.T et al (1995) Dose-response changes in plasma cortisol and lymphocyte glucocorticoid receptors following dexamethasone administration in combat veterans with and without PTSD. *Arch Gen Psychiatry* ;52:583-593.

ZANGROSSI JR H., FILE S. (1992_a) Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Res Bull* 29:381-388.

ZANGROSSI JR H., FILE S. (1992_b) Chlordiazepoxide reduces the generalised anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. *Pharmacol Biochem Behav* 43:1195-1200.

ZIMMER D.B., CORNWALL E.H., LANDAR A., SONG W. (1995) The S100 protein family: history, function and expression. *Brain Research Bulletin* 37 (4):417-429.

ANEXO

Tabela dos dados obtidos das dosagens de corticoesterona e do comportamento no labirinto em cruz elevado

Identificação		Dosagem sérica	Comportamento no labirinto em cruz elevado								
Rato	Grupo do rato	Corticoesterona (ng/ml)	NEA	tA (s)	NEF	tF (s)	NTE	EA %	TA %	R	G
1	C24h	337	7	152	4	63	11	0,64	0,71	15	0
2	C24h	371	5	148	10	108	15	0,33	0,58	16	0
3	C24h	227	11	147	9	98	20	0,55	0,60	27	0
4	C24h	370	4	47	9	155	13	0,31	0,23	20	0
5	C24h	313	6	72	10	114	16	0,38	0,39	20	0
6	C24h	252	7	149	8	127	15	0,47	0,54	16	0
7	C24h	392	7	210	2	42	9	0,78	0,83	7	0
8	C24h	410	7	132	7	89	14	0,50	0,60	19	0
9	C24h	365	5	108	10	134	15	0,33	0,45	19	0
10	C24h	288	7	122	8	106	15	0,47	0,54	25	0
11	E24h	442	1	11	8	210	9	0,11	0,05	21	0
12	E24h	634	8	61	8	172	16	0,50	0,26	16	0
13	E24h	500	6	88	11	153	17	0,35	0,37	16	1
14	E24h	677	7	65	10	172	17	0,41	0,27	23	1
15	E24h	610	9	63	7	144	16	0,56	0,30	15	0
16	E24h	235	3	58	4	99	7	0,43	0,37	8	0
17	E24h	182	6	126	4	134	10	0,60	0,48	14	0
18	E24h	271	6	164	7	145	13	0,46	0,53	13	1
19	E24h	554	9	191	2	81	11	0,82	0,70	8	2
20	E24h	640	1	65	4	180	5	0,20	0,27	12	0

Rato	Grupo do rato	Corticoesterona (ng/ml)	NEA	tA (s)	NEF	tF (s)	NTE	EA %	TA %	R	G
21	C1h	356	8	186	3	82	11	0,73	0,69	9	0
22	C1h	219	7	131	7	113	14	0,50	0,54	21	0
23	C1h	317	5	129	5	123	10	0,50	0,51	18	0
24	C1h	476	5	113	10	138	15	0,33	0,45	28	0
25	C1h	409	13	195	3	48	16	0,81	0,80	16	0
26	C1h	299	7	141	5	82	12	0,58	0,63	17	0
27	C1h	303	6	96	5	137	11	0,55	0,41	18	0
28	C1h	343	2	25	7	213	9	0,22	0,11	21	2
29	C1h	310	7	131	8	120	15	0,47	0,52	19	0
30	C1h	153	4	55	8	175	12	0,33	0,24	23	0
31	E1h	337	7	138	5	129	12	0,58	0,52	17	0
32	E1h	371	1	18	3	266	4	0,25	0,06	13	4
33	E1h	227	11	137	3	128	14	0,79	0,52	18	0
34	E1h	370	2	23	4	229	6	0,33	0,09	16	0
35	E1h	313	5	84	6	144	11	0,45	0,37	13	2
36	E1h	252	1	6	5	247	6	0,17	0,02	25	1
37	E1h	392	5	56	7	194	12	0,42	0,22	19	0
38	E1h	410	4	41	4	194	8	0,50	0,17	13	1
39	E1h	365	6	90	5	144	11	0,55	0,38	16	0
40	E1h	288	2	23	5	195	7	0,29	0,11	19	0

Níveis de corticoesterona e dados obtidos no labirinto em cruz elevado. C24h: ratos expostos a gaiola sem a presença do gato, cujo material foi coletado 24h após da exposição; E24h: ratos expostos ao gato, cujo material foi coletado 24h após a exposição; C1h: ratos expostos a gaiola cujo material foi coletado após 1h da exposição; E1h: ratos expostos ao gato, cujo material foi coletado após 1h da exposição. NEA: número de entradas no braço aberto do labirinto em cruz elevado; tA(s): tempo, em segundos, no braço aberto do labirinto em cruz elevado; NEF: número de entradas no braço fechado do labirinto em cruz elevado; tF(s): tempo, em segundos, no braço fechado labirinto em cruz elevado NTE: neutro (centro); EA: porcentagem de entradas no braço aberto; TA: porcentagem do tempo em braço aberto; G: número de *groomings*; R: número de *rearings*.