RAFAEL OLIVEIRA MARGATHO

**Efeitos de beta-bloqueadores sobre parâmetros comportamentais e
imunes no modelo de coabitação com parceiros doentes**

São Paulo

2016

RAFAEL OLIVEIRA MARGATHO

**Efeitos de beta-bloqueadores sobre parâmetros comportamentais e imunes no
modelo de coabitação com parceiros doentes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo-Neto

Co-orientador:

Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3292
FMVZ

Margatho, Rafael Oliveira
Efeitos de beta-bloqueadores sobre parâmetros comportamentais e imunes no modelo de coabitação com parceiros doentes / Rafael Oliveira Margatho. -- 2016.
145 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo-Neto.

Co-orientador: Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco.

1. Neuroimunomodulação. 2. Estresse psicológico. 3. Sistema nervoso autônomo simpático. 4. Propranolol. 5. ICI-118,551. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito dos beta bloqueadores sobre parâmetros comportamentais e imunes no modelo de coabitação com parceiros doentes", protocolado sob o CEUA nº 8317270114, sob a responsabilidade de **João Palermo Neto e equipe; Rafael Oliveira Margatho; Cristina de Oliveira Massoco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 07/05/2014.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 312 Heterogenics mice (312 females), protocol number CEUA 8317270114, under the responsibility of **João Palermo Neto and team; Rafael Oliveira Margatho; Cristina de Oliveira Massoco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 05/07/2014.

Vigência da Proposta: de 02/2014 a 02/2016

Área: Patologia

Procedência: própria instituição

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 7 semanas

N: 312

Linhagem: Swiss

Peso: 30 g

Resumo: Os trabalhos na área de neuroimunomodulação vêm contribuindo de forma marcante para o entendimento da regulação/modulação das respostas adaptativas dos organismos frente ao estresse ou às doenças. A existência de associações bidirecionais entre o cérebro e o sistema imune reforça a hipótese de que mudanças no sistema nervoso central (SNC) constituem um importante mecanismo através do qual a vivência de experiências estressoras influencia a resposta imune e a susceptibilidade orgânica às doenças. Desta forma, a proposta do presente trabalho é estudar mais profundamente e dentro de uma perspectiva neuroimunológica, o envolvimento do Sistema Nervoso Simpático com as decorrências da convivência com portadores de tumor ascítico de Ehrlich, usando ferramentas farmacológicas bloqueadoras de receptores beta adrenérgicos como o propranolol e o ICI nos animais [companheiros]. Serão utilizados uma quantidade de camundongos conforme descrito a seguir: a) um total de 96 camundongos serão dividido em 4 grupos (n= 8 animais por grupo) para análise da convivência com animal doente (CAD) e convivência com animal saudável (CAS); b) um total de 96 camundongos serão dividido em 4 grupos (n= 8 animais por grupo) para análise da convivência com animal doente (CAD) e convivência com animal saudável (CAS); c) um total de 120 camundongos serão divididos em 4 grupos (n= 10 animais por grupo) para análise da convivência (0 ao 11º dia) com animal doente (CAD) e convivência com animal saudável (CAS).

São Paulo, 16 de fevereiro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RAFAEL OLIVEIRA MARGATHO

Título: **Efeitos de beta-bloqueadores sobre parâmetros comportamentais e imunes no modelo de coabitação com parceiros doentes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais Pedro e Cássia, pelo apoio, pelos incentivos e compreensão, vocês foram fundamentais para que eu chegasse até esta etapa! À minha irmã Lisandra Margatho, excelente pesquisadora e profissional, pelas conversas, conselhos e contribuições!

Ao professor João Palermo Neto, fonte de inspiração, pelo exemplo inigualável de dedicação à vida acadêmica, agradeço pela orientação, pelos incentivos, pela amizade e pelo apoio irrestrito. Obrigado por proporcionar um ambiente de trabalho agradável e pela confiança! Ao longo de toda minha vida acadêmica e também fora dela serei grato pelos ensinamentos e pelos valores transmitidos!

Agradeço à Cris Massoco pela proximidade ao longo deste trabalho, pelo grande apoio e pelas conversas valiosas. Ao Fred pelas discussões científicas, conselhos e amizade. Junto ao grupo de Neuroimuno pude me realizar profissionalmente, trabalhar em um campo da pesquisa que tenho paixão, foi um período de desafios visto a complexidade desta área de estudo, porém, extremamente recompensador e prazeroso. Sou grato a todos que ajudaram não só nos experimentos, como também com ideias, agradeço as contribuições acadêmicas, principalmente dos amigos: Dani Gimenes, Thaísa Sandini, Atílio, Wandy, Nicole e Adriano. Aos funcionários Luciana, Nelsinho, Milena, Mauro e Idalina que foram sempre prestativos e cuidadosos! Não seria possível este trabalho sem o apoio de vocês. Todas as contribuições foram fundamentais e tornaram tudo mais fácil.

Aos queridos amigos que fizeram parte do meu dia-dia: Paula, Edu, Nati, Thiago, Jéssica, Everton, Júlia, Fabi, Gabi Keller, Talitha, Sayuri, Luana, Julieta, Fernando Ponce, Michael, Vera, Lilian, Natô, Milena Lobão, Luciano, Flávio e tantos outros. Aos queridos amigos Vagner, Herculano, Adri e Dennis, a companhia de vocês sempre muito agradável...o que falar dos nossos treinos no CEPE-USP! Aos amigos da USP e os queridos amigos da Unifesp, da vida acadêmica ou não, da querida Ribeirão Preto ou de São Paulo, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho! Agradeço ao apoio financeiro da CAPES e da FAPESP.

À Deus por permitir mais uma conquista em minha vida e pelos novos recomeços; jamais poderei conter a total gratidão por Ti, como certa vez disse o profeta Jeremias “Mas se eu digo: *‘Não o mencionarei nem mais falarei em seu nome, é como se um fogo ardesse em meu coração, um fogo dentro de mim.’* No meio científico, fazemos ciência utilizando o pensamento racional, que é a nossa base para defender ou refutar hipóteses, e que tem sim o seu mérito e grande utilidade; porém, toda sabedoria e autosuficiência humana em algum momento irá se mostrar limitada.

E quando há limitação, algo maior se revela: *‘assim como os céus são mais altos do que a terra, também os meus caminhos são mais altos do que os seus caminhos; e os meus pensamentos, mais altos do que os seus pensamentos’* (Is 55.9) e *‘já que o mundo, com a sua sabedoria, não reconheceu a Deus na sabedoria divina, aprovou a Deus salvar os que crêem pela loucura de sua mensagem’* (1 Co 1.21). Obrigado pela Tua mensagem, preciosa Palavra (meu alimento) e pela fé que um dia veio a mim por ouvi-la! De tudo o que existe e que merece meu louvor, Tu és o principal, Jesus. Como diz em Marcos 2.17 “ *os sãos não necessitam de médico, mas, sim, os que estão doente, eu não vim chamar os justos (..)*”. Se de errar ninguém escapa, se perceber os próprios erros é sinal de sanidade, se saber-se são desenhoca em loucura; a solução para minhas falhas, fraquezas e indagações tenho encontrado em Ti.

“Cada criatura é um rascunho a ser retocado sem cessar”

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

MARGATHO, R. O. **Efeitos de beta-bloqueadores sobre parâmetros comportamentais e imunes no modelo de coabitação com parceiros doentes.** [Behavioral and immune changes induced by beta-blockers in a model of cohabitation with sick partners]. 2016. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A existência de associações bidirecionais entre o Sistema Nervoso e o Sistema Imune reforça a hipótese de que mudanças no Sistema Nervoso Central (SNC) influenciam a resposta imune e a susceptibilidade orgânica às doenças. De fato, em contextos de estresse físico ou psicológico, glicocorticóides liberados pelo córtex das adrenais e catecolaminas produzidas pelo Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) e pela medula das adrenais, modulam a atividade do Sistema Imune. O estresse psicológico associado no ser humano ao ato de cuidar e conviver com companheiros acometidos por diversos tipos de enfermidades crônicas ou transtornos psíquicos têm sido correlacionado ao aparecimento de alterações comportamentais, tais como depressão e ansiedade, assim como alterações imunes e queda da resistência orgânica às infecções. Em nosso laboratório, camundongos que conviveram por 14 dias com coespecíficos portadores de um tumor ascítico de Ehrlich (TAE) apresentaram importantes alterações comportamentais e de imunidade inata, atribuídas tanto à estimulação do sistema catecolaminérgico central e do SNAS. Desta forma, pareceu-nos relevante estudar mais profundamente e dentro de uma perspectiva neuroimune o envolvimento do SNAS com os efeitos desencadeados pela convivência com dois portadores do TAE usando como ferramentas farmacológicas o propranolol (antagonista β -adrenérgico) e o ICI-118,551 (antagonista β_2 -adrenérgico). Os resultados obtidos mostraram que o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos nos animais companheiros do doente: 1) reverteu o comportamento do “tipo-ansioso”, uma vez que os camundongos voltaram a frequentar a zona central do campo aberto e reduziu a velocidade média dos animais no campo aberto, porém, não alterou de forma significativa a distância total percorrida; 2) reverteu a diminuição nos níveis de noradrenalina e aumentou os níveis do metabólito VMA no hipotálamo, mas não alterou o *turnover* hipotalâmico de noradrenalina ou os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no córtex frontal e no bulbo olfatório; 3) não alterou os níveis séricos de corticosterona; 4) não alterou o peso relativo das adrenais; 5) não alterou a contagem de células na medula óssea;

6) modulou a porcentagem de células *natural killer* (NK) sanguíneas e esplênicas e diminuiu a expressão da molécula CD69 em células NK esplênicas, mas não alterou a expressão da molécula CD69 em células NK sanguíneas; 7) não alterou o *burst* basal ou induzido por PMA ou por SAPI e a fagocitose de neutrófilos. O bloqueio dos receptores β 2-adrenérgicos nos animais companheiros do doente alterou apenas a expressão da molécula CD69 em células NK sanguíneas, mas não modificou de forma significativa quaisquer dos parâmetros comportamentais e neuroquímicos analisados. Conclui-se, então, que algumas das alterações imunes e comportamentais desencadeadas pela convivência com coespecíficos portadores de TAE sejam mediadas pelo SNAS via receptores beta-adrenérgicos.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação. Estresse psicológico. Sistema nervoso autônomo simpático. Propranolol. ICI-118,551.

ABSTRACT

MARGATHO, R. O. **Behavioral and immune changes induced by beta-blockers in a model of cohabitation with sick partners.** [Efeitos de beta-bloqueadores sobre parâmetros comportamentais e imunes no modelo de coabitação com parceiros doentes]. 2016. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The existence of bi-directional interactions between the Nervous System and the Immune System reinforces the hypothesis that changes in Central Nervous System (CNS) activity modify not only the immune response but also the susceptibility to diseases. Indeed, in presence of physical or psychological stress, glucocorticoids released by the cortex of the adrenal gland and catecholamines released by the Autonomic Sympathetic Nervous System (ASNS) activation and the adrenal glands were reported to modulate the activity of the Immune System. Psychological stress was described in human caregivers of sick partners, especially when they present chronic diseases and/or psychological disorders, such as depression and anxiety; immune disorders and decreased host resistance to infections were also reported in caregivers. In our laboratory, Swiss mice that lived for 14 days with Ehrlich ascitic tumor bearing conspecifics showed interesting behavioral and innate immune changes that were attributed to catecholaminergic activation within the Central Nervous System or to ASNS activation. Thus, it seemed relevant to study more deeply and under a neuroimmune perspective the involvement of the ASNS in the effects triggered by cohabitation with two sick partners using as pharmacological tools: propranolol (β -adrenergic antagonist) and ICI-118.551 (β 2-adrenergic antagonist). Our results showed that β -adrenergic receptors blockade: 1) reversed the “anxiety-like” behavior induced by cohabitation, once the animals returned to visit the central area of the open field arena and abrogated the effects of the housing condition on the average speed of locomotion measured in those animals; 2) reversed the decrease in norepinephrine levels and increased VMA levels in the hypothalamus; 3) modulated the percentage of natural killer (NK) cells in both, spleen and blood; also, decreased the expression of CD69 molecule on splenic NK cells. Further analysis showed no changes in: 4) the total distance traveled in the open field; 5) the hypothalamic norepinephrine turnover and the levels of monoamines and their metabolites in the frontal cortex and olfactory bulb; 6) the serum corticosterone levels; 7) the relative adrenal glands; 8) cell number in the bone marrow; 9) the basal oxidative burst or those induced by PMA or SAPI in neutrophils and in neutrophils

phagocytosis. The blockade of β 2-adrenergic receptors by ICI-118,551 changed only the CD69 expression in NK blood cells, being unable to modify any of the behavioral and neurochemical parameters analyzed. Therefore, it seems that only some of the immune and behavioral changes triggered by cohabitation with two sick partners present a relevant participation of SNAS through beta-adrenergic receptors.

Keywords: Neuroimmunomodulation. Psychological stress. Autonomic sympathetic nervous system. Propranolol. ICI-118,551.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação do terminal pré e pós-sináptico de uma fibra noradrenérgica (A) e receptores inibitórios e estimulatórios para diferentes ligantes na fibra noradrenérgica (B) 31
- Figura 2 - Representação de núcleos noradrenérgicos e suas projeções no cérebro de roedores. A linha sólida vermelha e a linha cinza tracejada indicam projeções do locus coeruleus (LC) e a linha fina escura as projeções a partir de outros núcleos noradrenérgicos (1,2,3 e 4) 32
- Figura 3 - Representação dos receptores pré e pós-ganglionares do sistema nervoso simpático e subtipos de receptores adrenérgicos em órgãos efetores (A) e a cascata de sinalização intracelular antes e após a ativação do receptor β adrenérgico (B e C)..... 37
- Figura 4 - Esquema ilustrativo da interação entre o sistema nervoso, endócrino e imune..... 43
- Figura 5 - Esquema ilustrativo do grupo experimental utilizado. O animal companheiro dos doentes (CAD) é o objeto de estudo deste trabalho 56
- Figura 6 - Esquema ilustrativo da formação dos grupos experimentais 57
- Figura 7 - Esquema de seleção das células NK (CD3-CD49b+NKp46+) à partir do gate de linfócitos..... 61
- Figura 8 - Representação da trajetória dos animais dos diferentes grupos na arena do campo aberto que foram submetidos ou não ao tratamento com propranolol (20mg/kg) e conviveram ou não com coespecíficos doentes 67

Figura 9 -	Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre parâmetros comportamentais (A) Distância percorrida, (B) Velocidade média e (C) Tempo gasto na zona central do campo aberto em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	68
Figura 10 -	Efeitos do ICI-118,551 (15 mg/kg) sobre parâmetros comportamentais (A) Distância percorrida, (B) Velocidade média e (C) Tempo gasto na zona central do campo aberto em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	70
Figura 11 -	Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina (A), VMA (B) e sobre o turnover de noradrenalina (C) no hipotálamo em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	73
Figura 12 -	Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de dopamina (A), assim como do seu metabólito DOPAC (B) e o turnover de DA (C) no bulbo olfatório de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	75
Figura 13 -	Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de serotonina (A), assim como do seu metabólito HIAA (B) e o turnover de 5-HT (C) no bulbo olfatório em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	76
Figura 14 -	Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina (A) assim como do seu metabólito VMA (B) no bulbo olfatório em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	77
Figura 15 -	Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de dopamina (A), DOPAC (B) e HVA (C) e sobre o turnover de dopamina	

(DOPAC/DA em D e HVA/DA em E) no córtex frontal em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	78
Figura 16 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de serotonina/5-HT (A) e sobre o turnover de serotonina (B) no córtex frontal em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	79
Figura 17 - Efeitos do ICI-118,551 (15 mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina no hipotálamo em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	81
Figura 18 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina (A), assim como do seu metabólito DOPAC (B) e o turnover de DA (C) no bulbo olfatório de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	82
Figura 19 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de serotonina (A), assim como do seu metabólito HIAA (B) e o turnover de 5-HT (C) no bulbo olfatório em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	84
Figura 20 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina no bulbo olfatório em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	85
Figura 21 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina (A), DOPAC (B) e HVA (C) e sobre o turnover de dopamina (DOPAC/DA em D e HVA/DA em E) no córtex frontal em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	87
Figura 22 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de serotonina-5-HT (A), HIAA (B) e sobre o turnover de serotonina (C) no córtex	

frontal em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	88
Figura 23 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina (A), DOPAC (B) e HVA (C) e sobre o turnover de dopamina (DOPAC/DA em D e HVA/DA em E) no corpo estriado em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	90
Figura 24 - Efeitos do propranolol (20 mg/kg) sobre os níveis de corticosterona sérica de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	92
Figura 25 - Efeitos do propranolol (20 mg/kg) sobre o peso relativo das adrenais (em gramas) de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	92
Figura 26 - Efeitos do propranolol (20 mg/kg) sobre a celularidade da medula óssea de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	93
Figura 27 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre a porcentagem de células natural killer (NK) no sangue e baço de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	95
Figura 28 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre o perfil de ativação de células natural killer (NK) no sangue (A) e baço (B) de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	95
Figura 29 - Efeitos do ICI-118,551 (15 mg/kg) sobre a porcentagem de células natural killer (NK) no sangue e baço de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	97

Figura 30 - Efeitos do fármaco ICI-118,551 (15mg/kg) sobre o perfil de ativação de células natural killer (NK) no sangue (A) e baço (B) de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	98
Figura 31 - Burst oxidativo basal dos neutrófilos (DCFH).....	100
Figura 32 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre parâmetros de burst oxidativo basal de neutrófilos (DCFH) a partir de amostras sanguíneas de animais que conviveram em relação aos animais que não conviveram com coespecíficos doentes	100
Figura 33 - Burst Oxidativo dos neutrófilos induzido por PMA.....	101
Figura 34 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre o burst oxidativo de neutrófilos induzido por PMA a partir de amostras sanguíneas de animais que conviveram em relação aos animais que não conviveram com coespecíficos doentes.....	101
Figura 35 - Burst Oxidativo dos neutrófilos induzido por SAPI	102
Figura 36 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre o burst oxidativo induzido por SAPI a partir de amostras sanguíneas de animais que conviveram em relação aos animais que não conviveram com coespecíficos doentes	102
Figura 37 - Porcentagem e Intensidade de Fagocitose de neutrófilos	103
Figura 38 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre a porcentagem (A) e a intensidade de fagocitose (B) de neutrófilos a partir de amostras sanguíneas de animais que conviveram em relação aos animais que não conviveram com coespecíficos doentes	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre a atividade geral em campo aberto em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	66
Tabela 2 -	Efeitos do ICI-118,551 (15 mg/kg) sobre a atividade geral em campo aberto em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	70
Tabela 3 -	Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina, de ácido vanilmandélico (VMA) e sobre o turnover de noradrenalina no hipotálamo em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	72
Tabela 4 -	Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina, de ácido vanilmandélico (VMA) e sobre o turnover de noradrenalina no hipotálamo em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	74
Tabela 5 -	Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de dopamina e de seus metabólitos DOPAC e HVA e de serotonina e seu metabólito HIAA, assim como o turnover de DA e 5-HT no córtex frontal de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	78
Tabela 6 -	Efeitos do ICI-118,551 (15 mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina no hipotálamo em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	80
Tabela 7 -	Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina, noradrenalina e serotonina, assim como o metabólito da dopamina (DOPAC) e da serotonina (HIAA) e o turnover de 5-HT e DA no	

bulbo olfatório de animais que conviveram ou não com coespecífico	82
Tabela 8 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina e de seus metabólitos DOPAC e HVA e de serotonina e seu metabólito HIAA, assim como o turnover de DA e 5-HT no córtex frontal de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	85
Tabela 9 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina e de seus metabólitos DOPAC e HVA no corpo estriado de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	89
Tabela 10 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre a porcentagem e o perfil de ativação de células natural killer (NK) no sangue e baço de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	94
Tabela 11 - Efeitos do fármaco ICI-118,551 (15mg/kg) sobre a porcentagem e o perfil de ativação de células natural killer (NK) no sangue e baço de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes	97
Tabela 12 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre parâmetros de burst oxidativo e de fagocitose de neutrófilos sanguíneos em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

BHE- barreira hematoencefálica

CAD - companheiro dos animais doentes

CAD+P- companheiro dos animais doentes e tratado com propranolol

CAD+I- companheiro dos animais doentes e tratado com ICI-188,551

CAS - companheiro dos animais saudáveis

CAS+P - companheiro dos animais saudáveis e tratado com propranolol

CAS+I - companheiro dos animais saudáveis e tratado com ICI-118,551

CRF- Fator liberador de corticotrofina

CRH- Hormônio liberador de corticotrofina

DA- Dopamina

DCFH- DA- 2'7' diacetato de diclorofluoresceína

DHBA- 3,4 diidroxibenzilamina

DOPAC- Ácido 4,4-diidroxifenilacético

HPA- Eixo Hipotálamo- Hipófise- Adrenal

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HVA- Ácido homovanílico

IFN- Interferon

Ig- Imunoglobulina

IL- Interleucina

LPS- Lipopolissacarídeo

NK- Célula *natural killer*

NOR- Noradrenalina

OVA- Ovalbumina

PBS- *Phosphate Buffered Saline*

PI- Iodeto de Propídeo

PMA- Miristato acetato de forbol

SAPI- *Staphylococcus aureus*

SI- Sistema Imune

SN- Sistema Nervoso

SNC- Sistema Nervoso Central

SNAS- Sistema Nervoso Autônomo Simpático

SNAP- Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático

SNC- Sistema Nervoso Central

TAE- Tumor ascítico de Ehrlich

Th1- Linfócitos T *helper* 1

Th2- Linfócitos T *helper* 2

TNF- Fator de Necrose Tumoral

VMA- Ácido vanilmandélico

VNO- Órgão Vomeronasal

β_2 -AR- Receptores beta2- adrenérgicos

5HIAA- Ácido 5-hidroindol, 3-acético

5-HT- Serotonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1	NEUROIMUNOMODULAÇÃO.....	27
2.2	DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO SIMPÁTICO (SNAS) AO SISTEMA IMUNE - RECEPTORES ADRENÉRGICOS EM CÉLULAS IMUNES.....	32
2.3	DAS CÉLULAS DA IMUNES AO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO SIMPÁTICO.....	39
2.4	CONVIVÊNCIA COM DOENTES	44
3	OBJETIVOS.....	52
3.1	OBJETIVO GERAL.....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	ANIMAIS.....	53
4.2	FÁRMACOS, REAGENTES, CORANTES E SUBSTÂNCIAS BIOLÓGICAS	54
4.3	FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	55
4.4	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich.....	57
4.5	COLETA DE SANGUE	58
4.6	COLETA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.....	58
4.7	PESO DA GLÂNDULA ADRENAL	58
4.8	CITÔMETRO DE FLUXO	59
4.9	OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS	59
4.10	AVALIAÇÃO DE CÉLULAS NK SANGUÍNEAS E ESPLÊNICAS.....	60
4.11	DOSAGENS NEUROQUÍMICAS.....	61
4.12	DOSAGEM DE CORTICOSTERONA SÉRICA	62
4.13	ANÁLISE COMPORTAMENTAL	62
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	65
5.1	EFEITOS DO PROPRANOLOL SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	65

5.1.1	Avaliação da atividade geral no campo aberto de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes	65
5.1.1.2	Resultados.....	66
5.2	EFEITOS DO ICI-118,551 SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	69
5.2.1	Avaliação da atividade geral no campo aberto de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes.....	69
5.2.1.1	Resultados.....	69
5.3	EFEITOS DO PROPRANOLOL SOBRE OS NÍVEIS DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS EM ESTRUTURAS CEREBRAIS.....	71
5.3.1	Dosagem de monoaminas e de seus metabólitos no hipotálamo, bulbo olfatório, córtex frontal no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes	71
5.3.1.1	Resultados.....	72
5.3.2	Efeitos do propranolol sobre os níveis de noradrenalina e do metabólito ácido vanilmandélico (VMA) no hipotálamo de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes.....	72
5.3.3	Efeitos do propranolol sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no bulbo olfatório de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes.....	74
5.3.4	Efeitos do propranolol sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no córtex frontal de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes	77
5.4	EFEITOS DO ICI-118,551 SOBRE OS NÍVEIS DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS EM ESTRUTURAS CEREBRAIS	79
5.4.1	Dosagem de monoaminas e de seus metabólitos no hipotálamo, bulbo olfatório, córtex frontal e estriado no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes	79
5.4.1.1	Resultados.....	80

5.4.2	Efeitos do ICI-118,551 sobre os níveis de noradrenalina no hipotálamo de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes	80
5.4.3	Efeitos do ICI-118,551 sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no bulbo olfatório de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes.....	81
5.4.4	Efeitos do ICI-118,551 sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no córtex frontal de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes	85
5.4.5	Efeitos do ICI-118,551 sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no estriado de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes	88
6	EFEITOS DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES β-ADRENÉRGICOS SOBRE PARÂMETROS IMUNES	91
6.1	EXPERIMENTO 1 - EFEITOS DO PROPRANOLOL SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA, PESO RELATIVO DAS ADRENAIS E CELULARIDADE DA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS NO 12º DIA DE CONVIVÊNCIA COM COESPECÍFICOS SAUDÁVEIS OU DOENTES	91
6.1.1	Resultados	91
6.2	EXPERIMENTO 2 - EFEITOS DO PROPRANOLOL SOBRE A POPULAÇÃO DE CÉLULAS NK NO SANGUE E NO BAÇO DE ANIMAIS NO 12º DIA DE CONVIVÊNCIA COM COESPECÍFICOS SAUDÁVEIS OU DOENTES	93
6.2.1	Resultados	94
6.3	EXPERIMENTO 3 - EFEITOS DO ICI-118,551 SOBRE A POPULAÇÃO DE CÉLULAS NK NO SANGUE E NO BAÇO DE ANIMAIS NO 12º DIA DE CONVIVÊNCIA COM COESPECÍFICOS SAUDÁVEIS OU DOENTES:	95
6.3.1	Resultados	96
6.4	EXPERIMENTO 4 – EFEITOS DO PROPRANOLOL SOBRE O BURST OXIDATIVO E SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE	

	NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS NO 12º DIA DE CONVIVÊNCIA COM COESPECÍFICOS SAUDÁVEIS OU DOENTES	98
6.4.1	Resultados	99
7	DISCUSSÃO	104
8	CONCLUSÃO	124
	REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

A atividade do Sistema Nervoso Central (SNC) afeta aquela do Sistema Imune e esta por sua vez, por meio de produtos originados em células imunes como citocinas, modificam a atividade nervosa cerebral e o comportamento. Diante de estressores físicos e psicológicos organismos respondem com a ativação do eixo HPA e do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS). A estimulação do SNAS leva à liberação de noradrenalina (NOR) nos terminais nervosos simpáticos e à secreção de adrenalina pela medula da adrenal (BELLINGER, 2014). Sabe-se que as fibras simpáticas terminam em íntimo contato com os órgãos linfoides como acontece, por exemplo, no baço que apresenta intensa inervação simpática (MADDEN, 1995). Aparentemente, todos os leucócitos expressam receptores β -adrenérgicos, com exceção apenas dos clones de linfócitos auxiliares (T CD4+) do tipo Th2 (KOHM, 1999; MADDEN, 2003) e, dessa forma, catecolaminas liberadas pelo SNAS regulam a atividade do Sistema Imune.

Em um contexto de estresse psicológico, o ato de conviver com pessoas portadoras de um tumor ou de patologias crônicas debilitantes tem sido estudado por vários pesquisadores, os quais têm relatado evidências que mostram ser algumas condições psicológicas experimentadas por “*caregivers*” associadas com variações de comportamento e de imunidade decorrentes do estresse. Neste contexto, sabe-se que o estresse gerado pelo ato de acompanhar pacientes com enfermidades crônicas tem sido associado em humanos à alterações da imunidade inata e humoral, queda da resistência orgânica a infecções e aparecimento de sintomas psiquiátricos, como ansiedade e depressão (VELLONE, 2008; ALPI et al., 2008; JIWA et al., 2010; CHEN, 2013; RICHARDSON, 2013; MOSHER, 2015a,b,c no prelo^{1,2,3}).

¹ MOSHER, C. E.; ADAMS, R. N.; HELFT, P. R.; O'NEIL, B. H.; SHAHDA, S.; RATTRAY, N. A.; CHAMPION, V. L. Family caregiving challenges in advanced colorectal cancer: patient and caregiver perspectives. **Support Care Cancer**, 2015. (no prelo).

² MOSHER, C. E.; OTT, M. A.; HANNA, N.; JALAL, S. I.; CHAMPION, V. L. Coping with physical and psychological symptoms: a qualitative study of advanced lung cancer patients and their family caregivers. **Support Care Cancer**, 2015b. (no prelo).

³ MOSHER, C. E.; GIVEN, B. A.; OSTROFF, J. S. Barriers to mental health service use among distressed family caregivers of lung cancer patients. **European Journal of Cancer Care**, 2015c. (no prelo).

Neste sentido, e guardado os devidos cuidados com as extrapolações, é difícil inferir “empatia” em camundongos, pois não existe um modelo experimental especificamente desenvolvido para analisar, em animais de laboratório, as eventuais alterações neuroquímicas e imunes que possam ocorrer em animais que convivem com coespecíficos doentes. Em nosso laboratório, foi demonstrado que camundongas que coabitaram com outras portadoras de um tumor ascítico de Ehrlich (TAE) apresentaram alterações neuroimunes bastante evidentes, fato que foi atribuído ao odor liberado pela companheira doente (ALVES; PALERMO-NETO, 2012). Especificamente, mostramos entre outros fatos, que camundongas que conviveram por 14 dias com coespecíficas portadoras de um TAE apresentavam diminuição nos níveis e aumento no *turnover* de noradrenalina no hipotálamo e ausência de alterações nos níveis de corticosterona sérica. Mostrou-se, mais recentemente, a ocorrência de um aumento nos níveis de catecolaminas circulantes em companheiras de doente; mostrou-se também que alterações imunes desencadeadas pela convivência com dois camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich intensificava o decréscimo no burst oxidativo de neutrófilos quando comparado ao de animais que conviveram com apenas um portador do tumor (ALVES; PALERMO-NETO, 2014). Neste experimento, a convivência feita com dois camundongos: um doente e outro saudável, reduziu e até mesmo reverteu os efeitos observados em neutrófilos (ALVES; PALERMO-NETO, 2014).

Além disso, mostrou-se que a convivência de camundongos machos com um parceiro doente produziu mudanças no perfil de citocinas Th1/Th2 em direção ao perfil Th2, fato comumente relatado em situações de estresse psicológico (MACHADO; PALERMO-NETO, 2013). Reforçando esta ideia Hamasato e Palermo-Neto (2014) mostraram que camundongos que conviveram por 14 dias com parceiros doentes apresentaram um aumento da resposta alérgica pulmonar (perfil Th2), em um modelo experimental que procura mimetizar a patogenia da asma alérgica. Por tudo quanto exposto, o propósito deste estudo é avaliar o envolvimento do SNAS com os efeitos neuroimunes desencadeados pela convivência com dois animais inoculados com TAE, empregando-se bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos como ferramenta farmacológica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

A existência de interações entre os Sistemas Neuroendócrino e Imune está bem estabelecida na literatura, assim como a sua natureza bidirecional. O entendimento destes grandes sistemas orgânicos, feita anteriormente de maneira isolada e fragmentada, vem cedendo espaço para um estudo mais integrado das complexas relações existentes entre eles. Há amplas evidências na literatura de que o Sistema Nervoso (SN) através de hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos é capaz de influenciar processos imunes e estes, por sua vez, podem afetar o SN por meio da produção de citocinas. A existência de receptores comuns para neurotransmissores, citocinas, hormônios e neuropeptídeos em células imunes e nervosas e a presença de neurotransmissores e hormônios em órgãos linfoides reforça esta percepção (ALVES; PALERMO-NETO, 2007). Tais interações recíprocas, envolvidas na regulação/modulação de várias funções orgânicas manifestam-se por meio de um equilíbrio dinâmico constituindo o ramo de pesquisa conhecido como **Neuroimunomodulação** (NIM) ou **Psiconeuroimunologia**.

As interações entre o comportamento, as funções neuroendócrinas e os processos imunes são relatadas desde a antiguidade quando Galeno, por volta do ano 200 a.C., em seus manuscritos abordou o fato de serem as mulheres melancólicas mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores de mama. No entanto, somente no início do século XX foram obtidos os primeiros relatos científicos da modulação exercida pelo SN sobre o SI, em que Loeper e Crouzon observaram que a injeção subcutânea de adrenalina (1mg) duplicava ou até triplicava os níveis de leucócitos circulantes em humanos. Evidências que apontam para esta mesma direção foram descritas por Ishigami (1919), ao relatar que pacientes com tuberculose crônica apresentavam um decréscimo da capacidade fagocítica de leucócitos, quando vivenciavam períodos de estresse intenso.

Um trabalho que se tornou um marco no estudo da Neuroimunomodulação, foi o proposto pelo endocrinologista canadense Hans Selye, em 1936, no qual ele descreve o desenvolvimento de uma síndrome decorrente da exposição de um

organismo a um conjunto muito diversificado de estímulos danosos tais como exposição ao frio, injúria tecidual, intoxicação, excesso de exercícios, entre outros. Os efeitos observados por ele foram perda de peso, hipertrofia das glândulas adrenais, presença de úlceras gástricas e, curiosamente à época, atrofia de órgãos linfoides (incluindo o timo, o baço e linfonodos), entre outras alterações. Como tais efeitos gerados nos diferentes órgãos eram não específicos, ou seja, eram independentes do estímulo nocivo empregado, Selye concluiu que eles representavam uma resposta orgânica estereotipada à injúria, e denominou-a “Síndrome de Adaptação Geral”. Deste trabalho surgiu a percepção de que os organismos são capazes de gerar uma resposta adaptativa à injúria ou a estímulos danosos na tentativa de se acomodarem a esta nova situação (SELYE, 1936). Posteriormente, estes diversos estímulos passaram a ser chamados, genericamente, de estressores. Na mesma década, o fisiologista Walter Cannon definiu a resposta ao estresse como uma situação do tipo “luta ou fuga”, associando-a à secreção e aos efeitos de catecolaminas (ELENKOV et al., 2000).

A partir dos trabalhos de Hans Selye, surgia um dos ramos principais de estudo da Neuroimunomodulação, isto é, o estudo dos efeitos do SNC sobre a resposta imune, assim como dos fatores que influenciam esta atividade tais como estímulos ambientais, fármacos, estressores físicos ou psicológicos, entre outros. Existem muitas maneiras de indução de estímulos em modelos experimentais, usando-se para tal protocolos baseados em estressores físicos e psicológicos como, por exemplo, a aplicação de choques escapáveis e/ou inescapáveis nas patas (PALERMO-NETO et al., 2003), confinamento (SAINT-MEZARD et al., 2003), convívio com um parceiro agressivo (VEGAS et al., 2004), entre outros. Além desta classificação que leva em conta a natureza do estímulo, os agentes estressores também podem ser classificados considerando-se a duração do evento estressor, isto é, em agudos ou crônicos.

Destaque-se aqui o trabalho de Bartrop et al. (1977); estes autores demonstraram em um modelo de estresse psicológico, que indivíduos em luto por perda de um companheiro apresentavam diminuição da atividade de linfócitos T. Uma característica notável é que tais indivíduos aparentemente não apresentavam níveis de glicocorticóides circulantes diferentes daquele das pessoas que não passavam por esta situação (controles).

A fim de focar de modo direto a importância de algumas áreas do SNC no controle do sistema imune, duas técnicas principais foram empregadas: estimulação direta de áreas específicas do SNC pela implantação de eletrodos ou lesão experimental de certos núcleos do SNC seguida do estudo da repercussão desta lesão sobre parâmetros de respostas imunes induzidas nesses animais.

Sabe-se que a interação do Sistema Nervoso com o Sistema Imune pode ocorrer por pelo menos três vias principais. Uma dessas vias se faz por meio da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), em que várias situações estressoras podem induzir a liberação do CRH (hormônio liberador de corticotrofina) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo, levando à expressão e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior na corrente sanguínea. Em seguida, o ACTH induz a liberação de glicocorticóides pelo córtex das glândulas adrenais. Já foi demonstrado que os hormônios liberados pelo eixo HPA são capazes de estimular ou suprimir a resposta imune (ELENKOV, 2000). De forma geral, glicocorticóides, andrógenos, estrógenos, progesterona, e endorfinas deprimem a resposta imune *in vivo*, enquanto que hormônio do crescimento, prolactina, tiroxina e insulina possuem efeitos estimulatórios (BESEDOVSKY, 1977). No entanto, cabe ressaltar que estes efeitos dependem fundamentalmente do tipo e intensidade do estresse, da duração da aplicação de estressores e, entre outros, do intervalo de tempo entre o evento estressor e a análise da resposta.

A segunda via de interação se faz pela ativação do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático (SNAP). Apesar de controverso, alguns estudos já demonstraram que a estimulação do SNAP tem potencial de modular a liberação de citocinas (BELLINGER, 2014). O neurotransmissor tanto das fibras pré e pós-ganglionares é a acetilcolina e a sua ligação pode ocorrer em receptores nicotínicos ou muscarínicos (GHIA et al., 2006). Especificamente, estudos têm mostrado que a estimulação elétrica ou farmacológica do nervo vago é capaz de modular respostas pró-inflamatórias, uma vez que células imunes possuem receptores nicotínicos como, por exemplo, o $\alpha 7nAChR$ (BOROVIKOVA et al., 2000; PAVLOV; TRACEY, 2005; CRUZ; MASSOCO, 2015).

Por fim, a terceira via decorre da ativação do SNAS com a subsequente liberação de catecolaminas, principalmente noradrenalina e adrenalina, além de neuropeptídeo γ , encefalinas/endorfinas, adenosina e adenosina 5'-trifosfato que afetam diretamente o funcionamento de componentes do sistema imune (ELENKOV,

2000; BELLINGER, 2014). Em vários tecidos, os terminais nervosos noradrenérgicos possuem receptores sensíveis às catecolaminas e a vários ligantes endógenos e/ou exógenos, conforme ilustra a figura 1.

Posterior ao trabalho pioneiro proposto por Hans Selye, um outro ramo de estudo na Neuroimunomodulação começou a surgir, em especial, a partir das décadas de 70 e 80. Anteriormente, a grande maioria dos trabalhos abordavam os efeitos modulatórios do SN sobre o SI e pouco se questionava sobre a vertente oposta. No entanto, ficou evidente nesta época que o sistema imune também atua sobre o SN; coube a Besedovsky e colaboradores mostrar a ocorrência de uma ativação do eixo HPA por citocinas (IL-1, TNF- α e IL-6) produzidas durante uma resposta imune, resultando no aumento dos níveis de corticosteróides plasmáticos. Além disso, neste mesmo período, surgiram os primeiros estudos mostrando que os órgãos linfoides recebiam inervação simpática, indicando esta íntima ligação anatômica que os processos imunes poderiam ser modulados por estímulos provenientes do SNAS.

Pelo exposto, percebe-se que a compreensão dos mecanismos implicados na regulação dos sistemas imune e nervoso constituiu na atualidade, uma das áreas de grande relevância na pesquisa biomédica. Cabe ressaltar que, ao invés de buscar entender esses processos de uma maneira isolada e fragmentada, os estudos na área da Neuroimunomodulação têm sido feitos buscando uma interpretação mais integrada. De fato, dadas as complexas relações bidirecionais existentes entre estes sistemas, veio à tona a percepção de que eles sejam partes de uma rede de controle muito mais ampla e refinada.

Figura 1 - Representação do terminal pré e pós-sináptico de uma fibra noradrenérgica (A) e receptores inibitórios e estimulatórios para diferentes ligantes na fibra noradrenérgica (B)

A)

B)

Fonte: (MARGATHO, R. O, 2015)

2.2 DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO SIMPÁTICO (SNAS) AO SISTEMA IMUNE - RECEPTORES ADRENÉRGICOS EM CÉLULAS IMUNES

O cérebro está em constante comunicação com o restante do corpo regulando processos vitais a fim de manter um ambiente interno estável, a homeostase. Para este fim, há regiões cerebrais que são ativadas após a percepção de um agente estressor; dentre as quais: formação reticular, bulbo olfatório, hipotálamo, amígdala e córtex cerebral, o chamado sistema límbico. A ativação do SNAS envolve neurônios que sintetizam NOR no SNC, situados nas regiões bulbar e pontínea, sendo que o grupo neuronal mais importante situa-se na região do *locus coeruleus* (LE MOAL, 1991; CHARMANDARI, 2005), conforme ilustra a figura 2. Essencialmente, os corpos celulares noradrenérgicos originam-se nas áreas A1-A7 do tronco cerebral projetando seus axônios para o prosencéfalo, cerebelo e medula espinhal. Destes, o *locus coeruleus*, também conhecido como área A6, é a região mais delimitada e possui a mais compacta massa de corpos celulares noradrenérgicos do cérebro.

Figura 2 - Representação de núcleos noradrenérgicos e suas projeções no cérebro de roedores. A linha sólida vermelha e a linha cinza tracejada indicam projeções do locus coeruleus (LC) e a linha fina escura as projeções a partir de outros núcleos noradrenérgicos (1,2,3 e 4)

Fonte: (MARGATHO, R. O., 2015)

No tronco encefálico situa-se a formação reticular, que possui centros neuronais que gerenciam diversas funções, como o controle das frequências cardíaca e respiratória, digestão, salivação, transpiração e micção. Uma vez que esta estrutura exerce um papel importante na regulação do SNAS, suas conexões constituem o chamado sistema ativador reticular, responsável por manter o organismo alerta e desperto. Neste sistema, uma série de longas vias nervosas modulam estímulos sensoriais e conduzem informações para o córtex cerebral (MORUZZI; MAGOUN, 1949).

O hipotálamo, por sua vez, possui conglomerados de neurônios que executam funções específicas, sendo ele considerado o principal centro coordenador do sistema límbico. Possui conexões com a hipófise e com o SNAS, respondendo pela manutenção de funções essenciais à vida; dentre elas: controle da temperatura corporal, do comportamento alimentar, de equilíbrio hídrico, da regulação hormonal e do ciclo de sono-vigília (FLAMENT-DURANT, 1980; HILLER-STURMHOFEL, 1998; BUIJS, 2001; STANLEY, 2005; MONTAGNA, 2006). Além disso, está envolvido com respostas como as de raiva e medo (LIN, 2011). Em situações geradoras de estresse pode ocorrer um aumento súbito de NOR no hipotálamo, principalmente em regiões como núcleo paraventricular e região posterolateral do hipotálamo (KVETNANSKÝ, 1995).

Em contextos de estresse, as emoções representam respostas psicológicas à estímulos destinadas, entre outros, a nos afastar do perigo. Talvez em humanos o sistema visual seja o órgão do sentido mais valorizado; porém, o olfato, principalmente nos roedores é fundamental para a sobrevivência, por ser ele capaz de gerar o estado de alerta. Assim, o órgão vomeronasal contém células receptoras de odor que propagam impulsos elétricos ao bulbo olfatório, que é parte do sistema límbico, o qual sinaliza por meio de sinapses a informação para outras regiões cerebrais. Dessa forma, sinais oriundos do bulbo olfatório passam pelo trato olfatório para chegar à região do córtex olfatório. Além disso, neurônios noradrenérgicos, a partir do *locus coeruleus* e outros, colinérgicos e serotoninérgicos, a partir dos núcleos medial e dorsal da rafe, possuem eferências que se projetam até o bulbo olfatório (SHIPLEY, 1985; ZABORSZKY et al., 1986).

Eventos aversivos como odores que indiquem perigo podem gerar estímulos que atingem o córtex olfatório, o qual emite sinais para a amígdala que, por sua vez, gera uma resposta de medo e de luta e fuga (NADER, 2000). Dessa forma, a

amígdala consiste em uma estrutura que “experimenta” diversos estímulos e sinaliza para outras áreas para que produzam a reação emocional apropriada, tais como os núcleos da base, relacionados ao movimento e ao controle motor. Neste sentido, vale ressaltar que a partir da substância negra, neurônios se projetam ao corpo estriado (LENT, 2005). Neste processo, há participação da dopamina que, está bem estabelecida na literatura, atua como mediador envolvido na modulação de funções relacionadas à recompensa e regulação da atividade motora e dos processos cognitivos (PALERMO-NETO, 1997; STUCHLIK et al., 2007). Dessa forma, a fonte de inervação dopaminérgica no encéfalo de mamíferos encontra-se situada principalmente na região mesencefálica, com os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos agrupando-se principalmente na substância negra e área tegmentar ventral.

Também durante as respostas emocionais e sob a influência do hipotálamo, áreas ventromediais da amígdala governam a atenção conferida a certos estímulos, influenciando o conteúdo evocado da memória e ajudando a elaborar planos mentais concebidos como resposta a um estímulo desencadeador. Neste sentido, o hipotálamo, centro coordenador das funções autônomas e endócrinas, possui diferentes papéis no comportamento, nas emoções e instintos. Essa rede autônoma central projeta-se diretamente na medula espinhal, mais especificamente em neurônios pré-ganglionares autônomos (KANDEL et al., 2000). Estas vias que influenciam a atividade adrenérgica central e periférica são significativas para a modulação das respostas imunes aos estressores. Como exemplo disso, lesões bilaterais ou microinjeções de glutamato na área pré-optica medial (MPO) do hipotálamo suprimiram a ativação do SNAS no baço (KATAFUCHI et al., 1993). Sabe-se que lesões na MPO aumentam a atividade de macrófagos esplênicos e o número de esplenócitos (CROSS et al., 1982), mas reduzem a atividade das células *natural killer* esplênicas (KATAFUCHI et al., 1993). Por outro lado, a estimulação elétrica das regiões laterais e posterior do hipotálamo suprimem (KATAFUCHI et al., 1993) ou estimulam (WENNER, 1996) a atividade de células NK esplênicas. Outros trabalhos mostraram o envolvimento do *locus coeruleus* na circuitaria do SNC que modula a supressão da resposta imune no baço durante a resposta ao estresse (BELLINGER et al., 2014). Dessa forma, o bloqueio, o estímulo ou lesões de regiões límbicas cerebrais ou de núcleos autonômicos cerebrais específicos também alteram parâmetros imunes (FELTEN, 1991).

Parece-nos interessante comentar que, apesar do termo *autônomo*, o SNAS depende do controle exercido por regiões supra medulares e não funciona através de comandos eferentes “cegos”; ao contrário, tem suas operações moduladas a partir de informações aferentes. Além disso, segundo Del Rey e Besedovsky (DEL REY; BESEDOVSKY, 2008), não se pode esquecer que as atividades do eixo HPA e do SNAS estão profundamente interconectadas. Assim, não é possível compreender as ações destes sistemas quando tomados isoladamente do resto do corpo.

Sabe-se que o SNAS atua durante os estados de alerta e exerce um papel chave nas funções cardiovasculares e metabólicas, facilitando a perda de energia; é particularmente ativo durante exercícios, frio e contextos de dor e participa de processos imunes, principalmente em resposta ao estresse (ELENKOV, 2000; ESLER, 2003; CROCKETT, 2011; BELLINGER, 2014). O principal mensageiro químico do SNAS que atua sobre diferentes receptores adrenérgicos, a noradrenalina (NOR), foi originalmente caracterizada pela sua contribuição relevante na resposta orgânica de “luta e fuga”. A inativação da NOR ocorre por recaptação pré-sináptica e por metabolização pela catecol-O-metiltransferase (COMT). A medula da glândula adrenal, diferente dos terminais nervosos simpáticos pós-sinápticos, sintetiza principalmente adrenalina; a razão para esta diferença é a presença da enzima feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT) na medula da glândula adrenal, mas não nos neurônios adrenérgicos pós-ganglionares simpáticos. A PNMT catalisa a conversão de NOR em adrenalina, uma etapa que, de modo interessante, exige cortisol proveniente da região do cortical da glândula, que é fornecido por um efluente venoso na junção córtico-medular da adrenal.

Para o SNAS exercer influência sobre as células do sistema imune, estas devem expressar os receptores adrenérgicos que respondem às catecolaminas liberadas pelos terminais pós-ganglionares das fibras nervosas simpáticas e pela medula da adrenal. Depreende-se, com isso, que a manutenção da homeostase durante mudanças agudas ou crônicas do estado fisiológico inclui a modulação de parâmetros imunes (ELENKOV et al., 2000).

De maneira geral, os receptores adrenérgicos podem ser divididos em dois tipos principais, os receptores α -adrenérgicos e os β -adrenérgicos (BELLINGER, 2014), conforme ilustra a figura 3A. As vias de sinalização e os mecanismos de ação dos receptores adrenérgicos são diferentes devido à associação desses receptores com diferentes frações da proteína G. Os receptores α_1 -adrenérgicos estão

associados com a fração Gq da proteína G (*GTP binding protein*) e ativam a fosfolipase C. Já os receptores α_2 -adrenérgicos estão ligados à porção Gi da proteína G regulando os canais de cálcio e potássio. Vários trabalhos utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro*, mostraram que o uso de antagonistas para receptores α_2 inibe a liberação de NOR pelas fibras nervosas simpáticas (ELENKOV; VIZI, 1991). Apesar da expressão de receptores α -adrenérgicos em células do sistema imune, os receptores β_2 -adrenérgicos parecem ser os principais receptores atuantes nestas células (ELENKOV, 2000). Os receptores β_2 -adrenérgicos são expressos em células NK, células dendríticas, macrófagos, células T CD4 e CD8 e células B, entre outras (ELENKOV, 2000; BELLINGER, 2014).

Conforme ilustram as figuras 3B e 3C, os receptores β_2 -adrenérgicos estão associados à fração Gs da proteína G do complexo adenilato- ciclase e sua ativação leva ao aumento intracelular de AMP cíclico com subsequente ativação da proteína quinase A (PKA). Além disso, a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos pode levar à formação de outros segundos mensageiros tais como proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK).

Figura 3 - Representação dos receptores pré e pós-ganglionares do sistema nervoso simpático e subtipos de receptores adrenérgicos em órgãos efetores (A) e a cascata de sinalização intracelular antes e após a ativação do receptor β adrenérgico (B e C)

A)

B)

C)

Fonte: (MARGATHO, R. O., 2015)

Caracteristicamente, os linfócitos apresentam duas respostas reconhecidas após a administração de catecolaminas: uma resposta rápida (< 30 min), no qual ocorre mobilização transitória de linfócitos, seguida por um aumento na migração de granulócitos e decréscimo na contagem de linfócitos. Os mecanismos pelos quais as catecolaminas modulam a re-distribuição de linfócitos ainda não estão completamente estabelecidos. Um dos mecanismos possíveis seria que o SNAS inervando a musculatura vascular lisa poderia regular o fluxo de sangue para determinados órgãos, e, conseqüentemente, controlaria a passagem de linfócitos para os órgãos (ELENKOV et al., 2000). Várias evidências na literatura indicam que durante a resposta ao estresse ocorre um aumento nos níveis de catecolaminas periféricas que resulta em inibição de vários parâmetros imunes e particularmente da atividade de células NK (IRWIN, 1994). Não surpreendentemente, o desbalanço nas funções efectoras das células NK tem sido considerado um parâmetro confiável na avaliação do impacto do estresse sobre a imunidade em um indivíduo (IRWIN, 1994; ELENKOV, 2000).

Além disso, o aumento mais tardio na contagem de granulócitos, principalmente de neutrófilos, parece estar relacionado com a estimulação de adrenoreceptores do tipo α e tais células são liberadas para a circulação a partir de reservas principalmente da medula óssea (FREY, 1914; SCHEDLOWSKI et al., 1996). Alguns trabalhos associaram a ativação de receptores β_2 (por concentrações

nanomolares de catecolaminas) com a supressão na quimiotaxia de neutrófilos frente a vários tipos de fatores quimiotáxicos, inibição da fagocitose, liberação de enzimas lisossomais e diminuição do *burst* oxidativo e da degranulação (HARVATH et al., 1991; WEISS et al., 1996).

2.3 DAS CÉLULAS DA IMUNES AO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO SIMPÁTICO

As células imunes originam-se na medula óssea, daí algumas passam por maturação e, posteriormente, migram para tecidos periféricos através da circulação e do sistema linfático. O sistema imune inato é composto por um braço bioquímico, caracterizado por peptídeos do sistema complemento e opsoninas e um braço celular, no qual fazem parte células fagocíticas e células *natural killer* (SANSONETTI, 2000; WIESNER, 2010; FREEMAN, 2014).

Os granulócitos são leucócitos derivados da mesma linhagem de fagócitos mononucleares e contém grânulos citoplasmáticos. Os neutrófilos, granulócitos que saem da medula óssea em estágio maturado, são células fagocíticas com alta mobilidade na corrente sanguínea, constituindo a primeira linha de defesa da resposta imune inata. Tais células emitem pseudópodes que envolvem e degradam bactérias por meio de grânulos citoplasmáticos. Neste processo são formados vacúolos fagocíticos e enzimas líticas (peróxido e lisozima) que destroem os microorganismos patogênicos (COHN et al., 1960). Em focos inflamatórios, os neutrófilos constituem a primeira população de células a migrar para esta região perpetuando a resposta imune por meio da secreção de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-12 e quimiocinas IL-8 e CCL2, as quais recrutam outros leucócitos (SCAPINI et al., 2000). Por outro lado, em certos contextos, neutrófilos podem também contribuir para danos relacionados à resposta inflamatória, assim como atuar em doenças autoimunes tais como aterosclerose e diabetes (NATHAN, 2006; MOCSAI, 2013). Dessa forma, sob condições fisiológicas, existe um mecanismo de regulação da atividade de neutrófilos para que estes, além de proteger o organismo contra patógenos, possam também protegê-lo de reações inflamatórias exacerbadas. Estudos têm mostrado que o eixo HPA, de alguma forma, estaria envolvido nesta

regulação; por exemplo, por meio de um de seus produtos finais, o cortisol, um hormônio imunossupressor (CHARMANDARI, 2005).

O baço é o principal local de respostas imunes a antígenos provenientes do sangue; porém esta noção, assim como aquela da importância deste órgão são alvos de discussões relativamente recentes na literatura biomédica (ELENKOV, 2000). Na década de 1940, o pesquisador Von Euler conseguiu isolar a NOR do baço de animais e demonstrou ser ela o principal hormônio liberado pelo SNAS. Na década seguinte, o baço foi considerado apenas um órgão “reservatório de sangue”, e trabalhos relacionados a este órgão focavam principalmente a inervação autonômica esplênica como sendo um meio de regulação da resistência vascular e do fluxo de sangue ao órgão. Isto levou à ideia, neste período, de que as fibras nervosas simpáticas aferentes do baço não tinham outra função que não regular o fluxo sanguíneo.

A partir da década de 50, no entanto, uma outra função foi descrita para as fibras nervosas aferentes simpáticas que inervam o baço; isto ficou evidente, quando Frank e Dougherty (1955) demonstraram a capacidade que têm as catecolaminas de afetar a redistribuição das células imunes por mudanças na afinidade destas aos receptores presentes em vasos sanguíneos (adesão celular). Neste trabalho pioneiro, os autores observaram um aumento significativo na circulação sanguínea de células classificadas como “*stress-lymphocytes*”, após 10 min da injeção subcutânea de adrenalina. Tais células apresentavam morfologia de linfócitos; porém, na atualidade sabe-se que isso ocorre por serem uma linhagem celular relacionada à de linfócitos, contendo imensos grânulos, posteriormente classificadas como células *natural killer* (NK).

Como demonstrado a seguir, o termo *natural killer* originou-se a partir do isolamento destas células do sangue ou do baço e da observação da capacidade que estas células tem de destruir células-alvo sem a necessidade de sensibilização prévia. De maneira oposta, linfócitos T CD8+ requerem uma ativação prévia antes de se diferenciar em linfócitos T citolíticos com capacidade de eliminar seus alvos (MILSTEIN, 2011).

No entanto, a forma como estes “*stress-lymphocytes*” destroem seus alvos ficou desconhecida durante muito tempo. A ação citolítica destas células foi descrita de maneira pioneira nos trabalhos de Kiessling et al. (1975). Estes autores observaram que camundongos sadios e não imunizados apresentavam células

esplênicas com capacidade de combater células tumorais *in vitro*. Ainda em 1975, o grupo de Herberman e colaboradores também publicou um estudo mostrando presença de células com capacidade de eliminar tumores alogênicos e singênicos *in vitro* (HERBERMAN, 1975).

O interesse na compreensão do papel destas células surgiu 10 anos depois, quando Karre publicou um trabalho mostrando a capacidade que elas têm de destruir células que não apresentavam ou apresentavam baixos níveis do complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC-I) (LJUNGGREN; KARRE, 1985). Estes autores verificaram que as células NK eram tolerantes a células autólogas “normais”, porém conseguiam reconhecer e atacar células que expressavam baixos níveis de MHC-I, a chamada teoria de reconhecimento pela ausência do próprio. Sabe-se que a infecção das células do hospedeiro, especialmente por vírus, leva frequentemente à expressão reduzida de moléculas de MHC-I e também que as células NK seriam uma estratégia do organismo contra esta evasão viral.

Outros estudos foram publicados nos anos seguintes, confirmando a existência de receptores inibitórios em células de camundongos (MASON et al., 1995) e de humanos (COLONNA; SAMARIDIS, 1995). Mais tarde, mostrou-se quais seriam os receptores ativadores nas células NK humanas (MORETTA et al., 2001). Recentemente, observou-se que o repertório desses receptores controla funções efectoras nas células NK, cuja função depende do equilíbrio dinâmico entre receptores inibidores e de ativação expressos em sua superfície (SPITS et al., 1998).

Em relação às funções das células NK, demonstrou-se ainda o papel bem relevante que exercem no combate à células cancerosas ou infectadas por patógenos intracelulares (LANIER, 2005). O estudo de Martin-Fontecha et al. (2004) mostrou que as células NK desempenham importante papel na modulação da resposta imune celular adaptativa através da liberação de citocinas, tais como IFN- γ , fato observado durante a indução de uma resposta imune celular; isto é importante para a polarização dos linfócitos T helper para um perfil Th1. Atualmente, as funções descritas para as células NK incluem, também, seu papel regulador da inflamação (VIVIER et al., 2008).

Neste contexto, uma vez que as células NK são passíveis da ação de catecolaminas, mostrou-se que a presença de inervações catecolaminérgicas localizadas em justaposição com células da imunidade inata e adquirida, isto é, a

existência de verdadeiras conexões sinápticas com leucócitos individuais (FELTEN et al., 1987). Frente a este conjunto de dados, ficou evidente que a resposta imune podia ser “desbalanceada” por diversos fatores, dentre os quais infecções, estresse e/ou estimulação do SNAS.

Em condições fisiológicas normais, as citocinas não atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) em quantidades significantes (ASHDOWN et al., 2006; DUNN, 2006). Vale ressaltar que diversas regiões do cérebro, incluindo glia e neurônios, expressam receptores para diferentes citocinas, dentre elas IL-1 β , TNF- α e IL-6 (YIRMIYA, 1999). Na literatura, diversos trabalhos têm relacionado a ruptura da BHE a uma exposição a agentes infecciosos; dessa forma, permitem que citocinas e células inflamatórias atuem no cérebro. Exemplo disso são os experimentos que mostram após um desafio com LPS na periferia, um aumento progressivo nos níveis de TNF- α no cérebro, observando-se ainda que estas alterações podem persistir por meses (THIBEAULT, 2001; RAGHAVENDRA, 2004; SEMMLER, 2008). Neste desafio, mostrou-se, inclusive a ativação da microglia, a principal célula imune do SNC (THIBEAULT, 2001). De maneira similar, resultados de nosso grupo mostraram que a exposição pré-natal ao LPS agravou um quadro de encefalomielite automine (EAE) na idade adulta; agravamento este associado ao infiltrado de macrófagos no SNC (ZAGER; PALERMO-NETO, 2015). Neste trabalho, a ativação imune materna durante a gestação predispôs a prole tanto a um perfil de neuroinflamação, como também potencializou a resposta autoimune e as manifestações clínicas da EAE (ZAGER; PALERMO-NETO, 2015).

Finalmente, e de maneira inovadora, vale lembrar que na atualidade alguns trabalhos estão começando a relacionar alguns tipos de estresse a um perfil neuroinflamatório, processos estes que estariam intimamente relacionados à gênese do comportamento ansioso. Em um modelo de estresse psicológico (derrota social) Reader et al. (2015) mostraram a associação entre exposições repetidas a um agente estressor à ativação microglial (neuroinflamação). As regiões cerebrais ativadas, evidentes pelo aumento de c-Fos foram córtex pré-frontal, região medial da amígdala e núcleo paraventricular do hipotálamo, que estão implicadas nas respostas de luta e fuga e ao medo e que são responsivas pela liberação de catecolaminas pelo SNAS (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009; KRUGERS, 2011; HANKE, 2012). A figura 4 ilustra a interação entre os diferentes sistemas nervoso, endócrino e imune em resposta ao estresse.

Figura 4 - Esquema ilustrativo da interação entre o sistema nervoso, endócrino e imune

Fonte: (MARGATHO, R. O., 2015)

2.4 CONVIVÊNCIA COM DOENTES

Uma quantidade enorme de dados foi recolhida a partir de relatos clínicos e experimentais, constituindo prova inequívoca da relevância biológica do estresse sobre interações neuroimunes na saúde e na doença (BARNARD et al., 1993; NAVAIE-WALISER, 2002; PINQUART, 2003; GLOZMAN, 2004; BERTRAND, 2006; SORRELL, 2007; JEONG, 2016). Estressores psicológicos, como isolamento social ou presença de odores de predadores, bem como estressores físicos, tais como o frio ou calor, evocam em animais de laboratório alterações fisiológicas que perturbam a homeostase. Como se mostrou, em resposta a tais perturbações, diversos mecanismos fisiológicos, tais como aqueles mediados pelo SNAS e pelo eixo HPA, atuam para restaurar a homeostase (PALERMO-NETO et al., 2003; BERNBERG et al., 2012). Sabe-se que diferentes tipos de estressores acarretam diferentes respostas fisiológicas (KEENEY et al., 2006), por exemplo, estressores agudos acarretam ativação mais proeminente do SNAS culminando com a liberação de catecolaminas; já em situações de estresse crônico existe predominância do eixo HPA que resulta na liberação de glicocorticóides (STAMP, 2001). Ora, se diferentes agentes estressores crônicos normalmente suprimem a resposta imune, os agudos estão associados à intensificação da mesma (DHABHAR et al., 2005).

Como já discutido, o estresse possui a capacidade de influenciar a comunicação bidirecional entre SN e SI e, dessa forma, induzir efeitos, geralmente negativos sobre a saúde e sobre o bem-estar do indivíduo, em especial quando mantido por tempo prolongado. As interações sociais são fundamentais para que ocorra o bem-estar, uma vez que em numerosas espécies de animais elas são um relevante componente adaptativo; levam à escolha de um (a) parceiro (a) para acasalamento ou ao estabelecimento de hierarquias sociais. Dentre as inúmeras situações já descritas como capazes de atuar como agente estressor, o convívio e o ato de cuidar de doentes crônicos são considerados como estressores psicossociais potentes; há muito relatos de estudos sobre estresse empregando *caregivers* (KIECOLT-GLASER et al., 1991; CASSIE; SANDERS, 2008; VELLONE, 2008; CHEN, 2013).

De maneira geral, a convivência com doentes afeta principalmente familiares ou pessoas próximas ao indivíduo doente, os chamados *informal caregivers*. Muitos

destes *caregivers* não realizam esta atividade por escolha; muitas vezes, eles o fazem por ser o doente um parente próximo. Ora, a atividade de cuidar de alguém próximo poderia à primeira vista parecer um fato recompensador; mas se considerarmos que para muitos isto exige dedicação exclusiva em relação ao doente (monitorar alimentação, auxiliar no transporte, cuidar da medicação, da higiene pessoal e da subsistência; conviver com manifestações de transtorno de humor, dor e efeitos colaterais dos medicamentos) e por períodos de tempo relativamente longos, o ato acaba por se tornar um evento altamente estressor. Em especial quando o *caregiver* deixa de trabalhar para executar esta função o que acaba, também, por complicar-se financeiramente. Wilson (1991) observou esposas de maridos que recebiam quimioterapia; mostrou que ao final do tratamento, eram as esposas destes pacientes que apresentavam sintomas como ansiedade, náusea e vômito. São conhecidos casos das esposas de pacientes com Alzheimer que faleceram antes de seus maridos (RICHARDSON, 2013).

Dessa forma, por envolver principalmente pacientes com câncer em estágios avançados ou que apresentam distúrbios psiquiátricos ou degenerativos crônicos, a assistência ao doente consiste em algo desafiador. Não surpreendentemente muitos indivíduos se sentem despreparados para esta função e não raros são acometidos de ansiedade, transtorno do sono, depressão e fadiga (WILSON, 1991; O'BRIEN, 1993; CORÀ, 2012; MOSHER, 2015 no prelo²). Além disso, tal atividade muitas vezes resulta em um eventual isolamento (NAVAIE-WALISER, 2002), uma vez que pode levar os indivíduos a interromperem suas atividades sociais e relacionamentos, outro evento considerado como muito estressor por gerar situações de conflito: cuidar do doente ou manter sua vida social?

Dados da literatura a partir de humanos indicam que vários fatores podem ser relevantes para se definir o impacto destes efeitos no bem-estar; dentre eles, pode-se destacar a idade em que o evento é experimentado, o tipo de evento e experiência prévia, a duração do evento e a presença de apoio social; outros fatores interferentes são genética e gênero (VETTER, 1999; PINQUART, 2003; KIM, 2006; 2012; IWATA, 2015).

² MOSHER, C. E.; ADAMS, R. N.; HELFT, P. R.; O'NEIL, B. H.; SHAHDA, S.; RATTRAY, N. A.; CHAMPION, V. L. Family caregiving challenges in advanced colorectal cancer: patient and caregiver perspectives. **Support Care Cancer**, 2015. (no prelo).

A importância destes estudos com *caregivers* está associada ao aumento da expectativa de vida da população, com o consequente aumento do número de idosos diagnosticados com Alzheimer, demência e distúrbios correlatos ou da prevalência de câncer na população (CONNELL, 2001; SMITH, 2009). Um dado interessante levantado por Vitaliano (2003) consiste em associar o ato de cuidar do doente e o comprometimento da saúde do *caregiver*. Para Sherwood et al. (2008), na fase inicial de um estresse agudo, como no momento do diagnóstico de um tumor maligno e na fase inicial do tratamento, as mudanças fisiológicas são consideradas adaptativas (para o paciente e parentes de primeiro grau); no entanto, respostas não-adaptativas e prejudiciais começam a aparecer, estando mais relacionadas ao estresse contínuo advindo da progressão da doença, e de tratamentos por longos períodos, que estariam associadas mais diretamente aos sistemas cardiovascular e imune (WEITZNER, 2000; LUCINI, 2008; CORA, 2012; TEIXEIRA et al., 2014). Exemplo disso são os vários estudos epidemiológicos indicando um maior risco de problemas cardíacos e elevação da mortalidade em *caregivers* hipertensos (VITALIANO, 1991; SHAW, 1999; MAUSBACH, 2010). É interessante notar que respostas cardiovasculares podem variar de acordo com parâmetros psicológicos, tais como mudanças de estados emocionais; sendo assim, o sistema circulatório seria um importante indicador fisiológico de estresse, relacionado ao SNAS (PARATI, 2012). Finalmente, inúmeros outros estudos relacionaram especificamente o *caregiving* de pacientes com câncer com um maior risco de desenvolvimento de doenças coronárias, metabólicas, autoimunes, inflamatórias e psiquiátricas (VANDERWERKER et al., 2005; ROHLDER et al., 2009).

É aparentemente simples imaginar que seres humanos sejam capazes de demonstrar empatia um pelo outro e, portanto, de responder a condições emocionais com alterações de suas funções e saúde. No entanto, em relação aos animais, estas extrapolações tornam-se muito difíceis; de fato, esta condição implicaria na demonstração da existência de afetividade entre os animais em modelos experimentais, o que é difícil, senão impossível. É difícil propor situações em que animais apresentem alterações fisiológico-comportamentais causadas por estressores psicossociais como, por exemplo, em resposta à doença de um parceiro ou do dono.

Neste sentido, o trabalho de Palermo-Neto et al. (2003) nos ajuda a entender o fato de que animais podem e reagem ao ambiente emocional em que se encontram. Neste trabalho os autores descreveram que tanto animais que passavam por um estresse físico (choques inescapáveis) como outros que observavam a aplicação do choque (estresse psicológico), apresentaram aumento nos níveis de corticosterona, diminuição da resistência ao TAE e alterações comportamentais tanto no campo aberto, como no labirinto em cruz elevado. Depreende-se que embora seja complicado assumirmos que roedores como camundongos possuam, de fato, algo similar à empatia, é notório que estes animais são capazes de perceber, de alguma forma, o estado emocional de um companheiro e de reagir a ele.

Assim, diversos trabalhos de nosso grupo de pesquisa avaliaram os efeitos intercorrentes da convivência com um parceiro portador da forma ascítica do tumor de Ehrlich, partindo do princípio de que roedores são seres sociais que estabelecem hierarquias, escolhem parceiros(as) para o acasalamento e apresentam comportamento social bem definido. Em nenhum momento, no entanto, se atribuíram os efeitos observados à presença de empatia entre os camundongos.

No primeiro deles, Morgulis et al. (2004), constataram que camundongas Swiss que conviviam com animais da mesma linhagem portadores do tumor ascítico de Erlich (TAE) apresentaram uma menor resistência ao desenvolvimento deste mesmo tumor quando desafiados após 11 dias de convívio. Ao analisarem o comportamento dos animais submetidos a esta condição, mostraram aumento da atividade locomotora, mas, surpreendentemente, não constataram alterações significantes nos níveis de corticosterona circulante destes mesmos animais (ALVES et al., 2010). Mais recentemente, mostrou-se em companheiros de coespecíficos doentes, um aumento dos níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina (ALVES; PALERMO-NETO, 2014). Ao mesmo tempo mostrou-se mais uma vez a ausência de alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona. Este fato é interessante pois classicamente situações ansiogênicas aumentam a produção de glicocorticóides. No entanto, e curiosamente, concordam com os dados obtidos por Bartrop (1977) em pessoas que perderam companheiros próximos.

Alves et al. (2005), em sequência, mostraram (a) uma diminuição nos níveis e aumento do *turnover* hipotalâmico de noradrenalina (NOR); (b) uma diminuição do *burst* oxidativo de neutrófilos após indução com miristato acetato de forbol (PMA) ou

com *Staphylococcus aureus*; (c) uma diminuição na porcentagem e na intensidade de fagocitose de neutrófilos (ALVES et al., 2006). A fagocitose de macrófagos peritoneais também foi menor em camundongas que conviveram com conspecíficas doentes em relação às do grupo controle (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

De relevância, observaram-se também, em camundongas que conviveram com portadoras de um tumor por 14 dias: 1) redução do peso e da celularidade do baço; 2) redução na contagem diferencial de blastos, eritrócitos jovens e linfócitos no esplenograma; 3) redução da porcentagem de linfócitos B e T helper e na proporção CD4/CD8 no baço; 4) aumento da atividade citotóxica de células NK; 5) aumento da celularidade total da medula; 6) aumento do número absoluto de blastos e redução daquele de eritrócitos jovens e de linfócitos no mielograma, e aumento do número relativo de blastos; 7) aumento de células em fase G1 e redução daquelas em fase G2 do ciclo celular na medula; 8) aumento de células tumorais em fase G1 e redução daquelas em fase G2 do ciclo celular do tumor ascítico de Ehrlich (ALVES et al., 2006).

Vale ressaltar que este modelo de estudo também foi feito em outra linhagem de camundongos (C57BL/6) e para outro tipo de tumor (melanoma) inoculado no animal doente. Da mesma forma, observaram-se alterações significantes nos companheiros de animais doentes, dentre elas: 1) aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD11c+ em células do baço; 2) alteração na diferenciação das células da medula na presença de CM-CSF, IL-4 e LPS, *in vitro*, resultando em uma menor porcentagem de células CD80+ *in vitro*, e 3) desestabilização do organismo a uma hipersensibilização por ovoalbumina (TOMIYOSHI et al., 2009).

Outros resultados com o mesmo modelo experimental em camundongos mostraram que o contato físico e visual não foram relevantes para o aparecimento das alterações induzidas pela convivência, mas sim os estímulos olfativos provenientes do animal injetado com o tumor. De fato, a remoção destes estímulos olfativos impediu o aparecimento das alterações induzidas pela convivência sobre o *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos, o crescimento tumoral, as alterações comportamentais, os níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina, e os níveis e *turnover* hipotalâmico de noradrenalina (ALVES; PALERMO-NETO, 2010, 2012).

Em um modelo experimental que procurou mimetizar a patogenia da asma alérgica, Hamasato e Palermo-Neto (2014) mostraram que camundongos que

conviveram por 14 dias com parceiros doentes apresentaram aumento da resposta alérgica pulmonar. Mostraram, especificamente: 1) aumento do número de eosinófilos e neutrófilos no líquido bronco-alveolar (BAL) e diminuição da contagem de células da medula óssea; 2) aumento dos níveis de IL-4 e IL-5 e diminuição dos níveis de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante de BAL; 3) aumento nos níveis de IgG1-OVA e diminuição nos níveis de IgG2a-OVA no sangue periférico; 4) aumento na expressão de L-selectina de granulócitos no BAL; 5) diminuição da reatividade traqueal à metacolina *in vitro* e 6) aumento nos níveis de adrenalina e noradrenalina plasmática.

Em um trabalho recente em nosso laboratório, foi feita a análise de citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 *in vitro* a partir de células do baço estimuladas com LPS obtidas de camundongos Swiss que conviveram ou não com portadores do tumor ascítico de Ehrlich (MACHADO; PALERMO-NETO, 2013). Os resultados mostraram que a convivência de 11 dias diminuiu ($p \leq 0,05$) em machos os níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-6 medida 24h e 48h após uma estimulação *in vitro* com LPS. Estes resultados preliminares obtidos após a convivência de camundongos machos com um parceiro doente sugerem que o evento ocorre também em machos e, ainda a ocorrência de uma mudança no perfil de citocinas Th1/Th2 em direção ao perfil Th2, fato comumente relatado em situações de estresse psicológico (MACHADO; PALERMO-NETO, 2013).

Analisando-se estes resultados em seu conjunto depreende-se que a convivência com animais portadores do TAE produziu alterações comportamentais, neuroquímicas e imunes em camundongos muito provavelmente desencadeadas pela estimulação olfativa proveniente dos doentes (ALVES; PALERMO-NETO., 2010; 2014). Substâncias liberadas em um contexto de estresse fornecem informações relevantes sobre as condições fisiológicas de roedores (HAUSER et al., 2008). De fato, camundongas exibem um interesse reduzido e evitam a urina e outras secreções de machos infectados com endoparasitas, tais como protozoários, nematóides e vírus influenza (KAVALIERS et al., 1993, 2005). Animais saudáveis ao perceberem “pistas de odor” de animais infectados da mesma espécie e imunologicamente desafiados por longos períodos procuram evitá-los (YAMAZAKI et al., 2002). Observou-se que tumores produzem componentes orgânicos voláteis, que são liberados para a atmosfera por meio da urina, suor e respiração (PHILLIPS et al., 1999). De maneira surpreendente, a habilidade de detectar sinais de doença

através de odores poderia inclusive ter reflexos na imunidade inata, por vezes definida como *behavioral immune system*, uma vez que as células imunes se tornariam rapidamente ativadas a fim de se antecipar para um possível contágio (SUNDELIN et al., 2015).

Alves e Palermo-Neto (2014) utilizaram um teste de preferência empregando um labirinto em T; neste teste, o animal doente ou saudável foi colocado na extremidade lateral (A): zona do companheiro de gaiola; um animal saudável naïve de mesma linhagem, sexo e idade foi posicionado na extremidade lateral oposta (B): zona do animal estranho. Os animais que conviveram ou não com o doente (companheiros de gaiola) foram posicionados na base do labirinto em T. Observou-se que os camundongos parceiros do doente permaneceram menos tempo na zona do companheiro doente, fato não observado com os companheiros de animais saudáveis que preferiram posicionar-se próximos a seus parceiros de gaiola.

Neste mesmo trabalho e um teste de interação social, os animais que conviveram com o doente apresentaram maiores níveis de interação social na presença de um animal estranho. Dados opostos foram observados com os companheiros de animais saudáveis. Em seu conjunto, estes dados levaram os autores a propor que os companheiros dos animais doentes vivenciaram em suas gaiolas de moradia uma situação de estresse psicológico gerado pela situação de conflito que experimentaram: a necessidade natural de manter relações sociais com o companheiro de gaiola (aproximação) *versus* a tendência também natural de evitar um animal doente (“evitação”). Situações como esta chamadas de “*approach and avoidance*” são reconhecidamente estressoras (BAUMEISTER; LEARY, 1995). Nesse sentido, e reforçando a hipótese, mostrou-se ainda neste trabalho, que a convivência de um animal saudável com dois camundongos portadores de TAE intensificou o decréscimo no *burst* oxidativo de neutrófilos quando comparados aos que conviveram com apenas um portador de tumor. Neste experimento, se a convivência fosse feita com um doente e com outro animal saudável, os efeitos imunes observados em neutrófilos eram revertidos. Tais dados em seu conjunto mostram, novamente, que pistas de odor do doente, por serem aversivas poderiam ser responsáveis pelo estresse psicológico gerado no companheiro do doente (ALVES; PALERMO-NETO, 2014).

Ainda neste trabalho, os autores propõem que as mudanças neuroimunes observadas nos animais que conviveram com o doente e os efeitos do estresse

psicológico inserido nesta condição estariam relacionados à ativação das vias catecolaminérgicas no cérebro e do SNAS. Neste sentido, a citocina pró-inflamatória IL-6 já foi associada com alterações comportamentais (ZORRILLA et al., 2001). Alterações nos níveis de glicocorticóides e/ou de catecolaminas após um estressor modificam a rede de citocinas (TORRES et al., 2005); citocinas são conhecidas por modular a atividade das células imunes (BELLINGER, 2014). Assim, as alterações imunes relatadas nos trabalhos do grupo após a coabitação com um parceiro doente poderiam, em última análise, depender de mudanças induzidas pelas catecolaminas na rede de citocinas. Desta forma, pareceu-nos relevante estudar mais profundamente e dentro de uma perspectiva neuroimune o envolvimento do sistema nervoso autônomo simpático com os efeitos desencadeados pela convivência com o doente usando-se como ferramentas farmacológicas o propranolol (antagonista β -adrenérgico) e o fármaco ICI-118,551 (antagonista β 2-adrenérgico).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos do bloqueio de receptores β -adrenérgicos sobre parâmetros de imunidade inata e de atividade do SNC em um modelo de estresse induzido em camundongos pela coabitação com dois parceiros inoculados com tumor ascítico de Ehrlich.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar os efeitos do bloqueio de receptores β -adrenérgicos com o propranolol e com o ICI-118,551 sobre as alterações induzidas em camundongas pela convivência com dois portadores do tumor ascítico de Ehrlich sobre:

- atividade geral em campo aberto;
- níveis de monoaminas e metabólitos no hipotálamo, bulbo olfatório e córtex frontal;
- níveis de corticosterona séricos;
- peso relativo das adrenais;
- celularidade da medula óssea;
- porcentagem de células e perfil de ativação de células NK no sangue e no baço;
- *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neuroimunomodulação. Foram utilizados camundongos adultos fêmeas da linhagem Swiss, com 7 a 9 semanas de idade, provenientes de proles obtidas no Biotério de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram utilizados conforme as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório estabelecidos pelo Comitê de Ética da FMVZ – USP (CEUA N° 8317270114).

Antes do início dos experimentos, os animais foram alojados por um período mínimo de 7 dias, em gaiolas de propileno (28 x 17 x 12 cm) e em número máximo de 3 animais por gaiola para adaptação às condições do biotério experimental. Estas gaiolas foram acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26° C) e umidade (65 a 70 %) foram controladas por meio de aparelhos de ar condicionado, ventilação e sistema de exaustão; a iluminação das salas é artificial e obedece a um ciclo de claro-escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores NUVILAB®. Ração e água foram fornecidos *ad libitum* durante todos os experimentos.

Escolheram-se camundongas para os experimentos porque as fêmeas desta espécie são menos agressivas que os machos, quando colocadas em grupos (PALANZA, 2001). Neste sentido, a presença de comportamento agressivo e/ou de lesões produzidas por encontros agonísticos poderiam representar variáveis intercorrentes.

4.2 FÁRMACOS, REAGENTES, CORANTES E SUBSTÂNCIAS BIOLÓGICAS

Os mais relevantes e dignos de destaque foram:

dL-Propranolol (Sigma®, St Louis, MO, USA) – antagonista β -adrenérgico não seletivo que foi diluído em solução de NaCl 0,9%. O bloqueio dos receptores β -adrenérgicos foi feito pela administração de 20 mg/kg/dia por via i.p. (FERRAZ-DE-PAULA et al., 2014).

ICI-118,551 (Tocris®, Ellisville, MO, USA) – antagonista β_2 -adrenérgico específico que foi diluído em solução de NaCl 0,9%. A administração de 15mg/kg do fármaco foi feita 1x dia, por via i.p, conforme dados da literatura (RICE et al., 2001; CAO; HUDSON; LAWRENCE, 2003).

CEPA de *Staphylococcus aureus* (SAPI) ATCC 25923 (DIFCO®) – Bactéria marcada com iodeto de propídeo utilizada para desencadear o *burst* oxidativo de neutrófilos e para avaliar a atividade fagocítica realizada por neutrófilos.

Iodeto de Propídio (PI) (Sigma®, St Louis, MO, USA) –utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha captada pelo citômetro;

Diacetato 2'7'Diclorofluorescína (DCFH-DA/Molecular Probes, Eugene, OR, USA) – responsável pela emissão de fluorescência verde após reações com espécies reativas de oxigênio produzidas pelos neutrófilos. Este reagente foi mantido congelado (- 20 ° C), e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso;

PMA – Miristato-acetato de forbol – (Calbiochem®, San Diego, CA, USA) – utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo de neutrófilos.

EDTA (Sigma®, St Louis, MO, USA) – utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3mM, com o objetivo de interromper a reação de fagocitose após o período de incubação das amostras;

Solução de NaCl 0,9% - solução utilizada para injeção nos animais dos grupos controle ou na diluição dos fármacos empregados nos experimentos;

Heparina (Liquemine® – Roche, São Paulo, SP, Brasil) – anticoagulante utilizado nas coletas de amostras de sangue;

PBS (Phosphate-buffer saline, pH= 7,2-7,4) – solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose;

Azul de TRIPAN (MERCK, Darmstadt, Germany) a 0,1% - utilizado para corar as células do baço e medula óssea, para realizar contagem e teste de viabilidade.

4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

A formação dos grupos foi feita a partir do “modelo de coabitação com um parceiro doente” proposto em nossos laboratórios por Alves et al. (2005), com adaptações; propomos inserir mais um animal doente por gaiola, conforme ilustra a **Figura 5**, de modo a aumentar o fator estressante (ALVES; PALERMO-NETO, 2014).

Os camundongos foram pesados e separados em trios de acordo com o peso corporal e deixados em coabitação durante 7 dias antes do início dos experimentos. Após este período, os camundongos foram randomicamente divididos em dois grupos iguais: controle e experimental. No grupo controle, um par de camundongos de cada trio foi tratado intraperitonealmente (i.p) com 0,9% NaCl (1mL/kg); o outro animal foi mantido sem manipulação e denominado **CAS**, companheiro dos animais saudáveis. No grupo experimental, um par de camundongos de cada trio foi inoculado com 5×10^6 células de tumor ascítico de Ehrlich (T.A.E) por via i.p.; o outro camundongo do grupo, objeto deste estudo, foi mantido sem manipulação sendo chamado de **CAD**, companheiro dos animais doentes.

Figura 5 - Esquema ilustrativo do grupo experimental utilizado. O animal companheiro dos doentes (CAD) é o objeto de estudo deste trabalho

Fêmeas Swiss inoculadas com 5×10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich

Fonte: (MARGATHO, R. O., 2015)

O dia da injeção do tumor foi denominado ED₁ (dia experimental 1) e a convivência foi feita por 12 dias, sendo que entre ED₆ a ED₁₁ procedeu-se a um tratamento dos camundongos CAS e CAD, conforme ilustrado na **Figura 6**. Desta forma, em cada grupo os camundongos CHP ou CSP foram sub-divididos em outros 2 grupos: CAS+P (ou CAS+I) e CAD+P (ou CAD+I). Nos dias ED₆ e ED₁₁, os camundongos dos grupos CAS e CAD foram injetados (i.p) diariamente com solução salina NaCl 0,9% (1mL/kg/dia); os camundongos CAS+P/CAS+I e CAD+P/CAD+I foram injetados (i.p) diariamente e no mesmo período com **propranolol** (administração de 20 mg/kg/dia) ou **ICI-118,551** (administração de 15 mg/kg/dia). No ED₁₂, foram feitas as análises comportamentais ou as coletas dos tecidos para os estudos. Dados de nosso laboratório mostraram que no dia ED₁₂, os escores atribuídos ao crescimento tumoral nos animais injetados com 5×10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich eram máximos: ausência de atividade, anorexia, presença de pêlos arrepiados e um severo aumento do volume abdominal (ALVES; PALERMO-NETO, 2012).

Figura 6 - Esquema ilustrativo da formação dos grupos experimentais

Fonte: (MARGATHO, R. O., 2015)

4.4 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

Após eutanásia em câmara de CO₂, é feita a colheita do fluído ascítico de um camundongo doador, portador de um tumor ascítico de Ehrlich com 7 dias de evolução. A suspensão de células obtidas deste animal é centrifugada a 300 xg, por 5 minutos sendo ressuspensa por três vezes em PBS. É realizado então a contagem e avaliação de viabilidade das células tumorais assim obtidas, usando-se para tal o azul de Tripán (1:20) e empregando-se uma câmara de Neubauer. Para manutenção “*in vivo*” do tumor no laboratório, 0,1 ml de fluído ascítico de um camundongo doador é inoculado semanalmente em um camundongo receptor.

Foi padronizado para uso nos camundongos chamados “doentes” nos experimentos deste trabalho um total de 1,25 x 10⁷ células tumorais por ml de PBS, com no mínimo de 90% de viabilidade. Foi inoculado 0,4 ml de uma suspensão de células tumorais com essa concentração no peritônio de cada camundongo (5,0 x 10⁶ células tumorais por animal).

No período de 11 dias após a inoculação do tumor ascítico de Ehrlich (ED11), os animais foram classificados em escores por sinais e sintomas, como se segue: 0 = predomínio de atividade, ausência de sinais e sintomas; 1 = predomínio de atividades normais como alimentação e ausência de alterações de pelagem; 2 = ativo, alimentação normal, pêlos arrepiados, e pequeno incremento no volume abdominal; 3 = ativo, alimentação normal, pêlos arrepiados, incremento moderado no volume abdominal; 4 = ausência de atividade, anorexia, dispneia, pêlos arrepiados e incremento elevado no volume abdominal.

4.5 COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue foi feita em tubos de polipropileno contendo heparina no ED₁₂ de convivência e imediatamente após a decaptação.

4.6 COLETA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

Após a coleta do sangue o fêmur direito foi removido e as epífises cortadas transversalmente. Uma agulha conectada a uma seringa plástica contendo 5 mL de PBS foi inserida na medula femoral e as células foram lavadas e retiradas fisicamente em tubos de polipropileno de 15 mL. As células foram lavadas e ressuspensas em 1mL de PBS. O número total de células da medula óssea foi quantificado em câmara de Neubauer empregando-se a coloração de Trypan (1:20).

4.7 PESO DA GLÂNDULA ADRENAL

Após pesagem e eutanásia, retiraram-se cirurgicamente dos animais as glândulas adrenais direita e esquerda através da abertura da cavidade abdominal.

As glândulas foram pesadas em balança de precisão para a análise do peso relativo do órgão (Peso glândula adrenal/Peso total do animal).

4.8 CITÔMETRO DE FLUXO

O citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) acoplado a um computador (Machintosh Apple, CA, USA) foi utilizado no presente trabalho para avaliar a atividade de neutrófilos sanguíneos e para realizar a fenotipagem e avaliar a atividade de células NK sanguíneas e esplênicas. Foram utilizados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

4.9 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS

O sangue foi coletado por decaptação (item 4.5) diretamente em tubos *eppendorfs* de 1,5 mL contendo 10 µl de heparina, sendo colocados imediatamente em banho de gelo. Foram utilizadas amostras sanguíneas de 100 µl para análise do *burst* oxidativo e da atividade fagocítica, conforme descrito por Hasui, Hirabayashi et al. (1989). As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*) do aparelho que avalia o tamanho e a complexidade celular. O comprimento de onda da fluorescência verde do DCFH foi mensurado pelo detector FL1, enquanto que aquele do iodeto de propídeo (PI) de fluorescência vermelha foi mensurado pelo detector FL2. Em relação ao *burst* oxidativo, o estímulo com PMA foi utilizado como desencadeador do burst; o DCFH é o responsável pela emissão de fluorescência verde após reagir com espécies reativas de oxigênio produzidas pelos neutrófilos. A fagocitose foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida em neutrófilos pelo PI após a fagocitose de bactérias SAPI marcadas com iodeto de propídio. A porcentagem de fagocitose (porcentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias) foi calculada através do número de neutrófilos fluorescentes divididos pelo número total destas

células e multiplicado por 100. Por meio do aparelho FACScalibur foi analisada a população de neutrófilos, excluindo-se as populações de linfócitos e monócitos, por meio da seleção por gates. Em todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco (sem estímulo) usado como controle (fluorescência basal) das células a serem analisadas.

4.10 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS NK SANGUÍNEAS E ESPLÊNICAS

A celularidade do baço foi determinada após a obtenção do peso total do baço e por dissociação em meio RPMI ou PBS. A cápsula foi rompida mecanicamente utilizando-se *cell-strainer* e com o auxílio do êmbolo de seringas; as células foram colocadas em placas de cultura. Estas células foram mantidas em meio RPMI ou PBS em banho de gelo, dentro de tubos falcons de 15 mL. Em seguida, procedeu-se à lise de hemácias utilizando-se solução de lise ACK; posteriormente à centrifugação (300 x g por 5 minutos), as células foram contadas utilizando-se uma câmara de Neubauer. Na contagem foi realizado o teste de exclusão do azul de Trypan 1%, sendo que apenas as amostras que apresentaram viabilidade maior que 95% foram utilizadas para avaliação da celularidade do baço.

A partir desta contagem, as células foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos para análise por citometria de fluxo. As células NK foram marcadas com CD49b conjugado com APC, CD3 conjugado com FITC e NpK46 conjugado com PE (BD PharMingen, San Jose, CA). Por fim, avaliou-se a população de células NK por citometria selecionando por meio de um gate a população de linfócitos no gráfico *tamanho x granulosidade*. A partir desta, selecionou-se as populações de células NK (CD49b+CD3-NpK46+), conforme ilustra a figura 7. Estas células também foram avaliadas quando à expressão da molécula ativadora CD69 conjugada com PerCP tendo-se medido a média de fluorescência emitida pelas células do sangue e do baço de cada animal.

Figura 7 - Esquema de seleção das células NK (CD3-CD49b+NKp46+) à partir do gate de linfócitos

Fonte: (MARGATHO, R. O., 2015)

4.11 DOSAGENS NEUROQUÍMICAS

Os animais foram submetidos à eutanásia por decaptação, sendo os cérebros rapidamente retirados e dissecados sobre uma placa de petri rodeada por gelo seco, formando-se assim, um micro-ambiente o mais frio possível. O córtex frontal, o hipotálamo, o bulbo olfatório e o estriado foram coletados e mantidos em gelo seco em um tempo máximo de 3 minutos, sendo posteriormente pesados e finalmente mantidos em *freezer* -80°C.

Antes das dosagens os tecidos cerebrais foram homogeneizados por sonicação (caneta sonicadora) com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, EDTA dissódico; uma concentração conhecida de DHBA foi utilizado, como padrão interno para as dosagens de monoaminas. O DHBA (3,4 diidroxibenzilamina) foi escolhido como padrão interno por apresentar as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas. Após a homogeneização, as amostras de tecido foram mantidas em geladeira onde permaneceram até o dia seguinte, sendo centrifugadas a 4000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para frascos de vidro, sendo as amostras novamente congeladas a -80°C, onde ficaram aguardando a leitura no aparelho.

As dosagens neuroquímicas foram realizadas a partir de método previamente descrito e validado (FELICIO, 1996; SILVA et al., 1998). Foi utilizado um

cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) acoplado a um detector eletroquímico (HPLC-ED; Shimadzu Modelo 6A). O HPLC-ED é composto de um recipiente injetor (válvula) de 20µl, bombas de fluxo A e B, um sistema controlador (monitoramento de fluxo, pressão e temperatura), uma coluna cromatográfica medindo 150 x 4,6 mm, diâmetro de partícula µm (Shimpak – ODS C 18) com filtro de linha, um detector eletroquímico e um integrador modulado Chromatopac. A técnica utilizada é a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico. Esta técnica fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção.

O limite de detecção do método foi igual a 10 ng/g e o limite de quantificação igual a 20 ng/g de tecido cerebral para DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA, NOR e VMA. O equipamento foi padronizado diariamente, no início e ao término do trabalho, usando-se para tal uma solução de trabalho de neurotransmissores ou de seus metabólitos e PI (DHBA) em solução de ácido perclórico, 0,1M, contendo EDTA e metabissulfito de sódio.

4.12 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA SÉRICA

A quantificação da corticosterona sérica foi realizada por meio de um kit de ELISA (DetectX®- Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit- Arbor Assays- Michigan USA), sendo os procedimentos realizados conforme as instruções do fabricante. O sangue colhido (item 4.5) foi centrifugado a 300 x g durante 10 minutos; o soro foi, em seguida, utilizado para a análise.

4.13 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

a) Sistema de observação computadorizada-EthoVision®

Para as análises comportamentais, foi utilizado o aparelho EthoVision® (Noldus Information Technology®, Leesburg, VA, USA) que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo, análise de movimento e reconhecimento comportamental. O

sistema é composto pelo programa Etho Vision Pro-Color 2.3 e pelos itens de “hardware”: câmera filmadora (CCD-Iris color Sony, New York, PA, USA), monitor de vídeo (Sony, New York, PA, USA), computador (Pentium 133, 16 MB de memória RAM, 1,2 gB de disco rígido) com placa de captura de vídeo (TARGA+Truevision, 2D NTSC), monitor SVGA, teclado e mouse, além de cabos e conectores.

b) Rastreamento do animal e análise do movimento

Os animais foram individualmente colocados no centro de uma arena (40 cm de diâmetro x 20 cm de altura) onde puderam explorar livremente; as sessões tiveram 5 minutos de duração. As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia (entre as 8 e 12 horas), intercalando-se os animais dos diferentes grupos. O aparato foi limpo com uma solução de água/álcool (5%) antes de colocar cada animal.

Os vídeos foram registrados com o auxílio de uma câmera montada verticalmente e conectada a um computador localizado em local subjacente à sala experimental. A partir das imagens recebidas pela câmera filmadora e digitalizadas na placa de captura, o programa gera coordenadas (x e y) provenientes do centro de gravidade do animal, em intervalos de tempo determinados. As coordenadas são geradas pelo método de subtração-ideal para rastrear um animal branco em uma arena escura, no qual o sistema subtrai a imagem de cada amostra dos pontos da imagem de referência (imagem do campo aberto, vazio, isto é sem o animal, e captada antes do experimento).

Nas análises a divisão da arena foi feita virtualmente em zonas central e periférica de forma tal a permitir a avaliação da atividade locomotora em cada área, a preferência manifestada pelos animais em cada zona. Para que o sistema reconhecesse em qual zona do aparelho se encontra o animal, foi necessário fazer uma representação gráfica do campo aberto. Assim, sobrepondo-se a imagem do campo aberto vazio, no monitor de vídeo, ao canal de edição de imagem do programa, foi possível desenhar o contorno e as subdivisões de cada arena. Antes do início dos experimentos foi necessário configurar o limiar de ruído - diferença mínima de intensidade entre o fundo (*background*) e o animal - a fim de ignorar possíveis ruídos no sinal de vídeo durante o processamento subsequente de imagens. Esse ajuste depende da intensidade de iluminação da arena e é feito automaticamente. A iluminação da sala durante as observações foi do tipo difusa,

obtida colocando-se uma placa semi-opaca de acrílico branco abaixo da fonte luminosa, a fim de espalhar a luz uniformemente em todas as direções e minimizar o aparecimento de reflexos e sombras e minimizar o estresse do animal a ser observado.

A arena foi limpa com uma solução de água/álcool 5% antes de colocar os animais para permitir a homogeneização de odores ambientais e evitar pistas odoríferas dos animais previamente avaliados.

c) Compilação e análise dos dados

Como indicativo da atividade no campo aberto foram registrados os seguintes parâmetros em cada zona do aparelho (central e periférica): a) distância percorrida - corresponde à distância gasta pelo animal no ato de entrar sucessivamente com as quatro patas em uma das divisões (zonas) do piso da arena, locomovendo-se (cm). b) velocidade média (cm/s) - corresponde à distância percorrida pelo animal por unidade de tempo. c) tempo em movimento - quanto tempo em segundos, o animal se movimenta no interior das zonas do campo aberto.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados pelo teste de Bartlett para determinação da homogeneidade das variâncias, ou seja, se eram paramétricos ou não paramétricos. Os dados paramétricos foram analisados por meio da análise de variâncias (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para avaliação dos contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste "U" de Mann-Whitney ou por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. Foram considerados significantes todas as análises com $p < 0,05$. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o *Software* estatístico *GraphPad Prism®* (versão 6.0 para *Windows*, San Diego Califórnia, EUA).

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Serão apresentados em cinco partes. Na parte 5.1 apresentam-se os efeitos decorrentes do bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos sobre parâmetros comportamentais de camundongos que coabitaram ou não com parceiros doentes, na parte 5.2 mostram-se os efeitos do ICI-118,551 sobre os parâmetros comportamentais destes animais e as partes 5.3 e 5.4 trazem os efeitos do propranolol e do ICI-118,551, respectivamente, sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos em estruturas cerebrais colhidas dos animais que coabitaram ou não com parceiros doentes. Finalmente, a parte 6 mostra os efeitos decorrentes do bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos sobre parâmetros imunes de camundongos que coabitaram ou não com parceiros doentes.

5.1 EFEITOS DO PROPRANOLOL SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Foram realizados dois experimentos:

5.1.1 Avaliação da atividade geral no campo aberto de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

Conforme descrito no item 4.3 foram utilizados um total 120 camundongos que constaram de 2 experimentos, os quais foram separados em trios de acordo com o peso corporal, e subdivididos em quatro grupos: CAS e CAD; CAS+P e CAD+P. O dia da injeção do tumor, denominado ED₁ (dia experimental 1), entre ED₆ a ED₁₁ os animais dos grupos CAS e CAD foram injetados (i.p) diariamente com solução salina (1mL/kg) e aqueles dos grupos CAS+P e CAD+P também por via i.p e diariamente com propranolol (20 mg/kg/dia), conforme ilustrado na Figura 6. No 12º dia de

convivência os animais companheiros dos inoculados com salina (CAS e CAS+P) ou tumor de Ehrlich (CAD e CAD+P) foram colocados individualmente no centro da arena do campo aberto para registro da atividade locomotora nas zonas central e periférica do campo aberto, como descrito no item 4.13.

5.1.1.2 Resultados

A Figura 8 mostra a trajetória dos animais dos diferentes grupos no campo aberto. Conforme a Tabela 1 mostra e a Figura 9 ilustra não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação à distância percorrida pelos animais dos diferentes grupos ($p>0,05$). Entretanto, conforme a Tabela 1 mostra e a figura 9 ilustra houve um aumento na velocidade média de locomoção nos coespecíficos que conviveram com o doente, em relação àqueles do grupo CAS; este parâmetro comportamental foi revertido pelo uso do propranolol ($F(3,35)=5,89$; $p<0,05$). Em relação ao tempo total de permanência na zona central do campo aberto também observamos uma diminuição deste parâmetro nos animais CAD, em relação àqueles do grupo CAS; este efeito foi revertido pelo propranolol ($F(3,35)=6,48$; $p<0,05$).

Tabela 1 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre a atividade geral em campo aberto em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Parâmetros	GRUPOS			
	CAS	CAS+P	CAD	CAD+P
Distância Percorrida (cm)	3022 $\pm$ 113.6	2976 $\pm$ 181.6	3452 $\pm$ 333.1	3324 $\pm$ 220.5
Velocidade Média (cm/s)	10.57 $\pm$ 0.23	10.54 $\pm$ 0.24	12.26 $\pm$ 0.37*/**	11.04 $\pm$ 0.26***
Tempo total na zona central	61.58 $\pm$ 1.99	71.08 $\pm$ 3.51	51.63 $\pm$ 1.50 */**	64.37 $\pm$ 1.70 ***

Legenda: Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Em relação à distância total percorrida e velocidade média foi utilizado ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas e em relação ao tempo total na zona central foi analisado por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. * $p<0,05$ em relação ao grupo CAS, ** $p<0,05$ em relação ao grupo CAS+P e *** $p<0,05$ em relação ao grupo CAD. n= 6-10 animais/grupo (2 experimentos). CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 8 - Representação da trajetória dos animais dos diferentes grupos na arena do campo aberto que foram submetidos ou não ao tratamento com propranolol (20mg/kg) e conviveram ou não com coespecíficos doentes

Fonte: (MARGATHO, R. O., 2015)

Legenda: CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 9 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre parâmetros comportamentais (A) Distância percorrida, (B) Velocidade média e (C) Tempo gasto na zona central do campo aberto em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Em relação à distância total percorrida e velocidade média foi utilizado ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas e em relação ao tempo total na zona central foi analisado por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CAS, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo CAS+P e *** $p < 0,05$ em relação ao grupo CAD. $n = 6-10$ animais/grupo (2 experimentos). CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

5.2 EFEITOS DO ICI-118,551 SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Foram realizados dois experimentos:

5.2.1 Avaliação da atividade geral no campo aberto de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

Conforme descrito no item 4.3 foram utilizados um total 138 camundongos que constaram de 2 experimentos, os quais foram separados em trios de acordo com o peso corporal, e subdivididos em quatro grupos: CAS e CAD; CAS+I e CAD+I. O dia da injeção do tumor, denominado ED₁ (dia experimental 1), entre ED₆ a ED₁₁ os animais dos grupos CAS e CAD foram injetados (i.p) diariamente com solução salina (1mL/kg) e aqueles dos grupos CAS+I e CAD+I também por via i.p e diariamente com ICI-118,551 (15 mg/kg/dia), conforme ilustrado na Figura 6. No 12º dia de convivência os animais companheiros dos inoculados com salina (CAS e CAS+I) ou tumor de Ehrlich (CAD e CAD+I) foram colocados individualmente no centro da arena do campo aberto para registro da atividade locomotora nas zonas central e periférica do campo aberto, como descrito no item 4.13.

5.2.1.1 Resultados

Conforme a Tabela 2 mostra e a Figura 10 ilustra não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação à distância percorrida ($F(3,37)=1,61$; $p>0,05$) e no tempo total de permanência na zona central do campo aberto pelos animais dos diferentes grupos ($F(3,36)=1,79$; $p>0,05$). Entretanto, houve um aumento na velocidade média de locomoção nos coespecíficos que conviveram com o doente, em relação àqueles do grupo CAS e CAS+I ($F(3,37)=4,18$; $p<0,05$), porém este parâmetro comportamental foi revertido pelo uso do ICI-118,551.

Tabela 2 - Efeitos do ICI-118,551 (15 mg/kg) sobre a atividade geral no campo aberto em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Parâmetros	GRUPOS			
	CAS	CAS+I	CAD	CAD+I
Distância Percorrida (cm)	4090 ± 188.3	3768 ± 402.1	4656 ± 329.9	3976 ± 258.2
Velocidade Média (cm/s)	14.9 ± 0.63	14.9 ± 0.60	17.6 ± 0.56 */**	15.23 ± 0.92
Tempo total na zona central	124.6 ± 8.82	128.5 ± 8.62	107.1 ± 4.80	110.7 ± 8.00

Legenda: os valores representam a média ± desvio padrão. Em relação à distância total percorrida e velocidade média foi utilizado ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas e em relação ao tempo total na zona central foi analisado por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. *p<0,05 em relação ao grupo CAS e **p<0,05 em relação ao grupo CAS+I. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

Figura 10 - Efeitos do ICI-118,551 (15 mg/kg) sobre parâmetros comportamentais (A) Distância percorrida, (B) Velocidade média e (C) Tempo gasto na zona central do campo aberto em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores representam a média ± desvio padrão. Em relação à distância total percorrida e velocidade média foi utilizado ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas e em relação ao tempo total na zona central foi analisado por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. *p<0,05 em relação ao grupo CAS e **p<0,05 em relação ao grupo CAS+I. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

5.3 EFEITOS DO PROPRANOLOL SOBRE OS NÍVEIS DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS EM ESTRUTURAS CEREBRAIS

Foram realizados dois experimentos:

5.3.1 Dosagem de monoaminas e de seus metabólitos no hipotálamo, bulbo olfatório, córtex frontal no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

Foram realizadas duas replicações iguais e utilizando um total de 138 camundongos separados ao acaso em trios de acordo com o peso corporal, conforme descrito no item 4.3. Os trios foram em sequência alocados em quatro grupos CAS, CAD, CAS+P e CAD+P. O dia da injeção do tumor, denominado ED₁ (dia experimental 1); entre ED₆ a ED₁₁ os animais dos grupos CAS e CAD foram injetados (i.p) diariamente com solução salina (1mL/kg) e aqueles dos grupos CAS+P e CAD+P também por via i.p e diariamente com propranolol (20 mg/kg), conforme ilustrado na Figura 6. No 12º dia de convivência os animais companheiros daqueles inoculados com salina (CAS e CAS+P) ou com tumor de Ehrlich (CAD e CAD+P) foram submetidos à eutanásia por decaptação e suas estruturas cerebrais foram coletadas, como descrito no item 4.11, para análise dos níveis de monoaminas e de seus metabólitos; especificamente: noradrenalina (NOR) e o metabólito ácido vanilmandélico (VMA); dopamina (DA) e os metabólitos ácido 3,4 diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 4 hidroxí 3-metil homovanílico (HVA); serotonina (5HT) e o metabólito ácido 5-hidroxí 3-indolacético (5HIAA). Desta forma, foi possível inferir os dados de *turnover* destes neurotransmissores nestes animais conforme especificado no item 4.11.

5.3.1.1 Resultados

Os níveis de monoaminas foram obtidos em duas replicações; dados obtidos foram agrupados para análise estatística e interpretação. Os resultados obtidos serão apresentados por estrutural cerebral, a saber: hipotálamo, córtex frontal e bulbo olfatório.

5.3.2 Efeitos do propranolol sobre os níveis de noradrenalina e do metabólito ácido vanilmandélico (VMA) no hipotálamo de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

A Tabela 3 mostra e a Figura 11 ilustra os níveis de noradrenalina e do ácido vanilmandélico (VMA) no hipotálamo. A análise estatística dos dados mostrou que os animais do grupo CAD apresentaram redução nos níveis de noradrenalina, em relação ao grupo CAS, e que o bloqueio com propranolol reverteu tais alterações ($F(3,32)=5,97$; $p<0,05$). Os níveis do metabólito VMA, que estavam aumentados nos animais do grupo CAD, em relação aos do grupo CAS, também foram revertidos pelo propranolol ($F(3,32)=7,06$; $p<0,05$). Não houve diferença estatística no *turnover* de noradrenalina no hipotálamo ($F(3,32)=1,15$; $p>0,05$). Análise adicional dos dados mostra que o desvio-padrão das médias foi elevado no grupo de animais que conviveram com os doentes (CAD) foi elevado.

Tabela 3 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina, de ácido vanilmandélico (VMA) e sobre o *turnover* de noradrenalina no hipotálamo em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Estrutura Cerebral - Hipotálamo				
GRUPOS				
Parâmetros	CAS	CAS+P	CAD	CAD+P
Noradrenalina	1270 ±25.40	1175 ±87.07	1028 ±19.16 *	1277 ±20.30 **
Ácido vanilmandélico	612.1 ±41.88	672.3 ± 30.59	932.3 ±120.8 *	496.8±44.17 **
VMA/NOR	0.56 ±0.02	0.50 ±0.04	0.99±0.46	0.44 ±0.08

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média ± desvio padrão (n=8/grupo). ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar o parâmetro VMA; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar os parâmetros NOR e VMA/NOR. * p<0,05 em relação ao grupo CHP e ** p<0,05 em relação ao grupo CSP. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 11 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina (A), VMA (B) e sobre o *turnover* de noradrenalina (C) no hipotálamo em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média ± desvio padrão (n=8/grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar o parâmetro VMA; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar os parâmetros NOR e VMA/NOR. * p<0,05 em relação ao grupo CAS e ** p<0,05 em relação ao grupo CAD. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

5.3.3 Efeitos do propranolol sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no bulbo olfatório de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

A Tabela 4 mostra e as Figuras 12 a 14 ilustram os níveis e o *turnover* de dopamina, serotonina e noradrenalina assim como dos níveis de seus metabólitos no bulbo olfatório. Os dados mostram que o tratamento com propranolol não modificou os níveis de nenhuma das monoaminas; especificamente: dopamina ($F(3,34)=0,48$; $p>0,05$), serotonina ($F(3,32)=0,23$; $p>0,05$) e noradrenalina ($F(3,34)=0,19$; $p>0,05$). A análise estatística dos dados também não mostrou diferença nos níveis dos metabólitos DOPAC ($F(3,34)=0,60$; $p>0,05$), HIAA ($F(3,34)=0,33$; $p>0,05$). Entretanto, observamos um aumento no *turnover* de serotonina ($F(3,33)=37,49$; $p<0,05$) e fato que não foi revertido pelo propranolol.

Tabela 4 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no bulbo olfatório em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Estrutura Cerebral – Bulbo Olfatório
GRUPOS

Parâmetros	CAS	CAS+P	CAD	CAD+P
Dopamina (DA)	193.8 ±22.10	177.3 ±20.18	208.5 ±16.44	217.5±34.61
DOPAC	24.58 ±3.38	25.51 ±2.06	29.63 ±3.18	29.11 ±3.55
DOPAC/DA	0.14 ±0.02	0.13 ±0.02	0.15 ±0.02	0.15 ±0.02
Noradrenalina	315.4 ±15.85	292.8 ±30.35	327.2 ± 19.13	331.8 ± 63.60
VMA	2365 ±150.3	2170 ±30.44	2171 ±25.94	2074 ±103.9
Serotonina (5-HT)	2810 ±154.6	2413 ±310.5	2499 ±233.2	2587 ±475.1
HIAA	1336± 215	1391±197.7	1564 ±198.6	1557±168
HIAA/5-HT	0.43 ±0.02	0.39 ±0.02	0.75 ±0.02 */ **	0.74 ±0.04 */ **

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média ± desvio padrão (n=8/grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar os parâmetros NOR, HIAA, DA e DOPAC/DA; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar os parâmetros VMA, DOPAC, 5-HT e HIAA/5-HT. * $p<0,05$ em relação ao grupo CAS e ** $p<0,05$ em relação ao grupo CAS+P. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 12 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de dopamina (A), assim como do seu metabólito DOPAC (B) e o *turnover* de DA (C) no bulbo olfatório de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n=8$ /grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar os parâmetros DA e DOPAC/DA; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar o parâmetro DOPAC. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 13 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de serotonina (A), assim como do seu metabólito HIAA (B) e o turnover de 5-HT (C) no bulbo olfatório em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n = 8/\text{grupo}$). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar o parâmetro HIAA; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar os parâmetros 5-HT e HIAA/5-HT. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CAS e ** $p < 0,05$ em relação ao grupo CAS+P. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 14 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina (A) assim como do seu metabólito VMA (B) no bulbo olfatório em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n=8$ /grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar o parâmetro NOR; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar o parâmetro VMA. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

5.3.4 Efeitos do propranolol sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no córtex frontal de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

A Tabela 5 mostra e as Figuras 15 e 16 ilustram os níveis de dopamina e de serotonina, assim como de seus metabólitos, no córtex frontal de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes. A análise estatística dos dados não mostrou diferenças estatísticas nos níveis de dopamina ($F(3,35)=1,15$; $p>0,05$) nem de seus metabólitos DOPAC ($F(3,17)=2,21$; $p>0,05$) ou HVA ($F(3,34)=0,87$; $p>0,05$), também o turnover de dopamina não foi estatisticamente diferente entre os grupos. Os níveis de serotonina ($F(3,37)=0,81$; $p>0,05$) e o turnover de serotonina ($F(3,32)=0,65$; $p>0,05$) também não foram alterados entre os animais dos diferentes grupos.

Tabela 5 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de dopamina e de seus metabólitos DOPAC e HVA e de serotonina e seu metabólito HIAA, assim como o *turnover* de DA e 5-HT no córtex frontal de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Estrutura Cerebral – Córtex Frontal				
GRUPOS				
Parâmetros	CAS	CAS+P	CAD	CAD+P
Dopamina (DA)	33.06 ±7.37	48.19±10.69	29.09 ±7.98	51.70 ±9.07
DOPAC	31.63 ±6.16	18.12 ±3.95	21.76 ± 2.17	18.54± 2.97
DOPAC/DA	1.47±0.45	0.66 ±0.13	1.51 ±0.42	0.44 ±0.07
HVA	62.83±5.69	57.44 ±6.19	48.70 ±7.01	54.06 ±6.52
HVA/DA	4.19±1.68	2.41 ±0.72	3.31 ±1.28	1.54±0.42
5-HT	4933 ±380.2	5561 ±440.8	5219 ±364.5	5760 ±410.8
HIAA/5-HT	0.50 ±0.09	0.44 ±0.06	0.50 ±0.09	0.36 ±0.05

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média ± desvio padrão (n=8/grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar os parâmetros HIAA, DOPAC, HVA e DA; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar os parâmetros 5-HT, HVA/DA e HIAA/5-HT. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 15 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de dopamina (A), DOPAC (B) e HVA (C) e sobre o *turnover* de dopamina (DOPAC/DA em D e HVA/DA em E) no córtex frontal em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média ± desvio padrão (n=8/grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar os parâmetros DOPAC e DA; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar o parâmetro HVA/DA. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 16 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre os níveis de serotonina/5-HT (A) e sobre o turnover de serotonina (B) no córtex frontal em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n=8$ /grupo). O teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar os parâmetros 5-HT e HIAA/5-HT. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

5.4 EFEITOS DO ICI-118,551 SOBRE OS NÍVEIS DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS EM ESTRUTURAS CEREBRAIS

Foram realizados dois experimentos:

5.4.1 Dosagem de monoaminas e de seus metabólitos no hipotálamo, bulbo olfatório, córtex frontal e estriado no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

Foram realizadas duas replicações iguais e utilizando um total de 138 camundongos separados ao acaso em trios de acordo com o peso corporal, conforme descrito no item 4.3. Os trios foram em sequência alocados em quatro grupos CAS, CAD, CAS+I e CAD+I. O dia da injeção do tumor, denominado ED₁ (dia experimental 1); entre ED₆ a ED₁₁ os animais dos grupos CAS e CAD foram

injetados (i.p) diariamente com solução salina (1mL/kg) e aqueles dos grupos CAS+I e CAD+I também por via i.p e diariamente com ICI-118,551 (15 mg/kg), conforme ilustrado na Figura 6. No 12º dia de convivência os animais companheiros daqueles inoculados com salina (CAS e CAS+I) ou com tumor de Ehrlich (CAD e CAD+I) foram submetidos à eutanásia por decaptação e suas estruturas cerebrais foram coletadas, como descrito no item 4.11, para análise dos níveis de monoaminas e de seus metabólitos; especificamente: noradrenalina (NOR); dopamina (DA) e os metabólitos ácido 3,4 diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 4 hidroxí 3-metil homovanílico (HVA); serotonina (5-HT) e o metabólito ácido 5-hidroxí 3-indolacético (5HIAA). Desta forma, foi possível inferir os dados de *turnover* destes neurotransmissores nestes animais conforme especificado no item 4.11.

5.4.1.1 Resultados

Os níveis de monoaminas foram obtidos em duas replicações; dados obtidos foram agrupados para análise estatística e interpretação. Os resultados obtidos serão apresentados por estrutura cerebral, a saber: hipotálamo, córtex frontal e bulbo olfatório.

5.4.2 Efeitos do ICI-118,551 sobre os níveis de noradrenalina no hipotálamo de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

A Tabela 6 mostra e a Figura 17 ilustra os níveis de noradrenalina no hipotálamo. Não houve diferença estatística nos níveis de noradrenalina no hipotálamo ($F(3,32)=2,01$; $p>0,05$).

Tabela 6 - Efeitos do ICI-118,551 (15 mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina no hipotálamo em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Estrutura Cerebral - Hipotálamo				
GRUPOS				
Parâmetros	CAS	CAS+I	CAD	CAD+I
Noradrenalina	1568 ± 120.0	1472 ± 111.5	1265 ± 81.7	1228 ± 125.9

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média ± desvio padrão (n=4-8/grupo). ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar o parâmetro NOR. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

Figura 17 - Efeitos do ICI-118,551 (15 mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina no hipotálamo em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média ± desvio padrão (n=4-8/grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar o parâmetro NOR. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

5.4.3 Efeitos do ICI-118,551 sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no bulbo olfatório de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

A Tabela 7 mostra e as Figuras 18 a 20 ilustram os níveis e o *turnover* de dopamina, serotonina e noradrenalina assim como dos níveis de seus metabólitos no bulbo olfatório. Os dados mostram que o tratamento com ICI-118,551 não modificou os níveis de nenhuma das monoaminas; especificamente: dopamina ($F(3,17)=0,29$; $p>0,05$), serotonina ($F(3,18)=2,09$; $p>0,05$) e noradrenalina ($F(3,17)=2,00$; $p>0,05$). A análise estatística dos dados também não mostrou diferença nos níveis dos metabólitos DOPAC ($F(3,19)=0,39$; $p>0,05$), HIAA ($F(3,18)=0,63$; $p>0,05$), também o

turnover de serotonina ($F(3,31)=0,41$; $p>0,05$) e no *turnover* de dopamina ($F(3,18)=1,01$; $p>0,05$) não foi estatisticamente diferente entre os grupos.

Tabela 7 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina, noradrenalina e serotonina, assim como o metabólito da dopamina (DOPAC) e da serotonina (HIAA) e o *turnover* de 5-HT e DA no bulbo olfatório de animais que conviveram ou não com coespecífico

Estrutura Cerebral – Bulbo Olfatório
GRUPOS

Parâmetros	CAS	CAS+I	CAD	CAD+I
Dopamina (DA)	246.5 ±20.69	237.5 ±39.37	253.0 ±12.26	221.2±30.04
DOPAC	90.54 ±9.33	97.30 ±24.50	77.70 ±8.42	96.24 ±14.40
DOPAC/DA	0.37 ±0.03	0.43 ±0.07	0.31 ±0.03	0.36 ±0.05
Noradrenalina	185.7 ±10.96	181.0 ±15.54	226.6 ± 14.16	202.3 ± 22.80
Serotonina (5-HT)	1364 ±134.60	1171 ±64.31	1321 ±53.16	1639 ±177.50
HIAA	267± 16.44	301.6±48.83	258.5 ±12.08	248.6±32.68
HIAA/5-HT	0.20 ±0.01	0.24 ±0.02	0.24 ±0.01	0.22 ±0.04

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média ± desvio padrão (n=4-8/grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar os parâmetros NOR, 5-HT, HIAA, DOPAC, DA e DOPAC/DA; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar o parâmetro HIAA/5-HT. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

Figura 18 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina (A), assim como do seu metabólito DOPAC (B) e o *turnover* de DA (C) no bulbo olfatório de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n=4-8$ /grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar os parâmetros DA, DOPAC, e DOPAC/DA. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

Figura 19 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de serotonina (A), assim como do seu metabólito HIAA (B) e o *turnover* de 5-HT (C) no bulbo olfatório em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n = 4-8$ /grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar os parâmetros 5-HT, HIAA e HIAA/5-HT. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

Figura 20 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina no bulbo olfatório em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n=4-8$ /grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar o parâmetro NOR; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar o parâmetro VMA. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

5.4.4 Efeitos do ICI-118,551 sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no córtex frontal de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

A Tabela 8 mostra e as Figuras 21 e 22 ilustram os níveis de dopamina e de serotonina, assim como de seus metabólitos, no córtex frontal de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes. A análise estatística dos dados não mostrou diferenças estatísticas nos níveis de dopamina ($F(3,16)=0,76$; $p>0,05$) nem de seus metabólitos DOPAC ($F(3,15)=0,36$; $p>0,05$) ou HVA ($F(3,17)=0,75$; $p>0,05$), também o turnover de dopamina, isto é, DOPAC/DA ($F(3,17)=1,11$; $p>0,05$) ou HVA/DA ($F(3,33)=1,53$; $p>0,05$), não foi estatisticamente diferente entre os grupos. Os níveis de serotonina ($F(3,16)=0,49$; $p>0,05$), de HIAA ($F(3,16)=1,61$; $p>0,05$) e o *turnover* de serotonina ($F(3,16)=0,70$; $p>0,05$) também não foram alterados entre os animais dos diferentes grupos.

Tabela 8 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina e de seus metabólitos DOPAC e HVA e de serotonina e seu metabólito HIAA, assim como o turnover de DA e 5-HT no córtex frontal de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Estrutura Cerebral – Córtex Frontal

GRUPOS

Parâmetros	CAS	CAS+I	CAD	CAD+I
Dopamina (DA)	33.06 ±7.37	48.19±10.69	29.09 ±7.98	51.70 ±9.07
DOPAC	56.18 ±6.78	56.50 ±8.44	63.94 ± 7.06	64.86± 8.72
DOPAC/DA	1.38±0.11	1.03 ±0.16	1.04 ±0.19	1.13 ±0.20
HVA	121.8±34.07	79.85 ±33.18	78.60±38.35	59.38±16.0
HVA/DA	1.59±0.25	1.26 ±0.33	0.90 ±0.22	1.02±0.20
5-HT	2785 ±347.5	2681 ±472.4	2276 ±139.4	2625 ±281.2
HIAA	374.1 ±42.18	368.2 ±49.33	260.7 ±45.33	323.6±26.09
HIAA/5-HT	0.15 ±0.03	0.14 ±0.01	0.11 ±0.01	0.12 ±0.01

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média ± desvio padrão (n=4-8/grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar todos os parâmetros. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

Figura 21 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina (A), DOPAC (B) e HVA (C) e sobre o *turnover* de dopamina (DOPAC/DA em D e HVA/DA em E) no córtex frontal em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n=4-8$ /grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar os parâmetros DOPAC e DA; o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar o parâmetro HVA/DA. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

Figura 22 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de serotonina-5-HT (A), HIAA (B) e sobre o *turnover* de serotonina (C) no córtex frontal em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n=4-8$ /grupo). O teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para avaliar os parâmetros 5-HT e HIAA/5-HT. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

5.4.5 Efeitos do ICI-118,551 sobre os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no estriado de animais no 12º dia de convivência com coespecíficos saudáveis ou doentes

A Tabela 9 mostra e a Figura 23 ilustra os níveis de dopamina e de seus metabólitos (DOPAC e HVA) no corpo estriado de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes. A análise estatística dos dados não mostrou diferenças estatísticas nos níveis de dopamina ($F(3,16)=0,28$; $p>0,05$) nem de seus metabólitos DOPAC ($F(3,18)=0,41$; $p>0,05$) ou HVA ($F(3,18)=0,82$; $p>0,05$), também o *turnover*

de dopamina, isto é, DOPAC/DA ($F(3,19)=1,21$; $p>0,05$) ou HVA/DA ($F(3,40)=3,86$; $p>0,05$), não foi estatisticamente diferente entre os grupos.

Tabela 9 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina e de seus metabólitos DOPAC e HVA no estriado de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes
Estrutura Cerebral – Estriado

GRUPOS				
Parâmetros	CAS	CAS+I	CAD	CAD+I
Dopamina (DA)	8959±870.9	9077±633.7	8265 ±878.2	8016±1267
DOPAC	967.2±158.4	945.3 ±120.4	773.6 ± 102.3	843.1± 166.9
DOPAC/DA	0.11±0.008	0.10 ±0.006	0.09 ±0.005	0.09 ±0.007
HVA	1041±125.8	1065±72.5	878.2±79.9	864.5±132.5
HVA/DA	0.11±0.005	0.12 ±0.006	0.10 ±0.006	0.09±0.004

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média ± desvio padrão (n=4-8/grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar todos os parâmetros. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

Figura 23 - Efeitos do ICI-118,551 (15mg/kg) sobre os níveis de dopamina (A), DOPAC (B) e HVA (C) e sobre o *turnover* de dopamina (DOPAC/DA em D e HVA/DA em E) no estriado em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: os valores constam de dois experimentos e estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n=4-8$ /grupo). Anova de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer foi utilizado para avaliar todos os parâmetros. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

6 EFEITOS DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES BETA-ADRENÉRGICOS SOBRE PARÂMETROS IMUNES

Na parte 6 foram realizados quatro experimentos:

6.1 EXPERIMENTO 1 - EFEITOS DO PROPRANOLOL SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA, PESO RELATIVO DAS ADRENAIS E CELULARIDADE DA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS NO 12º DIA DE CONVIVÊNCIA COM COESPECÍFICOS SAUDÁVEIS OU DOENTES

Foram utilizados 120 camundongos separados em trios de acordo com o peso corporal, conforme descrito no item 4.3; estes animais foram alocados ao acaso em quatro grupos: CAS e CAD; CAS+P e CAD+P. O dia da injeção do tumor foi denominado ED₁ (dia experimental 1), entre ED₆ a ED₁₁ os animais dos grupos CAS e CAD foram injetados (i.p) diariamente com solução salina (1 mL/kg) e aqueles dos grupos CAS+P e CAD+P também i.p e diariamente com propranolol (20mg/kg), conforme ilustrado na Figura 6. No 12º dia de convivência coletaram-se amostras de sangue dos animais companheiros dos inoculados com salina (CAS e CAS+P) ou com células do tumor de Ehrlich (CAD e CAD+P) para a análise dos níveis séricos de corticosterona, conforme descrito no item 4.12. Além disso, conforme descrito no item 4.7, foram coletadas as adrenais para o cálculo do peso relativo e foi feita a coleta da medula óssea para a contagem de células, conforme descrito no item 4.6.

6.1.1 Resultados

A Figura 24 ilustra os efeitos do propranolol sobre os níveis séricos de corticosterona em animais que conviveram ou não com camundongos portadores do tumor de Ehrlich durante 12 dias. Observa-se que em relação ao grupo controle,

não se verificaram alterações significantes dos níveis hormonais dos animais dos diferentes grupos ($F(3,23)=0,22$; $p>0,05$). Conforme ilustrado pela Figura 25, em relação ao peso relativo das adrenais, também não se observaram alterações significantes entre os grupos ($F(3,18)=0,94$; $p>0,05$). De igual forma, e conforme ilustra a Figura 26, a análise estatística dos dados não mostrou diferença no número absoluto de células da medula óssea ($F(3,19)=0,66$; $p>0,05$).

Figura 24 - Efeitos do propranolol (20 mg/kg) sobre os níveis de corticosterona sérica de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer ($p>0,05$). Os valores são representativos de média $\pm$ desvio-padrão; $n=5-9$ animais/grupo. CHP = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CSP) com propranolol.

Figura 25 - Efeitos do propranolol (20 mg/kg) sobre o peso relativo das adrenais (em gramas) de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer ($p>0,05$). Os valores são representativos de média $\pm$ desvio-padrão; $n=5-9$ animais/grupo. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 26 - Efeitos do propranolol (20 mg/kg) sobre a celularidade da medula óssea de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer ($p > 0.05$). Os valores são representativos de média $\pm$ desvio-padrão; $n=5-9$ animais/grupo. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAD) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

6.2 EXPERIMENTO 2 - EFEITOS DO PROPRANOLOL SOBRE A POPULAÇÃO DE CÉLULAS NK NO SANGUE E NO BAÇO DE ANIMAIS NO 12º DIA DE CONVIVÊNCIA COM COESPECÍFICOS SAUDÁVEIS OU DOENTES

Foram utilizados 120 camundongos que foram separados em trios de acordo com o peso corporal, conforme descrito no item 4.3. os animais foram alocados ao acaso em quatro grupos: CAS e CAD; CAS+P e CAD+P. O dia da injeção do tumor foi denominado ED₁ (dia experimental 1) e entre ED₆ a ED₁₁ os animais dos grupos CAS e CAD foram injetados (i.p) diariamente com solução salina (1mL/kg) e aqueles dos grupos CAD+P e CAS+P também pela via i.p e diariamente com propranolol (20 mg/kg), conforme ilustrado na Figura 6. As amostras de sangue dos animais companheiros dos inoculados com salina ou tumor de Ehrlich foram colhidas no ED12 para avaliação das células NK sanguíneas, conforme descrito no item 4.10. Em sequência coletou-se o baço para realização dos procedimentos descritos no item 4.10 avaliando-se as células NK esplênicas.

6.2.1 Resultados

A Tabela 10 mostra e a Figura 27 ilustra os efeitos do propranolol sobre a porcentagem e o perfil de ativação de células *natural killer* (NK) no sangue e no baço. Observamos que os animais que conviveram com companheiro doente apresentaram uma redução na porcentagem de células NK no sangue e uma reversão desta diminuição após o propranolol ($F(3,27)=9,04$; $p<0,05$). Por outro lado, observamos um aumento das células NK esplênicas no grupo de animais CAD, ainda que não significativo em relação ao grupo de animais CAS, com reversão deste aumento pelo propranolol ($F(3,40)=4,39$; $p=0,009$).

Conforme a Tabela 10 mostra e a Figura 27 ilustra o perfil de ativação das células NK do sangue não variou entre os animais dos diferentes grupos ($F(3,28)=0,69$; $p>0,05$). Em relação às NK esplênicas, o perfil de ativação das células NK do sangue também não variaram entre os animais dos grupos CAS e CAD; apesar disso, os animais que conviveram com o doente apresentaram um aumento estatisticamente significativo no perfil de ativação da molécula CD69 em relação aos do grupo CAS+P ($F(3,32)=3,78$; $p<0,05$).

Tabela 10 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre a porcentagem e o perfil de ativação de células *natural killer* (NK) no sangue e no baço de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Parâmetros	GRUPOS			
	CAS	CAS+P	CAD	CAD+P
% Célis NK - sangue	1.09 $\pm$ 0.06	1.08 $\pm$ 0.21	0.18 $\pm$ 0.05 */**	0.93 $\pm$ 0.13 ***
% Célis NK - baço	1.09 $\pm$ 0.04	1.23 $\pm$ 0.02	1.39 $\pm$ 0.12	0.99 $\pm$ 0.04 ***
Célis NK + CD69+ sangue	32.20 $\pm$ 1.30	31.61 $\pm$ 1.32	36.54 $\pm$ 3.32	31.64 $\pm$ 0.77
Célis NK + CD69+ baço	26.61 $\pm$ 0.36	25.78 $\pm$ 0.39	36.5 $\pm$ 4.15	23.19 $\pm$ 1.35 ***

Legenda: Os valores são representativos de média $\pm$ desvio-padrão. Teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas para as análises da porcentagem de NK no sangue e baço. * $p<0,05$ em relação ao grupo CAS, ** $p<0,05$ em relação ao grupo CAS+P e *** $p<0,05$ em relação ao grupo CAD. n= 7-10 animais/grupo (2 experimentos). CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 27 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre a porcentagem de células *natural killer* (NK) no sangue e baço de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: Os valores são representativos de média $\pm$ desvio-padrão. Teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas para as análises de sangue e baço. *p<0,05 em relação ao grupo CAS, **p<0,05 em relação ao grupo CAS+P e ***p<0,05 em relação ao grupo CAD. n=7-10 animais/grupo (2 experimentos). CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 28 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre o perfil de ativação de células *natural killer* (NK) no sangue (A) e baço (B) de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: Os valores são representativos de média $\pm$ desvio-padrão da média de fluorescência. Para amostras do baço e sangue foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. ***p<0,05 em relação ao grupo CAD; n=7-10 animais/grupo (2 experimentos). CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

6.3 EXPERIMENTO 3 - EFEITOS DO ICI-118,551 SOBRE A POPULAÇÃO DE CÉLULAS NK NO SANGUE E NO BAÇO DE ANIMAIS NO 12º DIA DE CONVIVÊNCIA COM COESPECÍFICOS SAUDÁVEIS OU DOENTES:

Foram utilizados 138 camundongos os quais foram separados ao acaso em duplas de acordo com o peso corporal, conforme descrito no item 4.3. Estas duplas de animais foram alocadas em quatro grupos: CAS, CAD, CAS+I e CAD+I. O dia da injeção do tumor foi denominado ED₁ (dia experimental 1) e entre ED₆ a ED₁₁ os

animais dos grupos CAS e CAD foram injetados (i.p) diariamente com solução salina (1mL/kg) e aqueles dos grupos CAS+I e CAD+I também pela via i.p e diariamente com ICI-118,551 (15 mg/kg/dia), conforme ilustrado na Figura 6. No ED12, as amostras de sangue dos animais companheiros dos inoculados com salina ou tumor de Ehrlich foram coletadas para avaliação das células NK sanguíneas, conforme descrito no item 4.10. Em referência os baços foram coletados para realização dos procedimentos descritos no item 4.10 e avaliação das NK esplênicas.

6.3.1 Resultados

A Tabela 11 mostra e a Figuras 29 ilustra a porcentagem de células NK do baço não variou entre os diferentes grupos de animais ($F(3,32)=1,94$; $p>0,05$). Entretanto, houve diminuição na porcentagem de células NK do sangue de animais que convivem com os doentes, em relação ao grupo de animais CAS ($F(3,21)=4.11$; $p<0,05$) e, porém, a administração de ICI-118,551 não reverteu este perfil. A tabela 11 mostra e a figura 30 ilustra que o perfil de ativação das células NK do sangue não variou entre os diferentes grupos de animais ($F(3,27)=1,31$; $p>0,05$). Entretanto, em relação às NK esplênicas, os animais que convivem com os doentes apresentaram um aumento no perfil de ativação da molécula CD69, em relação ao grupo de animais CAS; os dados também mostram que a administração de ICI-118,551 reverteu este perfil ($F(3,31)=7,5$; $p<0,05$).

Tabela 11 - Efeitos do fármaco ICI-118,551 (15mg/kg) sobre a porcentagem e o perfil de ativação de células *natural killer* (NK) no sangue e baço de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Parâmetro	GRUPOS			
	CAS	CAS+I	CAD	CAD+I
% Célis NK - sangue	11.28 ± 0.93	6.87 ± 0.38	7.18 ± 1.21 *	7.87 ± 0.91
% Célis NK - baço	6.91 ± 0.33	6.60 ± 0.29	6.09 ± 0.43	5.54 ± 0.71
Célis NK CD69+ sangue	54.94 ± 0.72	56.48 ± 1.00	58.95 ± 2.90	56.42 ± 1.24
Célis NK CD69+ baço	4.77 ± 0.14	4.74 ± 0.16	9.18 ± 1.98 */**	3.94 ± 0.32 ***

Legenda: os valores são representativos de média ± desvio-padrão. Para a porcentagem de células NK no sangue e baço e expressão da molécula CD69 no baço foi utilizado ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas e para expressão de CD69 no sangue por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. *p<0,05 em relação ao grupo CAS, **p<0,05 em relação ao grupo CAS+I e ***p<0,05 em relação ao grupo CAD. n= 7-10 animais/grupo (2 experimentos). CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 29 - Efeitos do ICI-118,551 (15 mg/kg) sobre a porcentagem de células *natural killer* (NK) no sangue e baço de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: Os valores são representativos de média ± desvio-padrão. Teste Anova de uma via seguido pelo teste de Kruskal-Wallis para as análises de sangue e baço. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

Figura 30 - Efeitos do fármaco ICI-118,551 (15mg/kg) sobre o perfil de ativação de células *natural killer* (NK) no sangue (A) e baço (B) de animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Legenda: Os valores são representativos de média $\pm$ desvio-padrão. Para amostras do sangue e do baço foi utilizado ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CAS, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo CAS+I e *** $p < 0,05$ em relação ao grupo CAD. $n = 7-10$ animais/grupo (2 experimentos). CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+I) ou não tratados (CAS) com ICI-118,551; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+I) ou não tratados (CAD) com ICI-118,551.

6.4 EXPERIMENTO 4 – EFEITOS DO PROPRANOLOL SOBRE O BURST OXIDATIVO E SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS NO 12º DIA DE CONVIVÊNCIA COM COESPECÍFICOS SAUDÁVEIS OU DOENTES

Foram utilizados 120 camundongos os quais foram separados em trios de acordo com o peso corporal, conforme descrito no item 4.3; os trios de animais foram alocados em quatro grupos: CAS e CAD; CAS+P e CAD+P. O dia da injeção do tumor, foi denominado ED₁ (dia experimental 1), entre ED₆ a ED₁₁ os animais dos grupos CAS e CAD foram injetados (i.p) diariamente com solução salina (1mL/kg) e aqueles dos grupos CAS+P e CAD+P também por via i.p e diariamente com propranolol (20 mg/kg/dia), conforme ilustrado na Figura 6. As amostras de sangue dos animais companheiros dos inoculados com salina ou tumor de Ehrlich foram colhidas no dia ED₁₂, conforme descrito no item 4.5, para avaliação do *burst* oxidativo e da atividade fagocítica de neutrófilos, conforme descrito no item 4.9.

6.4.1 Resultados

A Tabela 12 mostra e as Figuras de 31 a 38 ilustram os efeitos produzidos pela administração de propranolol (20mg/kg) sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos. A análise estatística dos dados não mostrou diferenças estatísticas em relação ao *burst* oxidativo basal de neutrófilos induzido por DCFH ($F(3,32)=0,69$; $p>0,05$), conforme a Tabela 12 mostra e a Figura 32 ilustra. Entretanto, conforme as Figuras 34 a 36 ilustram, houve redução do *burst* oxidativo induzido por PMA ($F(3,29)=27,34$; $p<0,05$) e SAPI ($F(3,28)=7,85$; $p<0,05$), respectivamente, em animais que conviveram com os doentes, em relação ao grupo de animais CAS; no entanto, também para este parâmetro não se observou reversão pelo uso do propranolol ($p>0,05$). De maneira similar, conforme ilustra a Figura 38, a intensidade com que neutrófilos fagocitam bactérias SAPI foi menor ($F(3,27)=6,21$; $p<0,05$) nos animais que conviveram com os doentes em relação ao do grupo de animais CAS; no entanto, não houve reversão deste parâmetro com o propranolol ($p>0,05$). Em relação à porcentagem de bactérias fagocitadas por neutrófilos também não houve qualquer alteração induzida pelo convívio com parceiros doentes assim como pelo tratamento com o propranolol ($p>0,05$).

Tabela 12 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre parâmetros de *burst* oxidativo e de fagocitose de neutrófilos sanguíneos em animais que conviveram ou não com coespecíficos doentes

Parâmetros	GRUPOS			
	CAS	CAS+P	CAD	CAD+P
DCFH	204.6 ± 4.99	202.7 ± 15.47	184.0 ± 10.14	189.6 ± 13.28
Burst - PMA	778.0 ± 62.92	807.0 ± 69.09	411.2 ± 13.8 ^{*/**}	520.8 ± 87.7 ^{*/**}
Burst - S. aureus	716.2 ± 41.89	684.6 ± 56.43	408.0 ± 56.05 ^{*/**}	587.0 ± 59.46 ^{*/**}
Intens de Fagoc	24.42.6 ± 1.39	22.32 ± 1.45	18.37 ± 1.22 [*]	18.98 ± 0.80 [*]
% de fagocitose	99.9 ± 0.04	99.3 ± 0.04	98.7 ± 0.04	99.1 ± 0.04

Legenda: os valores constam de dois experimentos e representam a intensidade média de fluorescência (média ± desvio padrão) correspondente ao gate da população de neutrófilos. Os parâmetros burst oxidativo induzido por SAPI, a porcentagem e a intensidade de fagocitose foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer; o burst oxidativo basal (DCFH) e aquele induzido por PMA foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. ^{*} $p<0,05$ em relação ao grupo CAS, ^{**} $p<0,05$ em relação ao grupo CAS+P. (n= 8/grupo). CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 31 - *Burst* oxidativo basal dos neutrófilos (DCFH)

Legenda: *Burst* Basal dos neutrófilos induzido por DCFH. As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*) do aparelho que avalia o tamanho e a complexidade. A população de neutrófilos foi selecionada a partir do dot-plot FSC-SSC e a intensidade de fluorescência emitida foi avaliada através de um histograma. Posteriormente foi calculada a intensidade média de fluorescência.

Figura 32 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre parâmetros de *burst* oxidativo basal de neutrófilos (DCFH) a partir de amostras sanguíneas de animais que conviveram em relação aos animais que não conviveram com coespecíficos doentes

Legenda: Os valores constam de dois experimentos e representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão), correspondente ao gate da população de neutrófilos. Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. $p > 0,05$ em relação a todos os grupos; $n = 8/\text{grupo}$. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 33 - *Burst* Oxidativo dos neutrófilos induzido por PMA

Legenda: *Burst* dos neutrófilos induzido por PMA. As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*) do aparelho que avalia o tamanho e a complexidade. A população de neutrófilos foi selecionada a partir do dot-plot FSC-SSC e a intensidade de fluorescência emitida foi avaliada através de um histograma. Posteriormente foi calculada a intensidade média de fluorescência.

Figura 34 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA a partir de amostras sanguíneas de animais que conviveram em relação aos animais que não conviveram com coespecíficos doentes

Legenda: Os valores constam de dois experimentos e representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão), correspondente ao gate da população de neutrófilos. Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CAS, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo CAS+P; $n = 8/\text{grupo}$. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 35 - *Burst* Oxidativo dos neutrófilos induzido por SAPI

Legenda: *Burst* oxidativo de neutrófilos induzido por SAPI. As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*) do aparelho que avalia o tamanho e a complexidade. A população de neutrófilos foi selecionada a partir do dot-plot FSC-SSC e a intensidade de fluorescência emitida foi avaliada através de um histograma. Posteriormente foi calculada a intensidade média de fluorescência.

Figura 36 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre o *burst* oxidativo induzido por SAPI a partir de amostras sanguíneas de animais que conviveram em relação aos animais que não conviveram com coespecíficos doentes

Legenda: Os valores constam de dois experimentos e representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão), correspondente ao gate da população de neutrófilos. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CHP, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo CAS+P; $n = 8$ /grupo. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

Figura 37 - Porcentagem e Intensidade de Fagocitose de neutrófilos

Legenda: avaliação da porcentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias SAPI marcadas com PI e da quantidade de bactérias fagocitadas por neutrófilos (intensidade de fagocitose) através da média de fluorescência emitida. As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*) do aparelho que avalia o tamanho e a complexidade. A população de neutrófilos foi selecionada a partir do dot-plot FSC-SSC e a intensidade de fluorescência emitida foi avaliada através de um histograma. Posteriormente foi calculada a intensidade média de fluorescência.

Figura 38 - Efeitos do propranolol (20mg/kg) sobre a porcentagem (A) e a intensidade de fagocitose (B) de neutrófilos a partir de amostras sanguíneas de animais que conviveram em relação aos animais que não conviveram com coespecíficos doentes

Legenda: Os valores constam de dois experimentos e representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão), correspondente ao gate da população de neutrófilos. Ambos parâmetros foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CAS; $n = 8/\text{grupo}$. CAS = animais que conviveram com outros injetados com salina e que foram tratados (CAS+P) ou não tratados (CAS) com propranolol; CAD = animais que conviveram com outros inoculados com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich e que foram tratados (CAD+P) ou não tratados (CAD) com propranolol.

7 DISCUSSÃO

Os presentes resultados procuram responder à hipótese anteriormente levantada pelos trabalhos do nosso grupo relativa ao mecanismo envolvido nos efeitos induzidos em camundongos, pela convivência com um coespecífico portador de um tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Especificamente, se a ativação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) induzida pela convivência forçada com o animal doente e a consequente liberação de catecolaminas estaria envolvida com as alterações imunes e comportamentais relatadas (ALVES et al., 2006; ALVES; VISMARI; PALERMO-NETO, 2007; ALVES; RIBEIRO; PALERMO-NETO, 2012). Quer nos parecer que a resposta a esta questão seja, ao menos em parte, positiva. De fato, observamos neste estudo que o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos empregando-se “dl-propranolol” em animais que conviveram por 12 dias com outros dois animais portadores do TAE: 1) reverteu o comportamento do “tipo-ansioso” dos animais CAD, que voltaram a frequentar a zona central do campo aberto e reduziu a velocidade média desses animais no mesmo aparato; 2) reverteu a diminuição dos níveis de noradrenalina e aumentou aqueles do metabólito VMA no hipotálamo; 3) modulou os efeitos da convivência sobre a porcentagem de células NK sanguíneas e esplênicas; 4) diminuiu a expressão da molécula CD69 em células NK esplênicas.

Destaque-se, porém, que o tratamento com o propranolol não alterou nos animais do grupo CAD: 1) o *burst* basal ou induzido por PMA ou por SAPI e a fagocitose de neutrófilos; 2) o *turnover* hipotalâmico de noradrenalina; 3) os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no córtex frontal e no bulbo olfatório; 4) a distância total percorrida no campo aberto; 5) a expressão da molécula CD69 em células NK sanguíneas; 6) a contagem de células na medula óssea; 7) o peso relativo das adrenais. O tratamento com o ICI-118,551, um bloqueador beta-adrenérgico mais específico, alterou apenas a expressão da molécula CD69 em células NK sanguíneas, mas não modificou quaisquer dos parâmetros comportamentais e neuroquímicos analisados no animais do grupo CAD. Estas alterações serão interpretadas e discutidas dentro de um contexto de Neuroimunomodulação.

Vale ressaltar inicialmente, que realizamos o bloqueio dos receptores do tipo beta-adrenérgicos, uma vez que estes receptores são aqueles em que se mostrou a maior expressão em células do sistema imune. Optamos por injetar os bloqueadores no final de tarde (18 horas), uma vez que os roedores têm aumento de atividade e de interação social neste momento, isto é, próximo ao apagar das luzes do biotério. O tratamento dos animais CAD com os beta-bloqueadores foi realizado do 6º e 11º dia de convivência com parceiros doentes; este período coincide com a progressiva instalação das alterações comportamentais e físicas indicativas de doença nos animais injetados com o tumor de Ehrlich em sua forma ascítica (ALVES; PALERMO-NETO, 2014). De fato, observou-se que os sinais e sintomas apresentados pelas camundongas injetadas i.p com células do tumor ascítico de Ehrlich foram aumentando progressivamente do ED1 ao ED12, quando os valores dos escores atribuídos às alterações observadas foram máximas, ou seja, iguais a 4. Neste dia as coespecíficas (CAD e CAD+P) foram empregadas para as análises comportamentais, bioquímicas e de imunidade inata (ED12).

Cabe, preliminarmente, uma breve discussão dos efeitos do propranolol e do ICI-118,551. O dl-propranolol possui uma porção lipofílica que permite a ele atravessar a barreira hematoencefálica (BHE); trata-se de um fármaco amplamente utilizado por sua eficácia clínica reconhecida em receptores presentes em aferências do SNAS, particularmente daquelas do sistema circulatório. Assim, vem sendo usado para tratar hipertensão, doenças coronárias e arritmias cardíacas, entre outras enfermidades (FREEMANTLE et al., 1999; PRIVIERO et al., 2006; WEBB et al., 2011). Quando se usam bloqueadores beta-adrenérgicos no tratamento de transtornos cardiovasculares, não são raras as observações de efeitos indesejáveis por eles produzidos, dentre os quais destacam-se sonolência, alterações motoras e, mais raramente, estados de confusão mental e alucinações (JEFFERSON, 1974; ELGHOZI, 1979). Estes fenômenos desagradáveis mostram de maneira indiscutível que os beta-bloqueadores não afetam somente a atividade autonômica periférica, mas também aquelas ligadas ao SNC. Após a descoberta do propranolol no início da década de 1960, Turner e Granville-Grossman (1965) sugeriram propriedades ansiolíticas para esse fármaco ao buscar tratar a taquicardia decorrente do hipertireoidismo. Em decorrência, surgiu o interesse pelo uso do propranolol em psiquiatria para tratamento paliativo de transtornos de ansiedade (BECKER, 1976; KATHOL, 1980; MEIBACH, 1987), sintomas de privação de narcóticos (GROSZ,

1972), esquizofrenia (YORKSTON, 1974; POLI; PALERMO-NETO, 1984), autismo (RATEY, 1987) e agressividade (FLEMINGER, 2006). Além disso, ele tem sido também utilizado para melhorar a performance de indivíduos em situações específicas de estresse e/ou ansiedade, tais como em oradores que precisam falar em público (BRANTINGAN, 1982), em músicos antes de suas apresentações (CLARK; AGRAS, 1991) e na diminuição da ansiedade de pacientes (DYCK; CHUNG, 1991; MEALY, 1996) e na melhora da performance de médicos (ELMAN, 1998) previamente a processos cirúrgicos. Estudos de James e Savage (1984) mostraram que a utilização do nadolol por músicos, um bloqueador beta-adrenérgico que não atravessa a BHE, também foi eficaz na melhora de seus desempenhos.

Relevante comentar que muitas das manifestações mais penosas e incapacitantes da ansiedade como os sintomas periféricos mediados pela atividade simpática em receptores beta-adrenérgicos, como, por exemplo, taquicardia, palpitações, tremores, diaforese, vertigens, hiperventilação, exaustão, e muitos outros, podem ser antagonizados pelos beta-bloqueadores por bloquearem receptores presentes em “órgãos-alvo” (MISHRIKI, 1983; SERLIN, 1983; POLI e PALERMO-NETO, 1985; HUDSON, 1987; NACE, 1987). Além disso, já foi sugerido que o dl-propranolol apresenta efeitos depressores centrais em animais (BAINBRIDGE; GREENWOOD, 1971). De fato, Bainbridge e Greenwood (1971) mostraram que o dl-propranolol apresenta um aparente efeito “tranquilizante” tanto em ratos condicionados a esperar por um choque elétrico como, também, em ratos tornados hiper-reativos por lesões da área septal prosencefálica.

O fármaco ICI-118,551, um antagonista com elevada afinidade por receptores do tipo beta2-adrenérgicos e que atravessa a BHE, tem seus primeiros relatos de uso ligados à década de 1980 (BILSKI, 1980; O'DONNELL; WANSTELL, 1980). Em modelos experimentais e em tecidos isolados, o fármaco mostrou propriedades estabilizantes de membranas, similares àquelas do propranolol (BILSKI, 1983). Em humanos, quando administrado em diferentes doses e por via oral, o ICI produz a broncoconstrição (TATTERSFIELD, 1983) e, atenua a taquicardia observada em estados de ansiedade (ARNOLD, 1982); ele também reduz o aumento da pressão sistólica, o fluxo sanguíneo para as extremidades (antebraço) e os tremores induzidos pelo agonista beta-adrenérgico isoproterenol (BILSKI, 1983; HARRY, 1988; ARNOLD, 1985). Em ratos, microinjeções de ICI-118,551 na região medial do núcleo amigdalóide antes de sessões de estresse por restrição de movimentos

induziu aumento da taquicardia observada nos animais, mas não afetou a pressão sanguínea dos mesmos (FORTALEZA, 2012); curiosamente, microinjeções de antagonistas β 1-adrenérgicos nesta região induziram efeitos opostos.

Uma busca na literatura mostra que os estudos conduzidos sobre o uso dos beta-bloqueadores no tratamento da ansiedade, além de serem limitados em quantidade (STEENEN, 2016), são heterogêneos quanto aos planejamentos e objetivos analisados, tornando os julgamentos comparativos dos resultados obtidos uma tarefa difícil e tênue (POLI e PALERMO-NETO, 1984). De qualquer forma, de acordo com estes trabalhos, alterações observadas na atividade nervosa central induzidas pelo propranolol ou por outros agentes antagonistas de receptores beta-adrenérgicos podem ser explicadas, tentativamente, por meio de três mecanismos diferentes.

O **primeiro** destes mecanismos sugere uma ação bloqueadora específica da transmissão dos impulsos nervosos beta-adrenérgicos em vias adrenérgicas dentro do SNC. Já se constatou, por meio de muitos ensaios com ligantes radioativos a existência de receptores beta-adrenérgicos e de vias adrenérgicas dentro do SNC (RAINBOW, 1984; RAMAN, 1996; JENSON, 2015). A existência de receptores do tipo beta adrenérgicos que utilizam a NOR como neurotransmissor sugere um mecanismo central específico, uma vez que a adrenalina periférica não atravessa a BHE (VAN BOCKSTAELE, 1999; DELANEY, 2007). Alguns trabalhos também têm evidenciado que o cérebro apresenta um mecanismo adaptativo e de defesa aos efeitos do estresse; mostrou-se que a adaptação envolve, entre outros mecanismos, diminuição da quantidade/densidade de receptores beta-adrenérgicos presentes em regiões como hipotálamo, córtex e tronco cerebral; na periferia, em órgãos como baço e coração (STONE, 1978; U'PRICHARD, 1980; TORDA, 1981; STONE, PLATT, 1984).

Uma **segunda** hipótese sugere uma ação inespecífica e central independente do bloqueio de beta-adrenoceptores em membranas de células nervosas; esta ação está fundamentada em propriedades estabilizantes de membranas ou efeitos semelhantes aos de anestésicos locais de intensidade moderada/forte exercida por estes fármacos. Neste sentido, mostrou-se que isômeros de beta-bloqueadoras que apresentam fraca capacidade de bloquear beta-adrenoceptores produzem efeitos centrais evidentes tanto em animais como em seres humanos. De fato, alguns isômeros de beta-bloqueadores, como o d-propranolol, que embora atravessem a

BHE (YORKSTON, 1974), são praticamente desprovidos de atividade beta-bloqueadora; contudo, produzem efeitos centrais similares aos produzidos por isômeros com propriedade bloqueadora. Segundo a literatura, isto é muito provavelmente decorrência de uma ação semelhante à dos anestésicos locais de intensidade moderada/forte relatada tanto em animais como em seres humanos (BONN, 1971; BECKER, 1976).

Finalmente, uma **terceira** corrente de raciocínio pressupõe que os efeitos centrais dos beta-bloqueadores sejam consequência de ações bloqueadoras exercidas fora do SNC (BALON, 1990; CLARK, 1986; STEENEN, 2016). Lembra-se que informações sobre alterações da atividade autônoma em órgãos da periferia são transmitidas ao SNC por canais de retro-alimentação neuronais e/ou hormonais dando lugar a modificações na atividade central. Existem algumas sugestões da existência deste fluxo informativo centrípeto. Neste contexto, agentes beta-bloqueadores como o practolol, que penetra pouco no SNC (SCALLES; COSGROVE, 1970; BONN; TURNER, 1972), produziram alterações comportamentais tanto nos animais como em seres humanos (SPEISER; WEINSTOCK, 1973). Assim, Bonvallet et al. (1954) e Koella et al. (1960) mostraram que um aumento da pressão arterial exercida nos pressoreceptores aórticos produziu modificações da atividade eletroencefalográfica central. Pequenas variações nas pressões de oxigênio e gás carbônico, devidas a modificações do ritmo e volume respiratório, captadas por meio dos quimioceptores carotídeos e aórticos, também produziram alterações na atividade elétrica central (HUGELIN et al., 1959). Outra explicação para os efeitos centrais de fármacos deste grupo que não atravessam a BHE seria a ocorrência de ações em algumas zonas, como a área postrema, que se encontram fora da BHE (KOELLA; CZICMAN, 1966; ROTH et al., 1970). De fato, não é de todo impossível que estruturas situadas fora da BHE incluam receptores beta-adrenérgicos em sistemas neuronais conectados com regiões cerebrais intrabarreira responsáveis, em última instância, pela regulação de algumas funções nervosas (POLI e PALERMO-NETO, 1985).

Quer nos parecer, que os efeitos centrais dos beta-bloqueadores possam decorrer de uma manifestação combinada destes três mecanismos. Assim, segundo o tipo, a forma estereoisomérica do bloqueador, a dose, a via de administração e, entre outros, o comportamento que se pretende estudar, um e outro destes mecanismos tomariam papel preponderante originando o efeito central observado.

Esta diversidade de mecanismos de ação justificaria a discrepância encontrada na literatura para os efeitos comportamentais dos beta-bloqueadores e quiçá, os do presente estudo. Seria, pois, simplista pretender discutir os resultados do presente trabalho embasados em uma posição radical que implicasse apenas em um destes mecanismos.

Como amplamente descrito por nosso grupo, mostrou-se que o ato de conviver com parceiros portadores de um tumor ascítico de Ehrlich por 14 dias desencadeia respostas características de um estresse crônico; mostrou-se, neste sentido, ser o odor liberado pelo animal doente é o estímulo responsável pelas alterações comportamentais, neuroquímicas e imunológicas observadas (ALVES, PALERMO-NETO, 2014). Especificamente, trabalhos anteriores do nosso grupo observaram que os animais CAD apresentavam maior atividade locomotora na arena do campo aberto e menor tempo gasto no centro do aparato; porém desta feita, não observamos alterações na distância total percorrida (ALVES, PALERMO-NETO, 2014). No presente estudo, empregando-se a convivência de um conspecífico com dois camundongos injetados com o TAE observamos um aumento na velocidade de locomoção dos animais do grupo CAD em relação aos animais do grupo CAS no campo aberto e, embora velocidade corresponda a uma maior distância percorrida em um mesmo tempo, apenas uma tendência de aumento foi observada na distância total percorrida pelos animais do grupo CAD em relação aos do grupo CAS neste aparelho.

Conforme discutido anteriormente, os experimentos de Alves e Palermo-Neto (2014) levaram os autores a propor que os companheiros dos animais doentes vivenciam em suas gaiolas de moradia uma situação de estresse psicológico gerado pela situação de conflito que experimentam. De fato, o companheiro saudável encontrava-se em uma situação chamada de “aproximação x evitação” tida como altamente estressante e ansiogênica, qual seja: aproximar-se e interagir com o companheiro de gaiola (*drive* de interação social) ou deles se afastar pela presença de odores aversivos. Em um destes experimentos, Alves e Palermo-Neto (2014) utilizaram um teste de preferência empregando um labirinto em T; observaram que os camundongos parceiros do coespecíficos doentes (CAD) permaneceram menos tempo na zona do labirinto em que estava o companheiro doente, fato não observado com os companheiros de animais saudáveis (CAS) que preferiram

posicionar-se a maior parte do tempo próximos a seus parceiros de gaiola. Neste mesmo trabalho, observou-se que no teste de interação social, os animais que conviveram com os doentes (CAD) apresentaram maiores níveis de interação social com um coespecífico estranho; mais uma vez, dados opostos foram observados com os companheiros de animais saudáveis (CAS), mostrando que a convivência com o doente produziu estresse psicológico, muito provavelmente gerado pela situação de conflito a que foram forçados: a permanência inescapável na gaiola com um coespecífico doente.

Como relatado anteriormente, não observamos alterações nos níveis séricos de corticosterona das camundongas que coabitaram com dois animais doentes em relação às daquelas do grupo controle (MORGULIS *et al.*, 2004; ALVES e PALERMO-NETO, 2006). Não observamos, também, alterações no peso das adrenais dos animais dos grupos CAD e CAS. Neste sentido, como compreender e interpretar as relevantes alterações comportamentais e imunológicas que mais uma vez foram observadas neste experimento e que podem ser atribuídas ao estresse gerado pela convivência?

O trabalho de MORGULIS (2004) e ALVES e PALERMO-NETO (2006) oferece algumas pistas para a interpretação dos achados comportamentais agora obtidos. Os autores analisaram o comportamento de camundongas que coabitaram com coespecíficas portadoras do tumor de Ehrlich em duas situações experimentais usualmente empregadas para inferir níveis de ansiedade: campo aberto e labirinto em cruz elevado (LCE). Aumentos no número de entradas e/ou no tempo gasto por roedores na exploração dos braços abertos do LCE indicam, comumente, a presença de níveis reduzidos de ansiedade nos animais (LISTER, 1987; PELLOW *et al.*, 1985). Os resultados obtidos naquela ocasião mostraram que os animais do grupo experimental (CAD) apresentaram um aumento do número de entradas nos braços abertos do LCE sugerindo uma diminuição nos níveis de ansiedade dos mesmos. No entanto, Morgulis (2004) analisando mais detalhadamente as diferenças encontradas entre os animais dos grupos CAD e CAS no tempo gasto na exploração dos braços abertos e no conjunto de dados registrados do LCE e, (2) na locomoção nas zonas centrais e tigmotáticas do campo aberto propuseram outra interpretação para os dados comportamentais que registraram. Especificamente, sugeriram que a condição de convivência com o doente tenha aumentado de tal maneira a atividade locomotora dos animais que tornava-se impossível inferir os

níveis de ansiedade dos mesmos dentro dos aparelhos (LISTER, 1991). Desta forma e segundo Morgulis (2004) o aumento de atividade locomotora dos animais do grupo experimental (CAD) em relação a CAS poderia estar mascarando alterações dos níveis de ansiedade que pretendiam avaliar por meio do campo aberto ou do *plus maze*.

Neste sentido, os trabalhos de ALVES e PALERMO-NETO (2006) mostram que a administração de anfetamina (1 e 2 mg/kg), que de modo geral atua liberando catecolaminas e inibindo sua metabolização (COSTA; FRUSSA-FILHO; FELICIO, 2001), produziu um aumento dose-dependente da atividade locomotora dos animais CAD em relação aos CAS em um campo aberto, sugerindo este fato um envolvimento das catecolaminas centrais com os achados. Mais especificamente, sugeriu-se que a convivência com um animal doente tenha aumentado a atividade catecolaminérgica central e, conseqüentemente, a atividade locomotora dos animais. De fato, o trabalho sequencial de Alves e Palermo-Neto (2005) mostraram um aumento nos níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina e uma diminuição dos níveis e aumento do *turnover* hipotalâmico de NOR nos animais do grupo CAD em relação aos do grupo CAS, reforçando a hipótese que haviam feito.

Qualquer que seja o mecanismo de ação pretendido para explicar os efeitos centrais do propranolol, diversos estudos conduzidos com o mesmo e com outros antagonistas de receptores beta-adrenérgicos têm sido feitos considerando-se tanto a hipermotilidade como o comportamento estereotipado induzido por anfetamina. Assim, alguns autores relataram que o propranolol reduz a motilidade de camundongos (ESTLER, 1971) e ratos (MANTEGAZZA, 1968), enquanto outros não encontraram quaisquer alterações após o emprego de altas doses deste fármaco (MIQUEL, 1969).

Nossos resultados, obtidos com companheiras de dois animais doentes, da mesma forma que outros trabalhos do grupo mostraram aumento da velocidade e do tempo gasto na zona central do campo aberto; no entanto, evidenciaram apenas uma tendência de aumento na distância percorrida pelos animais do grupo CAD, em relação aos animais do grupo CAS nesta arena. Seriam nossos resultados de coabitação com dois parceiros com TAE decorrentes de um nível de estresse maior que aquele observado em animais que conviveram apenas com um doente? Embora plausível, uma vez que odores liberados pelos animais com o TAE foram responsabilizados pelos efeitos neuroimunes observados (ALVES e PALERMO-

NETO, 2014), não há como responder a esta questão considerando-se os resultados deste trabalho.

De qualquer forma, os presentes achados experimentais permitem algumas importantes análises sobre os efeitos dos beta-bloqueadores. Eles descartam, em primeiro lugar, efeitos “*per se*”, isto é, próprios e diretos do propranolol e do ICI-118,551 sobre a atividade locomotora dos animais no campo aberto; de fato, não observamos diferenças estatísticas entre os dados dos grupos CAS e CAS+P e aqueles dos grupos CAS e CAS+I. No entanto, o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos com o uso do propranolol diminuiu a velocidade e o tempo total gasto pelos animais CAD+P na região central do campo aberto, em relação aos animais CAD. Embora algumas tendências de reversão tenham sido observadas, o bloqueio dos receptores β 2-adrenérgicos, pelo uso do ICI-118,551 não alterou de forma significativa quaisquer dos parâmetros comportamentais medidos nos animais do grupo CAD+I em relação a CAD. Assim, quer nos parecer seja viável inferir uma participação catecolaminérgica em nossos resultados, via estimulação beta-adrenérgica, mas não via beta2-adrenérgica específica; alternativamente, o propranolol poderia estar atuando como estabilizante de membranas ou reduzindo *inputs* ansiogênicos mediados pelo SNAS e gerados da periferia para o SNC.

Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Hanke e colaboradores (2012), em um contexto experimental diferente. Usando um modelo de derrota social, estes autores mostraram que animais submissos e submetidos a sessões de convivência com animal intruso agressivo por 2 horas ao longo de 6 dias apresentavam aumento nos níveis de adrenalina e noradrenalina no plasma e no baço; aumento da latência para entrar e diminuição da permanência na região central do campo aberto. Esses animais submissos apresentaram, além disso, aumento nos níveis de corticosterona séricos. De maneira interessante, quando tais animais submissos foram pré-tratados diariamente e 30 minutos antes de cada sessão com propranolol (10 mg/kg), tanto os níveis plasmáticos de catecolaminas, como os parâmetros comportamentais foram revertidos, mas não alterou os níveis de corticosterona séricos. Vale ressaltar mais uma vez que a convivência com parceiros doentes não altera os níveis de corticosterona, mesmo quando dosada ao longo de 14 dias de convivência (ALVES, PALERMO-NETO, 2014).

Em outro contexto, mostrou-se que o comportamento exploratório de ratos e camundongos isolados por 6 a 8 semanas e observados em um campo aberto era

maior que aquele de animais agrupados e observados de modo análogo (FAGGIN, 1982; WEINSTOCK, 1974). Neste aspecto, o uso do propranolol (isômeros “d” e “dl”), em doses baixas, reduziu a hipermotilidade e as frequências de levantar e de farejar de ratos isolados, sem contudo afetar estes comportamentos nos animais mantidos agrupados. Somente uma dose alta de propranolol (20mg/kg) foi capaz de reduzir o comportamento exploratório nestes últimos animais (WEINSTOCK, 1974). Em outro trabalho, estes autores mostraram que o pré-tratamento de ratos tanto com dl-propranolol como com d-propranolol produziu diminuição de hipermotilidade induzida por dl-anfetamina. A este respeito, já foi demonstrado que o dl-, d- e l-propranolol nas doses de 10 a 40 mg/kg foram capazes de antagonizar a hiperatividade induzida em ratos pela dopamina, injetada bilateralmente no núcleo *accumbens* (COSTALL, 1977). Neste particular, o efeito do d-propranolol foi mais marcante. Além do mais, a redução da hiperatividade registrada para o dl-, d-, e em menor extensão para o l-propranolol, administrados na dose de 40mg/kg, acompanhou-se de intensa sedação e hipotonia muscular que retardavam a resposta dos animais à estímulos externos (COSTALL, 1977).

Algumas evidências indicam que grandes doses de propranolol são capazes de modular a atividade de neurônios dopaminérgicos no SNC, especificamente no sistema límbico (CHANG, 2013; AONO, 2013). Trabalhos têm demonstrado efeitos modulatórios de adrenoceptores no núcleo *accumbens* sobre a síntese de dopamina; um trabalho recente mostrou que α -adrenoceptores inibem, enquanto que os β -adrenoceptores estimulam a atividade locomotora por ação na região mesolímbica (núcleo *accumbens*), o que estaria relacionado com a modulação indireta dos níveis locais de dopamina (VERHEIJ, 2015). Esta hipótese, no entanto, não encontra respaldo em nossos experimentos, visto que o propranolol não afetou a atividade locomotora dos animais do grupo CAS.

Desta forma, embora não se possa descartar a participação de outros hormônios, peptídeos e/ou neurotransmissores nos presentes resultados comportamentais, quer nos parecer seja possível interpretá-los à luz de alterações centrais em sistemas catecolaminérgicos e periféricas na atividade do SNAS das camundongas companheiras dos doentes (CAD). Novamente, seria simplista pretender concluir a discussão dos resultados comportamentais do presente trabalho embasados em uma posição radical que implicasse apenas em um dos

mecanismos, central ou periférico, isto é, em ativação catecolaminérgica central ou periférica (SNAS).

Em relação às alterações centrais sabe-se que situações indutoras de estresse ativam sistemas noradrenérgicos e produzem aumento do *turnover* de NOR medido através da análise dos níveis deste neurotransmissor e de seu metabólito, o MHPG, no SNC (CHARNEY, 1985; GLAVIN, 1983; PARÉ, GLAVIN, 1993). Neste sentido, o trabalho de Alves e Palermo-Neto (2006) confirma a hipótese ao mostrar aumento do *turnover* hipotalâmico de NOR e diminuição dos níveis de NOR nesta mesma região em camundongas companheiras de outras portadoras do TAE. Como eles, também observamos diminuição nos níveis de NOR hipotalâmica e um aumento de VMA (também um metabólito da NOR) em animais CAD, em relação aos animais do grupo CAS. Porém, nossos dados não apontaram para alterações significantes no *turnover* deste neurotransmissor entre os animais dos grupos CAS e CAD; provavelmente isto se deva à elevada variação dos resultados (inferida pelo elevado desvio-padrão) observado nos animais do grupo CAD. Neste contexto, e também de relevância, ao analisar os efeitos do propranolol, constatamos ausência de diferenças entre os dados dos grupos CAS e CAS+P, fato que descarta uma ação “*per se*” do fármaco, concordando com os dados comportamentais obtidos neste trabalho e discutidos acima.

Mostrou-se que o estresse aumenta a atividade de células do *locus coeruleus* (LC), principal região que sintetiza e disponibiliza NOR para diversas regiões do SNC (BERRIDGE, 1999, 2003; VALENTINO, 2008). De acordo com Abercrombie, Keller e Zigmond (1988) o aumento do *turnover* de NOR é consequência de uma maior atividade da enzima tirosina hidroxilase. Neste contexto, a magnitude da depleção dos níveis hipotalâmicos de NOR após um estímulo estressor já foi correlacionada inversamente com as alterações por ele produzidas nos níveis de NOR em animais de laboratório; isto é, quanto menores os níveis de NOR maiores as respostas ao estímulo estressor (GLAVIN, 1991).

Em relação ao fármaco ICI-118,551 não observamos uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos CAD e CAD+I. Dessa forma, quer nos parecer mais uma vez que o bloqueio dos receptores β_2 -adrenérgicos, pelo ICI-118,551 (usado na dose de 15mg/kg), não tenha sido capaz de alterar quaisquer dos parâmetros comportamentais ou bioquímicos cerebrais medidos na região do hipotálamo. Desta forma, e mais uma vez, teria o propranolol um efeito indireto via

outros tipos de receptores beta-adrenérgicos? Ou estaria o efeito ligado à estabilização de membranas neuronais no SNC? Qualquer que seja a resposta, quer nos parecer seja possível afirmar que haja participação catecolaminérgica nos efeitos induzidos pela coabitação com o animal portador do TAE.

Neste sentido, vale lembrar que a detecção do odor por roedores é feita por meio de dois sistemas quimio-sensoriais diferentes: o sistema olfatório que está envolvido com odores e informações sobre o meio ambiente, e o órgão vomeronasal (VNO), que está diretamente envolvido na resposta a feromônios. Assim, já foram identificados estímulos relacionados com a resposta de animais a odores; um deles é representado pelo complexo de histocompatibilidade ou MHC; o outro pelas proteínas urinárias maiores ou MUPs (DULAC e WAGNER, 2006). Mostrou-se que o MHC está relacionado à detecção de odores do ambiente e ao seu processamento nos receptores de olfato (JORDAN e BRUFORD, 1998). As MUPs, por sua vez, são expressas em altas concentrações na urina de camundongos de ambos os sexos (HURST, 2001; BEYNON, 2002). Cada camundongo expressa diferentes tipos de MUPs em altas concentrações e que são essenciais para a percepção de urina de machos ou de fêmeas.

Grande número de mamíferos, dentre os quais destacam-se os roedores, usam os feromônios presentes na urina para avisar coespecíficos da existência de uma provável situação de perigo (WHEELER, 1976; NOVOTNY, 1985; SCHAAL, 2003). Esta reação de alarme estimulada por feromônios provoca reações de defesa ou “evitação” em animais que tiveram contato com este estímulo. Nesta situação, já foram descritos em roedores as seguintes alterações: aumento de imobilidade, aumento da temperatura corpórea, aumento dos batimentos cardíacos e, inclusive, alterações no sistema imune (ABEL, 1992; KIKUSUI, 2001). Willis e colaboradores (2004) mostraram a presença de compostos voláteis na urina de portadores de tumores; dados de cromatografia gasosa e de espectroscopia de massa revelaram altos níveis de formaldeído, de alcanos e de derivados de benzenos em pacientes com alguns tipos de câncer (DI NATALE, 2003; SPANEL, 1999).

Em nosso modelo experimental mostrou-se que o ato de conviver com portadores de TAE desencadeia respostas características de um estresse crônico, sendo o odor liberado pelo animal doente o estímulo responsável pelas alterações comportamentais, neuroquímicas e imunológicas observadas (ALVES, PALERMO-NETO, 2014, 2015). Dados de literatura mostram que os neurônios serotoninérgicos

têm efeitos neuromoduladores no bulbo olfatório (DUGUÉ, 2009; PETZOLD et al., 2009; PTAK, 2009; SUZUKI et al., 2015). Os neurônios que sintetizam serotonina concentram-se em regiões próximas à linha média do tronco encefálico, onde está localizado o núcleo da rafe. De maneira geral, mostrou-se que as projeções serotoninérgicas a partir deste núcleo são importantes vias para a regulação do ciclo sono-vigília, e participam da modulação de comportamentos motivacionais e emocionais (ADRIANI, 2012; LY, 2013; DANKOSKI, 2016). Os resultados deste trabalho mostraram um aumento do *turnover* de serotonina nos animais do grupo CAD em relação aos do grupo CAS na região do bulbo olfatório, sugerindo um envolvimento de vias serotoninérgicas presentes no bulbo olfatório com nossos achados comportamentais e imunes. No entanto, e como esperado, o tratamento com propranolol não modificou o *turnover* de serotonina dos animais do grupo CAD+P, em relação ao grupo CAD. Desta forma quer nos parecer que os nossos resultados relativos à serotonina no bulbo olfatório possam ter um papel relevante nas manifestações induzidas pela convivência por 12 dias com dois parceiros portadores de um TAE. Estariam estes dados ligados à ausência de efeitos agora observados na atividade motora dos animais do grupo CAD em relação a CAS? Futuros experimentos, por exemplo, bloqueando-se a síntese de serotonina com para-cloro-fenilalanina poderão trazer subsídios adicionais a esta interessante hipótese.

Os seres humanos, assim como os animais, reagem ao estresse ativando um complexo repertório de respostas fisiológicas e comportamentais que, se inadequadas ou excessivas ou ainda se mantidas por tempo prolongado, podem afetar adversamente o próprio comportamento e várias de suas funções dentre as quais destacam-se aquelas ligadas às respostas imune/inflamatórias. Diversos experimentos têm mostrado que estressores ambientais ou psicológicos alteram de forma significativa tanto a imunidade inata como a adquirida (JESSOP et al., 1989; ESTERLING, 1996; BARTOLOMUCCI et al., 2003; PALUMBO et al., 2010). Desta forma, analisamos, também neste trabalho, os efeitos de bloqueadores de beta adrenoceptores na esfera imune de camundongos do grupo CAD.

Dentre as diversas células que participam da resposta imune inata, as células *natural killer* (NK) foram escolhidas como alvo desse estudo por diversas razões. Trabalhos de nosso grupo mostraram que camundongos saudáveis que conviveram por 11 dias com outro portador do TAE (CAD), quando injetados com células do mesmo

tumor apresentavam crescimento tumoral maior que aquele medido em animais que conviveram com saudáveis (CAS), fato este observado pelo aumento do número e concentração de células tumorais por mililitro de fluído ascítico (ALVES et al, 2006). Dessa forma, uma vez que células NK atuam de forma decisiva em células tumorais ou células infectadas por patógenos intracelulares, foi de nosso interesse avaliá-las quanto ao número e ao perfil de ativação. Estariam estas células com um perfil menos ativado nos animais que convivem com o doente? Haveria reversão destes efeitos pela utilização de beta-bloqueadores?

Neste contexto, escolhemos avaliar a molécula de ativação (CD69) em células NK visto que esta representa um importante receptor co-estimulatório presente nestas células e que participa das respostas de citotoxicidade, proliferação celular e secreção de citocinas (BORREGO et al., 1999). Além disso, dentre as células imunes, as NK são as células com maior expressão de receptores β_2 -adrenérgicos e, portanto, são susceptíveis aos efeitos de catecolaminas liberadas em contextos de estresse (ELENKOV, 2000). As catecolaminas após se ligarem em receptores adrenérgicos em células NK, alterariam o balanço de receptores ativadores (CD69) e inibitórios (Ly49a), afetando toda a cascata intracelular de sinalização e, via de consequência, o perfil de ativação e a capacidade citotóxica destas células (TARR, 2012).

Nossos resultados, não apontam para a existência de diferenças na expressão da molécula de ativação CD69 em células NK plasmáticas entre os animais dos grupos CAS e CAD; porém, observamos um aumento nessa expressão em células NK esplênicas nos animais do grupo CAD em relação aos do grupo CAS. A este respeito, comparando-se os efeitos do propranolol, nos animais dos grupos CAS e CAS+P, pode-se descartar uma ação “*per se*” do fármaco, uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Observamos, no entanto, uma diminuição estatisticamente significativa na expressão de CD69 em animais do grupo CAD+P, em relação aos do grupo CAD; ainda em relação a esta molécula, esta mesma diferença foi observada comparando-se os animais do grupo CAD+I, em relação ao grupo CAD. Assim, quer nos parecer que os efeitos imunes observados após o bloqueio de receptores beta-adrenérgicos estejam apontando uma participação relevante das catecolaminas - via estimulação de receptores β_2 -adrenérgicos - na modulação da ativação da molécula CD69 em animais que conviveram com dois coespecíficos doentes.

Até recentemente, as catecolaminas eram classificadas exclusivamente como moléculas imunossupressoras. Entretanto, sabe-se hoje que seus efeitos em células do sistema imune são mais de modulação, isto é, podem ser estimulantes ou supressores. Além das células NK, células B, monócitos CD14+ e células T expressam receptores β 2-adrenérgicos, com exceção de linfócitos Th2 (ELENKOV, 2000; KOM, SANDERS, 2000). Mais especificamente, observou-se que a NOR, por meio da sinalização via receptores β 2-adrenérgicos inibe a atividade citolítica de células NK esplênicas, suprime a síntese proteica e de mRNA de perforina, granzima B e também os níveis de mRNA de IFN- γ *in vitro* (DOKUR et al., 2004).

Experimentos recentes de nosso grupo mostraram que camundongas que conviveram por 12 dias com parceiras doentes (CAD) apresentaram uma queda estatisticamente significativa nos níveis de IFN- γ plasmáticos, que atingiram a metade dos valores medidos nos animais CAS. No entanto, em nenhum momento foi dosada nestes experimentos a concentração de IFN- γ no baço. A redução dos níveis plasmáticos desta citocina poderia justificar uma menor resistência orgânica ao tumor ou a patógenos internos e, também, a participação de catecolaminas liberadas durante o estresse sobre a imunidade inata e induzindo uma imunossupressão. Neste sentido, e de forma aparentemente conflitante observamos neste estudo um aumento da expressão da molécula CD69 em NK esplênicas nos animais do grupo CAD em relação aos do grupo CAS.

Neste contexto, o trabalho de Hamasato e Palermo-Neto (2014) sugere que a convivência com parceiros doentes suprima as respostas de citocinas de perfil Th1 (IFN- γ), exacerbando aquelas de perfil Th2. Mais especificamente, os autores mostraram que camundongos sensibilizados e posteriormente desafiados com ovoalbumina (OVA) e que conviveram por 14 dias com parceiros doentes apresentaram exacerbação da resposta alérgica pulmonar, de perfil Th2. Estes dados reforçam a hipótese de que catecolaminas liberadas pelo SNAS possam ter sido mesmo as responsáveis pelo aumento que eles observaram no perfil inflamatório com elevação do número de eosinófilos e neutrófilos no líquido bronco-alveolar (BAL), aumento dos níveis de IL-4 e IL-5 e diminuição dos níveis de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante de BAL, aumento nos níveis de IgG1-OVA e diminuição nos níveis de IgG2a-OVA no sangue periférico. Corroborando com esta hipótese, dados da literatura mostram diferenciação de células T *naïve* em células Th2 via receptores β 2 -adrenérgicos, e ao mesmo tempo inibição da diferenciação em células de perfil

Th1 (BELLINGER et al., 2014). Considerando-se estes dados em seu conjunto pode-se sugerir que os resultados do presente estudo nos animais do grupo CAD possam também decorrer de uma redução da resposta imune de perfil Th1 em relação a outra do tipo Th2, fato este que não teria ocorrido nos animais do grupo CAS.

Sabe-se ser a migração de células imunes essencial para a vigilância imunológica em interações célula-célula; o acúmulo destas células em órgãos linfoides é resultado do balanço entre células que recém-migraram para o órgão e o efluxo destas células para a circulação (CARLSON, 1997). É relevante notar que o sistema imune é ativado em situações de estresse e que algumas fibras simpáticas estão em íntima conexão com órgãos e células do sistema imune (ELENKOV, 2000). De maneira interessante, trabalhos relatam que o impacto das alterações observadas em células NK e induzidas por catecolaminas também são dependentes de variáveis como locais (sangue, baço, fígado), espécie (humanos e roedores) e tipo de estresse (SANDERS et al., 2012). Assim, procuramos avaliar os efeitos do uso de beta-bloqueadores sobre células NK circulantes no sangue e no baço.

Observamos neste trabalho, que a porcentagem de células NK no sangue foi menor nos animais do grupo CAD, em relação aos do grupo CAS. Além disso, a porcentagem de células NK plasmáticas aumentou, de forma estatisticamente significativa, nos animais do grupo CAD+P, em relação ao grupo CAD. No entanto, e curiosamente, não se observaram efeitos para o ICI neste parâmetro. Os presentes resultados obtidos com o propranolol concordam o trabalho de Carlson (1997) que mostrou ser a pré-estimulação *in vitro* de células T por catecolaminas - que modificariam a afinidade de células T em relação às células endoteliais - capaz de aumentar a migração destas células para o baço e para os linfonodos. Assim, os efeitos imunes observados neste estudo após o uso do propranolol, em animais que conviveram com dois coespecíficos doentes, sugere que as catecolaminas tenham modulado a migração de células NK do sangue para o baço por uma via β -adrenérgica, independente de ativação de β 2-adrenoceptores. Vale ressaltar que não observamos diferenças entre os grupos CAS e CAD no relativo à contagem de células da medula óssea e que não avaliamos o efeito dos beta-bloqueadores sobre o progenitores de células imunes da medula óssea.

Empregando-se o modelo de estresse por derrota social, mostrou-se extravasamento de monócitos do baço em direção à BHE, com subsequente

ativação microglial (WOHLEB et al., 2011). Mostrou-se, ainda neste trabalho que em regiões cerebrais responsivas ao estresse, um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e o estabelecimento de um perfil neuroinflamatório; segundo os autores estes fatos estariam relacionados a desordens comportamentais, como ansiedade e depressão (WOHLEB et al., 2014). De maneira interessante, este trabalho mostrou ainda que a esplenectomia dos animais preveniu tanto a migração/extravasamento de monócitos como a ativação microglial, abolindo o comportamento do tipo-ansioso anteriormente observado nos animais (WOHLEB et al., 2014). Curiosamente, estes autores já haviam mostrado que o pré-tratamento dos animais com propranolol antes das sessões de estresse revertia o aumento na síntese de progenitores de monócitos e de granulócitos na medula óssea, assim como a migração dos monócitos (HANKE, 2012; POWELL, 2013). Portanto, de acordo com o trabalho, as catecolaminas, via receptores beta-adrenérgicos, seriam fatores essenciais para a migração de monócitos aos órgãos linfoides nos animais submetidos às sessões de estresse. Haveria, portanto, alguma concordância desta conclusão com aquela apresentada acima, para o estresse de coabitação com dois coespecíficos portadores do TAE.

Estressores crônicos específicos como aquele que se observa em situação de luto alteram parâmetros imunes, diminuem a geração de radicais superóxido em neutrófilos e reduzem a resposta imune à vacinação por influenza (PHILLIPS, 2006). Alguns trabalhos associaram a ativação de receptores β 2-adrenérgicos, por concentrações nanomolares de catecolaminas, com a supressão na quimiotaxia de neutrófilos frente a vários tipos de fatores quimiotáticos, assim como com a inibição da fagocitose e da liberação de enzimas lisossomais e com a diminuição do *burst* oxidativo e da degranulação (WEISS et al., 1996). No presente trabalho, tanto o *burst* oxidativo induzido por PMA como por *Staphylococcus aureus* (SAPI) foram menores nos animais do grupo CAD em relação aos animais CAS; estes resultados concordam com dados de estudos anteriores de nosso grupo. Especificamente, concordam com a observação de que a coabitação com o parceiro doente modifica o *burst* oxidativo basal de neutrófilos dos animais do grupo CAD em relação aos do grupo CAS. No entanto, e de forma diferente daquela de nossa hipótese, os presentes resultados mostraram que o tratamento com β -bloqueadores não reverteu a queda do *burst* oxidativo e da fagocitose induzidos por PMA ou SAPI nos animais do grupo CAD+P, em relação ao grupo CAD. Este fato não era esperado, uma vez

que observou-se aumento dos níveis de catecolaminas periféricas nos animais do grupo CAD e, muito especialmente por saber que elas diminuem a formação e a liberação de íons superóxido por neutrófilos (GIBSON-BERRY, 1993). Esperava-se que o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos reverteria esta diminuição observada nos animais do grupo CAD. Uma das prováveis explicações para este fato pode ser a dose usada de propranolol (20mg/kg) além do momento de sua administração previamente ao experimento. Lembra-se a este respeito, que no presente trabalho, o propranolol não modificou os níveis circulantes de catecolaminas. Estariam as catecolaminas atuando em outros receptores adrenérgicos?

Nesse contexto, sabe-se que os receptores α -adrenérgicos, apresentam-se em quantidade limitada em células imunes; mesmo assim, alguns trabalhos da literatura têm relacionado a presença de receptores α 1-adrenérgicos em neutrófilos com a liberação de células imunes para a corrente sanguínea a partir da medula óssea e, também com a quimiotaxia (BELLINGER, 2014). Os resultados do presente estudo não permitem inferências relativas à participação dos receptores α 1-adrenérgicos ou de outros tipos de receptores beta-adrenérgicos com o *burst* oxidativo de neutrófilos dos animais do grupo CAD.

Em um contexto totalmente diferente, mostrou-se que o MDMA (*ecstasy*) produz alterações neuroquímicas, comportamentais e endócrinas semelhantes àsquelas produzidas pela exposição a um estresse agudo, sugerindo este fato, ser ele um estressor químico (PACIFICI, 2000; CONNOR, 2004; FERRAZ-DE-PAULA, 2011). Muitos estudos em modelos animais mostraram que o MDMA diminui o *burst* oxidativo de neutrófilos induzidos por SAPI ou PMA e também a porcentagem e intensidade de fagocitose destas células. Trabalho de nosso grupo com MDMA mostrou que as catecolaminas estariam envolvidas com a alteração da distribuição de neutrófilos entre baço e medula óssea, enquanto que alterações na atividade de neutrófilos, como o *burst* oxidativo e a fagocitose, se deviam à ação da corticosterona (FERRAZ-DE-PAULA e PALERMO-NETO, 2011). Um vez que nos nossos estudos, os níveis de corticosterona não diferiram entre os animais do grupo controle e experimental, quer se parecer que o eixo HPA não esteja envolvido com os efeitos agora observados.

Como já comentado, nenhuma alteração foi encontrada no *burst* oxidativo espontâneo de neutrófilos dos animais experimentais (CAD), indicando neste

achado que o efeito da situação experimental só tenha se manifestado na vigência de estimulação destas células imunes, isto é, na presença de ativação dos neutrófilos por SAPI ou PMA. Assim, é possível sugerir que os efeitos da condição experimental sobre o *burst* oxidativo induzido por PMA e por *S. aureus* observados neste trabalho decorram das alterações nos padrões de citocinas produzidas e/ou liberadas pelas células imunes, na presença de um cenário em que predomina uma ativação catecolaminérgica. De fato, sabe-se que as citocinas desempenham um papel relevante na produção de espécies reativas de oxigênio (VERSCHOOR, 2015) e, também que o SNAS, via catecolaminas, modula o perfil de resposta imune atuando na polarização de um perfil de citocinas de Th1 para Th2.

Há informações que sugerem ser o SNAS capaz de modular o SI dependendo este fato de várias condições, dentre as quais: o tipo de agente estressor e do tipo de célula imune analisada e, entre outros fatores de relevância, do estado de ativação/diferenciação das células do SI e da densidade dos receptores nas células imunes (BELLINGER, 2014). Ressalta-se, ainda, que a modulação pelo SNAS da imunidade inata tem sido pouco estudada quando comparada à modulação da imunidade adquirida (BELLINGER, 2014).

Neste sentido, os efeitos centrais dos beta-bloqueadores e a importância do SNAS na origem e na manutenção de sintomas de estresse/ansiedade, como os apresentados neste trabalho parecem-nos relevantes, assim como a busca por estratégias terapêuticas que os revertam. Difícil, no entanto, interpretar estes efeitos no contexto dos diversos estudos existentes na literatura sobre estresse/ansiedade, dada a variedade dos estressores que têm sido usados, de sua persistência, do momento pós-estresse em que foram feitos os estudos e, entre outros fatores de igual importância. Assim, pode parecer simplista implicar as catecolaminas e os efeitos que elas produzem em receptores β -adrenérgicos com a miríade de efeitos induzidos pela coabitação com o parceiro portador do TAE. Todavia, parece-nos inquestionável que pelo menos alguns destes efeitos envolvam este mecanismo, independentemente da existência de outros tão ou mais relevantes que os agora discutidos.

Ao terminar lembramos, mais uma vez, a quantidade de textos existentes na literatura sobre as consequências do ato de cuidar de pessoas portadoras de patologias crônicas e/ou debilitantes; os trabalhos têm sido unânimes ao mostrar uma maior susceptibilidade dos *caregivers* às doenças. Neste contexto, nosso

trabalho pretende ser um modelo experimental desta situação. Contudo, uma vez que a presença de empatia entre animais ainda persiste como tópico de discussão na literatura (DECETY, 2012; FELDMAN, 2016), não nos parece apropriado fazer extrapolações diretas dos dados agora obtidos para a situação humana.

Mesmo assim cabe lembrar que os resultados do presente trabalho, somados a outros obtidos por nosso grupo, concordam com relatos da literatura provenientes tanto de animais de laboratório ou de companhia, assim como de humanos frente a estressores crônicos de natureza psicológica, como o experimentado por *caregivers* (NAVAIE-WALISER, 2002; PINQUART, 2003; GLOZMAN, 2004; BERTRAND, 2006; SORRELL, 2007; JEONG, 2016). Desta forma, as alterações neuroimunes relatadas neste trabalho em camundongos que coabitam com animais portadores do TAE e seus prováveis mecanismos de ação não devem ser minimizados ou subestimados por aqueles que se dedicam a estudos clínicos ou mecanicísticos em humanos; eles podem muito bem responder por fenômenos ainda pouco compreendidos e considerados até mesmo como anedóticos ou como artefatos de técnica ou de diagnóstico em um passado médico ainda recente (ELENKOV, 2000; KONSMAN, 2000; BELLINGER, 2014).

8 CONCLUSÃO

O bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos empregando-se “dl-propranolol” em animais que conviveram por 12 dias com outros dois animais portadores do TAE (grupo CAD):

- reverteu o comportamento do “tipo-ansioso” dos animais CAD, que voltaram a frequentar a zona central do campo aberto e reduziu a velocidade média dos animais no campo aberto; porém, não alterou a distância total percorrida no mesmo aparato;
- reverteu a diminuição dos níveis de noradrenalina e aumentou os níveis do metabólito HVA no hipotálamo; mas não alterou o *turnover* hipotalâmico de noradrenalina; não alterou os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no córtex frontal e no bulbo olfatório;
- não alterou os níveis séricos de corticosterona;
- não alterou o peso relativo das adrenais;
- não alterou a contagem de células na medula óssea;
- modulou a porcentagem de células NK sanguíneas e esplênicas e diminuiu a expressão da molécula CD69 em células NK esplênicas, mas não alterou a expressão da molécula CD69 em células NK sanguíneas;
- não alterou o *burst* basal ou induzido por PMA ou por SAPI e a fagocitose de neutrófilos.

O tratamento com o ICI-118,551, um bloqueador β 2-adrenérgico, alterou a expressão da molécula CD69 em células NK sanguíneas, mas não modificou quaisquer dos parâmetros comportamentais e neuroquímicos analisados nos animais do grupo CAD.

Em seu conjunto, os presentes resultados mostram que apenas algumas das alterações imunes e comportamentais desencadeadas pela convivência com dois coespecíficos portadores de TAE têm participação relevante do sistema catecolaminérgico central e do SNAS via receptores beta-adrenérgicos.

REFERÊNCIAS

- ABEL E.L. Alarm substance emitted by rats in the forced-swim test is a low volatile pheromone. **Physiology and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 723-727, 1991.
- ABERCROMBIE, E. D.; KELLER, R. W.; ZIGMOND, M. J. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. **Neuroscience**, v. 27, n. 3, p. 897-904, 1988.
- ADRIANI, W.; TRAVAGLINI, D.; LACIVITA, E.; SASO, L.; LEOPOLDO, M.; LAVIOLA, G. Modulatory effects of two novel agonists for serotonin receptor 7 on emotion, motivation and circadian rhythm profiles in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 833-842, 2012.
- ALPI, A.; COCCHI, A.; MENEGHELLI, A.; PAFUMI, N.; PATELLI, G. Working with families in the early stages of psychosis: a structured intervention for caregivers. **Giornale Italiano DI Medicina Del Lavoro Ed Ergonomia**, v. 30, n. 3, p. B62-70, 2008. Supplement, B.
- ALVES, G. J.; VISMARI, L.; FLORIO, J. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. **Neuroscience Research**, v. 56, n. 2, p. 172-9, 2006.
- ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 4, p. 363-369, 2007.
- ALVES, G. J.; VISMARI, L.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: effects on ascitic form of Ehrlich tumor growth and macrophage activity. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 6, p. 297-303, 2007.
- ALVES, G. J.; VISMARI, L.; LAZZARINI, R.; MERUSSE, J. L. B.; PALERMO-NETO, J. Odor cues from tumor-bearing mice induces neuroimmune changes. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 357-367, 2010.
- ALVES, G. J.; RIBEIRO, A.; PALERMO-NETO, J. The neuroimmune changes induced by cohabitation with an Ehrlich tumor-bearing cage mate rely on olfactory information. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 26, n. 1, p. 32-9, 2012.
- ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune interactions and psychological stress induced by cohabitation with a sick partner: a review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, p. 4629-41, 2014.
- ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Odor cues released by Ehrlich tumor-bearing mice are aversive and induce psychological stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, p. 121-9, 2015.
- ANEGÓN, I.; CUTURI, M. C.; TRINCHIERI, G.; PERUSSIA, B. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and

lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 2, p. 452–72, 1988.

AONO, Y.; SAIGUSA, T.; TAGUCHI, H.; UCHIDA, T.; TAKADA, K.; KOSHIKAWA, N.; COOLS, A.R. Synergistic, but not separate, stimulation of accumbal $\beta 1$ and $\beta 2$ -adrenoceptors alters the accumbal dopamine efflux in freely moving rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 715, p. 363-9, 2013.

ARNOLD, J. M.; O'CONNOR, P. C.; RIDDELL, J. G.; HARRON, D. W.; SHANKS, R. G.; MCDEVITT, D. G. Effects of the beta 2-adrenoceptor antagonist ICI 118,551 on exercise tachycardia and isoprenaline-induced beta-adrenoceptor responses in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 5, p. 619–30, 1985.

ASHDOWN, H.; DUMONT, Y.; NG, M.; POOLE, S.; BOKSA, P.; LUHESHI, G. N. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 47–55, 2006.

BAINBRIDGE, J. G.; GREENWOOD, D. T. Tranquillizing effects of propranolol demonstrated in rats. **Neuropharmacology**, v. 4, n. 10, p. 453-458, 1971.

BALON, R.; YERAGANI, V. K.; POHL, R.; MUENCH, J.; BERCHOU, R. Somatic and psychological symptoms during isoproterenol-induced panic attacks. **Psychiatry Research**, v. 32, n. 2, p. 103–12, 1990.

BARNARD, C. J.; BEHNKE, J. M.; SEWELL, J. Social behaviour, stress and susceptibility to infection in house mice (*Mus musculus*): effects of duration of grouping and aggressive behaviour prior to infection on susceptibility to *Babesia microti*. **Parasitology**, v. 107, n. Part 2, p. 183–192, 1993.

BARNETT, J. R. C. C.; MOORE, E. E.; PARTRICK, D. A.; SILLIMAN, C. C. Beta-adrenergic stimulation down-regulates neutrophil priming for superoxide generation, but not elastase release. **Journal of Surgical Research**, v. 70, n. 2, p. 166–170, 1997.

BARTOLOMUCCI, A.; SACERDOTE, P.; PANERAI, A. E.; PETERZANI, T.; PALANZA, P.; PARMIGIANI, S. Chronic psychosocial stress-induced down-regulation of immunity depends upon individual factors. **Journal of Neuroimmunology**, v. 141, n. 1-2, p. 58–64, 2003.

BARTROP, R. W.; LUCKHURST, E.; LAZARUS, L.; KILOH, L. G.; PENNY, R. Depressed lymphocyte function after bereavement. **Lancet**, v. 1, n. 8016, p. 834–836, 1977.

BAUMEISTER, R. F.; LEARY, M. R. The need to belong: desire for interpersonal attachments as a fundamental human motivation. **Psychological Bulletin**, v. 117, n.3, p. 497-529, 1995.

BECKER, A. L. Oxprenolol and propranolol in anxiety states. A double-blind comparative study. **South African Medical Journal**, v. 50, n. 16, p. 627–9, 1976.

BECKER, B.; SHIN, D. H. Response to topical epinephrine. A practical prognostic test in patients with ocular hypertension. **Archives of Ophthalmology**, v. 94, n. 12, p. 2057–2058, 1976.

BELLINGER, D. L.; LORTON, D. Autonomic regulation of cellular immune function. **Autonomic Neuroscience: basic & clinical**, v. 182, p. 15–41, 2014.

BENSCHOP, R. J.; RODRIGUEZ-FEUERHAHN, M.; SCHEDLOWSKI, M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 10, n. 2, p. 77–91, 1996.

BERNBERG, E.; ULLERYD, M. A.; JOHANSSON, M. E.; BERGSTRÖM, G. M. L. Social disruption stress increases IL-6 levels and accelerates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. **Atherosclerosis**, v. 221, n. 2, p. 359–365, 2012.

BERRIDGE, C. W.; ABERCROMBIE, E. D. Relationship between locus coeruleus discharge rates and rates of norepinephrine release within neocortex as assessed by in vivo microdialysis. **Neuroscience**, v. 93, n. 4, p. 1263–1270, 1999.

BERRIDGE, C. W.; WATERHOUSE, B. D. The locus coeruleus-noradrenergic system: Modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Research Reviews**, v. 42, n. 1, p. 33–84, 2003.

BERTRAND, R. M.; FREDMAN, L.; SACZYNSKI, J. Are all caregivers created equal? Stress in caregivers to adults with and without dementia. **Journal of Aging and Health**, v. 18, n. 4, p. 534–551, 2006.

BERRIDGE, C. W.; SCHMEICHEL, B. E.; ESPAÑA, R. A. Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal. **Sleep Medicine Reviews**, v. 16, n. 2, p. 187–197, 2012.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E. Network of immune-neuroendocrine interactions. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 27, n. 1, p. 1–12, 1977.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response. **European Journal of Immunology**, v. 7, n. 5, p. 323–5, 1977.

BEYNON, R. J.; VEGGERBY, C.; PAYNE, C. E.; ROBERTSON, D. H.; GASKELL, S. J.; HUMPHRIES, R. E.; HURST, J. L. Polymorphism in major urinary proteins: molecular heterogeneity in a wild mouse population. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 7, p. 1429–46, 2002.

BILSKI, A. J.; HALLIDAY, S. E.; FITZGERALD, J. D.; WALE, J. L. The pharmacology of a beta 2-selective adrenoceptor antagonist (ICI 118,551). **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 430–437, 1983.

BORREGO, F.; ROBERTSON, M. J.; RITZ, J.; PEÑA, J.; SOLANA, R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. **Immunology**, v. 97, n. 1, p. 159–165, 1999.

BONN, J. A.; TURNER, P. D-propranolol and anxiety. **Lancet**, n.1, p.1355-1356, 1971.

BONN, J. A.; TURNER, P.; HICKS, D. C. Beta-adrenergic receptor blockade with practolol in treatment of anxiety. **Lancet**, p. 814-815, 1972.

BONVALLET, M.; DELL, P.; HEBEL, G. Tonus sympathetique et activité életrique corticale. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 6, n. 55, p. 118-144, 1954.

BOROVIKOVA, L.V.; IVANOVA, M.; ZHANG, C. Botchkina et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, p. 458-462, 2000.

BUIJS, R. M.; KALSBECK, a. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. **Neuroscience**, v. 2, n. 7, p. 521–526, 2001.

BRANTIGAN, C. O.; BRANTIGAN, T. a; JOSEPH, N. Effect of beta blockade and beta stimulation on stage fright. **The American Journal of Medicine**, v. 72, n. 1, p. 88–94, 1982.

CAO, L.; HUDSON, C. A.; LAWRENCE, D. A. Acute cold/restraint stress inhibits host resistance to *Listeria monocytogenes* via beta-1-adrenergic receptors. **Brain Behavior and Immunity**, v.17, n. 2, p.121-133, 2003a.

CASSIE, K. M.; SANDERS, S. Familial caregivers of older adults. **Journal of Gerontological Social Work**, v. 50, n. 14, p. 293–320, 2008. Suppl 1

CHANG, S. T.; LIU, Y. P.; HUANG, C. L.; WANG, P. Y.; TUNG, C. S. Implication of Cerebral Dopamine-beta Hydroxylase for Cardiovascular and Mood Regulation in Rats. **Chinese Journal of Physiology**, v. 56, n. 4, p. 209–218, 2013.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 259–284, 2005.

CHARNEY, D. S.; HENINGER, G. R. Noradrenergic function and the mechanism of action of antianxiety treatment. II. The effect of long-term imipramine treatment. **Archives of General Psychiatry**, v. 42, n. 5, p. 473-81, 1985.

CHEN, YUNAN; NGO, VICTOR; PARK, S. Y. Caring for caregivers. **Hospitals and Health Networks**, v. 87, p. 18–20, 2013.

CLARK, D. B.; AGRAS, W. S. The assessment and treatment of performance anxiety in musicians. **The American Journal of Psychiatry**, v. 148, n. 5, p. 598–605, 1991.

CLARK, D. M. A cognitive approach to panic. **Behaviour Research and Therapy**, v. 24, n. 4, p. 461–470, 1986.

COLONNA, M.; SAMARIDIS, J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. **Science** v. 268, n. 5209, p. 405–8, 1995.

CONNELL, C. M.; JANEVIC, M. R.; GALLANT, M. P. The costs of caring: impact of dementia on family caregivers. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 14, n. 4, p. 179–187, 2001.

CORÀ, A.; PARTINICO, M.; MUNAFÒ, M.; PALOMBA, D. Health risk factors in caregivers of terminal cancer patients: a pilot study. **Cancer Nursing**, v. 35, n. 1, p. 38–47, 2012.

COSTA, F. G.; FRUSSA-FILHO, R.; FELICIO, L. F. The neurotensin receptor antagonist, SR48692, attenuates the expression of amphetamine-induced behavioural sensitisation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 428, n. 1, p. 97–103, 2001.

COSTALL, B.; NAYLOR, R. J. **Cocaine and other stimulants**. New York: Plenum Press, 1977. v. 21, p. 47-76.

CROCKETT, A.; PANICKAR, A. Role of the sympathetic nervous system in pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 12, n. 2, p. 50–54, 2011.

CROSS, R. J.; BROOKS, W. H.; ROSZMAN, T. L.; MARKESBERY, W. R. Hypothalamic-immune interactions. Effect of hypophysectomy on neuroimmunomodulation. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 53, n. 3, p. 557–66, 1982.

CRUZ, D. G.; LIMA, A. N.; SILVA, P. B.; PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. Effects of Unilateral Cervical Vagotomy on Murine Dendritic Cells. **American Journal of Immunology**, v. 11, p. 48-55, 2015.

DANKOSKI E. C.; CARROLL S.; WIGHTMAN R.M. Acute SSRIs regulate the dorsal raphe nucleus causing amplification of terminal serotonin release. **Journal of Neurochemistry** v. 76, n. 6, p. 556-559, 2016.

DECETY, J.; NORMAN, G. J.; BERNTSON, G. G.; CACIOPPO, J. T. A neurobehavioral evolutionary perspective on the mechanisms underlying empathy. **Progress in Neurobiology**, v. 98, n. 1, p. 38–48, 2012.

DECETY, J.; SVETLOVA, M. Putting together phylogenetic and ontogenetic perspectives on empathy. **Developmental Cognitive Neuroscience**, v. 2, n. 1, p. 1–24, 2012.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O. Sympathetic nervous system-immune interactions in autoimmune lymphoproliferative diseases. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 1, p. 29–36, 2008.

DEL REY, A.; WOLFF, C.; WILDMANN, J.; RANDOLF, A.; HAHNEL, A.; BESEDOVSKY, H. O.; STRAUB, R. H. Disrupted brain-immune system-joint communication during experimental arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 10, p. 3090–3099, 2008.

MIQUEL C.; DEL RIO R.; PLISCOFF S. Propranolol and cardiac insufficiency. **Revista Médica de Chile**, v. 8, n. 97, p. 498-507, 1969.

DELANEY, A. J.; CRANE, J. W.; SAH, P. Noradrenaline modulates transmission at a central synapse by a presynaptic mechanism. **Neuron**, v. 56, n. 5, p. 56, 2007.

DHABHAR, F. S.; VISWANATHAN, K. Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. **American Journal of Physiology**, v. 289, n. 3, p. R738–R744, 2005.

DI NATALE C.; MACAGNANO A.; MARTINELLI E.; PAOLESSE R.; DÁRCANGELO G., ROSCIONI C.; FINAZZI-AGRÓ A.; D'AMICO A. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 10, p. 1209-1218, 2003.

DISHMAN, R. K.; WARREN, J. M.; HONG, S.; BUNNELL, B. N.; H., M. E.; MEYERHOFF, J. L.; JASO-FRIEDMANN, L.; EVANS, D. L. Treadmill exercise training blunts suppression of splenic natural killer cell cytotoxicity after footshock. **Journal of Applied Physiology**, n. 88, p. 2176–2182, 2000.

DOKUR, M.; BOYADJIEVA, N.; SARKAR, D. K. Catecholaminergic control of NK cell cytotoxic activity regulatory factors in the spleen. **Journal of Neuroimmunology**, v. 151, n. 1-2, p. 148–57, 2004.

DULAC, C.; WAGNER, S. Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. **Annual Review of Genetics**, v. 40, p. 449-467, 2006.

DUGUÉ, G. P.; MAINEN, Z. F. How serotonin gates olfactory information flow. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 6, p. 673–675, 2009.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, n. 1-2, p. 52–68, 2006.

DYCK, J. B.; CHUNG, F. A comparison of propranolol and diazepam for preoperative anxiolysis. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 38, n. 6, p. 704–9, 1991.

ELENKOV, I. J.; VIZI, E. S. Presynaptic modulation of release of noradrenaline from the sympathetic nerve terminals in the rat spleen. **Neuropharmacology**, v. 30, n. 12A, p. 1319–1324, 1991.

ELENKOV, I. J.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P.; VIZI, E. S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 595–638, 2000.

ELGHOZI, J. L.; BIANCHETTI, G.; MORSELLI, P. L.; MEYER, P. Brain distribution of propranolol in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 55, n. 0014-2999, p. 319–322, 1979.

ESLER, M.; LAMBERT, G.; BRUNNER-LA ROCCA, H. P.; VADDADI, G.; KAYE, D. Sympathetic nerve activity and neurotransmitter release in humans: translation from pathophysiology into clinical practice. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 177, p. 275–284, 2003.

ELMAN, M. J.; SUGAR, J.; FISCELLA, R.; DEUTSCH, T. A.; NOTH, J.; NYBERG, M.; PACKO, K.; ANDERSON, R. J. The effect of propranolol versus placebo on resident surgical performance. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 96, p. 283–91; discussion 291–4, 1998.

ESTERLING, B. A.; KIECOLT-GLASER, J. K.; GLASER, R. Psychosocial modulation of cytokine-induced natural killer cell activity in older adults. **Psychosomatic Medicine**, v.3, n.58, p. 264-272, 1996.

ESTLER, C. J.; AMMOM, H. P. Modification by two beta-adrenergic blocking drugs of the methamphetamine on behavior and brain metabolism of mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 5, n. 18, p. 777-9, 1971.

FAGGIN, B. M. **Efeitos do isolamento no desenvolvimento de tolerância ao barbital sódico**. 1980. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.

FLAMENT-DURAND, J. The hypothalamus: anatomy and functions. **Acta Psychiatrica Belgica**, v. 80, n. 4, p. 364-375, 1980.

FELDMAN R. The neurobiology of mammalian parenting and the biosocial context of human caregiving. **Hormones and Behavior**, v. 77, p. 3-17, 2016.

FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 253–256, 1996.

FELTEN, D. L. Direct innervation of lymphoid organs: substrate for neurotransmitter signaling of cells of the immune system. **Neuropsychobiology**, v. 28, n. 1-2, p. 110–112, 1993.

FERRAZ-DE-PAULA, V.; STANKEVICIUS, D.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. L.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; FLORIO, J. C.; LAPACHINSKE, S. F.; MOREAU, R. L. M.; PALERMO-NETO, J. Differential behavioral outcomes of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA-ecstasy) in anxiety-like responses in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 5, p. 428–437, 2011.

FLEMMING, S.; GREENWOOD, R. J.; OLIVER, D. L. Pharmacological management for agitation and aggression in people with acquired brain injury. **Cochrane database of systematic reviews (Online)**, n. 4, p. CD003299, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17054165>>. Acesso em: 1 fev. 2015.

FORTALEZA, E. A. T.; SCOPINHO, A. A.; CORRÊA, F. M. β -Adrenoceptors in the medial amygdaloid nucleus modulate the tachycardiac response to restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 227, p. 170–179, 2012.

FRANK, J. A.; DOUGHERTY T, F. Effect of graded amounts of epinephrine on normal and stress lymphocytes of intact and adrenalectomized mice. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 45, n. 3, p. 485-8, 1955.

FREEMANTLE, N.; CLELAND, J.; YOUNG, P.; MASON, J.; HARRISON, J. Beta blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. **British Medical Journal**, v. 318, n. 7200, p. 1730–1737, 1999.

GABAY, J. E.; HEIPLE, J. M.; COHN, Z. A.; NATHAN, C. F. Subcellular location and properties of bactericidal factors from human neutrophils. **Jornal of Experimental Medicine**, v. 164, n. 5, p. 1407–1421, 1986.

GLAVIN, G. Intramesolimbic dopamine D1 receptor activation reduced stress gastric lesions and gastric acid secretion. **International Journal of Experimental Clinical Gastroenterology**, v. 1, p. 55-60, 1991.

GHIA, J. E.; BLENNERHASSETT, P.; COLLINS, S. M. Vagus nerve integrity and experimental colitis. **American Journal of Physiology**, p. 293, 2007.

GIBSON-BERRY, K. L.; WHITIN, J. C.; COHEN, H. J. Modulation of the respiratory burst in human neutrophils by isoproterenol and dibutyryl cyclic AMP. **Journal of Neuroimmunology**. v. 43, p. 59-68, 1993.

GLOZMAN, J. M. Quality of life of caregivers. **Neuropsychology Review**, v. 14, n. 4, p. 183–96, 2004.

HAMASATO, E. K.; DE LIMA, A. P. N.; DE OLIVEIRA, A. P. L.; DOS SANTOS FRANCO, A. L.; DE LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick partner increases allergic lung inflammatory response in mice. **Brain, Behavior and Immunity**, n. 42, p. 109-117, 2014.

HANKE, M. L.; POWELL, N. D.; STINER, L. M.; BAILEY, M. T.; SHERIDAN, J. F. Beta adrenergic blockade decreases the immunomodulatory effects of social disruption stress. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 26, n. 7, p. 1150–9, 2012.

HARVATH, L. Neutrophil chemotactic factors. **Cell Motility Factors**, v. 59, p. 35–52, 1991.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**. v. 8, n. 117, p. 53-8, 1989.

HAUSER, R.; MARCZAK, M.; KARASZEWSKI, B.; WIERGOWSKI, M.; KALISZAN, M.; PENKOWSKI, M.; KERNBACH-WIGHTON, G.; JANKOWSKI, Z.; NAMIESNIK J. A preliminary study for identifying olfactory markers of fear in the rat. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 2, n. 37, p. 76-80, 2008

HERBERMAN, R.; NUNN, M. E.; LAVRIN, D. H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. **International Journal of Cancer**, v. 16, n. 2, p. 216–229, 1975.

HILLER-STURMHOFEL, S.; BARTKE, A. The Endocrine System. **Alcohol Health and Research World**, v. 22, n. 3, p. 153–163, 1998.

HUDSON, C. F. E.; JOSEPH, S. P.; LAWRIE, D. M. A comparative study of conventional and long-acting formulations of propranolol in essential hypertension. **British Journal of Clinical Practice**, v. 41, n. 1, p. 566–568, 1987.

HUGELIN, A.; BONVALLET, M.; DELL, P. Activation réticulaire et corticale d'origine chémoceptive au cours de l'hypoxie. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 6, n. 11, p. 325-340, 1959.

HURST, J. L.; PAYNE, C. E.; NEVISON, C. M.; MARIE, A. D.; HUMPHRIES, R. E.; ROBERTSON, D. H.; CAVAGGIONI, A.; BEYNON, R. J. Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. **Nature**, v. 414, n. 6864, p. 631-634, 2001.

IRWIN, M.; MASCOVICH, A.; GILLIN, J. C.; WILLOUGHBY, R.; PIKE, J.; SMITH, T. L. Partial sleep deprivation reduces natural killer cell activity in humans. **Psychosomatic Medicine**, v. 56, n. 6, p. 493–498, 1994.

IWATA, N.; HORIGUCHI, K. Differences in caregivers' psychological distress and associated factors by care recipients' gender and kinship. **Aging Mental Health**, v.14, p. 1-9. 2015

JAMES, I.; SAVAGE, I. Beneficial effect of nadolol on anxiety-induced disturbances of performance in musicians: a comparison with diazepam and placebo. **American Heart Journal**, v. 108, n. 4 Pt 2, p. 1150–5, 1984.

JEFFERSON, J.W. Beta-adrenergic receptor blocking drugs in psychiatry. **Archives of General Psychiatry**, n. 31, p. 681-691, 1974.

JENSON, D.; YANG, K.; ACEVEDO-RODRIGUEZ, A.; LEVINE, A.; BROUSSARD, J. I.; TANG, J.; DANI, J. A. Dopamine and norepinephrine receptors participate in methylphenidate enhancement of in vivo hippocampal synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v. 90, p. 23–32, 2015.

JEONG, A.; SHIN, D.W.; KIM, S.Y.; YANG, H.K.; PARK, K.; AN, J.Y, PARK J.H. The effects on caregivers of cancer patient's needs and family hardness. **Psychooncology**, v.1, n.10, p.84-90, 2016.

JESSOP, J. J.; BAYER, B. M. Time-dependent effects of isolation on lymphocyte and adrenocortical activity. **Journal of Neuroimmunology**, v. 23, n. 2, p. 143–147, 1989.

JIWA, M.; MITCHELL, G.; SIBBRIT, D.; GIRGIS, A.; BURRIDGE, L. Addressing the needs of caregivers of cancer patients in general practice: a complex intervention. **Quality in Primary Care**, v. 18, n. 1, p. 9–16, 2010.

JOÃO GUMARÃES ROSA. **Estas Estórias**, Rio de Janeiro, José Olympio, p.177, 1969.

JORDAN, W.C; BRUDFORD, M.W. New perspectives on mate choice and the MHC. **Heredity**, v. 81, p. 127-133, 1998.

KANDEL, E. R.; SQUIRE, L. R. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. **Science**, v. 290, n. 5494, p. 1113–1120, 2000.

KATAFUCHI, T.; ICHIJO, T.; TAKE, S.; HORI, T. Hypothalamic modulation of splenic natural-killer-cell activity in rats. **Journal of Physiology**, v. 471, p. 209–221, 1993.

KATHOL, R. G.; NOYES, R.; SLYMEN, D. J.; CROWE, R. R.; CLANCY, J.; KERBER, R. E. Propranolol in chronic anxiety disorders. A controlled study. **Archives of General Psychiatry**, v. 37, n. 12, p. 1361–5, 1980.

KAVALIERS, M.; CHOLERIS, E.; PFAFF, D. W. Recognition and avoidance of the odors of parasitized conspecifics and predators: Differential genomic correlates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1347–1359, 2005.

KAVALIERS, M.; COLWELL, D. D. Aversive responses of female mice to the odors of parasitized males: Neuromodulatory mechanisms and implications for mate choice. **Ethology**, v. 95, p. 202–212, 1993.

KEENEY, A.; JESSOP, D. S.; HARBUZ, M. S.; MARSDEN, C. a.; HOGG, S.; BLACKBURN-MUNRO, R. E. Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 13, p. 330–338, 2006.

KIECOLT-GLASER, J. K.; DURA, J. R.; SPEICHER, C. E.; TRASK, O. J.; GLASER, R. Spousal caregivers of dementia victims: longitudinal changes in immunity and health. **Psychosomatic Medicine**, v. 53, p. 345–362, 1991.

KIKUSUIT, T.; TAKIGAMI, S.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Alarm pheromone enhances stress-induced hyperthermia in rats. **Physiology and Behavior**, v. 72, n. 1-2, p. 45-50, 2001.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZELL, H. “Natural” killer cells in the mouse I. Cytotoxic Cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype*. **European Journal of Immunology**, v. 5, p. 112–117, 1975.

KIM, Y.; BAKER, F.; SPILLERS, R. L.; WELLISCH, D. K. Psychological adjustment of cancer caregivers with multiple roles. **Psycho-Oncology**, v. 15, n. 9, p. 795–804, 2006.

KIM, Y.; SPILLERS, R. L.; HALL, D. L.; Y., K.; R.L., S.; D.L., H. Quality of life of family caregivers 5 years after a relative’s cancer diagnosis: follow-up of the national quality of life survey for caregivers. **Psycho-Oncology**, v. 21, n. 3, p. 273–281, 2012.

KOELLA, W. P.; SMYTHIES, J. R.; BULL, D. M; LEVY, C. K. Physiological fractionation of the effect of serotonin on evoked potentials. **American Journal of Physiology**, v. 2, n. 198, p. 205-212, 1960.

KOELLA W. P.; CZICMAN, J. Mechanism of the EEG-synchronizing action of serotonin. **American Journal of Physiology**, v. 2, n.211, p. 926-934, 1966.

KOHM, A. P.; TANG2, Y.; SANDERS, V. M.; JONES, S. B. Activation of antigen-specific CD4+ Th2 cells and B cells in vivo increases norepinephrine release in the spleen and bone marrow. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 2, p. 725–33, 2000.

KONSMAN, J. P.; LUHESHI, G. N.; BLUTHÉ, R. M.; DANTZER, R. The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune

signals; a functional anatomical analysis. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 4434–4446, 2000.

KRUGERS, H. Regulation of excitatory synapses and fearful memories by stress hormones. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, p. 1–11, 2011.

KVETNANSKY, R. Sympathoadrenal System in Stress Interaction with the Hypothalamic-Pituitary- Adrenocortical System. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 771, n. 1, p. 131–158, 1995.

LANIER, L. L. NK cell recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 225–74, 2005.

LENT, R. **100 Bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de Neurociências**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

LE MOAL, M.; SIMON, H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. **Physiological Reviews**, v. 71, n. 11, p. 155-234, 1991.

LIN, D.; BOYLE, M. P.; DOLLAR, P.; LEE, H.; LEIN, E. S.; PERONA, P.; ANDERSON, D. J. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 221–226, 2011.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.

LISTER, R. G. Ethologically based animal models of anxiety disorders. In: UNIVERSITY OF LONDON. **Psychopharmacology of anxiolytics and antidepressants**. New York: Pergamon Press, 1991. p. 155–185.

LIVNAT, S.; MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y. Regulation of the immune system by sympathetic neural mechanisms. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological psychiatry**, v. 11, n. 2-3, p. 145–152, 1987.

LJUNGGREN, H. G.; KÄRRE, K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 162, n. 6, p. 1745–59, 1985.

LUCINI, D.; CANNONE, V.; MALACARNE, M.; BRUNO, D.; BELTRAMI, S.; PIZZINELLI, P.; PIAZZA, E.; DI FEDE, G.; PAGANI, M. Evidence of autonomic dysregulation in otherwise healthy cancer caregivers: a possible link with health hazard. **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 16, p. 2437–2443, 2008.

LY, S.; PISHDARI, B.; LOK, L. L.; HAJOS, M.; KOCSIS, B. Activation of 5-HT₆ receptors modulates sleep-wake activity and hippocampal theta oscillation. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 191–9, 2013.

MACHADO, T. R. M. **Alterações neuroimunes induzidas em camundongos machos pela convivência com um companheiro doente**. 2013. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível:

<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-30092013-164610/pt-br.php>>. Acesso em: 10 out. 2013.

MADDEN, K. S.; SANDERS, V. M.; FELTEN, D. L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 417–448, 1995.

MANTEGAZZA, P.; NAIMZADA, K. M.; RIVA, M. Effects of propranolol on some activities of amphetamine. **European Journal of Pharmacology**, v. 4, p. 25-30, 1968.

MARTÍN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L. L.; BRETT, S.; GERARD, C.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. **Nature Immunology**, v. 5, n. 12, p. 1260–1265, 2004.

MASON, L. H.; ORTALDO, J. R.; YOUNG, H. A.; KUMAR, V.; BENNETT, M.; ANDERSON, S. K. Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1: a member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 2, p. 293–303., 1995.

MAUSBACH, B. T.; ROEPKE, S. K.; ZIEGLER, M. G.; MILIC, M.; VON KÄNEL, R.; DIMSDALE, J. E.; MILLS, P. J.; PATTERSON, T. L.; ALLISON, M. A.; ANCOLI-ISRAEL, S.; GRANT, I. Association between chronic caregiving stress and impaired endothelial function in the elderly. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 55, n. 23, p. 2599–606, 2010.

MEALY, K.; NGEH, N.; GILLEN, P.; FITZPATRICK, G.; KEANE, F. B.; TANNER, A. Propranolol reduces the anxiety associated with day case surgery. **The European Journal of Surgery**, v. 162, n. 1, p. 11–4, 1996.

MEIBACH, R. C.; DUNNER, D.; WILSON, L. G.; ISHIKI, D.; DAGER, S. R. Comparative efficacy of propranolol, chlordiazepoxide, and placebo in the treatment of anxiety: a double-blind trial. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 48, n. 9, p. 355–358, 1987.

MILSTEIN, O.; HAGIN, D.; LASK, A.; REICH-ZELIGER, S.; SHEZEN, E.; OPHIR, E.; EIDELSTEIN, Y.; AFIK, R.; ANTEBI, Y. E.; DUSTIN, M. L.; REISNER, Y. CTLs respond with activation and granule secretion when serving as targets for T-cell recognition. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 1042–52, 2011.

MISHRIKI, A. A.; WEIDLER, D. J. Long-acting propranolol (Inderal LA): pharmacokinetics, pharmacodynamics and therapeutic use. **Pharmacotherapy**, v. 3, n. 6, p. 334–341, 1983.

MÓCSAI, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 7, p. 1283–99, 2013.

MORETTA, L.; BOTTINO, C.; CANTONI, C.; MINGARI, M. C.; MORETTA, A. Human natural killer cell function and receptors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 387–391, 2001.

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

MORUZZI, G.; MAGOUN, H. . Brainstem reticular formation and activation of the EEG. **Clinical Neurophysiology**, v. 1, p. 455–473, 1949.

MONTAGNA, P. Hypothalamus, sleep and headaches. **Neurological Sciences**, v. 27, p. 138–143, 2006.

NACE, G. S.; WOOD, A. J. Pharmacokinetics of long acting propranolol. Implications for therapeutic use. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 13, n. 1, p. 51–64, 1987.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722–726, 2000.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews**, v. 6, n. 3, p. 173–182, 2006.

NAVAIE-WALISER, M.; FELDMAN, P. H.; GOULD, D. A.; LEVINE, C.; KUERBIS, A. N.; DONELAN, K. When the caregiver needs care: The plight of vulnerable caregivers. **American Journal of Public Health**, v. 92, n. 3, p. 409–413, 2002.

NOVOTNY, M.; HARVEY, S.; JEMIOLO, B.; ALBERTS J. Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 7, p. 2059–2061, 1985.

O'DONNELL, S. R.; WANSTALL, J. C. Evidence that ICI 118, 551 is a potent, highly beta2-selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize beta-adrenoceptor populations in tissues. **Life Sciences**, v. 27, n. 8, p. 671–677, 1980.

PACIFICI, R.; ZUCCARO, P.; FARRÉ, M.; PICHINI, S.; DI CARLO, S.; ROSET, P. N.; ORTUÑO, J.; SEGURA, J.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, C.; DE LA TORRE, R. Immunomodulator properties of ecstasy (MDMA). **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, v. 36, n. 1, p. 69–75, 2000.

PALANZA, P.; GIOIOSA, L.; PARMIGIANI, S. Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. **Physiology and Behavior**, v. 73, n. 3, p. 411–420, 2001.

PALERMO-NETO, J.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 43–54, 2003.

PALUMBO, M. L.; CANZOBRE, M. C.; PASCUAN, C. G.; RÍOS, H.; WALD, M.; GENARO, A. M. Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice. Correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure. **Journal of Neuroimmunology**, v. 218, n. 1–2, p. 12–20, 2010.

PARATI, G.; ESLER, M. The human sympathetic nervous system: Its relevance in hypertension and heart failure. **European Heart Journal**, v. 33, n. 9, p. 1058–1066, 2012.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, p. 493–499, 2005.

PTAK, K.; YAMANISHI, T.; AUNGST, J.; MILESCU, L. S.; ZHANG, R.; RICHERSON, G. B.; SMITH, J. C. Raphé neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3720–3737, 2009.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PETZOLD, G. C.; HAGIWARA, A.; MURTHY, V. N. Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 6, p. 784–791, 2009.

PHILLIPS, M.; GLEESON, K.; HUGHES, J. M.; GREENBERG, J.; CATANEO, R. N.; BAKER, L.; MCVAY, W. P. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. **Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1930–3, 1999.

PHILLIPS, A. C.; CARROLL, D.; BURNS, V. E.; RING, C.; MACLEOD, J.; DRAYSON, M. Bereavement and marriage are associated with antibody response to influenza vaccination in the elderly. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 20, n. 3, p. 279–289, 2006.

PINQUART, M.; SÖRENSEN, S. Differences between caregivers and noncaregivers in psychological health and physical health: a meta-analysis. **Psychology and Aging**, v. 18, n. 2, p. 250–267, 2003.

POLI, A.; PALERMO-NETO, J. Effects of d,l-propranolol on open field behavior of rats. **Psychopharmacology**, v. 86, n. 1-2, p. 153–155, 1985.

POLI, A.; PALERMO-NETO, J. Effects of d,1-propranolol and haloperidol on aggressive behavior induced in mice by isolation and isolation plus amphetamine treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 19, n. 3, p. 411–417, 1986.

PRIVIERO, F. B. M.; TEIXEIRA, C. E.; TOQUE, H. A. F.; CLAUDINO, M. A.; WEBB, R. C.; DE NUCCI, G.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Vasorelaxing effects of propranolol in rat aorta and mesenteric artery: A role for nitric oxide and calcium entry blockade. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 5-6, p. 448–455, 2006.

PTAK, K.; YAMANISHI, T.; AUNGST, J.; MILESCU, L. S.; ZHANG, R.; RICHERSON, G. B.; SMITH, J. C. Raphé neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3720–3737, 2009.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F. Y.; DELEO, J. A. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 467–473, 2004.

RAINBOW, T. C.; PARSONS, B.; WOLFE, B. B. Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 5, p. 1585–1589, 1984.

RAMAN, I. M.; TONG, G.; JAHR, C. E. Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. **Neuron**, v. 16, p. 415–421, 1996.

RATEY, J. J.; BEMPORAD, J.; SORGI, P.; BICK, P.; POLAKOFF, S.; O'DRISCOLL, G.; MIKKELSEN, E. Open trial effects of beta-blockers on speech and social behaviors in 8 autistic adults. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 17, n. 3, p. 439–46, 1987.

READER, B. F.; JARRETT, B. L.; MCKIM, D. B.; WOHLEB, E. S.; GODBOUT, J. P.; SHERIDAN, J. F. Peripheral and central effects of repeated social defeat stress: Monocyte trafficking, microglial activation, and anxiety. **Neuroscience**, p. 0–14, 2015.

RICE, P. A.; BOEHM, G. W.; MOYNIHAN, J. A. Chemical sympathectomy increases the innate immune response and decreases the specific immune response in the spleen to infection with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Neuroimmunology**, v. 114, n. 1-2, p. 19-27, 2001.

RICHARDSON, T. J.; LEE, S. J.; BERG-WEGER, M.; GROSSBERG, G. T. Caregiver health: Health of caregivers of Alzheimer's and other dementia patients topical collection on geriatric disorders. **Current Psychiatry Reports**, v. 15, n. 7, 2013a.

RICHARDSON, T. J.; LEE, S. J.; BERG-WEGER, M.; GROSSBERG, G. T. Caregiver health: health of caregivers of Alzheimer's and other dementia patients. **Current Psychiatry Reports**, v. 15, n. 7, p. 367, 2013b.

ROHLEDER, N.; MARIN, T. J.; MA, R.; MILLER, G. E. Biologic cost of caring for a cancer patient: Dysregulation of pro- and anti-inflammatory signaling pathways. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 18, p. 2909–2915, 2009.

ROTH, G. I.; WALTON, P. L.; YAMAMOTO, W. S. Area postrema: abrupt EEG synchronization following close intra-arterial perfusion with serotonin. **Brain Research**, n. 23, p. 223-233, 1970.

SAINT-MEZARD, P.; CHAVAGNAC, C.; BOSSET, S.; IONESCU, M.; PEYRON, E.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J.-F.; BÉRARD, F. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 8, p. 4073–4080, 2003.

SANDERS, V. M.; BAKER, R. A.; RAMER-QUINN, D. S.; KASPROWICZ, D. J.; FUCHS, B. A.; STREET, N. E. Differential expression of the beta2-adrenergic

receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 9, p. 4200–4210, 1997.

SANDERS, V. M. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet? **Brain, Behavior and Immunity**, v. 26, n. 2, p. 195–200, 2012.

SANSONETTI, P. J. Phagocytosis, a cell biology view. **Journal of Cell Science**, v. 113, pt. 19, p. 3355–3356, 2000.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews**, v. 177, n. 4, p. 195–203, 2000.

SCALES, B.; COSGROVE, M. B. The metabolism and distribution of the selective adrenergic beta-blocking agent, practolol. **Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 175, p. 338–347, 1970.

SCHAAL, B.; COUREAUD, G.; LANGLOIS, D.; GINIÈS, C.; SÈMON, E.; PERRIER, G. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. **Nature**, v. 424, n. 6944, p. 68–72, 2003.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 10, n. 2, p. 230–231, 1998.

SEMMLER, A.; HERMANN, S.; MORMANN, F.; WEBERPALS, M.; PAXIAN, S. A.; OKULLA, T.; SCHÄFERS, M.; KUMMER, M. P.; KLOCKGETHER, T.; HENEKA, M. T. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 38, 2008.

SERLIN, M. J.; ORME, M. L.; MACIVER, M.; GREEN, G. J.; SIBEON, R. G.; BRECKENRIDGE, A. M. The pharmacodynamics and pharmacokinetics of conventional and long-acting propranolol in patients with moderate hypertension. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 15, p. 519–527, 1983.

SHAW, W. S.; PATTERSON, T. L.; ZIEGLER, M. G.; DIMSDALE, J. E.; SEMPLE, S. J.; GRANT, I. Accelerated risk of hypertensive blood pressure recordings among Alzheimer caregivers. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 46, n. 3, p. 215–227, 1999.

SHERWOOD, P. R.; GIVEN, B. A.; DONOVAN, H.; BAUM, A.; GIVEN, C. W.; BENDER, C. M.; SCHULZ, R. Guiding research in family care: A new approach to oncology caregiving. **Psycho-Oncology**, v. 17, p. 986–996, 2008.

SHIPLEY, M. T. Transport of molecules from nose to brain: transneuronal anterograde and retrograde labeling in the rat olfactory system by wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase applied to the nasal epithelium. **Brain Research Bulletin**, v. 15, n. 2, p. 129–142, 1985.

SILVA, M. R.; OLIVEIRA, C. A.; FELICIO, L. F.; NASELLO, A. G.; BERNARDI, M. M. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 60, n. 1, p. 203–8, 1998.

SMITH, B. D.; SMITH, G. L.; HURRIA, A.; HORTOBAGYI, G. N.; BUCHHOLZ, T. a. Future of cancer incidence in the United States: Burdens upon an aging, changing nation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 17, p. 2758–2765, 2009.

SORRELL, J. M.; MATTERS, A. Caring for the caregivers. **Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services**, v. 45, n. 11, p. 17–20, 2007.

STANLEY, S.; WYNNE, K.; MCGOWAN, B.; BLOOM, S. Hormonal regulation of food intake. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 1131–1158, 2005.

SPANEL, P.; SMITH, D.; HOLLANDM T. A.; AL SINGARY, W.; ELDER, J. B. Analysis of formaldehyde in the headspace of urine from bladder and prostate cancer patients using selected ion flow tube mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**: RCM, v. 13, n. 14, p. 1354-1359, 1999.

SPEISER, Z.; WEINSTOCK, M. The influence of propranolol on abnormal behaviour induced in rats by prolonged isolation- an animal model for mania. **British Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 67, p. 348-349, 1973.

SPITS, H.; BLOM, B.; JALECO, A. C.; WEIJER, K.; VERSCHUREN, M. C.; VAN DONGEN, J. J.; HEEMSKERK, M. H.; RES, P. C. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. **Immunological Reviews**, v. 165, p. 75–86, 1998.

STAMP, J.; HERBERT, J. Corticosterone modulates autonomic responses and adaptation of central immediate-early gene expression to repeated restraint stress. **Neuroscience**, v. 107, n. 3, p. 465–479, 2001.

STEENEN, S. A.; VAN WIJK, A. J.; VAN DER HEIJDEN, G. J.; VAN WESTRHENEN R.; DE LANGE, J.; DE JONGH, A. Propranolol for the treatment of anxiety disorders: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Psychopharmacology**. v. 30, n. 230, p.128-39, 2016.

STONE, E. A. Effect of stress on norepinephrine-stimulated cyclic AMP formation in brain slices. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 8, n. 5, p. 583-91, 1978.

STONE, E. A.; PLATT, J. E.; TRULLAS, R.; SLUCKY, A. V. Reduction of the cAMP response to norepinephrine in rat cerebral cortex following repeated restraint stress. **Psychopharmacology**, v. 82, n. 4, p. 403–5, 1984.

STROTH, N.; KURI, B. A.; MUSTAFA, T.; CHAN, S.; SMITH, C. B.; EIDEN, L. E. PACAP controls adrenomedullary catecholamine secretion and expression of catecholamine biosynthetic enzymes at high splanchnic nerve firing rates characteristic of stress transduction in male mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 330–9, 2013.

STUBBS, E. G.; CRAWFORD, M. L. Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children. **Journal of Autism and Childhood Schizophrenia**, v. 7, n. 1, p. 49–55, 1977.

STUCHLIK, A.; REHAKOVA, L.; TELENSKY, P.; VALES, K. Morris water maze learning in Long-Evans rats is differentially affected by blockade of D1-like and D2-like dopamine receptors. **Neuroscience Letters**, v. 422, n. 3, p. 169–174, 2007.

SUGIMOTO, K.; ISHIKAWA, M.; KOUKETSU, N.; OZAKI, M.; TOMITA, I.; HONG, Y.; MIURA, H.; NISHIKAWA, M.; YOKOE, Y.; NAKASHIMA, K. Medical care support intervention to the patient and family who has chosen a terminal care at home - an influence of satisfactory experience on the culture of terminal care. **Gan To Kagaku Ryoho**, v. 37, p. 259-260, 2010. Supplement, 2.

SUNDELIN, T.; KARSHIKOFF, B.; AXELSSON, E.; HÖGLUND, C. O.; LEKANDER, M.; AXELSSON, J. Sick man walking: Perception of health status from body motion. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 48, p. 53–56, 2015.

SUZUKI, Y.; KIYOKAGE, E.; SOHN, J.; HIOKI, H.; TOIDA, K. Structural basis for serotonergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 523, n. 2, p. 262–80, 2015.

TARR, A. J.; POWELL, N. D.; READER, B. F.; BHAVE, N. S.; ROLOSON, A. L.; CARSON, W. E.; SHERIDAN, J. F. β -Adrenergic receptor mediated increases in activation and function of natural killer cells following repeated social disruption. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 26, n. 8, p. 1226–38, 2012.

TATTERSFIELD, A. E.; CRAGG, D. J. Effect of ICI 118551 on bronchial beta-adrenoceptor function and exercise heart rate in normal man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 16, n. 6, p. 587–90, 1983.

TEIXEIRA, R. J.; PEREIRA, M. G. Psychological morbidity and autonomic reactivity to emotional stimulus in parental cancer: a study with adult children caregivers. **European Journal of Cancer Care**, v. 23, n. 1, p. 129–39, 2014.

THIBEAULT, I.; LAFLAMME, N.; RIVEST, S. Regulation of the gene encoding the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in the mouse and rat brain in response to circulating LPS and proinflammatory cytokines. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 434, n. 4, p. 461–477, 2001.

TOMIYOSHI, M. Y.; SAKAI, M.; BALEEIRO, R. B.; STANKEVICIUS, D.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J.; BARBUTO, J. a M. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 23, n. 4, p. 558–567, 2009.

TORDA, T.; YAMAGUCHI, I.; HIRATA, F.; KOPIN, I. J.; AXELROD, J. Quinacrine-blocked desensitization of adrenoceptors after immobilization stress or repeated injection of isoproterenol in rats. **Journal of Pharmacological Experimental Therapy**, v. 216, n. 2, p. 334–338, 1981.

TORRES, K. C. L.; ANTONELLI, L. R. V.; SOUZA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC. **Journal of Neuroimmunology**, v. 166, n. 1-2, p. 144–57, 2005.

TYRER, P. J.; LADER, M. H. Response to propranolol and diazepam in somatic and psychic anxiety. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5909, p. 14–6, 1974.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.

U'PRICHARD, D. C.; REISINE, T. D.; MASON, S. T.; FIBIGER, H. C.; YAMAMURA, H. I. Modulation of rat brain alpha- and beta-adrenergic receptor populations by lesion of the dorsal noradrenergic bundle. **Brain Research**, v. 187, n. 1, p. 143–54, 1980.

VALENTINO, R. J.; VAN BOCKSTAELE, E. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 2-3, p. 194–203, 2008.

VAN BOCKSTAELE, E. J.; PEOPLES, J.; TELEGAN, P. Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-Locus coeruleus dendrites in rat brain: Evidence for a monosynaptic pathway. **Journal of Comparative Neurology**, v. 412, p. 410–428, 1999.

VANDERWERKER, L. C.; LAFF, R. E.; KADAN-LOTTICK, N. S.; MCCOLL, S.; PRIGERSON, H. G. Psychiatric disorders and mental health service use among caregivers of advanced cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 28, p. 6899–6907, 2005.

VEGAS, O.; BEITIA, G.; SÁNCHEZ-MARTIN, J. R.; ARREGI, A.; AZPIROZ, A. Behavioral and neurochemical responses in mice bearing tumors submitted to social stress. **Behavioural Brain Research**, v. 155, n. 1, p. 125–34, 2004.

VERHEIJ, M. M. M.; COOLS, A. R. Accumbal noradrenaline that contributes to the alpha-adrenoceptor-mediated release of dopamine from reserpine-sensitive storage vesicles in the nucleus accumbens is derived from alpha-methyl-para-tyrosine-sensitive pools. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n. 4, p. 389–394, 2009.

VELLONE, E.; PIRAS, G.; TALUCCI, C.; COHEN, M. Z. Quality of life for caregivers of people with Alzheimer's disease. **Journal of Advanced Nursing**, v. 61, p. 222–231, 2008.

VERSCHOOR, C. P.; LOUKOV, D.; NAIDOO, A.; PUCHTA, A.; JOHNSTONE, J.; MILLAR, J.; LELIC, A.; NOVAKOWSKI, K. E.; DORRINGTON, M. G.; LOEB, M.; BRAMSON, J. L.; BOWDISH, D. M. E. Circulating TNF and mitochondrial DNA are major determinants of neutrophil phenotype in the advanced-age, frail elderly. **Molecular Immunology**, v. 65, n. 1, p. 148–156, 2015.

VETTER, P. H.; KRAUSS, S. Vascular dementia versus dementia of Alzheimer's type: do they have differential effects on caregivers' burden? **The Journals of Gerontology. Series B, Psychological Sciences and Social Sciences**, v. 54, n. 2, p. S93–S98, 1999.

VITALIANO, P. P.; RUSSO, J.; YOUNG, H. M.; TERI, L.; MAIURO, R. D. Predictors of burden in spouse caregivers of individuals with Alzheimer's disease. **Psychology and Aging**, v. 6, n. 3, p. 392–402, 1991.

- VITALIANO, P. P.; ZHANG, J.; SCANLAN, J. M. Is caregiving hazardous to one's physical health? A meta-analysis. **Psychological Bulletin**, v. 129, n. 6, p. 946–972, 2003.
- VIVIER, E.; TOMASELLO, E.; BARATIN, M.; WALZER, T.; UGOLINI, S. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 503–510, 2008.
- WEBB, A. J. S.; FISCHER, U.; ROTHWELL, P. M. Effects of β -blocker selectivity on blood pressure variability and stroke: a systematic review. **Neurology**, v. 77, n. 8, p. 731–7, 2011.
- WEISS, M.; SCHNEIDER, E. M.; TARNOW, J.; METTLER, S.; KRONE, M.; TESCHEMACHER, A.; LEMOINE, H. Is inhibition of oxygen radical production of neutrophils by sympathomimetics mediated via beta-2 adrenoceptors? **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, n. 3, p. 1105–13, 1996.
- WEINSTOCK, M.; SPEISER, Z. The effect of dl-propranolol, d-propranolol and practolol on the hyperreactivity induced in rats by prolonged isolation. **Psychopharmacology**, v. 30, p. 241–250, 1973.
- WELKENHUYSEN, M.; VAN KUYCK, K.; DAS, J.; SCIOT, R.; NUTTIN, B. Electrical stimulation in the lateral hypothalamus in rats in the activity-based anorexia model. **Neurosurgical Focus**, v. 25, n. 1, p. E7, 2008.
- WENNER, M.; KAWAMURA, N.; ISHIKAWA, T.; MATSUDA, Y. Reward linked to increased natural killer cell activity in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 7, n. 1, p. 1–5, 2000.
- WEITZNER, M. A.; HALEY, W. E.; CHEN, H. The family caregiver of the older cancer patient. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 14, n. 1, p. 269–81, 2000.
- WHEELER, J. W. Insect and mammalian pheromones. **Lloydia**, v. 39, n. 1, p. 53–59, 1976.
- WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 440–464, 2010.
- WILLIS, C. M.; CHURCH, S. M.; GUEST, C. M.; COOK, W. A.; MCCARTHY, N.; BRANSBURY, A. J.; CHURCH, M. R.; CHURCH, J. C. Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. **British Medical Journal (Clinical Research ed)**, v. 329, n. 7468, p. 712, 2004.
- WILSON, J. S. Caregiving: a mixed bag of burdens and rewards. **Home Healthcare Nurse**, v. 5, p. 45–6, 1991.
- WOHLEB, E. S.; HANKE, M. L.; CORONA, A. W.; POWELL, N. D.; STINER, L. M.; BAILEY, M. T.; NELSON, R. J.; GODBOUT, J. P.; SHERIDAN, J. F. β -Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 17, p. 6277–88, 2011.

YAMAZAKI, K.; BOYSE, E. A.; BARD, J.; CURRAN, M.; KIM, D.; ROSS, S. R.; BEAUCHAMP, G. K. Presence of mouse mammary tumor virus specifically alters the body odor of mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 5612–5615, 2002.

YIRMIYA, R.; WEIDENFELD, J.; BARAK, O.; AVITSUR, R.; POLLAK, Y.; GALLILY, R.; WOHLMAN, A.; OVADIA, H.; BEN-HUR, T. The role of brain cytokines in mediating the behavioral and neuroendocrine effects of intracerebral mycoplasma fermentans. **Brain Research**, v. 829, n. 1-2, p. 28–38, 1999.

YORKSTON, N. J.; ZAKI, S. A.; MALIK, M. K.; MORRISON, R. C.; HAVARD, C. W. Propranolol in the control of schizophrenic symptoms. **British Medical Journal**, v. 4, n. 5945, p. 633–5, 1974.

ZABORSZKY, L.; CARLSEN, J.; BRASHEAR, H. R.; HEIMER, L. Cholinergic and Gabaergic Afferents to the Olfactory-Bulb in the Rat with Special Emphasis on the Projection Neurons in the Nucleus of the Horizontal Limb of the Diagonal Band. **Journal of Comparative Neurology**, v. 243, n. 4, p. 488–509., 1986.

ZAGER, A.; PERON, J. P.; MENNECIER, G.; RODRIGUES, S. C.; ALOIA, T. P.; PALERMO-NETO, J. Maternal immune activation in late gestation increases neuroinflammation and aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis in the offspring. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 43, p. 159–71, 2015.

ZAK-NEJMARK, T.; JANKOWSKA, R.; MALOLEPSZY, J.; KRAUS-FILARSKA, M.; NADOBNA, G.; NOWAK, I. A. Modulation of adhesion and chemotaxis of human neutrophils by cortisol, transforming growth factor-beta and antiinflammatory drugs. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 8, n. 6, p.346-52, 1998.

ZESIEWICZ, T. A.; SHAW, J. D.; ALLISON, K. G.; STAFFETTI, J. S.; OKUN, M. S.; SULLIVAN, K. L. Update on treatment of essential tremor. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 15, n. 4, p. 410–23, 2013.

ZORRILLA, E. P.; LUBORSKY, L.; MCKAY, J. R.; ROSENTHAL, R.; HOULDIN, A.; TAX, A.; MCCORKLE, R.; SELIGMAN, D. A.; SCHMIDT, K. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 15, n. 3, p. 199–226, 2001.