GLAUCIE JUSSILANE ALVES

**Coabitação com um parceiro doente: avaliações das
alterações neuroimunes e da forma de comunicação**

São Paulo

2010

GLAUCIE JUSSILANE ALVES

***Coabitação com um parceiro doente: avaliações
das alterações neuroimunes e da forma de
comunicação***

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. João Palermo Neto

**São Paulo
2010**

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.2275
FMVZ

Alves, Glaucie Jussilane

Coabitação com um parceiro doente: avaliações das alterações neuroimunes e da forma de comunicação / Glaucie Jussilane Alves. -- 2010.
189 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo-Neto.

1. Neuroimunomodulação. 2. Comunicação Animal. 3. Odor. 4. Estresse psicológico. 5. Citometria. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da coabitação com um parceiro doente: avaliação das alterações comportamentais e da atividade imune inata e adquirida", protocolado sob o nº956/2006, utilizando 144 (cento e quarenta e quatro) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/08/06".

(We certify that the Research "Effects of the cohabitation with a sick cage-mate: evaluation of the changes on the behavior and on the immune activity innate and acquired", protocol number 956/2006, utilizing 144 (one hundred and forty for) mice, under the responsibility of Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome de Autor: ALVES, Glaucie Jussilane

Título: Coabitação com um parceiro doente: avaliações das alterações neuroimunes e da forma de comunicação

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____	Instituição _____

Assinatura _____	Julgamento _____

Prof. Dr. _____	Instituição _____

Assinatura _____	Julgamento _____

Prof. Dr. _____	Instituição _____

Assinatura _____	Julgamento _____

Prof. Dr. _____	Instituição _____

Assinatura _____	Julgamento _____

Prof. Dr. _____	Instituição _____

Assinatura _____	Julgamento _____

DEDICATÓRIAS

*À DEUS,
Por sempre, por tudo.*

*Aos meus amados pais, Nivalter e Marcia,
Pelo amor que me trouxe paz, equilíbrio e sobriedade em todos os
momentos.*

*Aos meus irmãos Gleids e Klauber,
Pela amizade e apoio irrestrito*

*Ào meu esposo Samuel,
Pela paz, pelo apoio e por todo seu amor.*

Ào meu amor incondicional que esta chegando.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço, antes de tudo, ao principal responsável por este momento de grande realização, o Professor Doutor João Palermo Neto, meu orientador, mestre e amigo, pela confiança despendida e por ter me guiado nos meandros deste mundo acadêmico.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas e algumas instituições. Manifesto a minha gratidão a todas elas e particularmente:

A Universidade de São Paulo que me deu a oportunidade de crescer academicamente.

Ao Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), local aonde este trabalho foi realizado.

A todos os professores do Departamento de Patologia (FMVZ-USP), pelo incentivo e auxílio.

Ao professor José Luis Bernardino Merusse pelo desenvolvimento do protótipo e por toda a ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Felício e a Prof.^a Dra. Maria Martha Bernardi que, por ocasião da qualificação, muito contribuíram com os rumos do trabalho, através de intervenções precisas e sensíveis.

Ao professor Doutor Ricardo Fock pelo auxílio nos experimentos de diferencial de celulariedade e pela amizade.

Ao Professor Doutor Jorge Camilo Flório pela amizade, aprendizado e apoio durante os experimentos de neuroquímica.

Ao Departamento de Reprodução Animal (VRA) na pessoa do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga pelas dosagens de corticosterona.

Ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas do VPT, pela replicação da *Staphylococcus aureus* utilizada neste trabalho.

Ao Rodrigo pela amizade e por toda a ajuda prestada.

Aos ex- funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (VPT-FMVZ-USP): Ricardo (Jibóia) e Priscila, pelo auxílio e pela convivência.

Aos funcionários do Biotério (VPT-FMVZ-USP): Claudia, Idalina, Rosiris, Herculano, Nelsinho e Mauro por toda a dedicação e aos animais utilizados nesse experimento.

As funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação: Cláudia, Joana e Dayse, pela ajuda e eficiência.

Aos funcionários da biblioteca pela correção da tese e auxílio sempre presentes.

Ao Ricardo Lazzarini por todo o auxílio prestado neste trabalho.

Agradeço as minhas queridas Daniela e Walquiria pela amizade tão essencial.

A todos aqueles que dividiram comigo a construção diária deste trabalho, meus companheiros de estrada: Luciana Vismari, Elaine, Ana Paula, Denise Moniquinha, Renato, Tiago Kirstein, Ricardo; Nato, Dudu, Beatriz, Alison, Vivi, Eduardo Hamasato, Andréia, Wanderley, Milena, Luciana Lippi, Luciana Cunha, Marina, Camila Lima, Daniel, Maria Isabel, Bruno, Domênica e Dario.

A CAPES/DS, a FAPESP (04/14128-0), ao CNPq (472083/2007-4) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

ALVES, G. J. **Coabitação com um parceiro doente: avaliações das alterações neuroimunes e da forma de comunicação.** [Cohabitation with a sick cage mate: evaluations of neuroimmune changes and of the way of communication]. 2010. 189 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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 integração de modelos biológicos e psicológicos surge e torna-se cada vez mais importante para a neuroimunologia. Cada animal comunica-se com outros de sua ou de outra espécie através de mecanismos que são característicos dentro de seus respectivos grupos; sabe-se que a comunicação entre os animais pode ser visual, tátil, química e sonora. Procuramos neste trabalho identificar o(s) tipo(s) de comunicação mais relevante(s) entre camundongas saudáveis e conspecíficas doentes. Mais especificamente, avaliamos efeitos neuroimunes decorrentes da convivência por 14 dias com companheiras inoculadas com tumor ascítico de Ehrlich e buscamos caracterizar o tipo de comunicação envolvida com este processo. Os resultados obtidos mostraram que a simples convivência com um portador do tumor de Ehrlich produziu em camundongas: 1) redução do peso e celulariedade 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 celulariedade total da medula; 6) aumento na contagem absoluta de blastos e redução de eritrócitos jovens e de linfócitos no mielograma; na contagem relativa observamos um aumento dos blastos; 7) aumento de células na fase G1 e redução na fase G2 do ciclo celular da medula; 8) aumento de células tumorais de Ehrlich na fase G1 e redução destas na fase G2, 9) aumento de permanência na zona animal estranho e redução de tempo na zona companheiro doente em um labirinto em T, 10) aumento de interação social; 11) redução do *burst* oxidativo basal de neutrófilos provenientes de animais que conviveram com dois doentes, e reversão destas alterações quanto da convivência com dois saudáveis. Observamos, ainda que: 12) a convivência não modificou os níveis de corticosterona dos animais desafiados ou não por contenção; 13) a ausência de contato físico não foi relevante para reverter as alterações induzidas pela convivência; 14) a falta de contato visual também não foi

relevante para reverter as alterações observadas; 15) os estímulos olfativos foram relevantes para as alterações induzidas pela convivência sobre o burst oxidativo e fagocitose de neutrófilos, crescimento tumoral, alterações comportamentais, dosagem plasmática de noradrenalina e de adrenalina e níveis hipotalâmicos de noradrenalina. Em seu conjunto observamos que a convivência por 14 dias com um animal portador de um tumor de Ehrlich produziu relevantes alterações no comportamento, em parâmetros neuroquímicos e de atividade imune inata de camundongas. Nossos resultados sugerem que a percepção do odor da doente esteja diretamente relacionada com as alterações relatadas.

Palavras chave: Neuroimunomodulação. Comunicação Animal. Odor. Estresse psicológico. Citometria.

ABSTRACT

ALVES, G. J. **Cohabitation with a sick cage mate: evaluations of neuroimmune changes and of the way of communication.** [Coabitação com um parceiro doente: avaliações das alterações neuroimunes e da forma de comunicação]. 2010. 189 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Several papers are showing relevant neuroimmune regulation and/or modulation during stress or diseases. The incorporation of biological and psychological models of humans conditions are of high relevance in neuroscience. Animals exhibit a variety of adaptative behaviors for communicating with conspecifics; communication between animals can be visual, tactile, chemical and sound induced. The present experiment was designed to analyze the effects induced by cohabitation with a sick cage mate and some aspects of communication between sick mice and their companions. Specifically, we analyzed some neuroimmune effects induced by cohabitation with a sick cage-mate for 14 days (mice bearing an ascitic Ehrlich tumor), looking also for the type of communication related to this process. Our results showed that cohabitation with a sick cage-mate induced, in female mice 1) decreased spleen weight and total cellularity; 2) decreased the number of blast, young erythrocytes and lymphocytes in spleen 3) decreased percentage of B and T *helper* cells, and decreased proportion of CD4/CD8 cells in the spleen; 4) increased NK cells cytotoxicity; 5) increased bone marrow total cellularity; 6) increased absolute number of blasts, and decreased the number of young erythrocytes and lymphocytes; in the relative count, an increase of blast cells in bone marrow was observed; 7) increased amount of cells on G1 cellular cycle phase, and a decreased population of cells on G2 cellular cycle phase in the bone marrow; 8) increased amount of Ehrlich tumor cells in G0-G1 cellular cycle phases, and decreased population of tumor cells in S/G2/M phases; 9) increased time spent with a strange animal and decreased time spent with sick companion in a T maze and increased locomotion in this apparatus; 10) increased social interaction; 11) decreased neutrophil basal oxidative burst in animals that lived with two sick companions. We also observed that: 12) cohabitation with a sick partner was unable to modify serum corticosterone levels with or without an immobilization stress challenge; 13) physical contact was not relevant for the neuroimmune changes induced by cohabitation; 14) visual cues were not relevant for the present contextual immune changes; 15) odor cues were effective mechanisms of communication used by the

mice in the present experiment; because its removal abrogated or reversed the neuroimmune changes reported above for cohabitation. The present findings showed that cohabitation with an ascitic Ehrlich tumor bearing mice produced behavioral, neurochemical, and immunological changes. The present results strongly suggest that volatile compounds released by the sick companion are directly related to the neuroimmune changes now reported in mice for cohabitation with a sick companion.

Keywords: Neuroimmunomodulation. Animal's communication. Odour. Psychological stress. Flow cytometry.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	NEUROIMUNOMODULAÇÃO: EFEITOS DO ESTRESSE SOBRE PARÂMETROS NEUROIMUNE	20
2.2	SOBRE A COMUNICAÇÃO ENTRE OS ANIMAIS	27
2.2.1	A capacidade da linguagem	27
2.2.2	A comunicação nas relações sociais dos animais	29
2.2.3	Definições de comunicação	30
2.2.4	Formas de comunicação	32
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	ANIMAIS	43
4.1.1	Formação dos Grupos	43
4.2	BIOLÓGICOS	45
4.3	CORANTES CELULARES.....	45
4.4	MEDICAMENTOS, REAGENTES E SOLUÇÕES	46
4.4.1	Reagentes e Estímulos para Análise do <i>Burst</i> Oxidativo	47
4.4.2	Reagentes e Estímulos para a Quantificação de catecolaminas, especificamente adrenalina e noradrenalina	50
4.5	EQUIPAMENTOS	51
4.5.1	O Protótipo usado para detecção da forma de comunicação	51
4.5.2	O Citômetro de Fluxo.....	55
4.5.3	O Ethovision.....	56

4.5.4	O HPLC	57
4.6	PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS	58
4.6.1	Rastreamento do animal e análise do movimento	58
4.6.2	Medida da Atividade Geral no Campo Aberto	60
4.6.3	Avaliação do Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	62
4.6.4	Avaliação do Comportamento no labirinto elevado em T	64
4.6.5	Avaliação da interação social	65
4.7	METODOLOGIAS BIOQUÍMICAS	66
4.7.1	Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	66
4.7.2	Dosagem dos níveis de adrenalina e noradrenalina plasmática	68
4.7.3	Dosagem dos Níveis Séricos de Corticosterona Plasmática	69
4.8	METODOLOGIAS IMUNES	71
4.8.1	Obtenção e Manutenção de Células do Tumor de Ehrlich	71
4.8.2	Avaliação do Crescimento do Tumor de Ehrlich	71
4.8.3	Medida da Atividade Celular	72
4.8.4	Avaliação do Burst Oxidativo e da Fagocitose de Neutrófilos por Citometria de Fluxo	73
4.8.5	Avaliação de moléculas de superfície celular	74
4.8.6	Avaliação da atividade citotóxica de células NATURAL KILLER (NK) por citometria de fluxo	75
4.8.7	Avaliação do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo	77
4.8.8	Avaliação da Celulariedade do Baço e Medula Óssea	77
4.8.9	Avaliação do peso dos animais e dos órgãos	78
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	79

5.1	EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO DO PESO RELATIVO DO BAÇO DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH	79
5.2	EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA CELULARIEDADE TOTAL DO BAÇO DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH.....	81
5.3	EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DO DIFERENCIAL DE CÉLULAS DO BAÇO DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH.....	82
5.4	EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE LINFOCITOS B E T (HELPER E CITOTOXICOS) EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH	84
5.5	EXPERIMENTO 5 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTOXICA DE CÉLULAS NK PROVENIENTES DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH	88
5.6	EXPERIMENTO 6 - AVALIAÇÃO DA CELULARIEDADE DA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH.	92
5.7	EXPERIMENTO 7 - AVALIAÇÃO DO DIFERENCIAL DE CÉLULAS DA MEDULA DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH.	93
5.8	EXPERIMENTO 8 – AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR NA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH.....	95
5.9	EXPERIMENTO 9 – AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DE UM TUMOR ASCITICO DE EHRLICH INJETADO EM ANIMAIS QUE	

	CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO MESMO TUMOR.....	98
5.10	EXPERIMENTO 10 – DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 8 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH.....	102
5.11	EXPERIMENTO 11 – DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH SEGUIDO OU NÃO POR DESAFIO ATRAVÉS DE CONTENÇÃO EM TUBOS DE PVC	103
5.12	EXPERIMENTO 12 – EFEITOS DA CONVIVENCIA OU NÃO POR 13 OU 14 DIAS COM PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH SOBRE A PREFERÊNCIA POR 1 LADO DO LABIRINTO ELEVADO EM T, SENDO: UM LADO COM O COMPANHEIRO, E O OUTRO LADO COM UM ANIMAL ESTRANHO E SADIO.....	105
5.13	EXPERIMENTO 13: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO SOCIAL DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH	110
5.14	EXPERIMENTO 14 – AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO, DO <i>BURST</i> OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS DE ANIMAIS MANTIDOS EM DIFERENTES TIPOS DE GRUPOS E QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH	114
5.15	EXPERIMENTO 15: A RELEVÂNCIA DO CONTATO FÍSICO PARA AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA COABITAÇÃO COM UMA CONSPECÍFICA DOENTE.....	118
5.16	EXPERIMENTO 16: A RELEVÂNCIA DO CONTATO FÍSICO PARA A ALTERAÇÃO DE ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA PELA COABITAÇÃO COM UMA CONSPECÍFICA DOENTE.	122

5.17	5.17 EXPERIMENTO 17: A RELEVÂNCIA DO ODOR PARA AS ALTERAÇÕES DE IMUNIDADE INATA INDUZIDAS PELA COABITAÇÃO COM UMA CONSPECÍFICA DOENTE.	125
5.18	EXPERIMENTO 18: RELEVÂNCIA DA SEPARAÇÃO FÍSICA, VISUAL E OLFATÓRIA NAS ALTERAÇÕES DE IMUNIDADE INATA INDUZIDAS PELA COABITAÇÃO COM UM CONSPECÍFICO DOENTE.....	128
5.19	EXPERIMENTO 19 – A RELEVANCIA DO ODOR NO CRESCIMENTO DE UM TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO MESMO TUMOR.....	131
5.20	EXPERIMENTO 20 – RELEVANCIA DO ODOR NA LOCOMOÇÃO DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRlich.....	135
5.21	EXPERIMENTO 21 – DOSAGENS DE NORADRENALINA E ADRENALINA PLASMÁTICA EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRlich.....	139
5.22	EXPERIMENTO 22 – A RELEVANCIA DO ODOR NAS DOSAGENS DE NORADRENALINA E ADRENALINA PLASMÁTICA EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRlich.....	141
5.23	EXPERIMENTO 23 – A RELEVANCIA DO ODOR NAS DOSAGENS DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS NO HIPOTÁLAMO DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRlich.....	144
6	DISCUSSÃO	146
7	CONCLUSÕES	166
	REFERÊNCIAS	168

1 INTRODUÇÃO

Psiconeuroimunologia ou Neuroimunomodulação (NIM) é o ramo da ciência que busca estudar o relacionamento recíproco entre o Sistema Nervoso e os vários componentes do Sistema Imune. A sabedoria antiga já conhecia e valorizava a análise da integração corporeamente. Aristóteles já afirmava que a “psique” (alma) e o corpo reagem complementarmente, segundo ele, uma mudança no estado da psique produzia uma mudança na estrutura do corpo e, inversamente, uma mudança na estrutura do corpo produzia uma mudança na estrutura da psique. No entanto, embora ao longo dos anos muitos autores se referissem à existência de comunicações entre o Sistema Nervoso e o Sistema Imune, desconheciam-se as bases biológicas para essas interações.

Os trabalhos iniciais em NIM enfocavam particularmente os efeitos supressivos do estresse sobre a imunidade e consideravam os agentes estressores como fazendo parte de um grupo homogêneo, desde que os efeitos que desencadeavam eram considerados como sendo estereotipados. No entanto, as décadas passadas testemunharam o desenvolvimento de novas teorias neuropsiquiátricas e neurobiológicas sobre a cognição neuroimune e sobre o papel do estresse à luz desses novos conhecimentos de neuroimunomodulação. Estes novos conceitos têm enfatizado a existência de diferenças marcantes entre os efeitos de diferentes tipos de estressores, em especial em relação à sua origem e natureza (físicos ou psicológicos) e padrão temporal (agudos versus crônicos). Mais que isso têm sido acessados os efeitos de estresse sobre diferentes parâmetros de imunidade, inata ou adaptativa, adicionando complexidade e variabilidade aos trabalhos anteriormente divulgados nesta área. Em todos eles, no entanto, permanece inalterada a existência de mecanismos comuns em neurônios e células imunes. De qualquer forma, o estresse tem assumido um papel mais intrincado de neuroimunomodulador em uma ampla variedade de respostas biológicas.

O presente trabalho se insere neste contexto; ele é uma continuação direta e mais aprofundada dos estudos realizados anteriormente no mestrado; naquela ocasião desenvolvemos o modelo de coabitação de animais saudáveis por um período de 11 dias, com outros doentes, isto é portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Dentre os resultados encontrados destacamos nos companheiros de animais doentes em relação àqueles que conviviam com animais sadios: 1- aumento de atividade locomotora em um campo aberto; 2- aumento do *turnover* de noradrenalina no sistema nervoso central e, 3- redução da atividade de neutrófilos colhidos do sangue periférico. Curiosamente, no entanto, não encontramos

diferenças significantes entre os níveis circulantes de corticosterona dos animais companheiros dos dois grupos, ao menos em condições basais (Alves, 2005).

Neste trabalho buscamos compreender melhor a forma de comunicação entre o camundongo doente e sua companheira (CAD). Sabemos, neste sentido, que cada espécie animal comunica-se com outra de sua ou de outra espécie, através de sinais, sons e odores que são característicos dentro de seus respectivos grupos; diz-se que ocorre comunicação entre os animais quando o comportamento de um indivíduo altera a probabilidade da emissão do comportamento de outro da mesma ou de outra espécie.

Em vista de tudo quanto exposto, propõe-se estudar dentro de uma perspectiva neuroimune a influencia da convivência prolongada com um doente sobre imunidade celular, alterações bioquímicas e comportamentais, e ainda investigar a forma de comunicação utilizada entre estes animais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Transcreve-se abaixo uma revisão dos dados de literatura mais relevantes e por nós considerados como necessários para a compreensão deste trabalho.

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO: EFEITOS DO ESTRESSE SOBRE PARÂMETROS NEUROIMUNE.

Atualmente, os estudos inter-disciplinares que mostram as relações bidirecionais entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imunológico (SI) tornam-se progressivamente mais relevantes, despertando interesse cada vez maior da área biomédica. Embora, as antigas observações de Galeno (2000 ac), já descrevessem serem mulheres melancólicas mais susceptíveis ao câncer que mulheres de natureza sanguínea, e outros relatos também já mostrassem existência de relações neuroimunes, apenas recentemente tem sido possível compreender e de forma mais lógica, os mecanismos subjacentes a estas interações.

Neste contexto, apesar de recente, enquanto área organizada do conhecimento, a Psiconeuroimunologia ou Neuroimunomodulação vem acumulando um corpo de dados e de conhecimentos suficientes para justificar a idéia, agora inequívoca, de que existem extensas relações entre os sistemas nervoso e imune. A neuroimunomodulação (NIM) ao mostrar a existência de receptores comuns para neurotransmissores, citocinas e hormônios em neurônios e células imunes, a produção destas substâncias nos sistemas nervoso central e imune bem como as interações bidirecionais entre estes sistemas (VISMARI, ALVES, PALERMONETO, 2008) contribui, ainda que por outros caminhos para a idéia da existência de um sistema cognitivo nervoso-imune. 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.

Se considerarmos a cognição como um conjunto de estratégias operacionais que nos permitem lidar, nos ajustar ao mundo, talvez seja possível não apenas relacionar este conceito ao Sistema Nervoso Central como também estendê-lo para as células imunes. De fato, do ponto de vista instrumental pode-se dizer que as células do sistema imune levam a cabo suas atribuições usando princípios operacionais semelhantes àqueles de neurônios. Assim como o sistema nervoso, o sistema imune recebe e integra sinais e a eles responde através da escolha

de um padrão particular de resposta colhida de seu repertório de respostas (toma uma decisão funcional) e, ao final do processo registra os resultados e se auto-organiza. De todos os sistemas orgânicos apenas os sistemas nervoso e imune são capazes de fazer escolhas. O sistema imune de cada indivíduo registra uma história única de individualidade porque ele assim como o cérebro se organiza e se reorganiza constantemente através da experiência, das escolhas que faz (FEITOSA, 2009; PALERMO-NETO, COSTA-PINTO, 2009; WILSON SAVINO, 2009). Nesse sentido, é relevante ter em mente, que a existência de um sistema cognitivo nervoso – imune possibilita a sobrevivência dos indivíduos ao permitir a eles a realização de escolhas, a construção de imagens internas e externas do ambiente e a auto-organização (COSTA-PINTO, PALERMO-NETO, 2010). A Figura 1 mostra um esquema ilustrativo da cognição neuro-imune.

Figura 1 - Esquema ilustrativo de cognição neuro-imune (retirado de Palermo-Neto; Costa-Pinto, 2009)

As relações neuroimunes não devem ser desprezadas ou subestimadas; podem ser responsáveis por fenômenos ainda pouco compreendidos, considerados até pouco tempo atrás como anedóticos, artefatos de técnica ou, até mesmo, como erros de diagnóstico. De fato, veio à tona a percepção de que esses sistemas são partes de uma rede de controle muito mais ampla (ADER, 2000).

Relatos da existência de influências mútuas entre o sistema nervoso central e o sistema imune são inúmeros na literatura (LAZZARINI et al., 2010; RIGHI et al., 2009; ALVES et

al., 2007). No contexto deste trabalho, enfocaremos particularmente as relações do sistema neuroendócrino em relação ao sistema imune. Os interessados em exemplos de análises experimentais que abordam a segunda vertente dessa interação: do sistema imune para o sistema neuroendócrino, são encaminhados para os trabalhos de Costa-Pinto e Palermo-Neto, 2010; Cederberg e Siesjö, 2010; Camacho-Arroyo et al.; 2009; Lucin e Wyss-Coray, 2009; del Rey e Besedovsky, 2008; Rettori et al., 2007; Besedovsky e del Rey, 1996; McCann et al., 1987.

A influência da atividade do sistema neuroendócrino sobre o sistema imune foi explicada magistralmente por Hans Seyle em um artigo que se tornou um marco na história do estudo do estresse. Seyle descreveu o desenvolvimento de uma síndrome decorrente da exposição de um animal a um conjunto muito diversificado de estímulos nocivos que incluía exposição ao frio, injúria tecidual, excesso de exercícios e intoxicações. Recorda-se, que os achados de necropsopia característicos dessa síndrome incluíam hipertrofia das glândulas adrenais, aparecimento de úlceras gástricas e, curiosamente para a época, atrofia de órgãos linfóides como timo, baço e linfonodos. Como tais achados eram independentes do estímulo empregado, Seyle concluiu que representavam uma resposta orgânica estereotipada à injúria denominando-os coletivamente de ‘síndrome de adaptação geral’, posteriormente chamada de estresse.

Desse trabalho nasceram dois conceitos fundamentais sobre o estresse: 1) a resposta aos estressores tinha caráter adaptativo e representava uma tentativa do organismo de acomodar-se a uma nova situação e, 2) ela não dependia do estímulo, isto é, era estereotipada (SEYLE, 1955); estes conceitos penduravam até pouco tempo atrás. Como essa síndrome era gerada por estímulos físicos e psicológicos e como tinha decorrências comportamentais e endócrinas, incluindo-se aqui a influência nervosa sobre a atividade de órgãos linfóides e sobre células imunes, pareceu natural supor que o SNC e o SI interagiriam na preparação dos organismos para acomodá-los às mudanças impostas pelo estressor. Essa noção se confirmaria, tendo-se como certo, nos dias atuais, que diversos estímulos provenientes do SNC são capazes de modular a resposta imune seja ela inata ou adaptativa. O sistema endócrino e, muito especialmente, o eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal (HHA), é um dos responsáveis por vários dos elos de ligação entre estes dois sistemas. Participam ainda dessa resposta, endorfinas, tireotrofinas, prostaglandinas, hormônio do crescimento e, de forma mais robusta os Sistemas Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) e Parassimpático (SNAP) (para revisão veja: ALVES e PALERMO-NETO, *no prelo* a; ALVES, QUINTEIRO-FILHO, e PALERMO-NETO, 2009; ALVES e PALERMO-NETO, 2007). Porém, sabe-se hoje que os

dois conceitos básicos acima não tem mais condições de serem generalizados de forma simplista. A Figura 2 mostra um esquema ilustrativo desta interação.

Figura 2 - Esquema ilustrativo das interações entre os sistemas nervoso, endócrino e imune.

Neste contexto, os trabalhos iniciais em NIM enfocavam principalmente os efeitos supressivos do estresse sobre a imunidade, pois consideravam os agentes estressores como fazendo parte de um grupo homogêneo de estímulos, desde que os efeitos que desencadeavam eram considerados como sendo estereotipados. No entanto, as décadas passadas testemunharam o desenvolvimento de novas teorias neuropsiquiátricas e neurobiológicas sobre a cognição neuroimune e sobre o papel do estresse à luz dos conhecimentos de neuroimunomodulação. Estes novos conceitos têm enfatizado as diferenças existentes entre os tipos de estressores, em especial em relação à sua origem e natureza (físicos ou psicológicos) e padrão temporal (agudos versus crônicos). Mais que isso, têm sido acessados efeitos de estressores sobre diferentes parâmetros de imunidade, inata ou adaptativa, o que adiciona maior complexidade e variabilidade aos trabalhos anteriormente divulgados nesta área. Em todos eles, no entanto, permanece inalterada a existência de mecanismos comuns em neurônios e células imunes. De qualquer forma, o estresse tem assumido um papel mais intrincado de um potencial neuroimunomodulador em uma ampla variedade de respostas biológicas.

A integração de modelos biológicos e psicológicos vêm se tornando cada vez mais importante para a neurologia (ALVES et al., 2006; BRASIL NETO, 2001). Alguns trabalhos na área humana têm correlacionado a presença de citocinas no SNC com neurodegeneração e

demência (MERRIL, 2001). Mostrou-se, que o estresse e a depressão têm sido associados com reduções de imunidade (Irwin, 2001), progressão dos sintomas de infecções (PALERMO-NETO et al., 2003; COLE e KEMENY, 2001) e até mesmo, com a recuperação de queimaduras (MARUCHA et al., 2001). Mostrou-se, também e não menos relevante, que o estresse gerado pelo ato de acompanhar um paciente com enfermidade crônica tem sido associado a alterações de imunidade inata e humoral, queda de resistência orgânica a infecções e aparecimento de sintomas psiquiátricos, como ansiedade e depressão (JIWA et al., 2010; FREDMAN et al., 2010; ALPI et al., 2008; ALVES et al., 2007; ALVES e PALERMO-NETO, 2006).

Neste sentido, uma série de estudos tem sido realizado também em animais a fim de se avaliar influências do SNC sobre a imunidade. Sá-Rocha mostrou, em nossos laboratórios, que animais submissos e mantidos em uma hierarquia social estável apresentavam diferenças no comportamento e na neuroquímica cerebral, respondendo de forma diferenciada daquela dos dominantes a idênticos estímulos imunes. Em especial, os animais submissos apresentavam, em relação aos dominantes, maiores níveis de ansiedade, menor atividade de células NK no baço e maior susceptibilidade ao desenvolvimento de metástases tumorais (SÁ-ROCHA et al., 2006). Morrow-Tesch, McGlone, Salak-Johnson (1994), em estudos feitos com suínos, mostraram que interações sociais geradas pelo confronto de dominantes com submissos afetavam as funções imunológicas. Em geral, tanto os animais dominantes como os submissos mostraram número elevado de neutrófilos e diminuição da produção de anticorpos quando comparados com outros que não haviam estabelecido relação de dominância. É possível, assim, que o estresse gerado pela necessidade de manter a dominância ou, contrariamente, pela condição de permanente submissão sejam os responsáveis pelas alterações imunológicas relatadas. Nesse sentido, qualquer semelhança com patologias humanas geradas pela condição: chefes dominantes x funcionários submissos, não é mera coincidência.

Outra abordagem que tem se mostrado extremamente interessante para a compreensão da influência de núcleos do SNC sobre as respostas imunes é aquela derivada de estudos conduzidos com lesões experimentais. Nesse sentido, a contribuição do grupo de Jankovic foi muito relevante; os autores demonstraram que lesões do *locus coeruleus*, núcleo do tronco encefálico que tem a maior concentração de neurônios noradrenérgicos no SNC, diminuíam a imunidade dos animais, observada tanto pela redução da produção de anticorpos contra albumina como do número de células T CD4⁺ circulantes. Observaram, ainda nos animais com lesão, atrofia do timo e supressão das reações de hipersensibilidade tardia à albumina.

A estimulação do SNAS pelo estresse produz liberação de noradrenalina nos terminais nervosos e secreção de adrenalina pelas adrenais (MAIER, 2003). Nesse sentido, sabe-se que as fibras nervosas simpáticas têm íntimo contato com órgãos linfóides como, por exemplo o baço. Por outro lado, órgãos e células imunes como o pulmão, macrófagos, neutrófilos e linfócitos circulantes, possuem alta densidade de β_2 -adrenoceptores. Brough-Holub e colaboradores em 1998 mostraram que ratos submetidos a estresse apresentavam maior liberação de IL-1 β (pró-inflamatória) por macrófagos alveolares; mostraram também, que este efeito era revertido pelo bloqueio prévio da atividade do SNAS e, em especial dos β_2 -adrenoceptores, minutos antes da indução do estresse.

A neuroimunomodulação também tem sido envolvida com a resistência orgânica à progressão de tumores. Mostrou-se um forte vínculo entre presença de estresse, alterações da função imune e sensibilidade ao câncer (COHEN e HERBERT, 1996). Palermo-Neto; Massoco; Robispierre de Souza, (2003) relataram alterações comportamentais, imunológicas e de resistência ao crescimento de um tumor experimentalmente induzido produzidas por estresse físico e psicológico em camundongos adultos. Neste trabalho mostrou-se que um estresse psicológico, produzia manifestações comportamentais indicativas de ansiedade, redução dos índices de espraio e de fagocitose de macrófagos peritoneais e aumento do crescimento de um tumor experimental, o tumor ascítico de Ehrlich. Curiosamente, mostramos em outro trabalho de nossos laboratórios que camundongos estressados durante a fase pré-natal (último terço da gestação) apresentavam níveis elevados de ansiedade, diminuição dos índices de espraio e de fagocitose por macrófagos peritoneais e, também, redução de resistência orgânica ao crescimento do Tumor de Ehrlich (SÁ-ROCHA et al., 2006). Nesse sentido, Strange e colaboradores (2000) relataram que camundongos machos submetidos a um estresse psicossocial e inoculados com um tumor andrógeno responsivo (AR SC115) apresentavam menor resposta à quimioterapia e menor sobrevida, dependendo dos efeitos observados e do tipo de estresse aplicado. Recente revisão dos trabalhos de nosso grupo mostra os resultados de diferentes tipos de estressores sobre parâmetros neuroquímicos, comportamentais e imunes (COSTA-PINTO e PALERMO-NETO; 2010).

A convivência prolongada com um animal conspecífico severamente doente (injetado com célula do tumor de Ehrlich) levou a alterações comportamentais e de imunidade (inata e adquirida) (ALVES et al., *no prelo*; 2007; 2006; ALVES e PALERMO-NETO, 2006); fatos que nos levaram a sugerir que animais, em especial, roedores tem sua fisiologia e homeostase modificada de forma marcante pela vivência com um companheiro doente.

Desta forma, é evidente que mecanismos biológicos ligados aos sistemas nervoso central e imune não podem mais ser pensados isoladamente. A existência de receptores, de neurotransmissores e de outras moléculas comuns a ambos os sistemas, embasa a noção de que eventos da esfera imune possam ter sua origem em alterações ocorridas no sistema nervoso central.

O presente trabalho que avalia, de maneira mais verticalizada, os efeitos da convivência com parceiros doente lançou mão de conceitos de neuroimunomodulação para sua concepção e para interpretação dos dados obtidos.

2.2 SOBRE A COMUNICAÇÃO ENTRE OS ANIMAIS

A faculdade da linguagem humana é o traço principal que nos distingue de outros seres do reino animal (especialmente a esse respeito CHOMSKY, 1973, e, mais recentemente, OTHERO, 2005; FRANCHETTO e LEITE, 2004; HAUSER et al., 2002). Nesse sentido, pesquisadores como Soltis et al. (2009); Okanoya (2007); Barton (2006); Pinker e Jackendoff (2005) e Ghazanfar e Hauser (1999) acreditam que, um dia, os animais chegarão a adquirir nossa forma de comunicação, em especial, a linguagem; porém, eles são unânimes ao relatar as muitas peculiaridades que deveriam ser adquiridas para tal, pois os animais possuem limitações anatômicas que os impedem do tipo de comunicação humana. Apesar dessas limitações, no entanto, resultados advindos de estudos sobre comunicação animal têm surpreendido cada vez mais a comunidade acadêmica ao mostrar que os processos de comunicação entre eles são extremamente sofisticados tendo, muitas vezes, uma incrível semelhança com as formas de comunicação humana.

Cada animal comunica-se com outros de sua ou de outra espécie através de mecanismos que são característicos dentro de seus respectivos grupos. É inquestionável a capacidade que os animais têm de conhecer muito bem cada gesto, odor ou som e de diferenciá-los uns dos outros, conhecendo os seus significados exatos (DARWIN, 1965). Nesse contexto, sabe-se que a comunicação entre os animais pode ser visual, tátil, química e sonora. Alguns animais usam dessas formas de comunicação para sua própria identificação, para atrair fêmeas, para fugir ou assustar predadores ou, até mesmo, para estabelecer hierarquias sociais ou demarcar territórios (DUNBAR, 1998).

2.2.1 A capacidade da linguagem

A evolução do sistema de comunicação, em especial da linguagem, dos primatas e dos primeiros humanos (*australopithecus*) para o homem moderno (*homo sapiens sapiens*), exigiu grande evolução neurológica. No entanto e apesar da relevância, não foi possível precisar, ainda, quando nossos ancestrais adquiriram as faculdades da fala e da linguagem no sentido estrito (HAUSER et al, 2002).

O que é a fala, se não as vibrações das pregas vocais produzidas pela energia proveniente do ar movimentado pelos pulmões, cujo som é posteriormente amplificado? (DEMOLIN et al., 2002). Alguns lingüistas acreditam que a capacidade da linguagem possa

ter começado de maneira rudimentar nos primeiros seres humanos (DELANCEY, 2001; GIVÓN, 1993, por exemplo); acreditam, também, que essa mesma capacidade possa vir a ser também adquirida em um futuro remoto por alguma outra espécie animal no decorrer de sua evolução (PINKER e JACKENDOFF, 2005, por exemplo). Esse raciocínio, embora simplista é efetivamente lógico: se a linguagem é uma característica complexa do homem, “desenvolvida” pelos motores da evolução, então outros animais que também estejam evoluindo poderão, de alguma forma e, em algum ponto de sua história evolutiva, vir a adquirir também a capacidade da linguagem.

Por enquanto, porém, a faculdade da linguagem é apenas humana, sendo o traço principal que nos distingue de outros seres do reino animal (CHOMSKY, 1973, e, mais recentemente, DEMOLIN et al., 2007; OTHERO, 2005; FRANCHETTO e LEITE, 2004; HAUSER et al., 2002; LYONS, 1981). O ser humano tem um inato conhecimento do funcionamento sintático de sua língua (OTHERO, 2008). Chomsky, 1973, deixa claro que o que diferencia o ser humano de outros seres vivos (e também o que o diferencia dos “robôs”) é a capacidade da linguagem. Para ele, a linguagem é inerente e exclusiva da espécie humana, o que provaria nossa inteligência “superior”, nossa alma ou nossa mente. Assim como Descartes, 1970; Chomsky, 1973 e também Wittgenstein, 1994 creem que a capacidade da linguagem seja exclusiva dos homens, ainda que os animais e as máquinas possam ter (ou desenvolver) várias habilidades e outros tipos de inteligência.

Nesse sentido, existem muitas diferenças e peculiaridades que tem impedido que outros primatas venham a adquirir a fala e a linguagem humana. Algumas destas diferenças são: 1- o formato do tórax do ser humano que é diferente daqueles dos primatas (DEMOLIN et al., 2002); 2- a capacidade dos humanos de abrir e fechar a glote que está ausente nos macacos que não tem controle sobre ela (MACNEILAGE e DAVIS, 2000; MACNEILAGE, 1998; DAVIS e MACNEILAGE 1990); 3- restrições anatômicas e fisiológicas que impedem aos chimpanzés a articulações de consoantes e vogais, isto é, os seres humanos possuem o controle da língua e dos órgãos auxiliares da fonação e os macacos não (DONALD, 1991); 4- a frequência e o número de ciclos da voz humana que é completamente diferente daquela dos macacos (DEMOLIN, 2005) e, entre tantas outras, 5- a espécie humana é a única que, além da fala tem a linguagem, isto é, que possui a capacidade da sintaxe e da morfologia. Em outras palavras, nós podemos pensar, formar e articular um número infinito de sílabas e de frases.

2.2.2 A comunicação nas relações sociais dos animais

Observar a comunicação existente entre os animais é sempre surpreendente. Ao contrário do que muitos possam acreditar ela assemelha-se, em diversos aspectos, à linguagem humana (ELIADES e WANG, 2008; OTHERO, 2005; FITCH, 2000). Por certo que os animais não tem a razão humana, mas tem uma razão própria. Não podemos assim, desconsiderar a existência de comunicação entre eles (BURGHARDT, 2009; DARWIN, 1965).

Nesse contexto, é relevante comentar que a comunicação é fundamental para a formação e para a manutenção das relações sociais. Todo comportamento social envolve comunicação, isto é a transferência de informações de um animal para outro por meio de sinais que evoluíram para esta função. Admite-se que haja comunicação quando o comportamento de um animal altera a probabilidade de emissão do comportamento de um outro da mesma ou de outra espécie (MCGREGOR, 2005).

Assim, a comunicação entre os animais ocorre, quando um indivíduo usa sinais especialmente elaborados ou exhibições posturais que modificam o comportamento de outros. A modelagem dos sinais é influenciada tanto por restrições ecológicas como pela eficiência que eles tem em modificar o comportamento dos receptores. Nesse sentido, o habitat pode influenciar a eficiência dos canais sensoriais de comunicação (KREBS e DAVIES, 1993).

Há que considerar, ainda, o problema da exigüidade de informações relativas às associações entre os símbolos e os processos de comunicação entre os animais, isto é, da descrição de como os fluxos de informações medeiam às relações entre o emissor e o receptor. Este assunto carece de melhor estudo, mesmo porque em um mundo em que se prioriza a linguagem, ainda temos dificuldade em compreender a real utilização dos símbolos no processo de comunicação, e isto ocorre porque não nos damos conta de quantos de nós mesmos os utilizamos em nossa própria comunicação diária (HAUSER e MARLER, 2002).

Ludwig Wittgenstein em 1921 colocou no *Tractatus Logicus Philosophicus* (Wittgenstein, 1994), “os limites da minha linguagem são os limites do meu mundo”, pois somos os únicos seres falantes pelo menos do ponto de vista da forma como nos comunicamos. A famosa frase de Wittgenstein “Se um Leão pudesse falar, nós não o

entenderíamos” tem como base as diferenças nas regras de linguagem. Uma coisa é produzir a fala, outra coisa é compreender a fala.

O exemplo mais impressionante de comunicação animal pode ser encontrado nos chamados primatas superiores (como gorilas, chimpanzés e bonobos), que estão mais próximos do homem na cadeia evolutiva. Além de esse tipo de primata apresentar uma comunicação bastante elaborada em seu habitat natural, diversas experiências tem mostrado a capacidade da aprendizagem de uma linguagem por sinais por parte desses animais. Os casos mais conhecidos são provavelmente os do chimpanzé Nim Chimpsky e da gorila Koko³. Nim Chimpsky, cujo nome é uma homenagem a Noam Chomsky, foi o primeiro chimpanzé a aprender uma linguagem de sinais norte-americana. Já a gorila Koko é talvez o caso mais bem-sucedido de aprendizado da linguagem de sinais por um primata. Ela é uma gorila de pouco mais de 30 anos que consegue utilizar mais de 1.000 gestos de uma linguagem de sinais norte-americana e de compreender cerca de duas mil palavras em inglês (OTHERO, 2005).

2.2.3 Definições de comunicação

A comunicação é uma modalidade de comportamento cujo início se confunde com a origem da vida. Todos os animais se comunicam. As crianças, inclusive antes de dominarem minimamente a linguagem, se comunicam também. Então, o que é comunicação? Qual a razão da sua existência? Os organismos vivem e se desenvolvem em nichos ecológicos, estabelecendo entre eles uma rede de relações necessárias para a sobrevivência. Para que essas relações pudessem ocorrer com êxito adaptativo, foi preciso que se desenvolvesse um conjunto de comportamentos especializados que coletivamente receberam o título genérico de comunicação. A comunicação é um complexo fenômeno psicológico que se resume de uma forma simplista através do seguinte esquema: emissor→ mensagem→receptor. Um exemplo disto é uma conversa entre humanos, os gestos agressivos de animais que disputam um território ou as exibições comportamentais disparadas por um macho antes do acoplamento sexual com a fêmea (PERINAT, 1993).

A comunicação pode ser considerada um processo social básico, isto é, primário; é ela que torna possível a própria vida em sociedade (ALVES e PALERMO-NETO, no prelo b). No processo de comunicação acima resumido o emissor é quem elabora e põe em circulação a

mensagem. A mensagem é qualquer coisa que o emissor envie com a finalidade de passar as informações. O receptor é quem recebe e interpreta a mensagem (PEREIRA, 2007).

A comunicação é ambígua na biologia, e certamente sua compreensão é essencial para o progresso da ciência. Ainda não existe uma definição que seja totalmente aceita para a comunicação biológica. As definições técnicas no sentido de adaptação são freqüentemente usadas; no entanto, existe uma significativa variação entre elas, provavelmente em razão da inexistência de exatidão na conceituação dos critérios usados. Uma alternativa tem sido definir a comunicação no sentido de transferência de informação (SCOTT-PHILLIPS, 2008).

De qualquer forma, em seu livro *Animal Signals* Maynard-Smith e Harper (2003) propuseram a seguinte definição de comunicação: algum sinal, ato ou estrutura que altera o comportamento de outros organismos, que estão envolvidos com o efeito destes sinais, que são efetivos exatamente porque os animais que os recebem a eles respondem. Nesse sentido, vale definir sinal. Segundo Scott-Phillips (2008) sinal é algum ato ou estrutura que (I) afeta o comportamento de outro organismo, (II) está envolvido com aquele que o afetou, (III) é efetivo porque ocasionou uma resposta através de um ato ou da mudança de uma estrutura.

Os adaptacionistas concordam com o fato de não serem muitos conceitos, freqüentemente utilizados em comunicação humana, apropriados para conceitualizar a comunicação entre os animais (MCGREGOR, 2005; HAUSER, 1996; SMITH, 1977); esses autores alegam que muitas definições de comunicação são equivocadas quando abordam a questão da transferência de informação, ao exigir que ela traga apenas informações exatas.

Para Wilson a comunicação ocorre quando a ação da parte de um organismo (ou célula), ou uma dica por ele emitida, altera o padrão probabilístico de comportamento de outro organismo (ou célula) de uma maneira adaptativa para qualquer um ou para ambos os participantes do processo (WILSON, 2000). Klopfer e Hatch consideram que tenha ocorrido comunicação quando um sinal altera a probabilidade de o receptor executar um determinado comportamento (KLOPFER e HATCH, 1968).

Um sinal de comunicação é um comportamento que evoluiu para transmitir informação para um membro da mesma ou de outra espécie, com o objetivo de modificar seu comportamento para o benefício do sinalizador (DAWKINS e KREBS, 1978). Este conceito, portanto, associa comunicação à biologia evolutiva.

Deag (1981) definiu comunicação como a transferência de informação de um animal para outro (dessa forma influenciando o comportamento do receptor) por meio de sinais que evoluíram para este fim. Já para Depute toda interação envolve comunicação; assim, para que se compreenda o sistema social de uma espécie é necessário que se identifiquem os sinais

empregados por seus integrantes em diferentes contextos de comunicação (DEPUTTE, 1994). São esses sinais que revelam a qualidade e intensidade das interações (STRIER, 2002).

Ressalta-se, no entanto, que críticas tem sido formuladas a esses conceitos de comunicação. Assim, por exemplo, há quem critique estas definições sugerindo que elas excluem a possibilidade de o sinal não ser recebido (KREBS e DAVIES, 1993). Outros, advogam que a definição técnica do termo é muito ampla, pois engloba um comportamento que vai em parte, afetar no futuro o comportamento de outro indivíduo; alegam, ainda, que reciprocidade não é medida de comunicação, embora ela atue de forma consistente na manutenção da coesão interativa que existe entre comportamentos emitidos (WEST et al., 2007). Finalmente, há quem diga que estas definições de comunicação trazem muita ambigüidade, pois há descrição de ocorrência de comunicação mesmo quando o receptor não é capaz de distinguir a coesão dos sinais emitidos (REBY e MCCOMB, 2003).

2.2.4. Formas de comunicação

A comunicação entre os animais pode ser classificada como sendo visual, táctil, química e sonora (DUNBAR, 1998).

✓ A comunicação Visual:

Existem dois tipos de comunicação visual entre os animais: (1) *Emblemática* que ocorre através das cores ou das formas dos animais. (2) *Ostentatória* que acontece pela aquisição de posturas e alterações de formas corporais. Ambas estão ligadas à estrutura social, sendo adaptativas (DUNBAR, 1998).

A linguagem visual ou por sinalização não está de forma alguma reservada aos animais superiores. As abelhas, no interior das suas colméias, executam movimentos complexos, que lhes permitem comunicar pormenorizadamente, por exemplo, a localização de determinada zona onde existe alimento. Quando encontram comida dão indicações precisas às companheiras sobre a localização das flores voando de determinada forma e, as outras as encontram! (DAWKINS, 1994). A descrição desse intrigante fato propiciou a Karl von Frisch o Prêmio Nobel de Medicina em 1973. Von Frisch mostrou ainda e, mais tarde, que as abelhas não apenas comunicavam às companheiras a distância em que se encontrava o néctar,

mas também que elas modificavam progressivamente a direção da dança no sentido contrário ao dos ponteiros do relógio à medida que as horas passavam. Elas iam se virando segundo um ângulo que correspondia ao ângulo descrito pelo Sol naquela ocasião. A luz ultravioleta pode ser invisível aos olhos dos homens, mas as abelhas podem vê-la e tirar proveito dela. Muitos tipos de flores como as margaridas, que aos olhos do homem parecem ter pétalas brancas e uniformes, parecem para as abelhas um conjunto de linhas ultravioletas sobre um fundo branco.

A comunicação visual nesse sentido é utilizada pelos animais para ajudá-los em diferentes aspectos da sua sobrevivência ou daquela de sua espécie, como, por exemplo, para a reprodução.

O pavão, (*Pavo cristatus*) com sua cauda verde e azul em forma de leque, é exemplo de um dos mais deslumbrantes cortejos do reino das aves. A linda cauda do pavão pode ter mais de 200 penas. Durante o período de acasalamento, o macho estabelece o seu território e fica exibindo-se com pompa, expondo-se às fêmeas que passam pelo local. Os machos expõem a cauda para atrair a fêmea; sabe-se, a esse respeito, que quanto mais marcas de olhos tiverem as suas penas, maiores serão as chances de seus acasalamentos (PETRIE, 2007; BORGIA, 1979; MAYNARD-SMITH 1978; FISHER 1930).

Quando quer atrair uma fêmea, o lagarto balança a cauda para cima e para baixo expondo suas cores vivas. Porém, movimentam-se de forma diferente quando querem afugentar os machos rivais (RÖDL et al., 2007).

Os vaga-lumes cortejam as fêmeas durante a noite, e para identificarem os que são da mesma espécie, emitem luzes que piscam na parte inferior de suas laterais. Espécies diferentes piscam luzes em ritmos diferentes. Alguns vaga-lumes machos chegam a piscar luzes de cores diferentes, como, por exemplo, cor de laranja quando estão voando e verde quando estão no chão (de CRESPIGNY e HOSKEN, 2007)

O macho da perereca arborícola de Bornéu comunica-se acenando uma das pernas traseiras e estirando os dedos do pé. Este comportamento é relevante, pois como ele vive perto de quedas d'água, o som de seu grito seria abafado pelo barulho da água corrente.

O caranguejo-violinista macho, ao balançar a garra atrai as fêmeas, mas rechaça a aproximação de outros machos (CASTIGLIONE e NEGREIROS-FRANSOZO, 2006).

✓ **A comunicação Sonora :**

Vários modelo animais têm sido usados para elucidar como os processos de vocalização afetam o cérebro; especificamente vários modelos analisam a parte auditiva do processo. Os animais mais freqüentemente utilizados para este tipo de experimento são: pássaros (THEUNISSEN e SHAEVITZ, 2006) e mamíferos como morcegos (LEROY e WENSTRUP, 2000), roedores (WALLACE et al., 2005; GEISLER e EHRET, 2004), gatos (GOURÉVITCH e EGGERMONT, 2007) e primatas (WANG, 2000). No caso de cobaias, já foram distinguidas mais de dez tipos diferentes de vocalizações em sua gama de chamados (MONTICELLI et al., 1999; MONTICELLI et al., 1997; BERRYMAN, 1976; ARVOLA, 1974). Os filhotes de Cobaia-doméstica *Cavia porcellus* emitem assobios agudos quando são isolados da mãe. Monticelli e colaboradores verificaram a relação entre o tempo de isolamento e a estrutura acústica do assobio; mostraram que à medida que esse tempo aumentava as notas do assobio se tornavam mais curtas, com freqüências médias maiores e uma tendência a diminuição do número de harmônicos na parte inicial, ou seja, a resposta vocal dos filhotes de cobaia sofriam mudanças estruturais possivelmente relacionadas à mudança no estado motivacional (MONTICELLI et al., 2004).

Muita, mas não toda a comunicação social de numerosas espécies são tonais por natureza incluindo-se aqui aquelas de primatas, gatos e várias espécies de roedores, morcegos, pássaros e sapos (DIMATTINA e WANG, 2006).

Os macacos chamados de *vervets* possuem um sofisticado e bem documentado repertório de vocalizações usado tanto para interações sociais intra-específicas (confrontação e formação de alianças de diversos tipos) (CHENEY e SEYFARTH, 1990) como para indicar a presença de predação iminente (SEYFARTH, CHENEY, 1992; SEYFARTH et al., 1980). Estudos de campo revelam três tipos de alarmes usados por esses animais para indicar a presença de (1) predadores mamíferos terrestres, (2) aves de rapina, e (3) cobras. O comportamento do grupo, subsequente à produção do alarme, é um indicador de interpretação discriminada do tipo de alarme emitido (SMITH, 1977). Outro exemplo é o do muriqui, um primata da mata atlântica. Entre outros aspectos de seu comportamento, se destaca a comunicação vocal, rica em chamados variados. Os membros dispersos de um mesmo grupo podem até se comunicar a longas distâncias através de chamados que têm variados sentidos (MENDES e ADES, 2004; ADES e MENDES, 1997). Em pássaros, a comunicação sonora é emitida:

- Em ocasiões ligadas ao acasalamento como, por exemplo, o gorjeio do macho da toutinegra do junco atrai a atenção das fêmeas. Neste sentido, a maioria dos cantos dos pássaros tem poucas sílabas e duram vários segundos, o da toutinegra do junco é prodigiosamente criativo. Algumas destas aves têm um repertório com até mais de cem sílabas. O macho escolhe de cinco a dez sílabas, mistura-as e torna a misturá-las em inúmeras seqüências, criando longas melodias. Análises do canto de pássaros mostram que machos com sons rebuscados encontram muito mais facilmente uma companheira do que os machos com sons mais simples e comuns. (BEARHOPS et al., 2005).
- Quando da identificação entre animais da mesma espécie como, por exemplo, ocorre com o canto da coruja amarelada, que muitas vezes é considerado como um único tipo de trinado; na verdade trata-se de um dueto em que sons diferentes emitidos pelos animais conferem o paradeiro um do outro. (PENCE e BERGAN, 1996).
- Na vigência de uma ameaça como, por exemplo, fazem os canários - da - terra (*Sicalis flaveola*) que avisam uns aos outros da presença de um predador; depois, se põem a entoar um coro de notas finas, desnortando esse predador. Estes canários-da-terra têm mais de 350 tipos diferentes de pios, cada um transmitindo um tipo de informação especializada (RODRIGUES et al., 2005).
- Em ocasiões em que ocorre transmissão cultural como fazem os pássaros canoros que têm um repertório de até sete músicas. Aves da mesma área cantam músicas semelhantes, aprendendo-as com os vizinhos e com os pais. (ARONOV et al., 2008; OLVECZKY et al., 2005).

As baleias azuis chamam umas às outras através da água e a distâncias superiores a 160 km, escolhendo para isso uma mesma janela própria de frequência. Como os usuários de telefone celular, elas se sintonizam através das áreas mais silenciosas do espectro sonoro (SIROVIĆ et al., 2007).

Nesse sentido, em determinadas situações aversivas, alguns animais emitem sons, cuja frequência é inaudível ao ouvido humano, fato conhecido como vocalização ultrassônica (HOFFMANN et al., 2009; MCKENZIE-QUIRK e MICZEK, 2008; HOUSEKNECHT, 1968), estas vocalizações podem servir como um indicador da expressão emocional (MICZEK et al., 1995; OLIVIER et al., 1991; CUOMO et al. 1988). Na expressão da comunicação afetiva, a vocalização pode complementar a expressão da emoção auxiliando de forma pragmática a fisiologia.

A vocalização ultrassônica é emitida em diferentes contextos, assim, por exemplo, quando camundongos foram expostos a baixa temperatura, eles emitiram vocalizações ultrassônicas na faixa de 56 kHz (FISHER et al., 2000; HOFER et al., 1996). Em camundongos adultos e ratos, o comportamento copulatório é acompanhado antes da ejaculação por vocalizações curtas e de alta frequência e após a ejaculação por vocalizações de baixa frequência e longa duração (WHITE et al., 1998; MCINTOSH, DAVIS, BARFIELD, 1979; NYBY, WHITNEY, SCHMITZ, 1978; BARFIELD e GEYER, 1975;1972). Ratos e camundongos emitem vários tipos de vocalização durante uma confrontação agressiva; o agressor, por exemplo, emite vocalizações curtas e de alta frequência (56 kHz) e o animal submisso emite vocalizações longas de baixa frequência (VAN DER POEL, NOACH, MICZEK, 1989; THOMAS et al., 1983). O último tipo de vocalização “a vocalização ansiogênica” ou “chamados isolados” foram observadas em situações de isolamento social (HAENSEL et al., 1991; WINSLOW e INSEL, 1991; GARDNER, 1985); assim, foram detectadas na faixa de 30 a 80 KHz em filhotes de camundongos que eram separados de suas mães. Nesse sentido, este tipo de vocalização chamada de ansiogênica não é limitada aos roedores visto que já foram observadas também em filhotes de pássaros (PANKSEPP et al., 1978), cachorros (PANKSEPP et al., 1978) e até mesmo primatas (MICZEK et al., 1995; KALIN et al., 1987).

✓ **A comunicação Tátil** –.

Os animais usam o toque de muitas maneiras diferentes e com diferentes propósitos. A comunicação tátil entre mãe e filhote é muito importante; além de fazer parte do cuidado com os filhotes, permite que seja estabelecido um vínculo entre eles. Os filhotes de hamster assim como o de outros mamíferos não conseguem se limpar sozinhos. A mãe hamster lambe o filhote para limpá-lo, mas o faz com cuidado, pois se o filhote ficar úmido demais, o resfriamento do corpo pode provocar uma perigosa hipotermia.

O *Loris tardigradus* um primata pequeno e leve da subordem *Strepsirrhini*, descendente dos macacos primitivos, apresenta locomoção lenta, movendo-se nas quatro patas, que apresentam elevada capacidade preênsil. A comunicação tátil ocorre entre mãe e cria e consiste numa “limpeza social” que é feita com os dentes, ao contrário da auto limpeza que é executada com a língua. Este comportamento não é usado pelos animais apenas para limparem locais que não conseguem alcançar; é também usado como forma de apaziguamento e, também, para estabelecimento de relações sociais (NAIR, 1992).

O contato tátil é muito importante até no fundo do mar. A mãe golfinho empurra o bebê recém-nascido para a superfície, ajudando-a respirar pela primeira vez (SCHUSTERMAN et al., 1986).

As toupeiras têm sensores táteis nas duas extremidades do corpo, uma adaptação ideal para se arrastar por túneis no escuro (BEOLCHINI et al., 1996).

As aves também utilizam a comunicação tátil em muitos dos seus diversos rituais de acasalamento. Os albatrozes-de-galápagos mordiscam o bico um do outro. O macho e a fêmea da gralha se alisam nas penas da cabeça e do pescoço. Os periquitos vivem entrelaçados (ANDY e STILL, 2006)

A linha lateral dos peixes permite detectar a presença de outros animais aquáticos, está linha lateral sente as mudanças de pressão causadas por movimentos na água, a uma distância de até cinco vezes o tamanho do seu corpo (BROWN et al., 2006).

A sobrevivência de uma alcateia depende do trabalho em conjunto. Os lobos obedecem a uma hierarquia rígida, expressa e confirmada em seus comportamentos. Um macho demonstra sua submissão ativa para o líder da alcateia quando lambe delicadamente o focinho do líder (ROBBINS, 2004)

Os cavalos fazem o toalete em conjunto, bom método para se livrar de parasitas instalados em partes difíceis. Para indicar o início da sessão um se aproxima do outro com a boca entreaberta. Os dois então mordicam um ao outro por vários minutos. O cavalo escolhe seu melhor parceiro para a sessão de toalete. Entre os cavalos este tipo de contato físico estimula a harmonia (MILLER, 1999).

Quando observamos as formigas em fileiras é por que elas estão trocando alimento. É freqüente observar entre as formigas operárias um contato boca a boca (trofalaxia) no qual ocorre a troca de alimento, precedido de um contato mútuo com as antenas (*anteneo*). (DORIGO e STÜTZLE, 2004)

Nos primatas, as mãos, os pés e a língua, que não tem pelos são especialmente sensíveis. Além dos sons e das expressões faciais, os gestos com o corpo as mãos e os braços têm um papel importante na comunicação. Tal como os seres humanos, os chimpanzés se

beijam e se abraçam, batem palmas e se cumprimentam ao se encontrarem após um período de separação. Esta comunicação é necessária para manter a ordem social.

✓ **A comunicação Química ou Olfativa –**

Existem vários tipos de comunicação química. Ao sentir o cheiro de urina da leoa o leão (*Panthera leo*) levanta a cabeça e abre a boca, com os lábios superiores curvados para dentro. Essa atitude leva o odor da urina a um órgão sensorial existente no céu da boca do leão, fazendo com que ele perceba se a fêmea está ou não pronta para o acasalamento. (PENNISI, 2001).

O cio da vaca dura de 10 a 18 horas; durante este período ela aceita o ato sexual, mas é no período pré-cio que ela indica estar entrando no cio emitindo sinais muito claros como: cauda erguida, vulva inchada e brilhante, muco cristalino com odor característico e urina constante. Desta forma, comunica ao touro que se deixa montar por estar no cio. Contudo, todos esses sinais vão diminuindo e a busca por acasalamento também diminui em frequência e intensidade à medida que se aproxima o final do cio (MARQUES, 1981).

Durante o cio, a égua se posiciona para urinar, eleva a cauda, libera pequenas quantidades de urina e expõe o clitóris através de contrações rítmicas e prolongadas. O colo do útero se relaxa, deixando escapar um muco, às vezes estriado, de sangue, que escorre pela vagina e pela vulva, do qual se desprende um odor característico que atrai e excita o macho (TORRES et al., 1987; ENSMINGER, 1969).

As vespas espalham o aroma característico de suas colônias e distribuem uma substância química produzida pela rainha, quando passam o alimento de um adulto para outro dentro da colônia. Isto parece tranquilizar as operárias, avisando-as de que a rainha está viva, e que tudo está bem na coméia (MORGAN et al., 1998).

Ao erguer a cabeça e colocar os dentes numa posição de “fleshmen”, o carneiro montês norte americano macho leva o cheiro da fêmea ao órgão de Jacobson, localizado em sua boca, para reconhecer se ela está ou não no cio. (STORMSHAK e BISHOP, 2008).

As borboletas machos da espécie *Rainha* encontradas na América do Norte possuem um ferohormônio “afrodisíaco” que permite a atração das fêmeas para o acasalamento. (BARKER e HERMAN, 1976).

Muitos pesquisadores têm comprovado que camundongos usam as cenas urinárias para a comunicação em muitos contextos sociais (BORELLI et al., 2009; ARAKAWA et al., 2008,

2007; DRICKAMER, 2001). As cenas urinárias envolvem informações genéticas sobre o indivíduo como a espécie, o sexo, a dominância social, além de avisar sobre a presença de um invasor (HURST et al., 2005; KAVALIERS et al., 2005; BROWN, 1995; DESJARDINS et al., 1973; BOWERS e ALEXANDER, 1967).

Neste sentido, vale lembrar que a detecção do odor pode ser registrado por 2 diferentes sistemas quimio sensoriais: o sistema olfatório que está envolvido com odores e informações sobre o ambiente, e o órgão vômero nasal (VNO) que está envolvido na resposta a feromônios (vide figura 3); especificamente, os componentes envolvidos na resposta de animais aos feromônios, já foram identificados, como MHC e as MUPs (DULAC e WAGNER, 2006). Sabe-se hoje que o MHC é um complexo gênico chamado de complexo de histocompatibilidade maior. O MHC pode ser considerado como um grupo organizado de genes que controlam o processamento e a apresentação do antígeno codificando os receptores do olfato (JORDAN e BRUFORD, 1998). As MUPs são proteínas urinárias, e já se mostrou que MUPs não voláteis carregariam feromônios voláteis (HOFFMAN et al., 2009). Sabe-se, hoje, que existe um complexo de quimiocinas urinárias composto por MHC-volátil e MHC-não volátil, e por MUPs-não voláteis. Assim, dependendo do tipo de cena urinária um ou mais destes componentes podem ser usados isolados ou em associação para comunicar diferentes situações endógenas e ou exógenas entre os animais.

O MHC está associado a odores urinários, e contém genes que codificam receptores do olfato e são usados por camundongos na discriminação e no reconhecimento de indivíduos familiares. A região do MHC de classe I de camundongos e suínos contém pelo menos 4 genes de receptores do olfato. Cada mamífero contém genes para moléculas MHC de classe I, II e III. Em camundongos, o MHC é denominado de H-2, e além de linfócitos, plaquetas, granulócitos, células renais e espermatozóides também está presente em hemácias. Mostrou-se que o MHC regula o reconhecimento de um odor individual de maneira alelo-específica e, assim, influencia entre outras as preferências, de acasalamento. Foi demonstrado também que camundongos preferem se acasalar com indivíduos que apresentem MHC incompatível. Este acasalamento produz descendência heterozigota no MHC, o que, segundo alguns autores pode ser determinante para a resistência orgânica dos mesmos às doenças (JORDAN e BRUFORD, 1998).

Os genes das proteínas urinárias maiores (MUPs) são expressos no fígado e os seus resíduos são eliminados na urina. As MUPs são expressas em altas concentrações na urina de camundongos de ambos os sexos (BEYNON et al., 2002; HURST et al., 2001). Cada camundongo expressa diferentes tipos de MUP em alta concentração, e isto ocorre tanto em

machos como em fêmeas. Sendo assim, elas são essenciais para percepção da urina de machos ou da presença de fêmea. As MUPs usadas neste tipo de comunicação são de origem MUP dependente não volátil.

Figura 3: Estruturas relacionadas com a detecção do odor em roedores (modificada de ARAKAWA e colaboradores, 2008).

Neste trabalho de Tese procuramos identificar o(s) tipo(s) de comunicação mais relevante(s) entre camundongas saudáveis e conspecíficas doentes. Buscaremos, em especial, caracterizar a importância desta comunicação para as alterações comportamentais e imunes desencadeadas pela convivência imposta (Figura 4).

Figura 4 - Esquema ilustrativo do grupo experimental utilizado nesta tese. O animal companheiro (CAD) será o objeto experimental deste trabalho

3 OBJETIVOS

Serão descritos os objetivos de modo geral e de maneira detalhada.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da convivência por 14 dias com companheiras inoculadas com tumor ascítico de Ehrlich sobre parâmetros bioquímicos, de imunidade adquirida e de comportamento buscando identificar a forma de comunicação existente entre os animais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da convivência com um animal doente sobre:

- a.** O peso relativo, celulariedade e diferencial de células do baço.
- b.** A porcentagem de linfócitos B e T (helper e citotóxicos).
- c.** A atividade citotóxica de células NK.
- d.** A celulariedade, o diferencial e o ciclo celular da medula óssea.
- e.** O ciclo celular do tumor ascítico de Ehrlich após inoculação de 5×10^6 células do mesmo tumor.
- f.** Os níveis séricos de corticosterona de animais submetidos ou não a um desafio por estresse de contenção.
- g.** Os níveis de adrenalina e noradrenalina plasmáticos.

h. Os níveis de interação social.

Analisar, ainda:

- i.** Os efeitos da adição de um animal (doente ou não) aos pares doente-parceiro e controle parceiro sobre a atividade de neutrófilos.
- j.** A preferência por lados de um labirinto em T, sendo um lado com o animal companheiro e o outro com um estranho.
- k.** A relevância do contato físico entre doente-parceiro para as alterações comportamentais e de atividade de neutrófilos.
- l.** A relevância da separação física, visual e olfatória de um animal doente com seu conspecífico para as alterações de atividade de neutrófilos
- m.** A relevância do odor de um animal doente (inoculado com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich), para as alterações de atividade de neutrófilos, crescimento do mesmo tumor, níveis de adrenalina e noradrenalina plasmáticas; níveis de noradrenalina e de seus metabólitos no hipotálamo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Transcreve-se abaixo e de modo especificado os materiais e métodos utilizados neste trabalho.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongas adultas da linhagem Swiss, com 7 a 9 semanas de idade, provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram utilizados segundo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ-USP (Protocolo de aprovação – nº -956/2006).

Antes do início dos experimentos, os animais foram alojados, por um período de 7 dias, em gaiolas de propileno (28 x 17x 12 cm) em número de 2 animais por gaiola para adaptação às condições do biotério experimental. Estas gaiolas foram devidamente 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 da sala era artificial, e obedeceu 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 NUTRILABOR GUABI®. Ração e água foram fornecidas *ad libitum* durante todos os experimentos. Após o período de adaptação, procedeu-se à realização dos experimentos como descrito em seqüência.

4.1.1 Formação dos Grupos

Escolheram-se camundongas para os experimentos porque as fêmeas desta espécie são menos agressivas que os machos, quando colocadas em grupos (GRACCEVA et al., 2009). Neste sentido, as presenças de comportamento agressivo e/ou de lesões produzidas por encontros agonísticos poderiam representar variáveis intercorrentes. As camundongas foram separadas em pares de acordo com o peso corporal sendo deixadas em coabitação durante 5

dias. No sexto dia (dia 1 dos experimentos) os pares de animais foram divididos ao acaso em dois grupos iguais: um controle sendo o “Companheiro do Animal Sadio” (CAS) e um experimental “Companheiro do Animal Doente” (CAD). Um camundongo de cada par do grupo CAS foi inoculado com PBS i.p. (0,1 ml/10g) e um camundongo de cada par do grupo CAD foi inoculado i.p. com uma suspensão de células do tumor de Ehrlich em PBS (5×10^6 céls/animal). As camundongas injetadas com tumor de Ehrlich foram analisadas em suas gaiolas moradia para registro dos sinais e sintomas eliciados pelo mesmo como feito anteriormente (Morgulis e colaboradores, 2004; Alves e colaboradores, 2006; Alves e colaboradores, 2007). Brevemente, os seguintes escores foram utilizados: 0, predominantemente ativas, sem sinais e sintomas de doença, 1, predominantemente ativas com apetite normal e presença de pelos arrepiados; 2, ativas, apetite normal e presença de um pequeno aumento de volume abdominal; 3, ativas, apetite normal presença de pelos arrepiados, e presença de um grande volume abdominal; 4, ausência de atividade, anorexia, dispnéia, presença de pelos arrepiados, e um severo aumento de volume abdominal. O dia em que a maioria dos animais injetados com o tumor de Ehrlich apresentavam escore 4 foi escolhido para a realização dos experimentos comportamentais e de imunidade, ou seja, o ED14. As outras camundongas de cada par, “companheiras” dos animais inoculados, não foram manipuladas, sendo o objeto deste estudo. No 14º dia, os diferentes procedimentos experimentais foram realizados com as “companheiras”. A figura 5 ilustra este procedimento.

Figura 5 - Esquema ilustrativo da formação dos grupos experimentais deste trabalho

4.2 BIOLÓGICOS

- ✓ **Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (DIFCO®)** - bactéria marcada com Iodeto de Propídio (Sigma, St Louis, MO) utilizada para avaliar a atividade fagocítica realizada por macrófagos peritoneais e de neutrófilos sanguíneos.

4.3 CORANTES CELULARES

- ✓ **Azul de TRIPAN (GIBCO) a 0,4 %**
Corante Utilizado para contagem de células e determinação de viabilidade celular.
- ✓ **ROSENFELD (Merck®)**
Utilizado para corar as células na técnica de sorteio (*sorting*) da citometria de fluxo.

4.4 MEDICAMENTOS, REAGENTES E SOLUÇÕES

- ✓ Anticorpos conjugados a FITC anti-CD3, anti-CD4 e conjugados a PE anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19 (Pharmingen – BD)- utilizado para a marcação de linfócitos esplênicos.
- ✓ Diacetato 2'7'Diclorofluorisceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR) - empregado na citometria de fluxo. Este reagente foi mantido congelado (-20° C), e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso.
- ✓ EDTA (Sigma®)- utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3 mM, com o objetivo de interromper a reação após o período de incubação das amostras.
- ✓ Heparina (Liquemine®-Roche)- utilizado para evitar a coagulação das amostras de sangue após a coleta.
- ✓ Iodeto de Propídio (PI) (Sigma, St Louis, MO)- utilizado nas técnicas de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha das amostras captadas pelo citômetro.
- ✓ Ficoll-Paque (Amersham-biosciences) – gradiente de concentração para a separação de linfócitos.
- ✓ Fungizone (GIBCO) – antifúngico a base de anfotericina B para meio de cultura celular.
- ✓ Hepes (GIBCO) - tampão para meio de cultura celular.
- ✓ Kit LSAB (DAKO) – reagente que contém anticorpo secundário e complexo streptavidina biotina.
- ✓ Kit de corticosterona Coat-a-Count (DPC®)- Kit de radioimunoensaio para dosagem de corticosterona.

- ✓ Liquemine 25.0000UI/5ml (Roche) – anticoagulante a base de heparina para coleta de sangue.
- ✓ Penicilina/streptomicina (GIBCO) – antibiótico para meio de cultura celular.
- ✓ RNase (Invitrogen)- utilizada para degradar RNA na técnica de ciclo celular.
- ✓ RPMI 1640 (GIBCO) – meio de cultura celular.
- ✓ Soro fetal Bovino (GIBCO) – utilizado para enriquecer o meio de cultura.
- ✓ NaCl 0,2% e 1,6%- Soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras.
- ✓ PBS (Phosphate-buffered saline, pH=7,2-7,4)-Solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose.
- ✓ PBS glicosado - Solução utilizada na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*.
- ✓ PMA - Miristato-acetato de forbol-(Calbiochem®)- utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo de neutrófilos.
- ✓ CFSE (carboxyfluorescein diacetato succinimidyl Ester) – utilizado na marcação dos esplenócitos.

4.4.1 Reagentes e Estímulos para Análise do *Burst* Oxidativo

a) Preparo das Soluções:

- **PBS-** (salina tamponada com fosfato, pH=7,2-7,4)- Solução estoque 10x concentrada:

-Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O (Merck®)	42,96g
-NaH ₂ PO ₄ .1 H ₂ O (Nuclear®)	3,6g

-NaCl (Labsynth ®)	82,0g
-H ₂ O destilada qsp	1000ml

- **PBS 1x:**

No momento do uso, dilui-se 100 ml da solução estoque 10x concentrada e completou-se com H₂O destilada para um volume de 1000 ml.

- **PBS glicosado:**

-PBS 10x	100 ml
-glicose	0,9 g
-gelatina	1 g
-H ₂ O destilada qsp	1000 ml

- **Soluções Salina 0,2%, 0,85% e 1,6%:**

Pesou-se 2g, 8,5g, e 16g respectivamente de NaCl e completou-se cada solução com 1000 ml de H₂O destilada.

b) Preparo dos Reagentes:

- **DCFH-DA 25 mM-Soluções Estoque**

Diluiu-se 28,35 mg de DCFH-DA em 2 ml de etanol. Esta solução foi acondicionada em frasco âmbar para protegê-la da luz, sendo mantida em freezer a -20°C.

- **Solução de DCFH-DA**

No momento do uso, dilui-se a solução estoque em PBS 1 x de modo tal a permitir que o volume final desta solução esteja de acordo com o número de animais, isto é, que seja suficiente para contemplar todas as amostras do experimento.

Apenas para ilustrar e facilitar a compreensão podemos citar alguns exemplos desta diluição:

-100 µl DCFH-DA (solução estoque) +8,2 ml de PBS-para 13 animais;

-50 µl DCFH-DA (solução estoque) +4,1 ml de PBS-para 6 animais;

E assim por diante...

- **Solução de EDTA 3mM**

Para o preparo desta solução, 3 ml da solução estoque de EDTA (1 mol/l) foram diluídos em 997 ml de PBS. Esta solução foi mantida em geladeira.

c) Preparo dos Estímulos:

- **Solução de PMA**

A solução de PMA foi preparada utilizando-se de 1 µl da solução estoque de PMA (100 ng/100 µl) e completando-se o volume com 999 µl de PBS. Este volume, ou seja, 1 ml, é suficiente para a realização da técnica de *burst* para um total de 10 animais.

- **Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923-SAPI**

Antes de esta bactéria ser utilizada para a realização da técnica do *Burst* e da Fagocitose, foi necessário conjugá-la com o iodeto de propídio (PI), de forma tal a permitir que a bactéria emitisse uma fluorescência vermelha possibilitando, assim, sua leitura no citômetro.

O protocolo de conjugação da bactéria foi aquele proposto por Hasui (1989), que consiste do seguinte procedimento:

- cultivar bactérias viáveis em ágar sangue por 48 horas;
- colocar as colônias de bactérias em tubos de ensaio estéreis, em um fluxo laminar próprio para bactérias;
- ressuspêndê-las em NaCl 0,85% e centrifugá-las por 10 minutos a 2500 rpm;
- “inativar” as bactérias a 60°C por 30 minutos;
- lavar 3 x com NaCl 0,85% e após cada lavada, centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm;
- ajustar a concentração das bactérias de modo tal que sua leitura no espectrofotômetro (Uv/Visível) a uma absorbância de 620 nm tenha um valor que varie entre 2.4 a 2.7. Estes valores, nesta absorbância, são aqueles em que as bactérias, em suspensão, apresentam uma turbidez que corresponde ao n ° 8 escala de Mc.Farland. Para a leitura no citômetro é necessário que as bactérias estejam nestas concentrações.
- preparar uma solução de iodeto de propídio a 5 %;
- centrifugar nas mesmas condições, desprezar o sobrenadante e adicionar 25 µl da solução de iodeto de propídio a 5%;

- incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro; lavar a suspensão de bactéria marcada mais 3x com NaCl 0,85% e centrifugando após cada lavagem por 10 minutos a 2500 rpm;
- ressuspender a bactéria em 5 ml de PBS glicosado (livre de Ca^{++} e Mg^{++});
- “aliquotar” em eppendorfs de 2 ml, proteger da luz e congelar ‘a -80°C;
- descongelar imediatamente antes do uso.

Após a inativação das bactérias e para evitar contaminações, todo o procedimento descrito acima citado, foi realizado dentro de um fluxo laminar empregando-se, sempre, soluções estéreis.

4.4.2 Reagentes e Estímulos para a Quantificação de catecolaminas, especificamente adrenalina e noradrenalina

a) Reagentes:

- **Fase móvel (Eluente A)** Diluição A- pesar 8,9g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Hidrogenofosfato dissodico dihidratado) e dissolver em 1 litro de água Milli-Q (0,05M Solvente A em um frasco de 2L.

Diluição B- pesar 10,5g de Acido cítrico monohidratado e dissolver em 1 litro de água Milli-Q (0,05M Solvente B).

- Adicionar solvente B no solvente A, sob agitação constante, e ajustar o Ph até 4,0. Neste momento devera chegar em um volume total, ou próximo de 1,8L.

- Adicionar 0,4g de octil sulfato de sódio e 0,075g de $\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e agitar ate dissolver completamente os sais.

- Filtrar esta solução utilizando filtro com poros de 0,45 μm e em seguida adicionar 200 mL de acetonitrila (ACN 10%).

- Desgaseificar com auxilio de bomba de vácuo por 10 minutos.

Tampão Tris-HCL:

Tris ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)PM=121,12 0,6M

$\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mM

pH= 8,6 (HCl 1 ou 2N)

Acido perclórico 0,1 M (PCA 0,1M).

Alumina ativada (Al_2O_3) em tampão Tris-HCl: 300 mg Al_2O_3 em 20 mL de tampão (Alumina-Tampão Tris-HCl).

Água Milli-Q ou água bi-destilada.

A coleta de sangue deve ser realizada usando como anticoagulante solução de EDTA 10%.

b) Solução estoque dos padrões:

- Preparar as soluções estoque de Adrenalina (A), Noradrenalina (NA) e Dopamina (DA) em uma concentração de 10^{-3}M cada dissolvida em água Milli-Q.
- Aliquotar os padrões em frações de 20 μl e estocar no freezer -80)

c) Solução de trabalho dos padrões:

- Pipetar 10 μl de cada solução estoque dos padrões em um eppendorf e complementar com 970 μl de PBS (solução 1).
- Pipetar 10 μl da solução 1 em outro eppendorf e adicionar 990 μl de PBS (solução padrão de trabalho).

4.5 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados estão descritos abaixo.

4.5.1 O Protótipo usado para detecção da forma de comunicação

As figuras 6 e 7 mostram um esquema e a foto ilustrativa do protótipo. Este equipamento foi construído por cubículos de dimensões iguais às de uma gaiola para camundongos, num total de 40 cubículos. Estes foram distribuídos em dois planos espaciais de 20 cubículos cada, um superior e outro inferior (50 cm abaixo do primeiro). Cada conjunto de 20 cubículos está disposto em duas fileiras de 10 cubículos cada uma, mantidas em

contacto pelo seu plano vertical posterior. Cada fileira de 10 cubículos é provida de uma tampa móvel de acrílico transparente comum para os 10 cubículos. Para a primeira fileira de 10 cubículos, a tampa é provida de áreas para insuflação de ar em formato circular, guarnecida de uma grade metálica (uma área de insuflação para cada um dos cubículos). Para a segunda fileira de 10 cubículos a tampa correspondente é, também, de acrílico transparente, porém sem áreas de insuflação de ar. Ainda esta segunda fileira é provida de uma área de exaustão em seu plano vertical anterior, área esta constituída de uma abertura circular guarnecida por uma grade metálica. A dimensão desta área é igual àquela da área de insuflação dos 10 cubículos adjacentes. A área de contato entre os cubículos, correspondente aos planos verticais posteriores destes, é provida de uma placa de acrílico transparente e perfurada. Quando acionado o sistema de exaustão, a massa de ar penetra pela área de insuflação da primeira fileira de 10 cubículos atravessa a placa de acrílico perfurada e é capturada pela área de exaustão existente na segunda fileira de 10 cubículos. Essa massa de ar, portanto, passa em primeiro lugar pelos animais alojados na primeira fileira e após isso, atinge os animais alojados no interior dos cubículos correspondentes da segunda fileira.

Os vinte cubículos alojados no plano inferior tiveram montagem semelhante aos do plano superior diferindo apenas no fato de que cada cubículo dispunha de área de insuflação e exaustão individuais e separados em seu plano vertical posterior por placa de acrílico continua, sem perfurações.

Esta montagem fazia com que os animais alojados no plano superior tivessem contato visual e olfativo uns com os outros, e no plano inferior tivessem apenas contato visual. Em outro experimento, as placas de acrílico transparentes foram substituídas por outras, opacas de forma tal a impedir qualquer tipo de comunicação visual entre os animais.

O sistema permaneceu sempre em pressão negativa em relação à sala. A massa de ar para todos os cubículos era tomada da sala, circulava no protótipo da forma já abordada, sendo posteriormente expurgada para a atmosfera em região distante da sala, não existindo nenhuma possibilidade de retorno do ar expurgado à sala. Para a finalidade de exaustão do ar do protótipo foram construídas 3 linhas de pressão negativa, duas para o plano inferior e uma para o plano superior. Estas linhas eram lotadas de válvulas de regulação de razão, individuais para cada cubículo sendo ao todo, trinta válvulas, vinte para o plano inferior e dez para o plano superior, uma vez que só uma das fileiras de dez cubículos deste plano era dotada de exaustão.

A circulação do ar foi garantida por um conjunto motor ventilador da marca WEG (WEG Motores Elétricos, Santa Catarina, Brasil), centrífugo, 4 HP de potencia, 220W

trifásico, dotado de relé de proteção contra queda de fase. A velocidade do ar foi medida nas áreas de insuflação com anemômetro tipo ventoinha e regulada pelas válvulas de regulação em 1m/s.

FIGURA 6 Ilustração do protótipo construído especialmente para analisar a influência do odor na indução das alterações neuroimunes. A figura A mostra que as perfurações do acrílico permitiam a passagem do odor do compartimento das camundongas doentes para as suas respectivas companheiras. A figura B mostra que o acrílico sem perfurações impedia a passagem de odor. No experimento 17, 19, 20, 21, 22, 23 esta placa de acrílico existente entre os cubículos (1) era transparente; no experimento 18, a mesma era opaca

Figura 7: Foto do protótipo especialmente desenvolvido para analisar a influência do odor na indução das alterações neuroimunes. Este aparelho encontra-se no laboratório de Neuroimunomodulação da FMVZ-USP

4.5.2 O Citômetro de Fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Machintosh Apple, Cupertino, CA, USA); 10.000 eventos foram adquiridos de cada amostra por meio de um software chamado Cell Quest Pro® (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). A figura 8 mostra este conjunto de equipamentos.

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – Foward Scatter e SSC - Side Scatter que avaliam o tamanho e a complexidade interna das mesmas, respectivamente. As populações de interesse em cada experimento foram analisadas por meio dos gates, através dos programas Flow Jo 7.0® (Flow Cytometry Analysis Software,

Ashland, OR, USA) ou Cell Quest Pro®, excluindo-se assim outros tipos celulares das amostras.

Figura 8 - Citômetro de fluxo modelo FACScalibur da Becton Dickinson acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple utilizado no presente trabalho para avaliar a atividade de neutrófilos, o ciclo celular, a citotoxicidade de NK e a proliferação de linfócitos
As setas indicam: **1**- Injeção da amostra, **2**-Painel de controle do citômetro e **3**-Gráficos dos dados adquiridos

4.5.3 O Ethovision

Para registro e análise comportamental foi utilizado o aparelho Ethovision® (Noldus Information Technology®, Leesburg, VA, USA) que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo de análise de movimento e reconhecimento comportamental. O sistema é composto pelo programa Ethon Vision Pro-Color 2.3 e pelos itens de *hardware*: câmara filmadora (CCD-Iris color Sony, New York, PA, USA), monitor vídeo (Sony, New York, PA, USA), computador (Pentium 133, 16 MB de memória RAM, 1,2GB de disco rígido) com placa de captura de vídeo, monitor SVGA, teclado e mouse, além de cabos e conectores. Conforme ilustrado na figura 9.

O sistema de observação indireta é constituído por uma filmadora instalada no teto da sala de observação, conectada ao monitor e ao microcomputador, localizados fora da sala.

Para interpretar as imagens observadas durante a realização dos testes comportamentais no campo aberto (CA), no labirinto em cruz elevado (LCE), e no labirinto em T elevado o software (EthoVision- Video Tracking, Motion & Behavior Recognition System® - versão 2.3 – noldus Information Technology®, Leesburg, VA, USA) fez virtualmente as divisões do campo aberto em 3 áreas concêntricas (central, média e periférica), em braços abertos, braços fechados e área central no LCE, e em diferentes zonas no no labirinto em T elevado. Este sistema digitalizou e analisou os comportamentos dos animais.

Figura 9 - Etho Vision® -(VÍdeo Tracking Motion & Behavior Recognition System Versão 1.90)- equipamento de rastreamento em vídeo, usado no procedimento experimental para análise de movimentos
As setas indicam: 1- Campo Aberto para camundongo, 2-Câmera filmadora acoplada ao computador, 3- Monitor de vídeo e 4- Imagem digitalizada representada em *pixels*

4.5.4 O HPLC

As dosagens das amins cerebrais e de seus metabólitos foram realizadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). O sistema de HPLC-ED (SHIMATZU Modelo 6 A) usado, é composto por uma bomba, um amortecedor de impulsos, uma válvula

injetora de 20 μ l, um detector eletroquímico, um forno de coluna para manutenção da temperatura, um registrador e um integrador (Modelo Chromatopac), todos marca SHIMATZU. A coluna cromatográfica utilizada foi a C-18 (SUPELCO) medindo 220 x 4,6 mm com filtro de linha. A figura 10 mostra o equipamento citado.

As micro-seringas, pipetas automáticas e vidrarias volumétricas usadas foram todas de boa procedência, tendo em vista a necessidade de precisão exigida para estas dosagens.

Figura 10 - Sistema HPLC-ED (SHIMATZU modelo 6A) utilizado no presente para dosagens neuroquímicas
As setas indicam: 1- Injeção da amostra, 2-Visor do painel de controle e 3-Detector eletroquímico

4.6 PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

4.6.1 Rastreamento do animal e análise do movimento

A partir de 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, obedecendo a uma taxa de amostragem de 6,66 amostras por segundo¹.

As coordenadas são geradas pelo método de subtração-ideal para rastrear um animal

¹ A taxa de amostragem ideal de roedores é de 2 a 8 amostras/seg, já que uma configuração de amostragem inferior causaria perda de detalhes, enquanto um valor superior a 8 excederia a dinâmica do roedor, captando movimentos corporais que não indicam deslocamento e, portanto, superestimando a distância movida.

branco em uma arena cinza, no qual o sistema subtrai a imagem de cada amostra dos pontos da imagem de referência (imagem do campo aberto, labirinto em cruz elevado ou do labirinto em T elevado, vazio, isto é sem o animal, e captada antes do experimento).

Para que o sistema possa reconhecer em qual zona² do aparelho se encontra o animal, foi necessário fazer uma representação gráfica do campo aberto, do labirinto em cruz elevado ou do labirinto em T elevado.

Assim, sobrepondo-se a imagem do campo aberto, labirinto em cruz elevado ou do labirinto em T elevado vazio, no monitor de vídeo, ao canal de edição de imagem do programa, foi possível desenhar o contorno e as subdivisões de cada arena³.

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 subsequentes 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, tendo sido 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. Outro fator importante para eliminar os reflexos foi o contraste perfeito entre a arena e o animal, fato alcançado pintando-se as superfícies do campo aberto, labirinto em cruz elevado e do labirinto em T elevado de cor cinza grafite.

Uma vez que a imagem digitalizada é representada em *pixels* (*picture elements*- elementos de imagem), para que as coordenadas do animal sejam, fielmente usadas para calcular seu deslocamento real em centímetros, foi necessário usar um procedimento de calibração da arena.

A calibração simples usa dois pontos separados por uma distância conhecida em centímetros (uma régua, por exemplo). No entanto, por assumir uma relação linear entre as distâncias no mundo real e aquela da imagem digitalizada, esse método negligencia a distorção provocada pela lente da câmera, o que afetaria os valores dos parâmetros de deslocamento (por exemplo, a distância movida). Deste modo, foi usado o método de calibração avançado, no qual, sobre a imagem digitalizada de uma cartolina com pontos desenhados com distâncias entre si conhecidas, digitalizados 35 pontos correspondentes às coordenadas reais em centímetros, de modo tal que o sistema tenha condições de fazer uma representação homogênea das distâncias em toda a arena, isto é, tanto no centro como nas extremidades

---

² Zonas são as divisões da arena: exemplo zona central do campo aberto

³ Arena é a representação gráfica da área do aparelho que o animal pode percorrer, dentro da qual o sistema rastreia o movimento.

a) Compilação e análise dos dados

Cada sessão de 5 minutos no campo aberto correspondia a uma trilha (*track*). A análise feita pelo ETHOVISION® consistia em processar os dados do conjunto de trilhas de um experimento, isto é, a partir do registro das coordenadas e do que ocorria em cada amostra, o sistema calculava os valores numéricos das características de distribuição escolhidas para cada parâmetro, isto é, frequência e duração (para parâmetros estáveis) valor total e média (para parâmetros contínuos). Os resultados foram “exportados” na forma de um arquivo “txt” (extensão de arquivo texto) que, ao ser aberto na planilha do programa Microsoft Excel 7.0, continha nas colunas às informações relacionadas ao número da trilha, zona, grupo e características de distribuição de cada parâmetro. Antes da análise estatística, a planilha com esses dados passou por uma série de etapas de organização e de cálculos de porcentagens de tempo e de número de ocorrências dos parâmetros em cada zona.

4.6.2 Medida da Atividade Geral no Campo Aberto

Em um ambiente novo os animais tendem a explorá-lo ou podem ficar imóveis, com a musculatura tensa, vigilantes e de prontidão. A atividade geral foi avaliada no campo aberto; esse aparelho tem sido usado para quantificar os efeitos comportamentais do estresse e da ansiedade (BELUNG; GRIBEL, 2001; BASSO et al., 2003, RIGHI; PALERMO-NETO, 2003).

O campo aberto utilizado é composto por uma arena circular de madeira medindo 40,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura pintada na cor cinza grafite, elevado a 55 cm do solo, como ilustra a figura 11. O fundo da arena circular é dividido, virtualmente, por 3 círculos concêntricos em 3 partes iguais: zona central, média e periférica. Esta divisão foi realizada para que pudéssemos avaliar não só a atividade geral dos animais, mas também para avaliarmos o tempo permanecido, por eles, em cada zona.

A atividade geral dos animais foi avaliada por meio de observação indireta através do sistema, ETHOVISION. Desta forma, a presença do observador não interferiu com os parâmetros observados, uma vez que este ficou fora da sala onde se encontravam os animais em teste. É importante ressaltar que a sala onde foi realizado o experimento era pouco iluminada e sem nenhum tipo de ruído. A medida de atividade dos animais no campo aberto

foi feita sempre no mesmo período do dia (entre as 8:00 hs e 14:00 hs), tendo sido avaliada colocando-se cada animal, individualmente, na arena do aparelho (centro da arena) por 5 minutos, tomando-se o cuidado de intercalar os animais dos diferentes grupos para observação, buscando-se assim, minimizar possíveis efeitos decorrentes de variações circadianas na atividade dos animais. Com a finalidade de evitar influência de odores, a arena foi limpa com uma solução aquosa de álcool a 5 % imediatamente antes da introdução de cada animal.

Como indicativos da atividade geral foram registrados os seguintes parâmetros em cada zona do aparelho:

- **Locomoção:** 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).
- **Porcentagem de Tempo em cada zona:** a porcentagem de quanto tempo em segundos, em que o animal se movimentou no interior das zonas do campo aberto(s).
- **Velocidade média (cm/s):** corresponde à distância percorrida pelo animal, por unidade de tempo.
- **Frequência de entradas:** corresponde ao numero de entradas do animal em cada uma das zonas do campo aberto.

Figura 11: Campo Aberto para camundongos

4.6.3 Avaliação do Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O estudo dos níveis de ansiedade foi feito como descrito para ratos por Pellow et al. (1985) e validado para camundongos por Lister (1987). O labirinto em cruz elevado é um teste frequentemente utilizado em roedores para avaliação dos níveis de ansiedade. Trata-se de um labirinto em forma de cruz, feito de madeira e pintado de cinza, constituído por dois braços abertos medindo 30 cm de comprimento por 5 cm de largura cada um, em oposição a dois braços fechados de iguais medidas, mas com paredes laterais de 15 cm de altura. Na intersecção entre os braços abertos e fechados forma-se um espaço de 25 cm² de área, denominado centro. O aparelho é colocado sobre um suporte a 55 cm do chão, como ilustrado na figura 10. Segundo Barnett (1956, 1958), os roedores têm preferência natural por locais próximos às superfícies verticais, provavelmente por ficarem menos expostos aos predadores. Este comportamento faz parte do repertório defensivo natural dos roedores (GROSSEN; KELLEY, 1972). Assim, sabe-se que animais muito ansiosos preferem os braços fechados do aparelho, enquanto fármacos ansiolíticos aumentam a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (PELLOW et al., 1985).

A avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado (Figura 10) foi feita imediatamente após o fim do teste de campo aberto, colocando-se cada animal, individualmente, no centro do aparelho, com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Resultados prévios deste laboratório e de outros têm mostrado que animais colocados no campo aberto ou no *hole-board*, imediatamente antes ao teste de labirinto em cruz elevado, apresentam uma melhor atividade exploratória no LCE, facilitando a análise dos dados (LISTER, 1987; PALERMO-NETO; GUIMARÃES, 2000). Foi considerada como “entrada” em um dos braços ou permanência nos braços ao ato de o animal colocar o centro de sua massa corpórea dentro de cada área do aparelho. Cada animal foi observado por 5 minutos através do sistema indireto, o ETHOVISION® como descrito em 4.5.3.1

Foram registrados os seguintes parâmetros: 1) número de entradas nos braços abertos (EA): corresponde ao ato do animal entrar nos braços abertos com o centro de sua massa corpórea; 2) número de entradas nos braços fechados (EF): corresponde ao ato de o animal entrar nos braços fechados com o centro de sua massa corpórea; 3) tempo em movimento nos braços abertos (TA): corresponde ao tempo gasto (s) em movimento neste braço; 4) tempo em movimento nos braços fechados (TF): corresponde ao tempo (s) em movimento gasto neste braço.

Para comparação dos níveis de ansiedade entre os grupos foram consideradas as seguintes taxas:

$$\% \text{ de entrada em EA} = \frac{\text{EA} \times 100}{\text{EA} + \text{EF}} \quad \text{e} \quad \% \text{ de tempo em TA} = \frac{\text{TA} \times 100}{\text{TA} + \text{TF}}$$

$$\% \text{ de entrada em EF} = \frac{\text{EF} \times 100}{\text{EF} + \text{EA}} \quad \text{e} \quad \% \text{ de tempo em TF} = \frac{\text{TF} \times 100}{\text{TF} + \text{TA}}$$

As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia (entre as 8:00 e 14:00 hs), intercalando-se os animais dos diferentes grupos. A arena do LCE foi limpa com solução aquosa de álcool a 5 % imediatamente antes da introdução de cada animal. Na figura 12 temos uma foto ilustrativa do equipamento.

Figura 12: Labirinto em cruz elevado para camundongos

4.6.4 Avaliação do Comportamento no labirinto elevado em T

O equipamento em forma de T foi desenvolvido para se avaliar a preferência do animal por um dos lados do aparelho no qual eram colocados diferentes estímulos. Trata-se de um labirinto em forma de T, feito de madeira e pintado de cinza, constituído por três braços fechados medindo 30 cm de comprimento, 5 cm de largura e 19 cm de altura. Na intersecção entre os três braços fechados forma-se um espaço de 25 cm² de área, denominado centro. O aparelho é colocado sobre um suporte a 60 cm do chão, como ilustrado na figura 13. A avaliação do comportamento no labirinto elevado em T foi feita colocando-se cada animal, individualmente, na parte inferior inicial do T, com a cabeça voltada para frente; esta zona do aparelho foi chamada de “sozinho”, pois ali não era colocado nenhum estímulo. A partir desta zona o animal podia optar por ficar ou seguir e escolher um dos dois braços onde eram colocados estímulos diferentes. As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia (entre as 8:00 e 14:00 hs), intercalando-se os animais dos diferentes grupos. A arena do labirinto elevado em T foi limpa com solução aquosa de álcool a 5 % imediatamente antes da introdução de cada animal. Cada animal foi observado por 5 ou 10 minutos através do sistema indireto ETHOVISION como descrito em 4.5.3.1.

Figura 13: Labirinto em T elevado para camundongos

4.6.5 Avaliação da interação social

Este estudo foi proposto para verificar se o animal CAD passava por situação similar à de um isolamento social; sabe-se que o isolamento social exacerba os episódios de interação social quando do pareamento subsequente de animais (FILE; SETH, 2003).

A interação social foi avaliada por meio de uma observação direta de duplas de camundongos em uma arena (a mesma arena utilizada nos ensaios de Campo Aberto), sendo medida a quantidade de tempo em que dois camundongos, não familiares, interagem. Este estudo foi realizado com o pareamento de um animal CAD com um animal estranho, e o mesmo foi feito com os animais do grupo controle CAS.

Para a avaliação da interação social, a quantidade de tempo em que dois camundongos não-familiares interagem foi medida no campo aberto (Figura 14). Para tanto, camundongos que nunca estiveram em contato com aqueles do grupo CAD ou do grupo CAS, foram avaliados por dois dias consecutivos para registro da interação social. Para tanto, um dia antes deste teste, cada animal era colocado individualmente no centro da arena sendo observado por 10 minutos. No dia seguinte, o camundongo era colocado novamente na arena, porém desta vez com seu par, tomando-se o cuidado para que os indivíduos tivessem pesos similares (variação inferior a 10 gramas), aguardavam-se 10 minutos, para habituação ao seu respectivo par. Após 24 horas deste procedimento realizou-se a segunda sessão, com a mesma dupla anterior pareada. O teste consistia em introduzir os pares no campo aberto ao mesmo tempo e medir sua interação por 10 minutos.

As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia, pela manhã, entre as 9:00 e 12:00 horas. A arena foi limpa com uma solução aquosa de álcool 5%, imediatamente antes da introdução de cada par. O comportamento dos animais foi filmado, e no final das sessões, analisado manualmente com uso de cronometro.

Os seguintes parâmetros foram medidos:

Farejar (s), entendido pelo tempo que um dos animais gasta farejando seu parceiro, ou seja, encostando o nariz no outro, para sentir seu cheiro.

Perseguir (s), computado pelo tempo em que um dos animais persegue o outro, ou seja, se movimenta em direção ao outro, quando o animal perseguido também está se movimentando.

Frequência de passar sobre ou sob o outro, quando um dos animais passa por cima ou por baixo do outro camundongo que está parado ou em movimento

Figura 14: Animais no campo aberto de camundongos realizando interação social.

4.7 METODOLOGIAS BIOQUÍMICAS

4.7.1 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

a) Coleta e processamento dos tecidos

Os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂, sendo os cérebros rapidamente retirados e lavados com solução salina gelada (4° C). Imediatamente após, foram dissecados sobre uma placa de petri rodeada por gelo seco, formando-se assim, um micro-ambiente o mais, assim, frio possível. Os hipotálamos foram, então, retirados, pesados e congelados a -80°C num tempo máximo de 3 minutos, onde permaneceram por no máximo 2 meses até as dosagens.

Antes das dosagens os tecidos cerebrais foram homogeneizados por sonicação (caneta sonicadora), durante 2 ou 3 minutos sobre uma cuba de gelo seco, com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA, utilizado como padrão interno para as dosagens de monoaminas. O

DHBA (3,4 diidroxibenzilamina) foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas das monoaminas a serem dosadas (COSTA; FRUSSA-FILHO; FELICIO, 2001). A figura 13 mostra o equipamento citado.

Após a homogeneização, as amostras foram colocadas na geladeira onde permaneceram por uma noite; no dia seguinte foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf, sendo as amostras em seguida congeladas a -80°C , onde ficaram aguardando a leitura no aparelho.

A Noradrenalina (NA) e seu metabólito 3-metoxifeniletlenoglicol (MHPG), foram dosadas por HPLC, com detector eletroquímico. Foram calculadas também as relações NOR/MHPG considerada como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de NOR.

b) Dosagens dos neurotransmissores

As dosagens neuroquímicas foram realizadas a partir de método previamente descrito (FELICIO, et al., 1996). A técnica utilizada foi a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico. Esta técnica fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção.

No preparo da fase móvel utilizada na quantificação das monoaminas e de seus metabólitos, foi utilizado um sistema isocrático constituído de fosfato dissódico (7,16 g/l), ácido cítrico (4,20 g/l), EDTA (40,0 mg/l), ácido heptanossulfônico (556 mg/l) e metanol (80 ml/l). O pH desta solução foi acertado para 3,0 com auxílio de ácido ortofosfórico.

A fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo e deaerado por 30 minutos com um fluxo de hélio antes de ser colocada no HPLC. Após sua instalação no sistema cromatográfico, a fase móvel permaneceu por uma noite circulando em um sistema fechado de modo tal a permitir a estabilização do aparelho, com fluxo constante de 1,2 ml/min. O detector eletrolítico foi mantido com potencial de +0,83 V no eletrodo de trabalho. A temperatura para amostragem no HPLC foi mantida em 25°C .

Os padrões com concentrações de 1 mM de NOR, MHPG, DHBA foram diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, distribuídos em tubos eppendorf (1,5 ml) e, em seguida estocados em freezer (-80°C) por um período de até dois meses. No momento da análise os padrões foram descongelados e diluídos 5.000, 10.000 e 20.000 vezes em ácido perclórico 0,1M.

As substâncias foram reconhecidas segundo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, através de comparação com os padrões de concentrações conhecidas. O tempo total de passagem de cada amostra foi de 20 min. O limite de detecção do aparelho foi

de 1,0 ng/ml e o limite de quantificação de 10,0 ng/ml para os diferentes neurotransmissores quantificados.

Para todas as dosagens foram estabelecidas curvas de calibração tendo sido calculados os coeficientes de correlação linear (r^2) sendo considerados adequados valores r^2 , superiores 0,9. Para o estabelecimento da precisão intra-ensaio do método cromatográfico foram calculados os coeficientes de variação (CV%) das diferentes concentrações dos neurotransmissores analisados e foram considerados adequados valores com CV% inferiores a 15%.

A recuperação do método foi estudada acrescentando-se a triplicata de amostras de concentrações conhecidas dos diferentes padrões mensurados, sendo que foi aceito como adequados valores superiores a 80%.

A cada amostra proveniente dos animais foram adicionadas concentrações de padrão interno (DHBA 14 ng/ml); os valores obtidos foram utilizados para efetivação dos devidos ajustes nas medidas das concentrações de neurotransmissores.

4.7.2 Dosagem dos níveis de adrenalina e noradrenalina plasmática

a) Coleta de sangue para dosagem dos níveis de adrenalina e noradrenalina plasmática

Os animais foram profundamente anestesiados em câmara de CO₂, para a coleta de sangue e posterior dosagem dos níveis de adrenalina e noradrenalina plasmática. Para tanto, sendo após 14 dias de convivência com o animal portador do tumor de Ehrlich, o sangue foi coletado, usando como anti-coagulante EDTA; o sangue assim obtido foi centrifugado sob refrigeração (2.500 rpm/20 minutos em temperatura ambiente) para obtenção do plasma. Este plasma foi armazenado em eppendorfs de polietileno em freezer a -80°C até o momento da realização das dosagens hormonais. As amostras foram coletadas à mesma hora do dia (entre 08:00 e 09:00 hs) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano.

b) Extração das catecolaminas (padrão e amostras)

Foram pipetados 50µl das amostras e da solução padrão de trabalho (duplicata) em eppendorfs de 1,5 ml e adicionado 500µl de Alumina-Tampão Tris-HCl. Em seguida os eppendorfs foram agitados em vórtex por 15 minutos na velocidade 4, e logo na sequência os mesmos eppendorfs foram centrifugados por 4 min a 1200 rpm (4° C). O sobrenadante foi cuidadosamente retirado com o auxílio de uma micropipeta e adicionado de 100µl de ácido perclórico 0,1M. Os eppendorfs foram agitados em vórtex por 5 minutos e, logo após foram centrifugados por 4 minutos a 14000 rpm (4° C). O sobrenadante foi coletado e transferido para um eppendorf de 0,2 mL, sendo mantido sempre no gelo. Foram injetadas 20µl das amostras e do padrão no HPLC. O limite de detecção da metodologia foi de 0,3 pmol. O limite de quantificação foi de 1,0 pM tanto para noradrenalina como para adrenalina.

4.7.3 Dosagem dos Níveis Séricos de Corticosterona Plasmática

a) Coleta de sangue para obtenção do soro

Os animais foram profundamente anestesiados em câmara de CO₂, para a coleta de sangue e posterior obtenção do soro para a dosagem dos níveis séricos de corticosterona. Trata-se do glicocorticóide mais abundante na circulação de camundongos, sendo considerado como um ótimo indicador da função adrenocortical nesta espécie animal. O sangue foi coletado após os 8 ou 14 dias de convivência com o animal portador do tumor de Ehrlich e foi deixado à temperatura ambiente para a retração do coágulo; o sangue dos animais dos grupos experimentais e controles foi, então, centrifugado sob refrigeração (2.500 rpm/20 minutos em temperatura ambiente) para obtenção do soro. Este soro foi armazenado em eppendorfs de polietileno em freezer a -80°C até o momento da realização das dosagens hormonais. As amostras foram coletadas à mesma hora do dia (entre 08:00 e 09:00 hs) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano sobre os níveis séricos de corticosterona.

b) Dosagem de Corticosterona

As amostras de soro dos animais foram retiradas do freezer, sendo mantidas a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) para o descongelamento. As dosagens para a quantificação de corticosterona foram realizadas por radioimunoensaio em fase sólida utilizando-se o kit comercial Coat-a-Count (DPC®) específico para corticosterona.

Nesta técnica de radioimunoensaio, há competição da corticosterona marcada com [I^{125}] (iodo radioativo) e do hormônio contido na amostra (soro) pelos sítios de anticorpos fixados à parede do tubo de ensaio (“fase sólida”). Foi pipetado dentro de cada tubo de ensaio um volume de 50 µl de cada amostra de soro dos animais dos grupos controles e experimentais. Após a adição de 1 ml da corticosterona marcada com [I^{125}], estes tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 2 horas para atingirem um equilíbrio. A seguir, o conteúdo dos tubos foi desprezado sendo a leitura da radioatividade remanescente desta reação feita no Contador Automático de Radiação Gama (Packard®). Os resultados finais das contagens por minutos (cpm) foram expressos em ng/ml.

c) Curva padrão

Para obtenção de uma curva padrão de corticosterona, foram utilizados calibradores-padrão (50µl) com concentrações previamente conhecidas de corticosterona, quais sejam: 0-20-50-100-200-500-1.000-2.000 ng/ml, no ensaio realizado.

d) Soro controle

Foi utilizado um soro controle (50µl) com concentração de 200ng/ml de corticosterona no início, no meio e no final do ensaio.

Os seguintes parâmetros de validação foram registrados:

Sensibilidade do método: 92%-dose;

coeficiente de Variação Baixo: 11,43%;

coeficiente de Variação Alto: 10,56%;

limite de Detecção: 7,75ng/ml.

Todos os ensaios para dosagem de corticosterona foram realizados no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal (VRA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-FMVZ/USP.

4.8 METODOLOGIAS IMUNES

4.8.1 Obtenção e Manutenção de Células do Tumor de Ehrlich

Após eutanásia em câmara de CO₂, procedeu-se à colheita do fluido ascítico de um camundongo doador, portador de um Tumor ascítico de Ehrlich com 14 dias de evolução. A suspensão de células obtida deste animal foi centrifugada a 1000 rpm, por 5 minutos sendo ressuspensa por três vezes em PBS. Realizou-se, então, a contagem e avaliação de viabilidade das células tumorais assim obtidas usando-se para tal o azul de Tripán (1:200) e empregando-se uma câmara de Neubauer.

Foi padronizado para uso nos camundongos chamados “doentes” nos experimentos deste trabalho um total de $1,25 \times 10^7$ células tumorais por ml de PBS, com no mínimo 90% de viabilidade. Para a análise do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich ou para os experimentos que avaliaram parâmetros da resposta imune de animais portadores do tumor, 0,4 ml de uma suspensão de células tumorais foi inoculada no peritônio de cada camundongo ($5,0 \times 10^6$ células tumorais).

Para manutenção “in vivo” do tumor no laboratório, 0,1 ml de fluido ascítico de um camundongo doador era inoculado semanalmente em um camundongo receptor.

4.8.2 Avaliação do Crescimento do Tumor de Ehrlich

Para avaliação do crescimento do Tumor Ascítico de Ehrlich as camundongas foram sacrificadas após anestesia profunda em câmara de CO₂, ao final de 14 dias da inoculação do tumor. Desses animais foi coletado o líquido ascítico para mensuração do volume e do número de células tumorais presentes e, também, a concentração (células tumorais/ml de fluido ascítico) de acordo com o proposto por Dagli (1993). A figura 15 mostra este procedimento experimental.

Figura 15 - Esquema ilustrativo da formação dos grupos experimentais dos experimentos em que se avaliou o crescimento tumoral em camundongas CAD e CAS

4.8.3 Medida da Atividade Celular

a) Obtenção de neutrófilos sanguíneos

As células utilizadas para o estudo no citômetro de fluxo foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais em câmara de CO₂. O sangue foi coletado através da veia porta hepática das camundongas, com auxílio de seringas e agulhas previamente umedecidas em solução aquosa de etilenodiamino-tetracética-dissódica (EDTA) a 10%, sendo colocadas imediatamente em banho de gelo. Foram usadas amostras sanguíneas de 100 µl para a análise do *burst* oxidativo e da atividade fagocítica.

4.8.4 Avaliação do Burst Oxidativo e da Fagocitose de Neutrófilos por Citometria de Fluxo

O preparo das amostras foi realizado de acordo com (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989), da seguinte maneira:

Após o sacrifício dos animais em câmara de CO₂, o sangue foi coletado; uma bateria de 6 tubos foi, então, montada e numerada de “A” até “E” para cada animal, e como mostra a figura 5. Cada tubo (de acordo com a letra) recebeu uma substância diferente, obedecendo-se sempre a uma mesma ordem.

Desta forma, todos os tubos de “A” a “E” receberam alíquotas, que correspondem a 2×10^5 cel/100µl de sangue. Os tubos com as letras “B”, “D” e “E” receberam 200µl da solução de DCFH-DA 3 mM cada. Todos os tubos de letra “C” e “D” receberam 100µl da solução de SAPI (100ng). Os tubos de letra “E”, por sua vez, receberam 100µl de PMA (100ng).

Como as amostras deveriam ter o volume final de 1100 µl, todos os tubos foram completados com PBS 1x. Sendo assim, todos os tubos “A” receberam 1000 µl de PBS, os tubos “B” 800 µl, os “C” 900 µl e finalmente os tubos “D” e “E” receberam 700 µl.

Todas as soluções, reagentes e estímulos acima citados foram preparados conforme descrito no item 4.5.1.

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria sob agitação a 37°C por 30 minutos. Depois da incubação, foram adicionados 2 ml de EDTA 3 mM em todos os tubos para interromper a reação, sendo os mesmos centrifugados posteriormente a 1200 rpm por 10 minutos.

O sangue (para a análise de atividade de neutrófilos) desprezou-se o sobrenadante após a centrifugação; as células foram, então, ressuspensas por agitação manual, realizando-se a seguir a lise hipotônica das amostras com soluções de NaCl a 0,2% e 1,6%. Primeiramente, foi colocado em cada tubo 2 ml de NaCl 0,2% durante 20 segundos. Imediatamente após este período, colocou-se mais 2 ml de NaCl 1,6% para tornar a solução isotônica novamente. Após centrifugação foram realizadas novas lises hipotônica (uma segunda vez) com NaCl 0,2% e após, com NaCl 1,6%, seguindo-se todo o procedimento descrito acima. Após esta segunda lise, os tubos foram centrifugados pela última vez sendo os sobrenadantes desprezados; as células resultantes foram ressuspensas em 1 ml de EDTA gelado.

Após todo este procedimento, realizou-se a leitura das amostras no citômetro de fluxo; os tubos “A”, “C” e “D” foram utilizados para a avaliação da Fagocitose, enquanto que os tubos “B” e “E” foram utilizados na avaliação do *Burst* Oxidativo.

Cada amostra passou pelo citômetro apenas 1 vez, e de cada uma, foram adquiridos 10.000 eventos (células). A fluorescência foi obtida padronizando-se o número de eventos para cada tubo A, B, C, D e E. Os valores referentes ao *Burst* oxidativo das amostras foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de neutrófilos. Este valor de média geométrica foi fornecido pelo aparelho sendo utilizado para indicar a intensidade de fluorescência das células.

Com relação à atividade fagocítica, verificou-se a porcentagem de fagocitose, ou seja, o número de neutrófilos que fagocitaram o *S. aureus* marcado com PI e, conseqüentemente que emitam fluorescência verde, divididos pelo número total destas células multiplicadas por 100.

Foi avaliada, também, a intensidade de fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas) por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência vermelha emitida pelos neutrófilos de acordo com o respectivo experimento.

4.8.5 Avaliação de moléculas de superfície celular

Para avaliação das moléculas de superfície celular, o baço foi coletado e macerado em solução de RPMI (suplementado com HEPES 10 mM, NaHCO₃ 24 mM, 10 U/mL de penicilina 10 µg/mL de estreptomicina, 0,5 U/mL de anfotericina B enriquecido com 5 % de SFB estéril. As células foram diluídas em Azul de Tripán (diluição 1:10) e contadas em Câmara de Neubauer, sendo ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/tubo em um volume de 100µL.

Foram empregados os seguintes anticorpos monoclonais conjugados à fluoresceína ou ficoeritrina: anti-CD3 para detectar linfócitos; anti-CD4 para linfócitos CD4+, anti-CD8 para detectar linfócitos TCD8+ e anti-CD19 para detectar linfócitos B. As amostras foram incubadas no escuro, a temperatura ambiente, durante 1 hora com os diferentes anticorpos. Após este período, foram centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de PBS para avaliação no citômetro de fluxo (FACScan Becton Dycson®).

A análise foi realizada por meio do Cell Quest Pro®. As células que estavam marcadas duplamente pelo anti-CD3 e anti-CD4 foram consideradas como linfócitos T helper, as

marcadas pelo anti-CD8 como linfócitos T citotóxico e as marcadas pelo anti-CD19 como linfócitos B. Os resultados foram expressos em porcentagem de células, calculada através do número de linfócitos fluorescentes dividido pelo número total destas células x 100.

4.8.6 Avaliação da atividade citotóxica de células NATURAL KILLER (NK) por citometria de fluxo

a) Separação e obtenção dos linfócitos de sangue periférico

Os linfócitos foram obtidos do sangue periférico de animais que conviveram com o doente ou não, coletados da veia cava caudal por meio de seringas de 1 mL com 0,1 mL de heparina sódica (Liquemine® 25.000 UI/5ml). O sangue foi então diluído em PBS estéril numa proporção de 1:1. Para separação dos linfócitos sanguíneos foi utilizado o reagente Ficoll-Paque (Amersham Biosciences), que separa linfócitos por gradiente de concentração. O Ficoll (à temperatura ambiente) foi adicionado a tubos falcon e o sangue + PBS foi adicionado aos tubos com ficoll vagarosamente pela parede numa proporção de sangue + PBS para Ficoll de 2:1. Estes tubos foram centrifugados por 30 minutos, a 18° C, 2100 rpm, com “break lento” . A camada de linfócitos foi retirada vagarosamente e colocada em outro tubo falcon, sendo que cada grupo foi feito um pool de linfócitos. Esta células foram lavadas por 3 vezes em meio RPMI (suplementado com HEPES 10mM, NaHCO₃ 24mM, 10 U/ml de penicilina, 10µg/mL estreptomicina, 0,5 Ug/mL de anfotericina B) enriquecido com 10% SFB estéril, a 1200rpm, 8 minutos e então contadas em câmara de Neubauer para ajuste do número de células para $2,5 \times 10^6$ céls/mL.

b) Cultura e marcação de células alvo YAC-1

A linhagem YAC-1 é sensível à atividade citotóxica das células NK e foi utilizada como população alvo. Estas células foram descongeladas de 3 a 5 dias antes do ensaio e mantidas em cultura em meio RPMI (suplementado com HEPES 10 mM, NaHCO₃ 24mM, 10 U/ml de penicilina 10 U/ml de penicilina 10 µg/ml de estreptomicina, 0,5 Ug/ml de anfotericina B enriquecido com 10% SFB estéril em concentração de aproximadamente 1×10^6 células /mL.

No dia do ensaio, 1×10^6 células alvo em 1 mL de RPMI foram incubadas com 1 μ L de fluorocromo CFDA-SE (5mM), durante 20 minutos em estufa de cultura de células a 37° C e 5 % de CO₂. Após incubação, as células alvo foram centrifugadas e ressuspensas em RPMI 10 % SFB. Estas células foram então contadas em câmara de Neubauer para ajuste do número de células para a concentração de 5×10^4 céls/mL.

c) Atividade de células NK

Para a determinação da atividade citotóxica das células NK foi utilizado o método proposto por Marcusson-Stahl e Cederbrant (2003). Nesta técnica, foram utilizados 2 fluorocromos: o 5-(6)-*carboxy-fluorescein succinimidyl ester* (CFDA-SE), um corante fluorescente que se conjuga a enzimas citoplasmáticas (fluorescência verde) e o iodeto de propídeo que se intercala no DNA de células com membranas comprometidas (fluorescência vermelha). Dois tipos celulares são necessários para este ensaio: linfócitos e células YAC-1. Os linfócitos são considerados como células efetoras do ensaio e a linhagem celular YAC-1 é considerada como célula alvo.

Para a avaliação da porcentagem de células alvo mortas pela citotoxicidade de NK foram feitas avaliações em duas diferentes concentrações de células efetoras, na primeira tentativa foram incubadas $2,5 \times 10^5$ células efetoras para 5×10^3 células alvo marcadas com CFSE (proporção de E:A = 50:1), e na segunda tentativa para detectar a atividade citotóxica de NK foram incubadas 5×10^5 células efetoras para 5×10^3 células alvo marcadas com CFSE (proporção de E:A = 100:1), cada encubação ocorreu durante 20 horas em placa de poliestireno com 96 poços, a 37° C e 5% de CO₂. Para avaliação da porcentagem de mortalidade espontânea de células alvo, 100 μ L de célula alvo marcadas com CFSE foram incubadas pelas mesmas 20 horas. Para identificação das células inviáveis, foi adicionado a todas as amostras o 50 μ L do corante iodeto de propídeo (50 μ g/mL de PBS) 5 minutos antes da leitura em Citômetro de Fluxo (FACScan Becton Dycson). Desta forma, foi possível identificar uma subpopulação duplo positiva, fluorescente em verde e vermelho que foi considerada como a população de células YAC-1 inviáveis. O resultado foi expresso em porcentagem de citotoxicidade conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \frac{\text{MA-ME}}{100-\text{ME}} \times 100$$

Onde: MA = porcentagem de células alvo mortas na amostra

ME = porcentagem de células alvo mortas espontaneamente

4.8.7 Avaliação do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

Foi utilizada a metodologia previamente descrita em detalhes (SANGER et al., 2000). Para a realização do ensaio $1,0 \times 10^6$ células (fixadas em etanol 70%) foram lavadas em PBS e centrifugadas (2.000 rpm, durante 5 minutos), sendo este procedimento repetido por duas vezes. Estas células foram incubadas e permeabilizadas em 200µl de solução contendo Iodeto de Propídeo 20µg/ml, RNase A 200µg/ml, Triton 0,1% v/v diluídos em PBS à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após 30 minutos de incubação procedeu-se à leitura em Citômetro de Fluxo (FACScan Becton Dycson®), com velocidade máxima de leitura equivalente a 200 eventos/segundo. A análise foi realizada por meio software Flow Jo® (Versão 7.1 para windows, análise de Watson). Os dados foram expressos em porcentagem de células em fase G0-G1, S ou G2-M.

4.8.8 Avaliação da Celulariedade do Baço e Medula Óssea

A celulariedade do baço foi determinada, após o peso total do baço e corte da extremidade do órgão, previamente pesado. Procedeu-se então, a dissociação do fragmento em meio RPMI-1640, a cápsula foi rompida em uma de suas extremidades com o auxílio de duas agulhas dobradas em “L” e fixas em seringas, com auxílio de lâminas para microscopia Perfecta®, as células foram retiradas pelo método de dissociação mecânica.

Estas células foram mantidas em banho de gelo, dentro de placas especiais de plástico (Costar® número 3424). Em seguida, as células foram contadas, utilizando a técnica descrita por Raissuddin et al. (1990), a qual utiliza a câmara de Neubauer para a contagem total. Foi utilizado o teste de exclusão do azul de Tripiano 1%, sendo que apenas as amostras que apresentaram viabilidade maior que 95% foram utilizadas.

Para determinar o esplenograma, as amostras da suspensão total de células foram utilizadas para preparar lamina de citocentrifugado (Incibrás, Brasil), e em seguida coradas

pelo método de May-Grünwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). A contagem absoluta de células foi realizada após diluição das amostras da suspensão celular com líquido de Turk, e contagem em hemocitômetro de Neubauer.

Para determinar a celularidade da medula óssea, foi utilizado o fêmur esquerdo de cada animal. O conteúdo da medula óssea foi lavado com 5 mL de meio RPMI-1640 e a suspensão resultante foi acondicionada em tubos de polipropileno de 15 mL, e cuidadosamente homogeneizada com pipeta tipo Pasteur, e mantida em banho de gelo. Para determinação do número total de células e avaliação morfológica foram realizados os mesmos procedimentos descritos para o baço.

4.8.9 Avaliação do peso dos animais e dos órgãos

Os animais foram profundamente anestesiados em câmara de CO₂, para a coleta do baço.

Cada órgão foi coletado após os 14 dias de convivência com o animal portador do tumor de Ehrlich. Para avaliarmos o peso do baço utilizamos uma balança semi-analítica (Marte®). Cada órgão foi pesado individualmente, logo após a coleta que foi realizada no período matutino entre 8 e 10 horas.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo teste de Bartlett, que determinou serem os mesmos paramétricos ou não. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste “t” de student com correção de Welch ou pela ANOVA de uma via seguida do teste de Turkey-Kramer para avaliação dos contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste de “U” de Man Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de sua resolução própria. Foram considerados significantes todas as análises que revelaram nível de significância $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa GRAPHPAD INSTAT em sua versão 3.01.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Transcrevem-se abaixo o delineamento e os resultados obtidos no presente trabalho.

5.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO DO PESO RELATIVO DO BAÇO DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

Conforme descrito em 4.1.1 foram utilizados 16 pares de camundongos e mais um grupo colônia com 8 camundongos que foi adicionado como um novo grupo controle; os animais foram separados de acordo com o peso corporal em três grupos iguais: um grupo controle, um grupo experimental e um novo grupo Colônia. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. Os animais do grupo colônia não receberam qualquer injeção. No 14º dia foi determinado o peso dos baços dos animais dos grupos colônia e dos companheiros dos animais inoculados com PBS (CAS) e dos companheiros dos animais inoculados com tumor de Ehrlich (CAD) conforme descrito em 4.8.8

Resultados

A figura 16 ilustra os efeitos da convivência por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre o peso relativo do baço. A análise estatística dos dados obtidos mostrou a existência de diferenças significantes entre elas ($F_{(2/21)} = 5,87$; $p < 0,05$) em especial sobre o peso relativo do baço dos animais do grupo experimental. Mais especificamente, a convivência por 14 dias com portadores de um tumor diminuiu o peso relativo do baço. Não se observaram diferenças significantes entre os dados dos grupos controle (CAS) e colônia.

Figura 16 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o peso relativo do baço (mg/ g).

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica e **Colônia** = grupo de animais que não foram injetados.

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$ (ANOVA).

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo.

5.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA CELULARIEDADE TOTAL DO BAÇO DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 16 pares de camundongos, conforme descrito em 4.1.1. Os animais foram separados de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle, um grupo experimental. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. No 14º dia foi determinada a celulariedade dos baços dos animais CAS e CAD, conforme descrito no item 4.8.9.

Resultados

A figura 17 ilustra os efeitos da convivência por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre a celulariedade do baço. A análise estatística dos dados obtidos mostrou a existência de uma redução significativa ($p < 0,05$) do número de leucócitos nos animais do grupo experimental. Mais especificamente, a convivência por 14 dias com portadores de um tumor diminuiu a celulariedade do baço.

Figura 17 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a celulariedade do baço (mg/g)

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica. Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$ (teste "t" de Student).

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo.

5.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DO DIFERENCIAL DE CÉLULAS DO BAÇO DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 16 pares de camundongos, conforme descrito em 4.1.1 e mais um grupo com 8 camundongos que foi adicionado como um novo grupo controle; os animais foram separados de acordo com o peso corporal em três grupos iguais: um grupo controle, um grupo experimental e um novo grupo Colônia. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. Os animais do grupo colônia não receberam qualquer injeção. No 14º dia foi determinado diferencial de celularidade dos baços de um dos animais (Colônia), e dos companheiros dos animais inoculados com PBS (CAS) e dos animais inoculados com tumor de Ehrlich (CAD), conforme descrito no item 4.8.9.

Resultados

A tabela 1 mostra os efeitos da convivência por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre a contagem diferencial de células do baço. A análise estatística dos dados obtidos mostrou uma redução significativa nos animais do grupo experimental (CAD) em relação aos animais do grupo quanto colônia no número de blastos totais ($F_{(2/21)} = 4,24$; $p < 0,05$); já a contagem de eritrócitos jovens ($F_{(2/21)} = 3,28$; $p < 0,05$), e de linfócitos ($F_{(2/21)} = 4,12$; $p < 0,05$) estava reduzida de forma significativa nos animais do grupo experimental (CAD) em relação ao grupo controle (CAS) e Colônia.

No que diz respeito à avaliação da contagem relativa de células do baço não foram encontradas diferenças significantes entre os três grupos.

Tabela 1 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, na contagem absoluta, relativa de células do baço

ESPLENOGRAMA			
ABSOLUTO(mm³)	GRUPOS		
	CAS	CAD	COLÔNIA
Blastos totais	0,048 ^{1,2}	0,035 ²	0,069 ¹
Neutrófilos em Forma em Anel	0,007 ¹	0,003 ¹	0,005 ¹
Neutrófilos Segmentados	0,088 ¹	0,074 ¹	0,083 ¹
Forma Jovem de Neutrófilos	todos os valores são zero		
Eosinófilos	0,002 ¹	0,004 ¹	zero
Linfócitos	1,587 ¹	1,402 ²	1,610 ¹
Monócitos	todos os valores são zero		
Eritrócito jovem	0,030 ¹	0,019 ²	0,034 ¹
Eritrócito maduro	0,164 ¹	0,237 ¹	0,179 ¹
Plasmócitos	zero	0.003	zero
Basófilos	todos os valores são zero		
RELATIVO (%)			
Blastos totais	2,63 ¹	2,09 ¹	3,50 ¹
Neutrófilos em Forma em Anel	0,37 ¹	0,18 ¹	0,25 ¹
Neutrófilos Segmentados	4,75 ¹	4,55 ¹	4,25 ¹
Forma Jovem de Neutrófilos	todos os valores são zero		
Eosinófilos	0,12 ¹	0,27 ¹	zero
Linfócitos	81,37 ¹	79,44 ¹	82,00 ¹
Monócitos	todos os valores são zero		
Eritrócito jovem	2,50 ¹	1,11 ¹	1,50 ¹
Eritrócito maduro	8,75 ¹	11,77 ¹	9,25 ¹
Plasmócitos	zero	0,18	zero
Basófilos	todos os valores são zero		

CAS = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com o animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica; **Colônia** = grupo de animais que não foram injetados.

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$ (ANOVA).

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo.

5.4 EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE LINFOCITOS B E T (HELPER E CITOTOXICOS) EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 32 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle e um grupo experimental conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle (CAS) foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental (CAD) foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. No 14º dia o baço dos animais CAS e CAD foi coletado para avaliação da porcentagem de linfócitos como descrita no item 4.8.5

Resultados

A Tabela 2 mostra e as figuras 18,19, 20 e 21 ilustram os efeitos da convivência com o animal doente, sobre a porcentagem de linfócitos T *helper*, citotóxico e B. A análise estatística dos resultados mostrou uma redução significativa entre os dados obtidos dos animais CAD em relação aos CAS, no relativo á porcentagem de linfócito B, T *helper*, e na proporção de linfócito T *helper*/citotóxico, para ($p < 0,05$). Mais especificamente, a convivência por 14 dias com portadores de um tumor diminuiu a porcentagem de linfócitos B, T *helper* e a proporção de CD4/CD8.

Tabela 2 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, na porcentagem de linfócitos B e T (*helper* e citotóxico) e na proporção de linfócitos CD4/CD8 medidos por citometria de fluxo

GRUPOS	LINFÓCITO B (%)	LINFÓCITO T HELPER (%)	LINFÓCITO T CITOTOXICO (%)	CD4/CD8 (%)
Controle (CAS)	14,81 $\pm$ 2,60⁽¹⁾	26,22 $\pm$ 6,56⁽¹⁾	7,63 $\pm$ 1,06⁽¹⁾	3,44 $\pm$ 0,79⁽¹⁾
Experimental (CAD)	11,80 $\pm$ 1,38⁽²⁾	19,20 $\pm$ 5,40⁽²⁾	8,08 $\pm$ 1,01⁽¹⁾	2,56 $\pm$ 0,90⁽²⁾

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; CAD = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo; (2) $p < 0,05$, teste “t” de Student

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$ (teste *t* de Student)

Figura 18 - Efeitos da convivência com portadores de um tumor de Ehrlich sobre a porcentagem de linfócitos B em (A) e T *helper* em (B) medido por citometria de fluxo

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$.

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p < 0,05$ (teste "t" de Student)

Figura 19 - Efeitos da convivência com portadores de um tumor de Ehrlich sobre a porcentagem de linfócitos T citotóxico em (A) e a proporção de linfócitos CD4/CD8 em (B) medido por citometria de fluxo
CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica
 Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$
 Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, (teste "t" de Student)

A figura 20 ilustra um citograma de células obtidas do baço. Neste citograma os linfócitos foram identificados pela propriedade FSC e SSC (tamanho e complexidade celular, respectivamente) e analisados conforme mostra a região R1.

A figura 21 ilustra um *dot plot* com eixos de dupla fluorescência FL-1 e FL-2 em escala logarítmica. As células destes *dot plot* são da região R1 como ilustrado na figura 20 e foram marcadas com diferentes anticorpos.

Figura 20- Citograma de linfócitos esplênicos ilustrando a população R1 analisada e equivalente aos linfócitos.

Figura 21: Dot plot de linfócitos esplênicos, ilustrando quadrantes com células marcadas com diferentes anticorpos conjugados a FITC ou PE
 Dot plot = anticorpos CD3 FITC e CD4 PE
 Dot plot = anticorpos CD4 FITC e CD8 PE

5.5 EXPERIMENTO 5 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE CÉLULAS NK PROVENIENTES DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 32 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle e um grupo experimental conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p.

No 14º dia do experimento o baço dos animais CAS e CAD foi coletado; procedeu-se à incubação com células efectoras YAC-1 para avaliação da citotoxicidade de células NK, conforme metodologia descrita no item 4.8.6.

Resultados

A tabela 3 mostra e as figuras 22 e 23 ilustram os efeitos da convivência por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre a citotoxicidade de células NK na concentração de 50 e de 100 esplenócitos para uma célula tumoral.

A análise estatística mostrou que a proporção de 50 esplenócitos para uma célula tumoral não foi suficiente para evidenciar atividade citotóxica das células NK; no entanto, quando se aumentou a concentração para 100 esplenócitos por célula tumoral observamos a existência de diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os dados dos animais CAD e CAS no relativo à citotoxicidade de células NK. Especificamente, os animais do grupo CAD apresentaram maior porcentagem de citotoxicidade quando comparados aos do grupo CAS.

Tabela 3- Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a avaliação da citotoxicidade de células NK

GRUPOS ^(*)	CITOTOXICIDADE 50:1 (%)	CITOTOXICIDADE 100:1 (%)
CONTROLE (CAS)	17,76 ± 6,70 ⁽¹⁾	25,55 ± 9,34 ⁽¹⁾
EXPERIMENTAL (CAD)	19,36 ± 4,40 ⁽¹⁾	45,07 ± 15,34 ⁽²⁾

CAS = animais que conviveram com o animais injetados com PBS;

CAD = animais que conviveram com o animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, $n = 8$ animais, teste “t” de Student.

Os dados representam a média ± desvio padrão

Figura 22 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich sobre a citotoxicidade de células NK (50:1)

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Números iguais representam ausência de diferença estatística $p > 0,05$.

Os dados representam a média ± desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste “t” de Student).

Figura 23 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a citotoxicidade de células NK (100:1)

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$,

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p < 0,05$ (teste "t" de Student).

A figura 24 ilustra um *dot plot* de dupla fluorescência FL-1 e FL-3 em escala logaritmica dos linfócitos e células YAC-1. Neste gráfico é possível observar a região correspondente às células YAC-1 que foram marcadas com fluorocromo CFDA-SE e são analisadas em leitor FL-1.

A figura 25 mostra um histograma de fluorescência FL-3 em escala logaritmica da região correspondente às células YAC-1 que foram marcadas com fluorocromo CFDA-SE como ilustrado na figura 23. M1 indica a fluorescência correspondente à morte celular das células YAC-1 que incorporaram o Iodeto de Propídeo.

Figura 24 - Dot Plot de dupla fluorescência com linfócitos e células YAC-1, ilustrando a região correspondente às células YAC-1 que foram marcadas com o fluorocromo CFDA-SE

Figura 25 - Histograma de fluorescência FL-3 em escala logarítmica da região R1 (ilustrada na figura 23). M1 indica fluorescência correspondente à morte celular das células YAC-1 que incorporam o Iodeto de Propídeo

5.6 EXPERIMENTO 6 - AVALIAÇÃO DA CELULARIEDADE DA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 16 pares de camundongos, conforme descrito em 4.1.1. Os animais foram separados de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle e um grupo experimental. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. No 14º dia foi determinada a celulariedade dos baços dos animais CAS e CAD, conforme descrito no item 4.8.9.

Resultados

A figura 26 ilustra os efeitos da convivência por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre a celulariedade da medula óssea. A análise estatística dos dados obtidos mostrou a existência de um aumento significativo ($p < 0,05$) do número de células no grupo CAD em relação à CAS. Mais especificamente, a convivência por 14 dias com portadores de um tumor aumentou a celulariedade da medula óssea.

Figura 26 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a celulariedade da medula ($10^7/\text{cel}$)

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica. Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$.

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p < 0,05$ (teste "t" de Student).

5.7 EXPERIMENTO 7 - AVALIAÇÃO DO DIFERENCIAL DE CÉLULAS DA MEDULA DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 16 pares de camundongos e mais um grupo colônia com 8 camundongos que foi adicionado como um novo grupo controle; os animais foram separados de acordo com o peso corporal em três grupos iguais: um grupo controle, um grupo experimental e um grupo colônia. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. Os animais do grupo colônia não receberam qualquer injeção. No 14º dia foi determinado diferencial de celularidade da medula dos animais CAS, CAD e Colônia, conforme descrito no item 4.8.9.

Resultados

A tabela 4 mostra os efeitos da convivência por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre o diferencial de células da medula óssea. A análise estatística dos dados relativos à contagem absoluta mostrou existência de aumento significativo ($KW_{(2/21)} = 6,87$; $p < 0,05$) na população de blastos totais; e uma redução significativa ($KW_{(2/21)} = 6,24$; $p < 0,05$) na população de eritrócitos jovens do grupo CAD em relação ao grupo CAS; a população de linfócitos apresentou uma redução significativa ($F_{(2/21)} = 9,40$; $p < 0,05$) no grupo CAD em relação ao grupo CAS e Colônia. Observamos, também, redução significativa ($F_{(2/21)} = 8,27$; $p < 0,05$) de neutrófilos em formas em anel, tanto no grupo CAS como do grupo CAD em relação ao grupo colônia.

Na contagem relativa observamos novamente, um aumento significativo dos blastos totais ($F_{(2/21)} = 7,36$; $p < 0,05$) dos animais do grupo CAD em relação aos do grupo CAS. Do mesmo modo verificamos que os mega acidófilos estão diminuídos no grupo CAD em relação ao grupo Colônia.

Tabela 4 – Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a contagem absoluta, relativa das células da medula

MIELOGRAMA			
	GRUPOS		
ABSOLUTO	CAS	CAD	Colônia
Blastos totais	0,033 ¹	0,061 ²	0,053 ^{1,2}
Neutrófilos em Formas em Anel	0,068 ¹	0,081 ¹	0,104 ²
Neutrófilo Segmentado	0,706 ¹	0,610 ¹	0,637 ¹
Forma Jovem de Neutrófilos	0,043 ¹	0,053 ¹	0,044 ¹
Eosinófilos	0,042 ¹	0,050 ¹	0,032 ¹
Eritrócito jovem	0,083 ¹	0,0358 ²	0,070 ^{1,2}
Eritrócito maduro	0,182 ¹	0,177 ¹	0,215 ¹
Linfócito	0,492 ¹	0,297 ²	0,519 ¹
RELATIVO (%)			
Blastos totais	2,12 ¹	4,25 ²	3,25 ^{1,2}
Neutrófilos em Formas em Anel	4,37 ¹	5,54 ¹	8,25 ¹
Neutrófilos Segmentado	44,37 ¹	43,60 ¹	36,00 ¹
Forma Jovem de Neutrófilos	2,75 ¹	3,33 ¹	2,75 ¹
Eosinófilos	2,40 ¹	3,50 ¹	2,00 ¹
Eritrócito jovem	5,25 ¹	2,90 ¹	3,50 ¹
Eritrócito maduro	11,50 ¹	11,11 ¹	13,25 ¹
Linfócito	26,87 ¹	26,55 ¹	31,75 ¹
Mega Acidófilo	4,57 ^{1,2}	3,11 ²	5,75 ¹
Mega Basófilo	1,33 ¹	1,71 ¹	1,33 ¹

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com o animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica; **Colônia** = grupo de animais que não foram injetados

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$.

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo. ANOVA para dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.

5.8 EXPERIMENTO 8 – AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR NA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 32 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle e um grupo experimental conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p.

No 14º dia do experimento foram coletadas células da medula dos animais CAS e CAD. O ciclo celular destas células foi avaliado como descrito no item 4.8.7

Resultados

A tabela 5 mostra e as figuras 27 e 28 ilustram os efeitos da convivência por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre o ciclo celular da medula óssea.

Em relação à porcentagem de células na fase G0-G1, a análise estatística mostrou a existência de diferenças significantes ($p < 0,05$) do grupo CAD em relação ao grupo CAS. Especificamente, o grupo experimental CAD apresentou uma maior porcentagem de células em fase G0-G1 quando comparado com o grupo controle CAS.

Em relação à porcentagem de células na fase S, a análise estatística não mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

Quanto à porcentagem de células na fase G2-M, a análise estatística mostrou a existência de diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos CAD e CAS. Especificamente, no grupo CAD observou-se menor porcentagem de células em fase G2-M em relação a CAS.

Tabela 5 - Efeitos da convivência por 14 dias com um animal portador de um tumor de Ehrlich, sobre o ciclo celular da medula em fase G0-G1, S e G2-M quando comparado ao grupo controle

GRUPOS ^(*)	Fase G0-G1 (%)	Fase S (%)	Fase G2-M (%)
CAS	70,59 ± 2,36 ⁽¹⁾	20,66 ± 1,68 ⁽¹⁾	3,46 ± 0,31 ⁽¹⁾
CAD	73,97 ± 3,85 ⁽²⁾	21,04 ± 2,45 ⁽¹⁾	3,09 ± 0,36 ⁽²⁾

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS e posteriormente foram inoculados com o tumor de Ehrlich; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica e posteriormente foram inoculados com o mesmo tumor .

* os dados representam a média ± desvio padrão

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, $n = 8$ animais, teste “t” de Student.

Figura 27 – Efeitos da convivência por 14 dias com um animal portador de um tumor de Ehrlich, foram feitas avaliações da porcentagem de células da fase G0-G1 das células da medula. Os dados representam a média ± desvio padrão, (2) $p < 0,05$ (teste “t” de Student). Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Figura 28 – Efeitos da convivência por 14 dias com um animal portador de um tumor de Ehrlich, foram feitas avaliações da porcentagem de células da fase S em (A) e G2-M em (B) das células da medula. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, (2) $p < 0,05$ (teste “t” de Student). Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica

5.9 EXPERIMENTO 9 – AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DE UM TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH INJETADO EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO MESMO TUMOR

Foram utilizados 32 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle e um grupo experimental conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p.

No 14º dia do experimento os animais CAD e CAS foram inoculados i.p. com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal); 14 dias após, as células do tumor ascítico de Ehrlich dos animais CAD e CAS foram coletadas para avaliação do ciclo celular como descrito no item 4.8.7.

Resultados

A figura 29 ilustra um citograma em (A) de células do tumor ascítico de Ehrlich. Neste citograma as células tumorais foram identificadas pelas propriedades FL2-A e FL2-W conforme mostra a região R1. A figura 29 ilustra um histograma em (B) de fluorescência FL-2 em escala linear. As células deste histograma são da região R1 como ilustra a figura 29A e foram incubadas com solução de Iodeto de Propídeo para avaliação do ciclo celular. As diferentes regiões analisadas neste histograma indicam o conteúdo de DNA e são delimitadas com base na intensidade de fluorescência das células.

Figura 29 - Gráficos utilizados na análise do ciclo celular. (A) Citograma de células do tumor ascítico de Ehrlich ilustrando a população R1 analisada e equivalente às células tumorais e (B) Histograma do ciclo celular do tumor ascítico de Ehrlich ilustrando as três regiões analisadas: células em fase G0-G1 (pico verde), células em fase S (pico amarelo) e G2-M (pico azul).

A tabela 6 mostra e as figuras 30 e 31 ilustram os efeitos da convivência por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre o ciclo celular das células do tumor de Ehrlich.

Em relação à porcentagem de células na fase G0-G1, a análise estatística mostrou a existência de diferenças significantes ($p < 0,05$) entre ao grupo CAD e CAS. Especificamente, o grupo CAD apresentou maior porcentagem de células em fase G0-G1 em relação ao grupo CAS.

No relativo à porcentagem de células na fase S, a análise estatística não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) entre ao grupo CAD quando comparado com o grupo controle CAS.

Quanto à porcentagem de células na fase G2-M, a análise estatística mostrou a existência de diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos CAD e CAS. Especificamente, o grupo CAD apresentou uma menor porcentagem de células em fase G2-M em relação ao grupo CAS.

Tabela 6 - Efeitos da convivência por 14 dias com um animal portador de um tumor de Ehrlich, sobre o desenvolvimento do mesmo tumor verificando-se a porcentagem de células em fase G0-G1, S e G2-M

GRUPOS ^(*)	Fase G0-G1 (%)	Fase S (%)	Fase G2-M (%)
CAS	48,12 ± 5,78 ⁽¹⁾	33,90 ± 6,38 ⁽¹⁾	16,67 ± 4,15 ⁽¹⁾
CAD	54,95 ± 9,31 ⁽²⁾	32,41 ± 11,53 ⁽¹⁾	11,72 ± 4,97 ⁽²⁾

CAS = animais que conviveram com o animais injetados com PBS e posteriormente foram inoculados com o tumor de Ehrlich; **CAD** = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica e posteriormente foram inoculados com 5×10^6 células do mesmo tumor .

* os dados representam a média ± desvio padrão

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, N = 8 animais, teste “t” de Student.

Figura 30 – Efeitos da convivência por 14 dias com um animal portador de um tumor de Ehrlich, sobre a porcentagem de células da fase G0-G1 deste tumor. Os dados representam a média ± desvio padrão, (2) $p < 0,05$ (teste “t” de Student). Números diferentes representam diferença estatística

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS e que foram posteriormente inoculados com o tumor de Ehrlich; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica e que foram posteriormente inoculados com o mesmo tumor.

Figura 31 – Efeitos da convivência por 14 dias com um animal portador de um tumor de Ehrlich, sobre a porcentagem de células da fase S em (A) e G2-M em (B) deste tumor. Números diferentes representam diferença estatística. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão, (2) $p < 0,05$ (teste “t” de Student).

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS e que foram posteriormente inoculados com o tumor de Ehrlich; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica e que foram posteriormente inoculados com o mesmo tumor.

5.10 EXPERIMENTO 10 – DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 8 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 32 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle e um grupo experimental conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p.

No 8º dia, as amostras de sangue dos animais CAD e CAS foram coletadas para a determinação dos níveis séricos de corticosterona conforme descrito no item 4.7.3

Resultados

A figura 32 ilustra os efeitos da convivência com camundongos portadores do tumor de Ehrlich, durante 8 dias sobre os níveis séricos de corticosterona. Não se verificaram diferenças significante ($p > 0,05$) nos níveis séricos deste hormônio entre os animais dos 2 grupos.

Figura 32 - Efeitos da convivência por 8 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Números iguais representam ausência de diferença estatística

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste U de Mann-Whitney)

5.11 EXPERIMENTO 11 – DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH SEGUIDO OU NÃO POR DESAFIO ATRAVÉS DE CONTENÇÃO EM TUBOS DE PVC

Foram utilizados 64 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em quatro grupos iguais: dois grupos controles (CAS1 e CAS2) e dois grupos experimentais (CAD1 e CAD2) conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p.

No 14º dia os animais companheiros dos grupos CAS2 e CAD2 foram contidos por duas horas em tubos de PVC; os animais companheiros dos grupos CAS1 e CAD1 não foram manipulados. Em seguida, foram coletadas amostras de sangue dos animais dos 4 grupos para a determinação dos níveis séricos de corticosterona, conforme descrito no item 4.7.3

Resultados

A figura 33 ilustra os efeitos da convivência com camundongos portadores do tumor de Ehrlich, durante 14 dias sobre os níveis séricos de corticosterona de animais que não passaram (CAS₁ e CAD₁) ou que passaram por um desafio por contenção de duas horas em tubos de PVC (CAS₂ e CAD₂). Não se verificaram alterações significantes ($KW_{3/28} = 26,04$; $p > 0,05$) nos níveis séricos deste hormônio entre os animais dos 4 grupos.

Figura 33 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, desafiados ou não por contenção, sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos

CAS₁ = animais que conviveram com os animais injetados com PBS sem contenção.

CAD₁ = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica sem contenção.

CAS₂ = animais que conviveram com os animais injetados com PBS com contenção de 2 horas.

CAD₂ = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica com contenção de 2 horas.

Números iguais representam ausência de diferença estatística $p > 0,05$.

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis).

5.12 EXPERIMENTO 12 – EFEITOS DA CONVIVENCIA OU NÃO POR 13 OU 14 DIAS COM PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH SOBRE A PREFERÊNCIA POR 1 LADO DO LABIRINTO ELEVADO EM T, SENDO: UM LADO COM O COMPANHEIRO, E O OUTRO LADO COM UM ANIMAL ESTRANHO E SADIO

Foram utilizados 32 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle e um grupo experimental conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p.

No 13º e no 14º dia os animais CAD e CAS foram colocados, individualmente, na zona de partida de um labirinto em T para análise da preferência por um dos lados do aparelho como descrito no item 4.6.4, por 5 minutos no primeiro dia e por 10 minutos no segundo dia (24 horas após).

Resultados

A tabela 7 mostra os efeitos da convivência com camundongos portadores do tumor de Ehrlich, durante 13 dias sobre o tempo percorrido nas diferentes zonas do labirinto em T durante 5 minutos. Como pode ser observado, não foram encontradas diferenças no tempo de permanência dos animais CAS nas zonas animal companheiro e o animal estranho, mostrando ausência de preferências.

Ao analisar os dados do grupo experimental CAD, observamos redução significativa ($p < 0,05$) no tempo de permanência na zona em que se encontrava o companheiro doente em relação à zona em que estava o animal estranho. Houve, portanto nítida preferência pela zona animal sadio e estranho.

Tabela 7 - Efeitos da convivência por 13 dias com portadores de um tumor de Ehrlich sobre o tempo gasto em zonas do labirinto em T: avaliação de escolha entre companheiro e estranho

GRUPOS	TEMPO NA ZONA DURANTE 5 MINUTOS (S)	
	CAS	CAD
ZONA ANIMAL COMPANHEIRO	66,90± 7,93 ⁽¹⁾	59,44± 6,04 ⁽²⁾
ZONA ANIMAL ESTRANHO	67,18± 8,68 ⁽¹⁾	70,72± 9,05 ⁽¹⁾

CAS = animais que conviveram com os outros tratados com PBS.

CAD = animais que conviveram com os outros inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

Os dados representam as médias ± desvio padrão em segundos (s)

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, N = 8 animais, teste “t” de Student

A tabela 8 mostra os efeitos da convivência com camundongos portadores do tumor de Ehrlich, durante 14 dias sobre o tempo gasto nas diferentes zonas do labirinto em T durante 10 minutos.

Ao analisar o grupo experimental CAD observamos uma redução significativa ($p < 0,05$) no tempo de permanência na zona em que se encontrava o companheiro doente quando comparado com o tempo gasto na zona em que estava um animal sadio. Não foram encontradas diferenças de preferência nos animais do grupo CAS.

Tabela 8 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich sobre o tempo gasto em zonas do labirinto em T: avaliação de escolha entre companheiro e estranho

GRUPOS	TEMPO NA ZONA DURANTE 10 MINUTOS (S)	
	CAS	CAD
ZONA ANIMAL COMPANHEIRO	113,60 ± 20,43 ⁽¹⁾	122,66± 19,06 ⁽²⁾
ZONA ANIMAL ESTRANHO	137,90 ± 24,42 ⁽¹⁾	149,88 ± 33,99 ⁽¹⁾

CAS = animais que conviveram com os outros tratados com PBS.

CAD = animais que conviveram com os outros inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

Os dados representam as médias ± desvio padrão em segundos (s)

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, N = 8 animais, teste “t” de Student

A tabela 9 mostra os efeitos da convivência com camundongos portadores do tumor de Ehrlich, sobre a frequência de entradas nas diferentes zonas do labirinto em T durante 5 minutos.

Não foram encontradas diferenças, neste parâmetro (número de visitas às zonas animal companheiro *versus* animal estranho) entre animais CAD e CAS.

Tabela 9 - Efeitos da convivência por 13 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a frequência de entrada em zonas do labirinto em T: avaliação de escolha entre companheiro e estranho

GRUPOS	FREQÜÊNCIA DE ENTRADA NA ZONA DURANTE 5 MINUTOS	
	CAS	CAD
ZONA ANIMAL COMPANHEIRO	12,72± 2,10 ⁽¹⁾	10,36± 1,56 ⁽¹⁾
ZONA ANIMAL ESTRANHO	11,18± 2,52 ⁽¹⁾	12,90± 2,66 ⁽¹⁾

CAS = animais que conviveram com os outros tratados com PBS.

CAD = animais que conviveram com os outros inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

Os dados representam as médias ± desvio padrão em frequência de entradas

Números iguais representam ausência de diferença estatística $p > 0,05$, N = 8 animais, teste “t” de Student

A tabela 10 mostra os efeitos da convivência com camundongos portadores do tumor de Ehrlich, durante 14 dias sobre a frequência de entradas nas diferentes zonas do labirinto em T durante 10 minutos.

Não foram encontradas diferenças do número de visitas às zonas do labirinto entre animais CAD e CAS.

Tabela 10 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a frequência de entrada em zonas do labirinto em T: avaliação de escolha entre companheiro e estranho

GRUPOS	FREQUÊNCIA DE ENTRADA NA ZONA DURANTE 10 MINUTOS	
	CAS	CAD
ZONA ANIMAL COMPANHEIRO	19,80 ± 3,15 ⁽¹⁾	15,72 ± 4,73 ⁽¹⁾
ZONA ANIMAL ESTRANHO	21,60 ± 6,60 ⁽¹⁾	23,18 ± 6,91 ⁽¹⁾

CAS = animais que conviveram com os outros tratados com PBS.

CAD = animais que conviveram com os outros inoculados com 5 x 10⁶ células do tumor de Ehrlich

Os dados representam as médias ± desvio padrão em frequência de entradas

Números iguais representam ausência de diferença estatística p>0,05., N = 8 animais, teste “t” de Student

A tabela 11 mostra os efeitos da convivência ou não com portadores de um tumor de Ehrlich por 13 e 14 dias, sobre a locomoção dos animais nas zonas do labirinto em T. No 13º dia, quando observamos os animais por 5 minutos, verificamos que os animais do grupo CAD tiveram locomoção total na arena menor (p<0,05) que aquela do grupo CAS. Neste sentido observou-se, idêntico fato aos 10 minutos quanto à locomoção total na arena e na zona animal estranho (p<0,05).

Tabela 11 – Efeitos da convivência por 13 e 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a locomoção na arena e em cada uma das zonas de um labirinto em T

LOCOMOÇÃO (cm)	Teste em T para Sociabilidade			
	1º dia por 5 minutos		2º dia por 10 minutos	
	CAS	CAD	CAS	CAD
TOTAL	1313,2 ± 133,3 ⁽¹⁾	1162,4 ± 118,6 ⁽²⁾	2368,43 ± 274,2 ⁽¹⁾	2041,7 ± 339,92 ⁽²⁾
ZONA ANIMAL COMPANHEIRO	256,58 ± 34,80 ⁽¹⁾	234,36 ± 24,73 ⁽¹⁾	405,35 ± 39,68 ⁽¹⁾	356,95 ± 74,97 ⁽¹⁾
ZONA ANIMAL ESTRANHO	242,77 ± 37,05 ⁽¹⁾	229,52 ± 36,27 ⁽¹⁾	480,26 ± 104,7 ⁽¹⁾	366,62 ± 78,54 ⁽²⁾

CAS = animais que conviveram com os outros tratados com PBS.

CAD = animais que conviveram com os outros inoculados com 5 x 10⁶ células do tumor de Ehrlich

Os dados representam as médias ± desvio padrão em cm

Números diferentes representam diferença estatística p<0,05, N = 8 animais, teste “t” de Student para dados paramétricos e teste “U” de Mann-Whitney para dados não paramétricos.

A tabela 12 mostra os efeitos da convivência por 13 e 14 dias com outros portadores de um tumor de Ehrlich sobre a velocidade média na arena e em cada zona, do labirinto em T. No 13º dia, quando observamos os animais por 5 minutos, verificamos que os animais do grupo CAD tiveram velocidade média na arena menor que aquela do grupo CAS.

Neste sentido observou-se, idêntico fato aos 10 minutos quanto à velocidade média na arena ($p < 0,05$); encontramos uma redução significativa da velocidade média desenvolvida pelos animais do grupo CAD nas zonas em que estavam tanto o animal companheiro doente como o animal estranho.

Tabela 12 – Efeitos da convivência por 13 e 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a velocidade média na arena e em cada uma das zonas de um labirinto em T

VELOCIDADE	Teste em T para Sociabilidade			
MÉDIA	1º dia por 5 minutos		2 dia por 10 minutos	
(cm/s)	CAS	CAD	CAS	CAD
ARENA	$4,39 \pm 0,44^{(1)}$	$3,90 \pm 0,41^{(2)}$	$4,08 \pm 0,36^{(1)}$	$3,35 \pm 0,75^{(2)}$
ZONA ANIMAL COMPANHEIRO	$3,94 \pm 0,81^{(1)}$	$3,55 \pm 0,55^{(1)}$	$3,54 \pm 0,41^{(1)}$	$2,84 \pm 0,30^{(2)}$
ZONA ANIMAL ESTRANHO	$3,62 \pm 0,61^{(1)}$	$3,45 \pm 0,30^{(1)}$	$3,27 \pm 0,43^{(1)}$	$2,77 \pm 0,54^{(2)}$

Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão em cm/s

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, N = 8 animais, teste “t” de Student para dados paramétricos e teste “U” de Mann-Whitney para dados não paramétricos.

CAS = animais que conviveram com os outros tratados com PBS.

CAD = animais que conviveram com os outros inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

5.13. EXPERIMENTO 13: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO SOCIAL DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 16 pares de camundongos conforme descrito em 4.1.1 e mais um grupo extra com 8 pares de camundongos estranhos, que serviram como objeto de exploração dos animais dos grupos controle e experimental. Os animais foram separados de acordo com o peso corporal em três grupos iguais: um grupo controle, um grupo experimental e um grupo para o pareamento (Branco). No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. Nos 14º e 15º dias determinou-se a interação social dos animais CAS e CAD em relação aos animais estranhos (grupo branco) conforme descrito em 4.6.5.

Resultados

A tabela 13 mostra e as figuras 34 e 35 ilustram os efeitos da convivência por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre os níveis de interação social. A análise estatística dos dados obtidos mostrou a existência de diferenças significantes entre os grupos CAS e CAD ($p < 0,05$), em especial sobre o farejar, o perseguir e o passar sobre ou sob. Mais especificamente, em relação ao grupo CAS, a convivência por 14 dias com portadores de um tumor ascítico de Ehrlich aumentou a interação social dos animais CAD com o animal estranho.

Tabela 13 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a interação social

GRUPOS	FAREJAR (s)	PERSEGUIR (s)	PASSAR SOBRE OU SOB (frequência)
Controle (CAS)	43,00 ± 16,98 ⁽¹⁾	41,50 ± 20,75 ⁽¹⁾	1,37 ± 0,74 ⁽¹⁾
Experimental (CAD)	145,33 ± 61,37 ⁽²⁾	100,00 ± 28,24 ⁽²⁾	2,75 ± 1,98 ⁽²⁾

Os dados representam as médias ± desvio padrão

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, $N = 8$ animais, teste t de Student para dados paramétricos e teste “U” de Mann-Whitney para dados não paramétricos

CAS = animais que conviveram com os outros tratados com PBS

CAD = animais que conviveram com os outros inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

Figura 34 - Efeitos da convivência com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o tempo de farejar

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica. Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$. Os dados representam a média ± desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste “U” de Mann-Whitney).

Figura 35 - Efeitos da convivência com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o tempo de perseguir em segundos em (A) e a frequência de passar sobre ou sob o outro animal em (B)

CAS = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica. Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p < 0,05$. Em (A) teste “t” de Student e em (B) teste “U” de Mann-Whitney.

Como mostra a tabela 14, idênticos achados foram obtidos após 15 dias de convivência com o portador do tumor de Ehrlich, isto é, no segundo dia de análises de interação social.

Tabela 14 - Efeitos da convivência por 15 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sendo realizada a interação social

GRUPOS	FAREJAR (s)	PERSEGUIR (s)	PASSAR SOBRE OU SOB (frequência)
Controle (CAS)	18,85 ± 12,37 ⁽¹⁾	19,28 ± 14,88 ⁽¹⁾	1,20 ± 0,44 ⁽¹⁾
Experimental (CAD)	103,80 ± 36,40 ⁽²⁾	52,00 ± 12,09 ⁽²⁾	1,66 ± 0,51 ⁽¹⁾

CAS = animais que conviveram com os outros tratados com PBS

CAD = animais que conviveram com os outros inoculados com o tumor de Ehrlich

Os dados representam as médias ± desvio padrão

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, N = 8 animais, teste *t* de Student

5.14 EXPERIMENTO 14 – AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO, DO *BURST* OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS DE ANIMAIS MANTIDOS EM DIFERENTES TIPOS DE GRUPOS E QUE CONVIVERAM OU NÃO POR 14 DIAS COM PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 64 camundongos os quais foram separados em um grupo de 8 pares, e dois grupos em trios de 8 animais de acordo com o peso corporal. Em um grupo de animais manteve-se a divisão tradicional de par, um animal inoculado com tumor e outro não (CAD1); o primeiro trio foi formado por dois animais não inoculados (um deles, chamado CAD2) e um animal inoculado com tumor de Ehrlich; o segundo foi formado por dois animais inoculados com tumor de Ehrlich e um animal não inoculado (CAD3) A inoculação das células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) foi feita no dia (0) conforme descrito no item 4.1.1. No 14º dia, um camundongo companheiro e não inoculado de cada par ou trio (CAD1, CAD2 e CAD3) foi utilizado para as análises. O sangue dos animais foi, então, colhido para a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos por citometria de fluxo conforme descrito em 4.8.4

Resultados

A tabela 15 mostra e as figuras 36 e 37 ilustram o fato de que a convivência de um camundongo (CAD3) com dois outros doentes por 14 dias diminuiu o *burst* oxidativo dos neutrófilos tanto no que diz respeito ao *burst* oxidativo espontâneo ($KW_{(2/21)} = 24,00$; $p < 0,05$), quanto como ao *burst* induzido pelo PMA e pela *S.aureus* ($KW_{(2/21)} = 17,12$ $p < 0,05$) e ($KW_{(2/21)} = 13,38$; $p < 0,05$ respectivamente) quando comparado com os animais dos outros dois grupos (CAD1 e CAD2). Observamos, também que não se encontraram diferenças significantes (dados $p > 0,05$) entre os animais dos grupos CAD1 e CAD2 para quaisquer parâmetros analisados.

Tabela 15 - Efeitos da convivência com o animal portador de um tumor de Ehrlich e mantidos em diferentes tipos de grupos, sobre o burst oxidativo e fagocitose de neutrófilos

CONDIÇÃO	CAD1	CAD2	CAD3
DCFH	37,41 ± 2,23 ¹	39,73 ± 8,17 ¹	20,68 ± 5,17 ²
PMA	105,87 ± 32,10 ¹	110,14 ± 17,81 ¹	71,12 ± 8,84 ²
Burst induzido pela <i>S.aureus</i>	152,29 ± 33,09 ¹	171,06 ± 67,58 ¹	77,05 ± 10,22 ²
% de fagocitose	71,01 ± 8,58 ^{1,2}	76,33 ± 9,35 ¹	63,87 ± 14,88 ²
Intensidade de fagocitose	30,03 ± 7,23 ¹	35,76 ± 8,25 ¹	23,80 ± 3,90 ²

CAD1 = grupo separado em pares que conviveram com os animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

CAD2 = grupo separado em trios em que conviveram dois animais sadios com um animal inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

CAD3 = grupo separado em trios em que conviveram um animal sadio com dois animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

Números diferentes representam diferença estatística Os valores representam a intensidade média de fluorescência (média ± desvio padrão); N = 8 animais por grupo. ANOVA para dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos

Os dados representam a média ± desvio padrão de 8 animais por grupo, (2) = $p < 0,05$ (ANOVA).

Figura 36 - Efeitos da convivência por 14 dias com o animal portador de um tumor de Ehrlich, mantido em diferentes tipos de grupo, sobre o *burst oxidativo* basal de neutrófilos em (A)

CAD1 = grupo separado em pares em que conviveram um animal sadio e outro inoculado com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

CAD2 = grupo separado em trios em que conviveram dois animais sadios e um animal inoculado com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

CAD3 = grupo separado em trios em que conviveram um animal sadio e dois animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

Números diferentes representam diferença estatística Os dados representam a média ± desvio padrão de 8 animais por grupo, $p < 0,05$ (ANOVA).

Figura 37 - Efeitos da convivência por 14 dias com o animal portador de um tumor de Ehrlich, mantido em diferentes tipos de grupo, sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos induzido por PMA em (A) e por *S. aureus* em (B)

CAD1 = grupo separado em pares em que conviveram um animal sadio e outro inoculado com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

CAD2 = grupo separado em trios em que conviveram dois animais sadios e um animal inoculado com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

CAD3 = grupo separado em trios em que conviveram um animal sadio e dois animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

Números diferentes representam diferença estatística. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p < 0,05$ (ANOVA).

Observou-se ainda, que a convivência de um camundongo (CAD3) com dois outros doentes por 14 dias reduziu significativamente ($F_{(2/21)} = 4,28$; $p < 0,05$) a porcentagem de fagocitose de *S. aureus* conjugada com PI em relação ao grupo em que a convivência era de dois sadios com doente (CAD2). Verificamos que os animais do grupo em que conviveram dois sadios e um doente, ou seja os animais do grupo CAD2 não apresentaram diferença

significante em relação ao grupo CAD1. Observou-se, também, uma diminuição significativa ($F_{(2/21)} = 10,55$; $p < 0,05$) na intensidade de fagocitose nos animais do grupo que conviveu com dois doentes (CAD3) em relação aos animais dos outros dois grupos (CAD1 e CAD2). Diferenças não foram encontradas para a porcentagem de fagocitose entre CAD1 e CAD2. Houve, no entanto uma tendência de aumento no grupo CAD2, ao menos no que diz respeito a intensidade de fagocitose. A figura 38 ilustra os resultados deste experimento.

Figura 38 - Efeitos da convivência por 14 dias com o animal portador de um tumor de Ehrlich e mantido, em diferentes tipos de grupo, sobre a porcentagem em (A) e a intensidade em (B) de fagocitose de neutrófilos induzido por *S. aureus*

CAD1 = grupo separado em pares em que conviveram um animal sadio e outro inoculado com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

CAD2 = grupo separado em trios em que conviveram dois animais sadios e um animal inoculado com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

CAD3 = grupo separado em trios em que conviveram um animal sadio e dois animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich

Números diferentes representam diferença estatística. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p < 0,05$ (ANOVA).

5.15. EXPERIMENTO 15: A RELEVÂNCIA DO CONTATO FÍSICO PARA AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA COABITAÇÃO COM UMA CONSPECÍFICA DOENTE

Foram utilizados 64 camundongos separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle e um grupo experimental conforme descrito em 4.1.1. O grupo controle foi subdividido em CAS1 e CAS2; o mesmo ocorreu com o grupo experimental que foi subdividido em CAD1 e CAD2. Cada animal dos grupos CAS1 e CAD1 foi separado de seu par por uma placa de acrílico transparente e perfurada que foi colocada no meio da gaiola moradia durante toda a coabitação; deste modo, as camundongas CAS1 e CAD1 podiam receber o odor de suas companheiras, mas não podiam estabelecer contato físico; os animais dos grupos CAS2 e CAD2 foram mantidos juntos. A figura 39 ilustra este procedimento. No dia (0) do experimento, um camundongo de cada par controle (CAS1 e CAS2) foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental (CAD1 e CAD2) foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p.

No 14º dia os animais foram colocados individualmente no centro da arena do campo aberto para a medida da atividade geral conforme descrito 4.5.3.2. Após 5 minutos de observação no campo aberto, os animais foram retirados e colocados no labirinto em cruz elevado para avaliação dos níveis de ansiedade, por mais 5 minutos conforme descrito nos itens 4.6.2 e 4.6.3 respectivamente.

Figura 39: Esquema ilustrativo da formação dos grupos experimentais deste experimento

Resultados

A tabela 16 mostra os efeitos da separação física sobre o comportamento, no campo aberto de camundongas que tiveram contato físico (CAD₂) ou não (CAD₁) com companheiras doentes em relação a seus respectivos controles (CAS₂ e CAS₁). O parâmetro locomoção total foi significativamente maior ($F_{(3/28)} = 6,16$; $p < 0,05$) nos animais do grupo experimental sem contato físico (CAD₁) em relação aos outros grupos (CAD₂, CAS₁, CAS₂); o aumento deste parâmetro no grupo que teve contato físico com o doente (CAD₂) foi diferente estatisticamente em relação aos dois grupos controle (CAS₁ e CAS₂). A locomoção foi significativamente maior nos animais de ambos os grupos experimentais (CAD₁ e CAD₂) em relação aos grupos controle (CAS₁ e CAS₂) tanto na zona central ($F_{(3/28)} = 4,97$; $p < 0,05$) como na zona intermediária ($F_{(3/28)} = 4,65$; $p < 0,05$). Entretanto, a locomoção na zona tigmotática foi maior ($F_{(3/28)} = 1,8$, $p < 0,05$) apenas para os animais mantidos juntos com os doentes (CAD₁) em relação a CAS₁.

A velocidade dos animais no campo aberto foi maior nos animais que tinham algum contato com as doentes (grupos CAD₁ e CAD₂) em relação aos grupos controle (CAS₁ e CAS₂) tanto na arena total do campo aberto ($F_{(3/28)} = 4,30$; $p < 0,05$), como nas zonas periférica ($F_{(3/28)} = 4,18$; $p < 0,05$), intermediária ($F_{(3/28)} = 5,84$; $p < 0,05$) e central ($F_{(3/28)} = 6,12$; $p < 0,05$) do aparelho; não se observaram diferenças entre CAD₁ e CAD₂ e entre CAS₁ e CAS₂ para este parâmetro.

Os grupos experimentais (CAD₁ e CAD₂) apresentaram um aumento significativo ($F_{(3/28)} = 2,81$; $p < 0,05$) na porcentagem do tempo gasto na zona tigmotática do campo aberto em relação aos grupos controles (CAS₁ e CAS₂). Entretanto, não foram encontradas diferenças significantes na porcentagem do tempo gasto nas outras zonas do campo aberto entre CAD₁, CAD₂, CAS₁ e CAS₂.

Tabela 16 Comportamento de camundongas que tiveram (CAD₂) ou não (CAD₁) contato físico com uma companheira doente no campo aberto

Parâmetros	<u>pares separados por um acrílico¹</u>		<u>pares mantidos juntos¹</u>	
	CAS ₁ 	CAD ₁ 	CAS ₂ 	CAD ₂
Locomoção Total (cm)	2578,75 ± 216,20 ⁽¹⁾	2901,42 ± 191,30 ⁽³⁾	2320,00 ± 374,80 ⁽¹⁾	2758,88 ± 289,70 ⁽²⁾
Locomoção na zona tigmotaxica (cm)	1333,75 ± 232,70 ⁽¹⁾	1474,28 ± 222,70 ⁽²⁾	1102,50 ± 108,10 ⁽¹⁾	1327,00 ± 260,70 ⁽¹⁾
Locomoção na zona intermediaria (cm)	1770,00 ± 255,70 ⁽¹⁾	2015,71 ± 383,10 ⁽²⁾	1513,75 ± 127,70 ⁽¹⁾	1885,50 ± 288,30 ⁽²⁾
Locomoção na zona central (cm)	1646,25 ± 203,20 ⁽¹⁾	1905,71 ± 364,11 ⁽²⁾	1432,50 ± 127,10 ⁽¹⁾	1762,00 ± 256,90 ⁽²⁾
Velocidade (cm/s)	8,75 ± 1,10 ⁽¹⁾	9,78 ± 1,53 ⁽²⁾	7,42 ± 0,50 ⁽¹⁾	8,96 ± 1,48 ⁽¹⁾
Velocidade na zona tigmotaxica (cm/s)	8,01 ± 1,40 ⁽¹⁾	8,84 ± 1,32 ⁽²⁾	6,61 ± 0,65 ⁽¹⁾	8,29 ± 1,57 ⁽²⁾
Velocidade na zona intermediaria (cm/s)	10,61 ± 1,53 ⁽¹⁾	12,1 ± 2,30 ⁽²⁾	9,07 ± 0,76 ⁽¹⁾	11,67 ± 1,39 ⁽²⁾
Velocidade na zona central (cm/s)	9,88 ± 1,23 ⁽¹⁾	11,42 ± 2,18 ⁽²⁾	8,59 ± 0,75 ⁽¹⁾	10,88 ± 1,23 ⁽²⁾
Porcentagem de tempo gasto na zona tigmotaxica (s)	174,52 ± 13,66 ⁽¹⁾	195,33 ± 24,65 ⁽²⁾	162,02 ± 20,15 ⁽¹⁾	191,94 ± 16,30 ⁽²⁾
Porcentagem de tempo gasto na zona intermediaria (s)	79,83 ± 19,15 ⁽¹⁾	73,99 ± 18,90 ⁽¹⁾	87,40 ± 14,84 ⁽¹⁾	77 ± 20,52 ⁽¹⁾
Porcentagem de tempo gasto na zona central (s)	119,08 ± 20,99 ⁽¹⁾	104,59 ± 24,67 ⁽¹⁾	34,22 ± 24,61 ⁽¹⁾	111,48 ± 29,12 ⁽¹⁾

¹ As camundongas CAS₁ e CAD₁ foram separadas por uma placa de acrílico transparente durante a coabitação e as camundongas CAS₂ e CAD₂ foram mantidas juntas

Os dados representam as médias ± desvio padrão os valores foram considerados estatisticamente diferente para p<0,05 (ANOVA de uma via seguida do teste de Turkey) n= 8 animais/grupo.

Desenhos da tabela

= animal injetado com tumor

= animal injetado com NaCl na concentração de 0,9%

= CAD

= CAS

= placa de acrílico

A Tabela 17 mostra os dados obtidos no labirinto em cruz elevado. A única diferença estatística encontrada entre os grupos ($F_{(3/28)} = 3,39$; $p < 0,05$) foi na porcentagem de entradas nos braços abertos; as camundongas CAD₂ mantidas juntas com suas companheiras, apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos que aquelas dos grupos CAS₂.

Tabela 17 Comportamento de camundongas que tiveram (CAD₂) ou não (CAD₁) contato físico com uma companheira doente no labirinto em cruz elevado

Parâmetros	pares separados por um acrílico¹		pares mantidos juntos¹	
	CAS ₁ 	CAD ₁ 	CAS ₂ 	CAD ₂
Porcentagem de entrada nos braços abertos (%)	36,4 ± 10,54 ^(1,2)	37,21 ± 9,7 ^(1,2)	28,02 ± 6,18 ⁽¹⁾	39,27 ± 5,72 ⁽²⁾
Porcentagem de entrada nos braços fechados (%)	65,53 ± 9,37 ⁽¹⁾	67,78 ± 13,34 ⁽¹⁾	67,52 ± 9,14 ⁽¹⁾	62,72 ± 6,9 ⁽¹⁾
Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%)	23,98 ± 11,71 ⁽¹⁾	26,46 ± 9,18 ⁽¹⁾	20,79 ± 11,89 ⁽¹⁾	28,08 ± 11,65 ⁽¹⁾
Porcentagem de tempo gasto nos braços fechados (%)	75,70 ± 15,48 ⁽¹⁾	76,39 ± 11,19 ⁽¹⁾	76,58 ± 18,54 ⁽¹⁾	77,57 ± 12,68 ⁽¹⁾

¹ As camundongas CAS₁ e CAD₁ foram separadas por uma placa de acrílico transparente durante a coabitação e as camundongas CAS₂ e CAD₂ foram mantidas juntas

Os dados representam as médias ± desvio padrão.

Os valores foram considerados estatisticamente diferente para p < 0,05.

(ANOVA de uma via seguida do teste de Turkey) n= 8 animais/grupo.

Desenhos da tabela

= animal injetado com tumor

= animal injetado com NaCl na concentração de 0,9%

= CAD

= CAS

= placa de acrílico

5.16 EXPERIMENTO 16: A RELEVÂNCIA DO CONTATO FÍSICO PARA A ALTERAÇÃO DE ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA PELA COABITAÇÃO COM UMA CONSPECÍFICA DOENTE

Foram utilizados 64 camundongos separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle e um grupo experimental conforme descrito em 4.1.1. O grupo controle foi subdividido em CAS1 e CAS2, e o grupo experimental em CAD1 e CAD2. Cada animal dos grupos CAS1 e CAD1 foi separado de seu par por uma placa de acrílico transparente e perfurada que foi colocada no meio da gaiola moradia durante toda a coabitação; deste modo, as camundongas CAS1 e CAD1 podiam receber o odor de suas companheiras, mas não podiam estabelecer contato físico; e os animais dos pares dos grupos CAS2 e CAD2 foram mantidos juntos. A figura 47 ilustra este procedimento. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle (CAS₁ e CAS₂) foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental (CAD₁ e CAD₂) foi inoculado com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich i.p.

No 14º dia o sangue de todos os animais foi colhido para a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos conforme técnica descrita em 4.8.4.

Resultados

As figuras 40 e 41 ilustram os efeitos da separação física sobre o *burst* oxidativo e a fagocitose de neutrófilos dos animais que conviveram (CAD₁ e CAD₂) ou não (CAS₁ e CAS₂) com um doente. Não foram encontradas diferenças significantes ($F_{(3/28)} = 0,67$; $p < 0,05$) para o *burst* oxidativo basal (DCFH) em (A) entre os quatro diferentes grupos. Diferenças significantes entre os grupos também não foram observadas após PMA ($F_{(3/28)} = 2,96$; $p < 0,05$) em (B); no entanto, os valores de *burst* oxidativo induzido por *S. aureus* ($KW_{(3/28)} = 11,61$; $p < 0,05$) em (C) foram menores nos neutrófilos provenientes das camundongas CAD₂ (que permaneceram juntas) em relação àqueles dos outros grupos.

Figura 40 -. *Burst* oxidativo de neutrófilos de camundongas mantidas juntas (CAS₂ e CAD₂) ou separadas (CAS₁ e CAD₁) com uma companheira doente. As camundongas CAS₁ e CAD₁ foram separadas por uma placa de acrílico durante a coabitação; as camundongas CAS₂ e CAD₂ foram mantidas juntas. A figura mostra o *burst* oxidativo basal (A) assim como o *burst* estimulado e obtido *in vitro* na presença de *Staphylococcus aureus* (B) e PMA (C). Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. (ANOVA de uma via seguida do teste de Turkey. O significado das figuras das camundongas foi explicado na Tabela 19.

Dados da fagocitose de neutrófilos das camundongas mantidas fisicamente separadas (CAD₁ e CAS₁) ou juntas (CAD₂ e CAS₂) estão também, ilustrados na figura 41. Encontrou-se uma redução significativa ($F = 15,77$; $p < 0,05$) na porcentagem de fagocitose das camundongas dos grupos CAD₂ quando comparada àquela dos animais dos grupos CAD₁, CAS₁, e CAS₂. Uma análise complementar mostrou que as camundongas dos grupos CAD₁

(mantidas juntas) apresentaram uma redução significativa na porcentagem de fagocitose em relação àquelas do respectivo grupo controle CAS₁ (Figura 41A). A Figura 41B ilustra a intensidade de fagocitose, ou seja, a quantidade de bactérias fagocitadas; apenas os dados provenientes das camundongas dos grupos CAD₂ (mantidas juntas) foram diferentes ($F_{(3/28)}=6,80$; $p<0,05$), sendo menores que aqueles avaliados nos grupos CAS₁ e CAS₂, não apresentando diferença estatística de CAD₁. Assim, e à primeira vista, a separação física parece ter sido capaz de reduzir os efeitos induzidos pela coabitação com um animal doente na fagocitose de neutrófilos.

Figura 41 -. Fagocitose de neutrófilos de camundongas mantidas juntas (CAS₂ e CAD₂) ou separadas (CAS₁ e CAD₁) com uma companheira doente.. As camundongas CAS₁ e CAD₁ foram separadas por uma placa de acrílico durante a coabitação; as camundongas CAS₂ e CAD₂ foram mantidas juntas. A figura mostra a porcentagem (A) e a intensidade (B) de neutrófilos realizando a fagocitose de *S. aureus*. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p<0,05$. (ANOVA de uma via seguida do teste de Turkey). O significado das figuras das camundongas foi explicado na Tabela 19.

5.17 EXPERIMENTO 17: A RELEVÂNCIA DO ODOR PARA AS ALTERAÇÕES DE IMUNIDADE INATA INDUZIDAS PELA COABITAÇÃO COM UMA CONSPECÍFICA DOENTE

Foram utilizados 32 camundongas separadas em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos experimentais; os animais destes grupos foram colocados em um protótipo em que tinham contato visual com suas companheiras doentes, mas a elas não era permitido contato físico. A diferença entre os grupos estava no fato de que os animais companheiros CAD1 tinham contato olfatório com as companheiras doentes o que não ocorria com os companheiros CAD2. De fato, as gaiolas dos animais do grupo CAD2 tinham entrada de ar independente daquela de sua companheira doente, como descrito no item 4.5.1 No dia (0) do experimento um camundongo de cada par foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p.

No 14º dia do experimento, o sangue dos animais CAD1 e CAD2 foi colhido para a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos por citometria de fluxo conforme técnica descrita em 4.8.4

Resultados

As figuras 42 e 43 ilustram os efeitos da ausência de contato físico e olfatório para as alterações de imunidade inata induzidas pela convivência com um animal doente. Assim, não foram encontradas diferenças ($p < 0,05$) entre os animais dos grupos (CAD₁ e CAD₂) para o *burst* oxidativo basal de neutrófilos (Figura 42A); no entanto, uma diferença significativa foi observada para o *burst* oxidativo após os estímulos de *S. aureus* em (B) ou PMA em (C) ($p < 0,05$). Como consequência, as camundongas dos grupos CAD₁ (grupo de animais que percebiam o odor das companheiras doente) apresentaram valores menores que aqueles observados nos grupos CAD₂ (grupo de animais que não percebiam o odor das companheiras doentes).

Figura 42 - *Burst* oxidativo de neutrófilos de camundongas que conviveram com uma companheira doente. As camundongas CAD₁ e CAD₂ tiveram contato visual com suas companheiras doentes, mas a elas não era permitido que estabelecessem contato físico. Os animais do grupo CAD₁ tinham, além disso, contato olfativo com suas companheiras o que não foi permitido aos CAD₂. A figura mostra o *burst* oxidativo basal de neutrófilos (A) assim como o *burst* estimulado e obtido *in vitro* na presença de *Staphylococcus aureus* (B) e PMA (C). Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Números diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$.

- = animal injetado com tumor e privado da passagem do odor.
- = animal injetado com tumor e permitido a passagem do odor.
- = animal CAD privado de receber o odor de sua companheira.
- = animal CAD recebeu o odor de sua companheira.
- = placa de acrílico transparente no protótipo

Encontrou-se uma redução significativa tanto na porcentagem (A) como na intensidade (B) ($p < 0,05$) de fagocitose quando comparamos as camundongas dos grupos CAD₁ com aquelas do grupo CAD₂ (Figura 43). Novamente, os dados das camundongas CAD₁ que tinham contato olfatório com suas companheiras ($p < 0,05$) foram menores que aqueles dos animais do grupo CAD₂. Por esta razão, o odor dos animais injetados com tumor mostrou-se relevante para as alterações de imunidade induzidas pela coabitação.

Figura 43 - Fagocitose de neutrófilos de camundongas que conviveram com uma companheira doente. As camundongas CAD₁ e CAD₂ tiveram contato visual com suas companheiras doentes, mas a elas não era permitido que estabelecessem contato físico. Os animais do grupo CAD₁ tinham, além disso, contato olfativo com suas companheiras o que não foi permitido aos CAD₂. A figura mostra a porcentagem (A) e a intensidade (B) de neutrófilos realizando a fagocitose de *S. aureus*. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Números diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$.

- = animal injetado com tumor e privado da passagem do odor.
- = animal injetado com tumor e permitido a passagem do odor.
- = animal CAD privado de receber o odor de sua companheira.
- = animal CAD recebeu o odor de sua companheira.
- = placa de acrílico transparente no protótipo

5.18 EXPERIMENTO 18: RELEVÂNCIA DA SEPARAÇÃO FÍSICA, VISUAL E OLFATÓRIA NAS ALTERAÇÕES DE IMUNIDADE INATA INDUZIDAS PELA COABITAÇÃO COM UM CONSPECÍFICO DOENTE

Foram utilizados 24 pares de camundongos separados de acordo com o peso corporal em três grupos experimentais. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. Os animais companheiros CAD1 e CAD2 foram colocados no protótipo, sendo que a eles não foi permitido o estabelecimento de contato visual e físico. A diferença entre os grupos CAD1 e CAD2 estava no fato de que aos animais CAD1 foi permitido contato olfatório com o doente que não ocorria para aqueles do grupo CAD2. De fato, o grupo CAD2 estava em caixas do protótipo com entrada de ar independente daquela da companheira doente, como descrito no item 4.5.1. Os animais companheiros CAD3 correspondiam ao grupo experimental tradicional deste trabalho, portanto permaneceram juntos em suas gaiolas moradia com a companheira inoculada com o tumor, isto é, este grupo não foi colocado no protótipo.

No 14º dia o sangue dos animais foi colhido para a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos que foram avaliados por citometria de fluxo conforme técnica descrita em 4.8.4

Resultados

As figuras 44 e 45 mostram os efeitos da ausência de contato físico, olfatório e visual sobre a atividade de neutrófilos de camundongas que conviveram com uma companheira doente. Não foram encontradas diferenças significantes ($F_{(2/21)} = 0,24$; $p < 0,05$) entre os dados dos grupos CAD₁, CAD₂, e CAD₃ para o *burst* oxidativo basal (Figura 44A); contudo, um aumento foi observado no *burst* oxidativo induzido por *S. aureus* ($F_{2/21} = 6,98$; $p < 0,05$) nas camundongas do grupo CAD₂ (grupo isolado que não recebia contato visual e olfativo suas respectivas companheiras) quando comparado com aqueles dos grupos CAD₁ e CAD₃ isto é, que tinham contato com parceiros doentes ($KW_{(2/21)} = 9,17$; $p < 0,05$); o mesmo se observou para o *burst* oxidativo induzido por PMA, como mostrado nas figuras (Figura 45 A e B). Análises suplementares mostraram que as camundongas CAD₂ (animais sem o contato visual, físico e olfatório com a companheira doente) apresentavam maior porcentagem ($KW_{(2/21)} =$

9,81; $p < 0,05$) de neutrófilos realizando fagocitose quando comparadas às camundongas CAD₁ e CAD₃ (Figura 45C). Por fim, não foram encontradas diferenças ($F_{(2/21)} = 1,61$; $p < 0,05$) entre os 3 grupos para a intensidade de fagocitose de neutrófilos (Figura 45 D). Estes dados sugerem que, a privação de contato visual não tinha sido relevante para reverter as alterações de imunidade induzidas pela coabitação e reforçam a relevância do contato olfatório.

Figura 44 - *Burst* oxidativo de neutrófilos de camundongas que conviveram com uma companheira doente. As camundongas CAD₁ foram fisicamente separadas e não viam suas companheiras doentes, mas percebiam o odor de suas respectivas companheiras. As camundongas CAD₂ foram fisicamente separadas e privadas do contato visual e olfativo de suas respectivas companheiras doentes. As camundongas CAD₃ foram mantidas junto. A figura mostra o *burst* oxidativo basal de neutrófilos (A). Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

- = animal injetado com tumor e privado do contato visual, mas foi permitido receber o odor
- = animal injetado com tumor e privado tanto do contato visual como do olfativo
- = animal injetado com tumor e permitido o contato visual e a passagem do odor.
- = animal privado do contato visual, mas foi permitido receber o odor
- = animal privado tanto do contato visual como do olfativo
- = animal que recebeu contato visual e o odor
- = placa de acrílico opaca

Figura 45 - *Burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos de camundongas que conviveram com uma companheira doente. As camundongas CAD₁ foram fisicamente separadas e não viam suas companheiras doentes, mas percebiam o odor de suas respectivas companheiras. As camundongas CAD₂ foram fisicamente separadas e privadas do contato visual e olfativo de suas respectivas companheiras doentes. As camundongas CAD₃ foram mantidas junto. A figura mostra o *burst* estimulado e obtido *in vitro* na presença de *Staphylococcus aureus* (A) e PMA (B) e a porcentagem (C) e a intensidade (D) de neutrófilos realizando a fagocitose de *S. aureus*. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

- = animal injetado com tumor e privado do contato visual, mas foi permitido receber o odor
- = animal injetado com tumor e privado tanto do contato visual como do olfativo
- = animal injetado com tumor e permitido o contato visual e a passagem do odor.
- = animal privado do contato visual, mas foi permitido receber o odor
- = animal privado tanto do contato visual como do olfativo
- = animal que recebeu contato visual e o odor
- = placa de acrílico opaca

5.19 EXPERIMENTO 19 – A RELEVANCIA DO ODOR NO CRESCIMENTO DE UM TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO MESMO TUMOR

Foram utilizados 24 pares de camundongos separados de acordo com o peso corporal em três grupos experimentais. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. Os animais companheiros CAD1 e CAD2 foram colocados no protótipo, sendo que a eles não foi permitido contato físico. A diferença entre CAD1 e CAD2 estava no fato de que aos companheiros CAD1 era permitido contato olfatório com a companheira doente fato que não ocorreu com os CAD2, isto é, estes animais estavam em caixas com entrada de ar independente daquela sua companheira doente, como descrito no item 4.5.1. Os animais do grupo CAD3 correspondiam ao grupo experimental tradicional permanecendo juntos com uma companheira doente em suas gaiolas moradia, isto é; este grupo não foi colocado no protótipo.

No 14º dia os animais companheiros dos grupos CAD1, CAD2 e CAD3 foram inoculados com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p; sendo alojados em número de 8 em gaiolas de propileno (medindo 41 x 34 x 16 cm); após 14 dias procedeu-se à verificação do crescimento tumoral nos camundongos conforme descrito em 4.8.2. A figura 46 ilustra este procedimento.

Figura 46 - Esquema ilustrativo da formação dos grupos experimentais deste experimento

Resultados

A tabela 18 mostra e as figuras 47 e 48 ilustram os efeitos da ausência de contato físico e olfatório por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre o crescimento deste mesmo tumor ascítico. A análise estatística mostrou existência de diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os dados dos grupos CAD₁, CAD₂, e CAD₃ para os seguintes parâmetros: concentração de células tumorais ($F_{(2/21)} = 5,13$; $p < 0,05$) que esteve menor nas camundongas do grupo CAD₂ (grupo que não recebeu contato olfativo, físico com suas respectivas companheiras) quando comparado com aqueles dos grupos CAD₁ (grupo de animais que percebiam o odor das companheiras doentes) e CAD₃ (mantidas juntas) e, também, quanto ao número total de células tumorais ($KW_{(2/21)} = 7,31$; $p < 0,05$) que esteve reduzido nas camundongas do grupo CAD₂ quando comparado com aqueles dos grupos CAD₁ e CAD₃; no entanto, não foram encontradas diferenças para o volume de líquido ascítico entre os três grupos ($F_{(2/21)} = 4,24$; $p > 0,05$).

Tabela 18 – A relevância do odor nos efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o volume (em ml), concentração e número total de células da ascite após inoculação do tumor ascítico de Ehrlich (5×10^6 células/animal)

GRUPOS	VOLUME (ML)	CONCENTRAÇÃO (Nº DE CÉLULAS/ML 1×10^7)	CÉLULAS TOTAIS (Nº DE CÉLULAS/ANIMAL 1×10^7)
CAD₁	$18,17 \pm 2,09^{(1)}$	$13,38 \pm 3,17^{(2)}$	$201,96 \pm 35,07^{(2)}$
CAD₂	$14,88 \pm 2,35^{(1)}$	$8,85 \pm 2,25^{(1)}$	$159,57 \pm 25,37^{(1)}$
CAD₃	$15,60 \pm 2,70^{(1)}$	$12,94 \pm 4,06^{(2)}$	$194,01 \pm 12,03^{(2)}$

CAD₁ = as camundongas foram fisicamente separadas de suas companheiras doentes, mas percebiam o odor de suas respectivas companheiras.

CAD₂ = as camundongas foram fisicamente separadas e privadas do contato olfatório de suas respectivas companheiras doentes.

CAD₃ = as camundongas foram mantidas juntas.

Números diferentes representam diferença estatística. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA para dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos).

Figura 47 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre (A) o volume, e (B) o número de células/ml ($\times 10^7$) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células)

As camundongas CAD₁ foram fisicamente separadas de suas companheiras doentes, mas percebiam o odor de suas respectivas companheiras. As camundongas CAD₂ foram fisicamente separadas e privadas do contato olfatório de suas respectivas companheiras doentes. As camundongas dos pares CAD₃ foram mantidas juntas. Números diferentes representam diferença estatística. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA).

Figura 48 - Efeitos da convivência por 14 dias com outros portadores de um tumor de Ehrlich, sobre (A) o número de células totais ($\times 10^7$) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células). As camundongas CAD₁ foram fisicamente separadas de suas companheiras doentes, mas percebiam o odor de suas respectivas companheiras. As camundongas CAD₂ foram fisicamente separadas e privadas do contato olfatório de suas respectivas companheiras doentes. As camundongas dos pares CAD₃ foram mantidas juntas. Números diferentes representam diferença estatística. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis).

5.20 EXPERIMENTO 20 – RELEVANCIA DO ODOR NA LOCOMOÇÃO DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 48 camundongos separados em pares de acordo com o peso corporal em três grupos experimentais. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. Os animais companheiros CAD1 e CAD2 foram colocados no protótipo, onde as camundongas CAD₁ e CAD₂ tinham contato visual, mas não físico com suas companheiras doentes. A diferença entre os grupos estava no fato de que aos companheiros CAD1 era permitido o contato olfatório com a companheira doente o que era restrito aos animais CAD2, isto é este grupo estava em caixas com entrada de ar independente daquele de sua companheira doente, como descrito no item 4.5.1. Os animais CAD3 permaneceram juntos com a companheira injetada com tumor de Ehrlich durante todo o experimento.

No 14º dia foram feitas as avaliações comportamentais. Para isso, os animais de cada um dos 3 grupos foram colocados individualmente primeiro no centro da arena do campo aberto para a medida da atividade geral conforme descrito 4.5.3.2. Após 5 minutos de observação no campo aberto, os animais foram retirados e colocados no labirinto em cruz elevado para avaliação dos níveis de ansiedade, por mais 5 minutos conforme descrito respectivamente nos itens 4.6.2 e 4.6.3.

Resultados

A tabela 19 mostra os efeitos da ausência de contato físico e olfatório sobre o comportamento, no campo aberto, de camundongas que conviveram com companheiras doentes. Os parâmetros da locomoção total avaliados no campo aberto ($KW_{(2/21)} = 9,10$; $p < 0,05$), e locomoção nas zonas tigmotática ($F_{(2/21)} = 6,08$, $p < 0,05$) e intermediária ($KW_{(2/21)} = 8,59$; $p < 0,05$) foram maiores nos animais que foram privados do contato físico com a companheira doente, mas que recebiam o odor da companheira doente quando comparados aos animais CAD2 (privados de contato físico e olfatório); não se observaram diferenças entre CAD₁ e CAD3 (conviveram com a companheira doente). A locomoção na zona central ($F_{(2/21)} = 5,83$; $p < 0,05$) foi maior nos animais do grupo CAD1 quando comparada àquele dos animais CAD2 e CAD3.

Em relação à velocidade total na arena ($F_{(2/21)} = 11,45$; $p < 0,05$) do campo aberto e nas zonas intermediária ($F_{(2/21)} = 19,08$; $p < 0,05$) e central ($F_{(2/21)} = 7,73$; $p < 0,05$), verificamos que ela foi maior nos animais CAD1 (privados do contato físico, mas não olfatório com a companheira doente) quando comparados aos animais CAD2 e CAD3. A velocidade na zona periférica ($KW_{(2/21)} = 8,33$; $p < 0,05$) foi maior nos animais CAD1 quando comparada aquela dos animais CAD2, no entanto este valor não diferiu daquele do grupo CAD3.

O grupo CAD1 (grupo de animais que percebiam o odor das companheiras doentes) mostrou um aumento na porcentagem do tempo gasto na zona central do campo aberto ($F_{(2/21)} = 3,85$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo CAD2; não se encontraram diferenças entre CAD₁ e CAD₃ neste mesmo parâmetro. Não foram encontradas diferenças significantes entre os dados de permanência dos 3 grupos na zona tigmotaxica ($F_{(2/21)} = 1,80$; $p > 0,05$) e intermediária ($F_{(2/21)} = 0,76$; $p > 0,05$) do aparelho.

Tabela 19 Comportamento de camundongas que conviveram com uma companheira doente e foram avaliadas no campo aberto. As camundongas CAD₁ e CAD₂ tiveram contato visual com suas companheiras doentes, mas a elas não foi permitido estabelecimento de contato físico. CAD₁ tinham, além disso, o contato olfativo com suas companheiras, e as camundongas CAD₃ foram mantidas juntas

Parâmetros	pares separados por um acrílico		pares mantidos juntos
	CAD ₁ 	CAD ₂ 	CAD ₃
Locomoção Total (cm)	3004,95 ± 666,06 ⁽²⁾	2286,81 ± 239,66 ⁽¹⁾	2739,95 ± 201,49 ^(1,2)
Locomoção na zona tigmotaxica (cm)	1788,79 ± 294,93 ⁽²⁾	1334,61 ± 140,88 ⁽¹⁾	146,83 ± 314,90 ^(1,2)
Locomoção na zona intermediaria (cm)	1050,75 ± 265,19 ⁽²⁾	732,45 ± 74,90 ⁽¹⁾	819,59 ± 90,03 ^(1,2)
Locomoção na zona central (cm)	421,86 ± 98,49 ⁽²⁾	298,60 ± 52,80 ⁽¹⁾	320,15 ± 55,64 ⁽¹⁾
Velocidade (cm/s)	10,49 ± 1,04 ⁽²⁾	8,32 ± 0,52 ⁽¹⁾	8,73 ± 1,04 ⁽¹⁾
Velocidade na zona tigmotaxica (cm/s)	9,21 ± 0,58 ⁽²⁾	7,16 ± 0,43 ⁽¹⁾	8,05 ± 1,63 ^(1,2)
Velocidade na zona intermediaria (cm/s)	14,61 ± 1,13 ⁽²⁾	10,86 ± 1,43 ⁽¹⁾	11,58 ± 1,01 ⁽¹⁾
Velocidade na zona central (cm/s)	14,95 ± 1,18 ⁽²⁾	11,59 ± 1,82 ⁽¹⁾	12,77 ± 1,78 ⁽¹⁾
Porcentagem de tempo gasto na zona tigmotaxica (s)	200,40 ± 18,51 ⁽¹⁾	188,19 ± 10,61 ⁽¹⁾	205,90 ± 22,38 ⁽¹⁾
Porcentagem de tempo gasto na zona intermediaria (s)	69,19 ± 12,14 ⁽¹⁾	77,16 ± 11,49 ⁽¹⁾	69,78 ± 16,11 ⁽¹⁾
Porcentagem de tempo gasto na zona central (s)...	31,83 ± 8,45 ⁽²⁾	20,35 ± 6,31 ⁽¹⁾	24,30 ± 8,58 ^(1,2)

CAD₁ = as camundongas foram fisicamente separadas de suas companheiras doentes, mas percebiam o odor de suas respectivas companheiras.

CAD₂ = as camundongas foram fisicamente separadas e privadas do contato olfatório de suas respectivas companheiras doentes.

CAD₃ = as camundongas foram mantidas juntas.

Números diferentes representam diferença estatística. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA para dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos).

Desenhos da tabela

= animal injetado com tumor e privado da passagem do odor.

= animal injetado com tumor e permitido a passagem do odor.

= animal CAD privado de receber o odor de sua companheira.

= animal CAD recebeu o odor de sua companheira.

= placa de acrílico transparente no protótipo

A Tabela 20 mostra os efeitos da ausência de contato físico e olfatório nas alterações de comportamento medidas no labirinto em cruz elevado. Tanto para a porcentagem de entrada nos braços abertos ($KW_{(2/21)} = 19,63$ $p < 0,05$) como para a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($KW_{(2/21)} = 21,97$; $p < 0,05$) observamos uma redução significativa dos valores nos animais do grupo CAD₁ (grupo de animais que percebiam o odor das companheiras doente) quando comparados aos animais CAD₂ e CAD₃.

Encontrou-se um aumento significativo tanto na porcentagem de entrada nos braços fechados ($KW_{(2/21)} = 21,81$; $p < 0,05$) e na porcentagem de tempo gasto nos braços fechados ($KW_{(2/21)} = 16,68$; $p < 0,05$) nos animais do grupo CAD1 (grupo de animais que percebiam o odor das companheiras doente) quando comparados aos animais CAD2; no entanto os dados do grupo CAD1 não foram diferentes daqueles do grupo CAD3. Por esta razão, o odor dos animais injetados com tumor mostrou-se relevante também para as alterações de comportamento induzidas pela coabitação.

Tabela 20 Comportamento de camundongas que conviveram (CAD₁, CAD₂, CAD₃) com uma companheira doente e foram avaliadas no labirinto em cruz elevado. As camundongas CAD₁ e CAD₂ tiveram contato visual com suas companheiras doentes, mas a elas não foi permitido estabelecimento de contato físico. CAD1 tinham, além disso, o contato olfativo com suas companheiras, e as camundongas CAD₃ foram mantidas juntas

Parâmetros	pares separados no protótipo		pares mantidos juntos
	CAD ₁ 	CAD ₂ 	CAD ₃
Porcentagem de entrada nos braços abertos (%)	12,06 ± 7,68 ⁽²⁾	43,03 ± 12,44 ⁽¹⁾	31,41 ± 4,43 ⁽³⁾
Porcentagem de entrada nos braços fechados (%)	87,93 ± 7,47 ⁽²⁾	49,45 ± 4,81 ⁽¹⁾	72,70 ± 7,43 ⁽²⁾
Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%)	11,93 ± 2,95 ⁽²⁾	44,92 ± 17,49 ⁽¹⁾	24,94 ± 10,90 ⁽¹⁾
Porcentagem de tempo gasto nos braços fechados (%)	88,48 ± 3,07 ⁽²⁾	53,57 ± 14,41 ⁽¹⁾	79,65 ± 9,56 ⁽²⁾

CAD₁ = as camundongas foram fisicamente separadas de suas companheiras doentes, mas percebiam o odor de suas respectivas companheiras.

CAD₂ = as camundongas foram fisicamente separadas e privadas do contato olfatório de suas respectivas companheiras doentes.

CAD₃ = as camundongas foram mantidas juntas.

Números diferentes representam diferença estatística. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos).

Desenhos da tabela

- = animal injetado com tumor e privado da passagem do odor.
- = animal injetado com tumor e permitido a passagem do odor.
- = animal CAD privado de receber o odor de sua companheira.
- = animal CAD recebeu o odor de sua companheira.
- = placa de acrílico transparente no protótipo

5.21 EXPERIMENTO 21 – DOSAGENS DE NORADRENALINA E ADRENALINA PLASMÁTICA EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH

Conforme descrito em 4.1.1 foram utilizados 16 pares de camundongos e mais um grupo colônia com 8 camundongos que foi adicionado como um novo grupo controle; os animais foram separados de acordo com o peso corporal em três grupos iguais: um grupo controle, um grupo experimental e um novo grupo Colônia. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. Os animais do grupo colônia não receberam qualquer injeção. No 14º dia foi coletado o sangue dos animais CAS e CAD e de 1 dos animais do grupo colônia para quantificação de catecolaminas, especificamente de adrenalina e noradrenalina conforme descrito no item 4.7.2

Resultados

A tabela 21 mostra os efeitos da convivência por 14 dias com portadores do tumor de Ehrlich sobre a quantificação de noradrenalina e adrenalina. A análise estatística dos dados obtidos de noradrenalina mostrou a existência de diferenças significantes ($KW_{(2/21)} = 8,93$; $p \leq 0,05$) entre os animais do grupo experimental CAD em relação aos grupos CAS (controle) e Colônia. Não se observaram diferenças significantes entre os dados dos grupos controle CAS e colônia. Especificamente observou-se uma redução de Noradrenalina nos animais do grupo CAD em relação aos grupos CAS e Colônia.

Do mesmo modo, dados de dosagem de adrenalina mostraram uma redução significativa ($KW_{(2/21)} = 10,45$; $p \leq 0,05$) da mesma no plasma dos animais do grupo CAD (experimental) em relação aos do grupo controle CAS (controle) e colônia. Não se observaram diferenças significantes entre os dados dos grupos controle CAS e Colônia.

Tabela 21 – A relevância do odor nos efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a quantificação de catecolaminas, especificamente adrenalina e noradrenalina

GRUPOS	Noradrenalina (nmol/mL)	Adrenalina (nmol/mL)
CAS	0,80 ± 0,09 ⁽¹⁾	0,93 ± 0,18 ⁽¹⁾
CAD	0,45 ± 0,22 ⁽²⁾	0,53 ± 0,08 ⁽²⁾
Colônia	0,79 ± 0,02 ⁽¹⁾	0,95 ± 0,01 ⁽¹⁾

CAS = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; **CAD** = animais que conviveram com o animais inoculados com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich na forma ascítica; **Colônia** = grupo de animais que não foram injetados.

Os dados representam as médias ± desvio padrão em nmol/mL

Números diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$, N = 8 animais, teste Kruskal-Wallis

5.22 EXPERIMENTO 22 – A RELEVANCIA DO ODOR NAS DOSAGENS DE NORADRENALINA E ADRENALINA PLASMÁTICA EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 48 camundongos separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos experimentais. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par experimental nos dois grupos foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. Os animais companheiros CAD1 (grupo 1) e CAD2 (grupo 2) foram colocados no protótipo, onde as camundongas CAD₁ e CAD₂ tinham contato visual, mas não físico com suas companheiras doentes. A diferença entre os grupos estava no fato de que às companheiras CAD1 era permitido o contato olfatório com a companheira doente o que era restrito aos animais CAD2, isto é este grupo estava em caixas com entrada de ar independente daquele de sua companheira doente, como descrito no item 4.5.1.

No 14º dia foi coletado o sangue dos animais CAD1 e CAD2 para quantificação de adrenalina e noradrenalina conforme descrito no item 4.7.2

Resultados

A tabela 22 mostra e as figuras 49 e 50 ilustram os efeitos da ausência de contato físico e olfatório com portadores do tumor de Ehrlich sobre a quantificação de adrenalina e noradrenalina no plasma. A análise estatística mostrou existência uma redução significativa de noradrenalina ($p < 0,05$) nas camundongas dos grupos CAD₁ (grupo de animais que percebiam o odor das companheiras doentes) quando comparadas com as CAD₂ (grupo de animais que não percebiam o odor das companheiras doentes).

Em relação à adrenalina observaram-se que o grupo CAD1 (grupo de animais que percebiam o odor das companheiras doente) apresentou uma redução significativa da mesma em relação a CAD₂ (grupo de animais que não percebiam o odor das companheiras doente).

Tabela 22 – A relevância do odor nos efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a quantificação de catecolaminas, especificamente adrenalina e noradrenalina

Grupos	Noradrenalina (nmol/mL)	Adrenalina (nmol/mL)
CAD1	$0,47 \pm 0,20^{(1)}$	$0,39 \pm 0,04^{(1)}$
CAD2	$0,78 \pm 0,02^{(2)}$	$0,91 \pm 0,22^{(2)}$

CAD₁ = as camundongas foram fisicamente separadas de suas companheiras doentes, mas percebiam o odor de suas respectivas companheiras; **CAD₂** = as camundongas foram fisicamente separadas e privadas do contato olfatório de suas respectivas companheiras doentes.

Números diferentes representam diferença estatística. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (teste Mann-Whitney).

Figura 49 - Dosagens de Noradrenalina plasmática de camundongas que conviveram (CAD₁ e CAD₂) com uma companheira doente. Camundongas CAD₁ e CAD₂ tiveram contato visual com suas companheiras doentes, mas a elas não era permitido que estabelecessem contato físico. Os animais do grupo CAD₁ tinham, além disso, contato olfativo com suas companheiras. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Números diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$, os dados representam a média $\pm$ desvio padrão em nmol/mL. Teste Mann-Whitney

- = animal injetado com tumor e privado da passagem do odor.
- = animal injetado com tumor e permitido a passagem do odor.
- = animal CAD privado de receber o odor de sua companheira.
- = animal CAD recebeu o odor de sua companheira.
- = placa de acrílico transparente no protótipo

Figura 50 - Dosagens de Adrenalina plasmática de camundongas que conviveram (CAD₁ e CAD₂) com uma companheira doente. Camundongas CAD₁ e CAD₂ tiveram contato visual com suas companheiras doentes, mas a elas não era permitido que estabelecessem contato físico. Os animais do grupo CAD1 tinham, além disso, contato olfativo com suas companheiras. Os dados representam a média e o desvio padrão de 8 animais por grupo. Números diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$, os dados representam a média $\pm$ desvio padrão em nmol/mL. Teste Mann-Whitney

- = animal injetado com tumor e privado da passagem do odor.
- = animal injetado com tumor e permitido a passagem do odor.
- = animal CAD privado de receber o odor de sua companheira.
- = animal CAD recebeu o odor de sua companheira.
- = placa de acrílico transparente no protótipo

5.23 EXPERIMENTO 23 – A RELEVANCIA DO ODOR NAS DOSAGENS DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS NO HIPOTÁLAMO DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 14 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 24 pares de camundongos separados de acordo com o peso corporal em três grupos experimentais (CAD1, CAD2 e CAD3). No dia (0) do experimento um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. Os animais companheiros CAD1 e CAD2 foram colocados no protótipo, sendo que a eles não foi permitido contato físico. A diferença entre CAD1 e CAD2 estava no fato de que aos companheiros CAD1 era permitido contato olfatório com a companheira doente fato que não ocorreu com os CAD2, isto é, estes animais estavam em caixas com entrada de ar independente daquela sua companheira doente, como descrito no item 4.5.1. Os animais do grupo CAD3 correspondiam ao grupo experimental tradicional permanecendo juntos com uma companheira doente em suas gaiolas moradia, isto é; este grupo não foi colocado no protótipo.

No 14º dia os animais companheiros dos grupos CAD1, CAD2 e CAD3 foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂; após este procedimento, foi colhido o cérebro para remoção do hipotálamo conforme descrito em 4.7.1.a. Foram dosados os seguintes neurotransmissores noradrenalina e serotonina, bem como seus metabólitos 4-hidroxi 3-metoxifeniletlenoglicol (MHPG) e ácido 5 hidroxi 3-indolacético (5HIAA) respectivamente conforme descrito em 4.7.1.b. Desta forma, foi possível inferir os dados de “turnover” destes neurotransmissores nestes animais.

Resultados

A tabela 23 mostra os efeitos da convivência com camundongos portadores do tumor de Ehrlich, durante 14 dias sobre os níveis e *turnover* de neurotransmissores, medidos no hipotálamo.

Como pode ser observado, a convivência com o animal portador do tumor diminuiu ($F_{(2/21)} = 4,90$; $p < 0,05$) os níveis hipotalâmicos de noradrenalina e aumentou aqueles de MHPG ($F_{(2/21)} = 5,90$; $p < 0,05$) dos animais CAD1 e CAD3 em relação aos animais do grupo CAD2. Observamos, também que o “turnover” hipotalâmico de noradrenalina estava maior dos animais CAD1 e CAD3 em relação a CAD2 ($F_{(2/21)} = 5,19$; $p < 0,05$).

Tabela 23 - Efeitos da convivência por 14 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre os níveis e “turnover” hipotalâmicos de noradrenalina e serotonina

PARÂMETROS	HIPOTÁLAMO		
	CAD1	CAD2	CAD3
NOR	626,41 ± 217,91 ⁽²⁾	927,71 ± 237,23 ⁽¹⁾	620,61 ± 222,47 ⁽²⁾
MHPG	427,77 ± 128,65 ⁽²⁾	262,51 ± 53,31 ⁽¹⁾	433,44 ± 92,46 ⁽²⁾
MHPG/NOR	0,72 ± 0,29 ⁽²⁾	0,30 ± 0,09 ⁽¹⁾	0,80 ± 0,39 ⁽²⁾

CAD₁ = as camundongas foram fisicamente separadas de suas companheiras doentes, mas percebiam o odor de suas respectivas companheiras.

CAD₂ = as camundongas foram fisicamente separadas e privadas do contato olfatório de suas respectivas companheiras doentes.

CAD₃ = as camundongas foram mantidas juntas.

Números diferentes representam diferença estatística. Os dados representam a média e o desvio padrão em ng/g. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA).

Desenhos da tabela

= animal injetado com tumor e privado da passagem do odor.

= animal injetado com tumor e permitido a passagem do odor.

= animal CAD privado de receber o odor de sua companheira.

= animal CAD recebeu o odor de sua companheira.

= placa de acrílico transparente no protótipo

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho confirmam dados obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (MORGULIS et al., 2004; ALVES 2005; ALVES et al., 2006, 2007) e acrescentam novas informações mostrando a presença de alterações imunes, bioquímicas e comportamentais em camundongas companheiras de outras ditas doentes, isto é, inoculadas com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich. Especificamente, os resultados obtidos mostraram que a convivência por 14 dias com um animal portador do tumor produziu: 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 da medula; 8) aumento de células tumorais em fase G1 e redução daquelas em fase G2 do ciclo celular do tumor ascítico de Ehrlich, 9) aumento de permanência com um animal estranho e redução da permanência com a companheira doente em um labirinto em T, 10) aumento de interação social. Observamos, ainda que: 11) houve uma redução do *burst* oxidativo basal de neutrófilos provenientes de animais que conviveram com dois doentes, e que houve reversão destas alterações quanto da convivência de um doente com dois sadios. 12) a convivência não modificou os níveis de corticosterona dos animais desafiados ou não por contenção; 13) o contato físico não foi relevante para reverter as alterações induzidas pela convivência; 14) o contato visual também não foi relevante para as alterações observadas; 15) os estímulos olfativos foram relevantes para as alterações induzidas pela convivência sobre o *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos, crescimento tumoral, alterações comportamentais, níveis plasmáticos de noradrenalina e de adrenalina, níveis hipotalâmicos de noradrenalina. Analisando-se estes resultados em seu conjunto depreende-se que a convivência por 14 dias com um animal portador de um tumor de Ehrlich produziu relevantes alterações no comportamento e em parâmetros neuroquímicos e de atividade imune inata de camundongas, muito provavelmente desencadeadas por estimulação olfativa proveniente da doente. Estas alterações serão interpretadas e discutidas dentro de um contexto de neuroimunomodulação.

Como revisado por Dantzer (DANTZER, BLUTHE, 1982), animais doentes tornam-se deprimidos, letárgicos e apresentam baixo nível de interesse pelo ambiente. Este grupo de sintomas não específicos de depressão, atribuídos à liberação de citocinas, têm sido chamados coletivamente de “comportamento doentio”. Este comportamento foi observado em todas as camundongas injetadas com o tumor ascítico de Ehrlich e utilizadas nos presentes experimentos. De fato, os sinais e sintomas apresentados pelas camundongas injetadas i.p com células do tumor de Ehrlich foram progressivamente aumentando do ED₁ ao ED₁₄, sendo os valores de escores atribuídos máximos, ou seja, 4, no dia em que as conspécificas (CAD) foram empregadas para as análises comportamentais, bioquímicas e/ou de imunidade inata (ED₁₄).

As alterações comportamentais, todavia, começam a ser observadas nas camundongas companheiras (CAD) quando observadas ainda em suas gaiolas de moradia, aproximadamente no ED₁₀, isto é, no momento este em que as camundongas injetadas com o tumor deixavam de responder aos apelos que as CAD faziam para interação. De fato, próximo do ED₁₀, os animais doentes diminuíram progressivamente sua atividade geral, ficando parados em um canto da gaiola moradia, frequentemente colocando-se sob a maravalha. Ao mesmo tempo, as camundongas CAD começavam a apresentar um aumento de atividade locomotora, permanecendo preferencialmente do lado oposto da gaiola em que estava a companheira doente. De uma maneira geral, pode-se dizer que as mudanças comportamentais observadas em CAD e nas camundongas injetadas com o tumor ocorreram ao mesmo tempo, mas em direções diferentes. Isto é, as camundongas doentes diminuíram e as camundongas CAD aumentaram sua atividade na gaiola por volta do dia ED₁₀. No dia ED₁₄, as camundongas CAD estavam muito ativas, tentavam sair da gaiola de moradia e não respondiam a estímulos externos como, por exemplo, ao barulho produzido por um estalo; estes fatos não foram detectados nas camundongas que conviveram com as camundongas sadias (CAS).

As avaliações deste trabalho, que eram anteriormente realizadas no 11º de convivência (MORGULIS et al., 2004; ALVES et al., 2006; 2007) passaram a ser realizadas no 14º dia de inoculação do tumor; com isto observamos que as alterações induzidas pela convivência em CAD foram exacerbadas. De fato, verificamos que os resultados provenientes dos animais CAD foram mais exuberantes e homogêneos além disso, os animais inoculados com tumor de Ehrlich apresentavam maior similaridade quanto aos sintomas (escores) de doença.

Buscamos, inicialmente, verificar se existiam diferenças entre nosso grupo controle tradicional (grupo de animais mantidos em pares, sendo um desses injetado com PBS) e outro em que os animais permaneciam em colônia (animais alojados em grupos de quatro, e que não

recebiam qualquer tipo de injeção). Nossos resultados mostraram ausência de diferenças comportamentais ou de imunidade inata entre estes dois grupos; de fato, ambos apresentaram resultados estatisticamente similares. Quer nos parecer, assim, que não foi à injeção *per se* que induziu estresse nos animais ou, ainda, que a situação de convivência em pares tenha levado às alterações. Assim sendo, parece-nos possível afirmar que as alterações observadas e aqui relatadas ocorreram exclusivamente pela situação de convivência com o doente.

Em determinadas situações aversivas, alguns animais emitem sons, cuja frequência é inaudível ao ouvido humano, fato conhecido como vocalização ultrassônica (HOUSEKNECHT, 1968; MCKENZIE-QUIRK e MICZEK, 2008; HOFFMANN et al., 2009), estas vocalizações podem servir como um indicador de expressão emocional (CUOMO et al. 1988; MICZEK et al., 1995; OLIVIER et al., 1991). Avaliações de vocalizações ultrassônicas (VU), mostraram diferenças relevantes entre as camundongas CAD e CAS (dados não mostrados). As chamadas vocalizações ultrassônicas - VU foram gravadas como descritas por de Vry e colaboradores (DE VRY et al., 1993). Assim, as chamadas das camundongas CAS foram gravadas durante o período de coabitação com a companheira saudável tendo-se observado que ocorria vocalização sempre que se observava interação social. No sentido contrario, as camundongas CAD apresentavam uma menor frequência de vocalizações, por volta do ED₁₀ e, apenas vocalizavam após tentativas frustradas de estabelecer contato com a doente. Vocalização, todavia, não foi observada nas camundongas injetadas com tumor de Ehrlich. Este fato é relevante porque a vocalização de roedores já foi relatada como indicativa de estresse (MICKZEK, TORNATZSKY, 1991; MOLEWIJK et al., 1995).

A maioria das situações estressoras que são vivenciadas pelos humanos, e outros animais, tem caráter social (BROWN, PRUDO; 1981; KESSLER, 1997; BJORKQVIST, 2001). Modelos animais são, assim, relevantes por explicar como as experiências sociais alteram a atividade do SNC e, de forma subsequente, o comportamento e a imunidade. Têm sido demonstrados efeitos deletérios de agentes estressores sobre a saúde tanto em modelos animais como em humanos (COHEN, HERBERT, 1996). Familiares ou amigos de indivíduos cronicamente doentes (*Caregivers*) são frequentemente usados como um modelo para examinar os efeitos do estresse crônico sobre o sistema imune (GALLAGHER et al., 2008). Já se relataram alterações no estado emocional e na saúde de *caregivers* (BEDNARSKI, 2009).

Os leucócitos do sangue periférico de *caregivers* produziram significativamente menos mRNA para interleucina (IL)- 1 β em resposta a uma estimulação com lipopolissacarídeos

(KIECOLT-GLASER et al., 1995). Gallagher e colaboradores, 2008 estudaram a secreção de imunoglobulina A (S-IgA) na saliva de *caregivers*; observaram que estes indivíduos apresentavam menor taxa de secreção de S-Ig A. Isto deixa claro que a situação vivenciada por *caregivers* produz inúmeros efeitos sobre a imunidade.

A incorporação de modelos animais para o estudo de situações humanas tem alta relevância em neurociência, particularmente na área de psiconeuroimunologia. Como agora amplamente confirmado, mostramos que camundongas que coabitaram por 11 dias com conspecíficas doentes apresentaram aumento de atividade motora no campo aberto e diminuição da resistência orgânica ao crescimento de um tumor ascítico de Ehrlich (MORGULIS et al., 2004). Esta convivência com um animal doente induziu também (a) uma diminuição nos níveis e um aumento do turnover hipotalâmico de noradrenalina (NA); (b) uma diminuição no *burst* oxidativo de neutrófilos após a 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 uma conspecífica doente em relação ao grupo controle, ou seja, animais que haviam convivido com companheiras saudáveis (Alves et al., 2007). Finalmente, a convivência com um doente induziu: (d) um aumento *in vitro* na expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e $^{+}CD11C^{+}$ em células do baço; (e) uma alteração na diferenciação das células da medula na presença de CM-CSF, IL-4 and LPS, *in vitro*, resultando em uma menor porcentagem de células $^{+}CD80^{+}$ *in vitro*, (f) uma desestabilização no organismo após uma hipersensibilização com ovoalbumina (TOMIYOSHI et al., 2009). De relevância salientar que este último experimento foi realizado com outra linhagem de camundongos (C57BL/6) e com outro tipo de tumor (Melanoma) inoculado no animal doente.

Estes achados experimentais não foram discutidos como sendo consequência de altruísmo, nos trabalhos que resultaram; foram interpretados como resposta a um possível estresse imposto pela presença do animal doente na gaiola. Roedores são conhecidos por reconhecer e ter reações de empatia como seus conspecíficos (CHURCH, 1959), um fato que implica na comunicação de um camundongo com o outro. Baseado nas alterações encontradas anteriormente na imunidade inata nos questionamos se ocorreriam alterações na imunidade adquirida dos animais CAD.

Dados observados neste trabalho e relativos ao peso e a celularidade esplênica dos animais que conviveram com outro doente por 14 dias trazem essas informações. Observamos a ocorrência de um menor peso relativo do baço em animais do grupo experimental. Da

mesma forma, a celularidade total estava diminuída no baço. Estes dados, apesar de metodologicamente simples, sugerem a existência de uma resposta imune esplênica menor nos animais CAD. De acordo com dados do esplenograma observamos uma redução na contagem diferencial de blastos, eritrócitos jovens e linfócitos. A porcentagem de linfócitos B e T *helper* foi diferente estatisticamente entre os grupos de animais presentemente usados, sendo menor nos CAD.

Diversos experimentos têm mostrado que estressores ambientais ou psicológicos alteram de forma significativa a imunidade adquirida (JESSOP et al., 1988; ESTERLING, 1996; MILLS et al., 1999, BARTOLOMUCCI et al., 2003; LI et al., 2007; PALUMBO et al., 2010). Sá-Rocha mostrou, em nossos laboratórios, que animais submissos e mantidos em uma hierarquia social estável apresentavam diferenças no comportamento e na neuroquímica cerebral, respondendo de forma diferenciada daquela dos dominantes a idênticos estímulos imunes. Em especial, os animais submissos apresentavam, em relação aos dominantes, maiores níveis de ansiedade, alteração da atividade de células NK no baço e maior susceptibilidade ao desenvolvimento de metástases tumorais (SÁ-ROCHA et al., 2006). Morrow-Tesch e Andersson, 1994, em estudos feitos com suínos, mostraram que interações sociais geradas pelo confronto de dominantes com submissos afetavam as funções imunológicas. Em geral, tanto os animais dominantes como os submissos mostraram redução da produção de anticorpos quando comparados com outros que não haviam estabelecido relação de dominância. É possível, assim, que o estresse gerado possa ter sido o responsável pelas alterações imunológicas que observaram.

Sabe-se serem os linfócitos importantes elementos para uma efetiva resposta contra o tumor de Ehrlich. De fato, animais portadores de maior atividade de linfócitos, avaliada por uma maior porcentagem de linfócitos B e T *helper* apresentaram um menor crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (MONDAL et al, 2002). Nossos resultados concordam com os dados de Mondal, porem em sentido contrário, pois encontramos uma menor porcentagem de linfócitos B e T *helper* e um maior crescimento do tumor de Ehrlich nos nossos animais experimentais (CAD).

A atividade de células NK foi realizada dentro do contexto de investigação dos efeitos da convivência com o doente sobre a imunidade e na busca por mecanismos que pudessem elucidar, em especial, as alterações imunes que culminariam com o maior crescimento do tumor ascítico de Ehrlich em animais que conviveram por 14 dias com um animal inoculado com células do tumor de Ehrlich. Observamos que os animais CAD - ao contrario do que se esperava – apresentaram maior atividade de células NK. É possível sugerir que, em nosso

experimento, as células NK não tenham desempenhado um papel anti-tumoral eficaz, pois mesmo na presença de um aumento de atividade citotóxica, o tumor ascítico de Ehrlich cresceu mais nos camundongos CAD. Uma das hipóteses para que isto ocorresse é que o número de células NK estivesse reduzido, e que tenha acontecido um aumento de atividade compensatória, na tentativa de adaptação do organismo à nova situação imposta pela convivência com a doente. Oya et al., 2000 quantificaram o número de células NK e a atividade citotóxica da mesma após um estresse, e verificaram que a atividade citotóxica se alterava em sentido oposto ao número de células NK, ocorrendo uma discrepância entre número e função.

Desde a comunicação pioneira de Ader e Cohen (1975), tem havido um aumento do número de trabalhos científicos que analisam as relações entre estresse, funções neuroendócrinas e imunes. Uma recente análise dos efeitos de estressores sobre a função imune mostrou que esta condição está associada com (1) reduções no número absoluto de células NK e no número relativo de células T, (2) aumentos marginais nas relações CD4/CD8, e (3) aumentos na função de células T e NK (ZORILLA et al., 2001). Ressalta-se, no entanto, que os presentes dados de CAD referem-se à atividade de células NK e não ao número.

Outros experimentos do nosso grupo (PALERMO-NETO et al., 2003; SÁ-ROCHA, 2006) e de outros grupos científicos também (VISINTAINER et al., 1982) mostraram decréscimo na resistência ao crescimento de um tumor em situações que envolviam níveis muito elevados de ansiedade e/ou estresse, fato que concorda com os dados deste trabalho. De fato, após a descrição de um aumento no crescimento tumoral dos animais CAD, questionou-se sobre a atividade proliferativa que apresentavam estas células tumorais. Na tentativa de elucidar esta questão, foram realizados experimentos *in vitro* que analisaram os efeitos da convivência por 14 dias com o animal inoculado com tumor ascítico de Ehrlich sobre o ciclo celular do mesmo tumor injetado, agora nos CAD. As células do tumor ascítico de Ehrlich provenientes dos animais CAD e analisadas *in vitro* mostraram maior porcentagem de ocorrência da fase G0-G1 (fase de repouso- e produção de enzimas); não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na fase S (síntese de DNA). Observamos, ainda, uma menor porcentagem de células tumorais em fase G2-M (fase de maior metabolismo e duplicação do conteúdo de DNA) nos animais CAD. Nesse sentido, uma redução de G2-M sugere uma diminuição do crescimento de um tumor. Estes resultados parecem, assim, conflitar com o aumento de crescimento tumoral observado em CAD. No entanto, deve-se ressaltar que os dados relativos ao ciclo celular tumoral foram obtidos no 14º dia de inoculação do tumor, momento em que o número de células já era muito grande e,

possivelmente, as células tumorais estavam sujeitas a alterações metabólicas ligadas a um desgaste orgânico, fato que tem grande possibilidade de levar aos resultados agora relatados.

O organismo dos seres humanos e dos animais reage ao estresse ativando um repertório complexo de respostas fisiológicas e comportamentais que, se inadequadas ou excessivas ou, ainda mantidas por tempo prolongado, podem afetar adversamente o próprio comportamento, e várias funções fisiológicas dentre as quais aquelas ligadas às respostas imune/inflamatórias. Após comprovarmos a existência de alterações na imunidade inata e adquirida de CAD resolvemos analisar a celularidade da medula óssea, a qual foi maior nos animais do grupo experimental em relação aos seus controles (CAS). A medula óssea é constituída por células de tecido hemopoético, células estromais e células acessórias em associação com as macromoléculas da matriz extracelular (MEC), formando uma estrutura altamente organizada e ricamente vascularizada. Os sinusóides estão separados das células hemopoéticas por uma única camada de células endoteliais e por uma rede de células reticulares que atua como suporte para a formação dos cordões hemopoéticos. A medula óssea é um reservatório de células tronco hemopoéticas, e sua organização estrutural fornece um microambiente adequado para a proliferação e diferenciação de células precursoras e também para a liberação de células sanguíneas diferenciadas para a circulação (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000; HUTCHISON, DAVEY, 1996). Os presentes achados podem, então, indicar uma diminuição da liberação de células da medula óssea. A migração das células da medula para os tecidos é subordinada aos efeitos de hormônios como as catecolaminas. Nesse sentido, sabe-se que o aumento de atividade do SNAS estimula a liberação de noradrenalina produzindo retenção de células na medula (PANES et al., 1999; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008) o que poderia ter ocorrido no presente experimento (vide adiante).

Na sequência das análises realizamos o mielograma de animais CAD1, CAD2 e CAD3; mostramos maior presença da população de blastos e redução significativa tanto série eritrocítica, como também neutropenia de neutrófilos em forma de anel no grupo CAD em relação aos animais mantidos em colônia. Avaliação da série linfocítica revelou linfopenia significativa no grupo CAD em relação aos grupos CAS e Colônia. Quanto à contagem relativa de células da medula observamos um aumento significativo da população de blastos nos animais do grupo CAD em relação ao grupo CAS; no entanto, os megaacidófilos estavam diminuídos no grupo CAD em relação aos do grupo Colônia, não havendo alteração numérica nas outras linhagens: Estes resultados indicativos de queda de resistência orgânica, permitiram vários questionamentos a respeito da causa destas alterações, em especial, tentativas de explicação. Foram, assim realizados novos experimentos *in vitro* que analisaram

os efeitos da convivência por 14 dias com o animal inoculado com tumor ascítico de Ehrlich sobre o ciclo celular da medula óssea.

O perfil do ciclo celular de cada população celular corresponde ao estágio funcional delas: as células tronco mais primitivas estão em estado quiescente (em G0 do ciclo), a maioria das células tronco que estão se auto-renovando estão em G1 e ciclaram lentamente, já os progenitores comissionados estão ativamente no ciclo de efetiva expansão (FUKURAWA, 1998). As células da medula óssea de CAD foram analisadas *in vitro* através da quantificação de DNA e RNA, pela DNAploidia por citometria de fluxo (HSIEH et al., 2002). Observamos que a medula óssea dos animais CAD continha uma maior porcentagem de células em fase G0-G1, considerada então como em estado de repouso do ciclo celular; não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na fase S, porém verificamos uma menor população de células em fases proliferativa, fases G2/M, em relação aos animais do grupo CAS. Estes achados concordam com a suposição prévia de que haveria uma possível alteração na capacidade de proliferação e de maturação das células progenitoras. Em seu conjunto, os dados de proliferação na medula sugerem menor funcionamento (menor número de divisões mitóticas) o que poderia também estar ligado a uma diminuição da resistência orgânica a desafios imunes como, por exemplo, ao próprio tumor de Ehrlich. Lembra-se que este tumor desenvolveu mais em CAD. A existência destas alterações levou a novo questionamento; agora, sobre o que desencadearia estas alterações no organismo de CAD. Assim desenvolvemos em um primeiro momento um experimento onde avaliamos a relevância da formação dos grupos.

Sabemos que o animal que convive com o doente apresenta alterações na atividade de burst oxidativo e fagocitose de neutrófilos (ALVES et al., 2006). Após um estímulo biológico como, por exemplo a fagocitose de bactérias, estas células (neutrófilos) produzem espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e o radical hidroxila, num processo intracelular rico em consumo de oxigênio e, por isso, conhecido como *burst* oxidativo (ELSBACH, WEISS, 1983). Observamos em nosso trabalho que animais que conviveram em trios (dois componentes injetados com tumor de Ehrlich, e um saudável CAD3) apresentaram uma admirável redução tanto do *burst* oxidativo basal como o *burst* oxidativo induzido por PMA ou por *Staphylococcus aureus*, assim como da porcentagem fagocitose de neutrófilos sanguíneos em relação a animais mantidos em trios (dois componentes saudáveis, um deles a CAD2 e um injetado com tumor de Ehrlich) e, também em relação ao nosso tradicional grupo experimental (CAD1). Este fato pode ser interpretado como decorrente de uma menor atividade basal dos neutrófilos de CD3. Se assim for, este fato

pode ter repercutido na menor capacidade destas células em responder ao estímulo tumoral daí a menor sensibilidade dos companheiros de doentes ao crescimento tumoral. Porém, vale lembrar, que os mecanismos celulares desencadeados por bactérias e por células tumorais no organismo não são os mesmos (MOSS; BLASER, 2005).

Nossos resultados mostraram, então, em relação aos animais que conviveram com o doente que quanto maior o número de doentes no grupo maiores os resultados sobre a esfera imune inata, sendo o oposto também real, isto é, quanto maior o número de saudáveis no grupo, mais sutis as alterações desencadeadas. Estes achados são surpreendentes e da maior importância uma vez que na maior parte das vezes, os autores sequer se preocupam quando de seus experimentos em separar os animais submetidos a manipulações experimentais uns dos outros; isto é, embora procurem separar fisicamente animais de um grupo controle de outro chamado experimental, não cuidam de separar os experimentais dentro do mesmo grupo, nem de alojá-los em ambientes separados. Neste sentido, e à luz do que se discute, a existência de variações individuais permite sugerir que um mesmo procedimento experimental não vá atuar de maneira igual em todos eles e, desta forma, não apenas o comprometimento do estado de higiene dos animais, mas também comunicações emocionais entre eles poderiam interferir com os resultados obtidos. Mais que isto, estímulos visuais, olfativos e/ou auditivos provenientes de animais de um grupo experimental poderiam, até mesmo, interferir com variáveis experimentais a serem mensuradas em animais do grupo controle, se estes forem mantidos próximos dos experimentais (ALVES e PALERMO-NETO, 2006).

Nos últimos anos, os efeitos de estressores de natureza psicológica têm sido muito analisados em animais de laboratório. Novamente nossos resultados mostraram ausência de diferenças estatísticas entre os níveis plasmáticos de corticosterona entre CAD e CAS; contudo, desta vez as análises foram feitas em animais conviveram por 8 ou por 14 dias com doentes e desafiados ou não por contenção física. Relevante dizer que repetimos este estudo uma vez que nos experimentos que realizamos anteriormente a convivência havia sido por 11 dias, e suspeitamos que as alterações de corticosterona poderiam ter ocorrido antes; optamos, também, por desafiar os animais utilizando um modelo de contenção física para verificar a integridade do eixo HPA. A técnica de imobilização é conhecida como um bom modelo de indução de estresse físico (DONG et al., 2004; TAHERA et al., 2006). Mesmo assim, embora os níveis de corticosterona dos animais contidos tenham aumentado, não foram observadas diferenças consistentes nos níveis de corticosterona entre os animais CAS e CAD. Quer nos parecer, assim, que o estresse gerado pela convivência não tenha modificado a atividade do eixo HPA de CAD. Outros trabalhos que se valeram de estressores psicológicos também

mostraram ausência de alterações nos níveis de corticosterona (BARTOLOMUCCI et al., 2010; YEE et al., 2010; JECKEL et al., 2010). Assim, é de se supor que outra explicação que não os níveis de corticosterona sérica, justifiquem os achados imunes de CAD, acima relatados.

O sistema nervoso simpático, em conjunto com o eixo HPA, integra a maior via de comunicação entre o cérebro e o sistema imune. As catecolaminas, produtos finais do SNS (Sistema Nervoso Simpático), auxiliam na manutenção da homeostase do organismo como reguladoras do metabolismo, batimento cardíaco, tônus dos vasos sanguíneos e termogênese. Historicamente a ativação do SNS e liberação de catecolaminas, em resposta ao estresse, está associada com resposta de “fuga ou luta” (KOHM, SANDERS, 2001). Até pouco tempo atrás, as catecolaminas, eram consideradas apenas como imunossupressoras. Entretanto, sabe-se hoje que os efeitos das catecolaminas nas células do sistema imune são moduladores, isto é, podem ser estimulantes ou supressores. O perfil deste efeito dependerá, dentre outros fatores, dos níveis destes neurotransmissores presentes em um dado momento na circulação sanguínea e/ou nos tecidos (ELENKOV et al., 2000).

A noradrenalina pode modular a atividade celular por se ligar a receptores adrenérgicos em vários tipos celulares. A família dos β -adrenoreceptores contém três subtipos: β_1 , β_2 e β_3 (KOM, SANDERS, 2001). Células T, NK, monócitos CD14⁺ e células B expressam β_2 AR (ELENKOV et al., 2000; KOM, SANDERS, 2000). A ligação de noradrenalina a esses receptores leva ao aumento de AMPcíclico intracelular, culminando com vários efeitos intracelulares característicos (RAMER-QUINN et al., 1997). Existem também receptores α_1 e α_2 que são encontrados em células B, T, sendo que os adrenoceptores α_2 também estão presentes em células NK e macrófagos; no geral, estes receptores α se subdividem em duas classes (α_1 A, α_1 B, α_1 C; α_1 D; α_2 A, α_2 B, α_2 C) (HASKO, SZABÓ, 1998). Sabe-se serem os α_2 AR expressos em células mononucleares, onde parecem desempenhar efeitos modulatórios no perfil de citocinas produzidas *in vivo* e *in vitro* (HASKÓ, SZABÓ, 1998).

A liberação de NE próxima aos órgãos linfóides ou sua presença na circulação e a subsequente estimulação dos adrenoceptores, em especial dos β_2 AR, levam a uma série de efeitos nas células imunes. Alguns modelos animais mostraram que NE inibe a proliferação de células T pela estimulação de β_2 AR, o que pode ser explicado pelo aumento dos níveis intracelulares de AMPcíclico que inibiria a produção de IL-2, um importante estímulo proliferativo (ELENKOV et al., 2000; KOHM, SANDERS, 2001; WHALE et al., 1999).

Além disso, a noradrenalina diminuiu a expressão de IL-2R nas células T CD4+, via estimulação dos β_2 AR (KOM, SANDERS, 2001).

O isolamento social representa uma forma de estresse psicológico que produz ativação simpática. Gavrilovic investigou as alterações na expressão gênica e nos níveis protéicos da bio-síntese das enzimas catecolaminérgicas tirosina hidroxilase (TH), dopamina-beta-hidroxilase (DBH) e metil-fenilalanina transferase (PNMT) na medula da adrenal de roedores mantidos em grupos controle ou cronicamente estressados (por isolamento social de 12 semanas). O autor mostrou que os animais cronicamente estressados apresentavam uma expressão significativamente menor das enzimas de síntese catecolaminérgica, concluindo que o estresse psicológico influenciaria a expressão gênica e os níveis destas enzimas; sugeriu ainda, que teria ocorrido uma adaptação na síntese de catecolaminas induzidas nos animais pelo estresse crônico (GRAVILOVIC, 2010).

KVETNANSKY (2004) após aplicação de um estresse crônico em ratos encontrou redução nos níveis plasmáticos de noradrenalina e de adrenalina quando comparados com dados provenientes de animais aos quais se fez aplicação aguda do mesmo estresse, concluindo pela sugestão de uma provável ocorrência de uma adaptação no organismo animal. Nesse sentido, sabe-se ser a resposta adrenérgica ao estresse desencadeada por um mecanismo regulatório central ou por um mecanismo local relacionado à regulação da transcrição de genes conexos à bio-síntese de enzimas catecolaminérgicas na adrenal e/ou no terminal simpático. De fato, mostrou-se que diferentes estímulos estressores alteraram de forma diferenciada a sensibilidade dos neurônios noradrenérgicos em áreas centrais ligadas às respostas aos estímulos estressores. Nesse contexto, diversos fatores de transcrição já foram arrolados como envolvidos na regulação dos níveis de RNA mensageiro para síntese das enzimas tirosina hidroxilase e fenil-etanolamina-N-metiltransferase em áreas do SNC de roedores (SABBAN, KVETNANSKY, 2001) durante situações de estresse. Quanto ao mecanismo local, sabe-se ser ele deflagrado de diferentes formas na dependência da duração, frequência, e da especificidade do agente estressor, isto, é, o tipo da sinalização e/ou os fatores de transcrição do RNAm locais são também ativados de forma diferenciada em função do tipo e duração da estimulação.

Talvez seja necessário comentar que, no contexto do presente trabalho, estresse não é compreendido apenas como um estímulo ou como uma resposta, mas como um processo. Verificamos uma redução nos níveis plasmáticos de adrenalina e de noradrenalina após os 14 dias de convivência com o animal doente; estes resultados nos permitem supor que caso tenha ocorrido uma adaptação na expressão e/ou na atividade das enzimas na síntese de

catecolaminas no SNC, na medula da adrenal e/ou em terminações simpáticas induzidas pela convivência prolongada com o doente, no momento do estudo (ED14) deveria ter ocorrido. uma exaustão destes sistemas em função de ter sido a estimulação muito intensa e prolongada. De fato, observamos no hipotálamo resultados semelhantes aos encontrados na periferia; verificamos no ED14, redução dos níveis de noradrenalina e aumento daqueles de MHPG e do *turnover*. Neste contexto, a magnitude da depleção dos níveis de noradrenalina no SNC após um estímulo estressor já foi correlacionada inversamente com as alterações por ele produzidas em animais de laboratório; isto é, quanto menores os níveis de noradrenalina no SNC maiores foram as respostas ao estímulo estressor (VOGEL, JENSH, 1988; GLAVIN et al., 1991; WALTER et al., 2005). Assim, os resultados do presente trabalho em relação à noradrenalina e adrenalina plasmática, e a noradrenalina e MHPG hipotalâmicas são coerentes com aqueles de literatura e permitem inferir presença de estresse intenso e prolongado nas companheiras dos animais doentes do presente trabalho.

Resultados interessantes de nosso experimento vieram da análise dos dados obtidos no labirinto em T, em especial quando em um dos braços do equipamento se colocou o animal companheiro doente e no outro um animal estranho. Os animais do grupo CAS não mostraram preferência na escolha por zonas; porem, os animais do grupo experimental (CAD) permaneceram menos tempo na zona em que estava a companheira doente, preferindo, ao invés, a estranha saudável. Quer nos parecer, assim, que esta convivência com a doente seria aversiva. Se pensarmos em termos evolutivos, e para a sobrevivência da espécie não seria interessante para um animal permanecer em um ambiente em que se encontra um conspecífico severamente doente. Assim, quer nos parecer que alterações observadas possam ser decorrência de uma estratégia utilizada pelo animal companheiro do doente (CAD) e destinada à manutenção da sobrevivência e perpetuação de sua vida e de sua espécie. Diversos trabalhos mostram como a busca pela sobrevivência da espécie está relacionada ao instinto animal (RAUSER, MUELLER, ROSE, 2003; FOERSTER et al., 2003; GOWATY, 2003; GOWATY, 2008).

Feli e Hyde (1978) visando avaliar o comportamento de roedores, desenvolveram um modelo de estudo de interação social medindo o tempo em que os animais permanecem relacionando-se, isto é, cheirando-se, limpando-se e seguindo o parceiro. De acordo com File e Seth, (2003) o isolamento social exarceba os episódios de interação social. Com base neste conceito, resolvemos verificar se o animal do grupo experimental (CAD) passava por situação similar à de um isolamento social. De fato, e como já comentado, os animais doentes

isolavam-se à medida que ocorria a progressão da doença. Assim, após os 14 dias de convivência com o doente, colocamos o animal CAD para interagir com um outro saudável. Nossos resultados mostraram que os animais CAD apresentavam, em relação a CAS um admirável interesse pela interação social, apresentando um aumento significativo no perseguir, na frequência de passar sobre ou sob e no farejar, sendo o valor deste último parâmetro três vezes maior que o registrado no grupo controle (CAS). Estes resultados nos chamaram a atenção, pois os animais que conviveram com o doente apresentavam uma insistente busca por interação social, destacando-se neste contexto a constante procura por farejar o outro. Suspeitamos, na ocasião que o ato constante de farejar estivesse relacionado ao odor do parceiro, uma das formas mais utilizadas de comunicação animal. De fato, o odor tem um papel predominante na comunicação intra-específica para uma variedade de espécies animais (ARAKAWA et al., 2008). Para comprovar nossa hipótese desenvolvemos alguns experimentos e até mesmo um equipamento.

O conhecimento do tipo de mecanismo que torna possível a comunicação entre os animais tem sido objetivo de estudo de muitos pesquisadores. Foram analisados neste trabalho diferentes estímulos sensoriais entre eles o visual, o auditivo, o olfatório ou químico e o tátil (COYNE, ORR, 2004; PTACEK, 2000; SEBEOK, 1965). Os presentes resultados sugerem que a comunicação auditiva parece não ser importante para as alterações neuroimunes induzidas pela convivência com uma parceira doente; de fato e como já comentado, não se observaram chamados quer nas camundongas injetadas com tumor quer em suas companheiras (CAD). A não ser, no entanto, que se considere relevante a ausência de chamados no animal injetado com o tumor do grupo experimental, pois estas vocalizações continuaram a acontecer durante as interações sociais dos animais no grupo controle.

A relevância do sentido tátil para o comportamento e para as mudanças na imunidade inata foi testada no experimento 15. Assim, quando as camundongas CAD₁ foram fisicamente separadas de suas companheiras doentes, algumas mudanças comportamentais em relação às camundongas CAD₂ foram observadas no campo aberto. Assim, as camundongas CAD₁ apresentaram um aumento nos valores de locomoção total, locomoção na zona tigmotática, e na velocidade total na arena do campo aberto em relação às camundongas CAD₂, ou seja, mantidas juntas. Um pequeno, mas significativo aumento de locomoção na zona tigmotática do campo aberto pode sugerir, à primeira vista, um aumento dos níveis de ansiedade. De fato, os animais que se movem mais na zona tigmotática são tidos como apresentando um alto nível de ansiedade (Lister, 1987; Pellow e colaboradores, 1985). Os dados gravados do labirinto em cruz elevado apóiam esta hipótese desde que as camundongas CAD₁

apresentaram uma menor porcentagem de entradas nos braços abertos do aparelho em relação às camundongas CAD₂. Entretanto, não foram encontradas diferenças significantes entre as camundongas CAD₁ e CAD₂ nos braços fechados do aparelho, assim como na porcentagem de tempo gasto pelas camundongas nos braços abertos, fatos que não eram de se esperar de animais que apresentassem altos níveis de ansiedade. A ansiedade foi descrita como sendo capaz de aumentar a exploração dos animais nos braços fechados e, ao mesmo tempo, diminuir o tempo de atividade nos braços abertos. Neste sentido, sugerimos anteriormente (MORGULIS et al., 2004) que os efeitos induzidos pela coabitação de camundongas com as companheiras doentes no labirinto em cruz elevado poderiam ser confundidos com aqueles induzidos por esta condição na locomoção, um fato muito descrito para os fármacos psicoestimulantes (DAWSON et al., 1995; LISTER, LINNOILA, 1991). De fato, o aumento nos parâmetros de locomoção das camundongas CAD₁ poderia ser consequência de um aumento nos níveis de *arousal* imposto pela coabitação com o animal doente e/ou pelo isolamento na gaiola moradia. Contudo, a locomoção no campo aberto de camundongas CAD₂ (mantidas juntas) embora maior que a de CAS₂ e CAS₁ (controles separados ou não por um acrílico) foi menor que a locomoção das camundongas CAD₁ (separadas por um acrílico), a qual por sua vez foi maior que a locomoção daquelas dos grupos CAS₁ e CAS₂. É possível pois, sugerir que a separação física induziu isolamento social que teria interferido, aumentando, a locomoção, dos animais; quando associado à convivência com o doente este isolamento teria aumentado ainda mais a locomoção fazendo que os animais CAD₁ apresentassem valores de locomoção maiores que os dos outros dois grupos (CAD₂, CAS₁ e CAS₂).

Camundongos são animais sociais e são profundamente influenciados pela interação social. Eles possuem motivos essenciais para manter suas relações sociais incluindo-se aqui a hierarquia social e o reconhecimento por parte do grupo (BAUMEISTER, LEARY, 1995). Sabe-se que o isolamento e a falta de contato na gaiola ativam o sistema nervoso central (SNC) (MOYER, 1976). Assim, o aumento da atividade das camundongas CAD em suas gaiolas moradia bem como o aumento de locomoção no campo aberto poderiam ser indicativos de ativação do SNC imposta pela ausência de contato social e/ou por outros sinais emitidos pelas companheiras doentes. A diminuição dos níveis e o aumento do *turnover* hipotalâmico de noradrenalina (NE) já descritos anteriormente em camundongas CAD reforçam esta premissa uma vez que a atividade da NE no SNC é indicativa de *arousal* (LEVINE et al., 1990; GALEF, CLARK, 1971). Assim, os presentes dados comportamentais

em CAD₁ e CAD₂ estão de acordo com aqueles relatados anteriormente (MORGULIS et al., 2004; ALVES et al., 2006; ALVES et al., 2007).

Como já descrito (Alves et al., 2006) os presentes dados de neutrófilos também mostraram alterações induzidas pela condição de coabitação com um doente. Não obstante, e novamente, não foram encontradas diferenças para o *burst* oxidativo basal, sugerindo este fato que a ativação de neutrófilos é necessária para o aparecimento de mudanças induzidas pela coabitação com a parceira doente. De fato, observamos uma diminuição na porcentagem de neutrófilos realizando fagocitose em camundongas CAD₂. Curioso, foi o fato de que a intensidade destas alterações diminuíram pela ausência de contato físico entre os animais, desde que a porcentagem de fagocitose das camundongas CAD₁ (separadas por um acrílico) foi diferente, sendo maior, que a porcentagem daquela das camundongas CAD₂ (mantidas juntas). Uma tendência semelhante foi observada para a intensidade de fagocitose assim como para o *burst* oxidativo induzido por *S. aureus*. Porém, o *burst* oxidativo de neutrófilos após PMA não apresentou diferença entre os grupos, sugerindo uma diminuição específica da resposta de neutrófilos à bactéria.

Em seu conjunto, os presentes dados de neutrófilos sugerem uma diminuição da resistência do animal quando exposto à convivência com a companheira doente. Este fato já foi descrito em nossos trabalhos anteriores (ALVES et al., 2007; MORGULIS et al., 2004). Portanto, parece-nos que o contato físico entre as camundongas CAD e suas companheiras doentes seja, de alguma forma, relevante para a manifestação desta alteração. Considerando-se que não foram encontradas diferenças entre as camundongas CAS₁ e CAS₂, parece-nos possível supor que o isolamento na gaiola *per se* não foi o fator central responsável pelas alterações observadas entre as camundongas CAD₁ e CAD₂, mas sim a presença ou a ausência de contato físico com a camundonga doente. O contato físico foi descrito sendo relevante para indução da aversão pelo sabor (GALEF, 1971).

A comunicação entre os animais é descrita quando sinais emitidos por um indivíduo mudam o comportamento e/ou a fisiologia de outro indivíduo (SCHLEIDT, 1973); assim, e como uma decorrência sugerimos que as alterações neuroimunes agora descritas em camundongas que conviveram com a companheira doente tenham sido consequência da existência de comunicação entre elas. Têm-se mostrado situações em que animais doentes produzem respostas comportamentais e fisiológicas em conspecíficos (CURNO et al., 2009). Iraola e colaboradores (IRAOLA et al., 1995) observaram a influencia de uma situação na qual um animal acompanhava um parceiro receber uma substancia tóxica através da água de bebida; eles mostraram que ratos que conviviam com um companheiro intoxicado, bebiam

menos água que os animais do grupo controle. No entanto, quando o contato físico não era permitido estas alterações de consumo não ocorriam. Contudo, o que dizer sobre as outras formas de comunicação como olfativa e/ou química ou visual na vigência deste modelo experimental? Na tentativa de determinar a relevância destas modalidades sensoriais para os presentes achados, bloqueamos a participação da visão e do odor colocando barreiras físicas.

Dados provenientes do experimento dezessete mostraram que o odor também é relevante para a manifestação de alterações induzidas pela coabitação com o animal doente. De fato, quando as camundongas foram privadas do odor da companheira doente foram detectadas diferenças no *burst* oxidativo e na fagocitose de neutrófilos. Assim, camundongas CAD₁ (grupo onde a passagem de odor era permitida) apresentavam uma redução do *burst* oxidativo estimulado por *S. aureus* ou por PMA, mudanças apresentadas na atividade de neutrófilos quando comparadas com suas conspecíficas CAD₂ que não recebiam o odor das companheiras doentes. Já foi descrita a existência de sinalização química através de produtos excretados pela urina e por exsudatos glandulares; esta comunicação é um importante componente de relações sociais e reprodutivas (BEAUCHAMP, YAMAZAKI, 2003; BRENNAN, ZUFALL, 2006).

Descreveu-se, também, transferência social de informações sobre o potencial de toxicidade de uma comida entre os animais através de estímulos olfatórios, sem necessidade de experiência previa (BROAD, KEVERNE, 2008). Estudos conduzidos usando-se a aversão a sabores descreveram que ratos podem influenciar-se mutuamente através da urina (LÉON, 1974) ou de outros sinais olfatórios (GALEF, WHISKIN, 1995).

Bímová e colaboradores (2009) sugeriram que sinais emitidos via urina são os candidatos mais óbvios para o reconhecimento de indivíduos, assim como para sinalização da presença de estranhos. Além disto, tem sido descrito o uso de sinais químicos na formação e na manutenção de relações sociais (HURST, 1990), sendo a olfação a principal via através da qual os animais detectam e possivelmente identificam outros animais. Neste sentido, camundongos e outros roedores usam os odores em diferentes contextos sociais, agonísticos e de defesa, fornecendo informações para o ajuste de comportamentos durante as interações subseqüentes (BROWN, MACDONALD, 1985; STAPLES et al., 2008). Neste contexto, os odores influenciam as interações sociais entre os roedores através do sistema olfatório juntamente com o sistema vomeronasal (HALPERN, MARTINEZ-MARCOS, 2003). De fato, a cavidade nasal de roedores o órgão vomeronasal e o epitélio olfatório contem dois grupos neuronais distintos para as funções quimio sensoriais, uma para os fero-hormônios e outra para os odores, vide figura 3 (DULAC, WAGNER, 2006).

Considerando-se os dados ilustrados pelas Figuras 42 e 43 parece possível sugerir que os sinais visuais não são relevantes para as presentes alterações imunes. De fato, tanto as camundongas CAD₁ (grupo onde a passagem de odor era permitida) e CAD₂ (grupo privado do odor da companheira) foram capazes de ver suas companheiras doentes e apenas as camundongas CAD₁ apresentaram uma diminuição na atividade de neutrófilos. Mesmo assim, desenvolvemos um experimento para melhor analisar esta possibilidade. Como representado na Figura 45, foi encontrada uma diferença significativa entre as camundongas CAD₁ (com privação visual da companheira doente, mas com passagem de odor) e CAD₂ (com privação visual e do odor da companheira doente), mas não entre as camundongas CAD₁ e as camundongas mantidas juntas (CAD₃). Assim, os sinais visuais podem ser descartados, e novamente o odor passa a ser visto como o mecanismo mais efetivo na comunicação usada pelas camundongas do presente experimento. Aliás, a privação visual por si própria (CAD₁) não reverteu à atividade de neutrófilos quando os dados deste grupo foram comparados com aqueles das camundongas que foram mantidas juntas (CAD₃). Como pode ser visto nas Figuras 42, 43 e 45, os dados dos grupos CAD₁ (grupo onde a passagem de odor era permitida) e CAD₂ (grupo privado do odor da companheira doente) seguiram uma direção similar, independente da presença ou da ausência dos sinais visuais. Desta forma, é possível que a sinalização química da camundonga injetada com tumor através de produtos químicos excretados pela urina ou por exsudatos glandulares seja o fator central responsável pelos presentes achados.

Entretanto, e ao contrário do que foi descrito no experimento 16, o contato físico não foi relevante para as alterações descritas na atividade de neutrófilos induzidas pela coabitação no experimento 18 (Figure 45). De fato, neste experimento não foram encontradas diferenças entre as camundongas CAD₁ (mantidas separadas) e CAD₃ (mantidas juntas). Diferenças das metodologias utilizadas nestes experimentos parecem justificar a aparente discrepância e ressaltar a relevância dos sinais do odor. Assim, no experimento 16, uma placa de acrílico perfurada foi utilizada para separar os animais permitindo a comunicação olfatória; e a tampa da gaiola era uma grade que permitia a volatilização do odor. No experimento 18, as gaiolas das camundongas que conviveram com a outra doente estavam completamente fechadas (veja a Figura 6) e a bomba de vácuo usada, forçava a passagem do odor exalado pela camundonga injetada com o tumor para o compartimento da camundonga CAD, sem perda dos componentes voláteis.

Finalmente, para comprovarmos se nossos estudos estavam no sentido certo, resolvemos fazer o caminho inverso, pois utilizamos também de resultados de

comportamento, bioquímica e neuroquímica, até então já conhecidos no nosso modelos de estudo, e verificamos que a ausência do odor da companheira doente era um fator capaz de reverter todas as alterações até então observadas (Tabelas 19, 20, 21, 22 e 23).

Neste sentido, sabendo da sensibilidade dos camundongos para distinguir o odor de uma companheira injetada com tumor, fomos à literatura e encontramos trabalhos que comprovam serem tumores capazes de produzir compostos orgânicos voláteis nos seus portadores, que são liberados para atmosfera, por exemplo, através da urina e do suor (HORVATH et al., 2009; PHILLIPS et al., 1999; YAMADA et al., 1992). Alguns destes compostos voláteis têm odores distintos e, ainda que presentes em pequenas quantidades poderiam ser detectados por animais, pois eles possuem uma excepcional sensibilidade olfatória (GORDON et al., 2008; SCHOON, DE BRUIN, 1994).

Camundongos comunicam-se primeiramente usando a via olfatória (PETRULIS, 2009; ARAKAWA et al., 2008) e os sinais acústicos (MOLES et al., 2007; PORTFORS, 2007; NUNNES, WHITNEY, NYBY, 1979). A marcação de cena através da deposição do feromônio da urina em locais estratégicos é usado pelos camundongos para demarcar território, reconhecer indivíduos, atrair machos e manter a organização do grupo. Entretanto, estas cenas parecem ser um sinal para machos identificar um sinal negativo, para excluir outros machos adultos de seu território e prevenir um potencial embate (DESJARDINS et al., 1973; HURST, 1990). Estas cenas feitas por camundongos machos podem servir também como um aviso positivo relacionado com a seleção de fêmeas (DAVIES, BELLAMY, 1972; HURST, 1990; MARUNIAK et al., 1974). Hoffmann e colaboradores, 2009 mostraram que camundongos machos emitem um número menor de vocalização ultrassônica quando na presença de urina resfriada (por 24 horas em -20° C) em comparação à urina fresca de fêmeas. Além disto, os machos não são capazes de distinguir se a fêmea é familiar ou estranha se a urina usada para esta investigação for uma urina resfriada. Estes achados indicam que o resfriamento altera a volatilidade dos compostos urinários e por consequência reduz o potencial de emissão de respostas comportamentais dos animais receptores (a emissão da vocalização ultrassônica de machos) e elimina importantes informações sobre o reconhecimento de indivíduos familiares. Teria isto ocorrido na presente situação experimental? De fato, testando animais companheiros do doente dois dias após a morte do seu companheiro observamos que as alterações neuroimunes retornavam ao normal.

Trabalhos de pesquisa apontam que o resfriamento da urina provavelmente esteja relacionado com a desnaturação de proteínas urinárias chamadas “MUPs” que são proteínas urinárias maiores; sabe-se, nesse sentido, que MUPs não voláteis servem como carregadoras

de feromonios voláteis. Se o resfriamento desnatura a proteína urinária, este procedimento pode afetar tanto a quantidade e a composição das MUPs como sua ligação aos feromonios. Estes achados mostram que o odor da urina tem um importante papel na comunicação de camundongos.

Willis e colaboradores (2004), neste sentido, sugeriram que portadores de tumores apresentem compostos voláteis na urina, uma característica do tumor e não de outros efeitos secundários do mesmo, como por exemplo, da presença de inflamação, ou de infecção. Corroboram para estes achados, os testes de cromatografia gasosa e de espectroscopia de massa que revelaram altos níveis de formaldeído, alcanos e derivados de benzenos em pacientes com alguns tipos de câncer (DI NATALE et al., 2003; SPANEL, 1999). Nesse sentido, mostrou-se que a expressão das moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), conhecida como leucócitos antigênicos de humanos (HLA), está alterada em células cancerígenas levando a diferentes tipos de odores que poderiam ser detectados por alguns animais.

Os mamíferos usam os feromonios para avisar sobre uma situação de perigo (WHEELER, 1976; NOVOTNY et al., 1985; SCHAAAL et al., 2003). Esta reação de alarme estimulada pelos feromonios provoca reações de defesa no animal que recebe este estímulo. Em roedores já foram descritos as seguintes alterações: aumento da imobilização, aumento da temperatura corpórea, aumento dos batimentos cardíacos, e alterações na atividade do sistema imune como decorrentes de uma resposta ao estímulo eliciado pelos feromonios (ABEL et al., 1992; KIKUSUI et al., 2001). O choque nas patas é um modelo bem conhecido por eliciar uma estímulo de alarme através de feromonios liberados de roedores (MACKAY-SIM, LAING, 1980; 1981; FANSELOW, 1985); estes feromonios ativam a resposta ao estresse tanto no SNC como em órgãos periféricos, sendo as alterações no SNC sinalizadas por citocinas pró-inflamatórias (SAWCHENKO, SWANSON, 1981; DEAK et al., 2003). Estas citocinas têm um papel de alarme no SNC, sendo relevante que sejam produzidas por ação dos feromonios em roedores. De fato, mostrou-se que a IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória, tem papel proeminente na neuroinflamação (ROTHWELL, LUHESHI, 2000; BASU et al., 2004). Em especial, mostrou-se que animais que recebem um choque nas patas expressam IL-1 β no núcleo paraventricular do hipotálamo, estrutura que medeia à ativação da via noradrenérgica (FORRAY, GYSLING, 2004; JOHNSON et al., 2004). Estes fatos sugerem que em roedores as citocinas pró-inflamatórias tenham um papel ativador no SNC somente na presença de liberação de feromonios. Estariam estas citocinas envolvidas, também, com a

presente situação experimental? Por tudo quanto dissemos, acreditamos que a resposta (que buscaremos adiante) deva ser positiva.

Em seu conjunto, estes dados de literatura e os presentes resultados sugerem que compostos voláteis liberados pelo animal injetado com células do tumor de Ehrlich, provavelmente feita através da urina, tenham sido percebidos pelas camundongas CAD induzindo as alterações neuroimunes agora descritas. Especulamos que o odor da urina de uma companheira doente, seja o estímulo aversivo, que produz estresse na conspecífica fato que, provavelmente seria mediado por uma cascata de citocinas pró-inflamatórias (ARAKAWA et al., 2009; 2010). Assim novos experimentos deverão ser realizados para aprofundar a interpretação dos dados relevantes e interessantes decorrentes da presente situação experimental e de todas as variantes que agregar.

7 CONCLUSÕES

Conclui-se a partir dos resultados obtidos que a convivência com animais doentes em relação aos animais do grupo controle:

- ✓ Produziu no baço uma redução do peso e da celularidade total, assim como da contagem diferencial de blastos, eritrócitos jovens e linfócitos, e também da porcentagem de linfócitos B e T *helper* e da proporção CD4/CD8;
- ✓ Aumentou no baço a atividade citotóxica de células NK;
- ✓ Aumentou, na medula, a celularidade total; na contagem absoluta observamos aumento de blastos e redução de eritrócitos jovens e de linfócitos. Na contagem relativa encontramos aumento dos blastos. No que diz respeito ao ciclo celular, observamos aumento de células em fase G1 e redução daquelas em fase G2;
- ✓ Interferiu com as fases do ciclo celular do tumor de Ehrlich, aumentando aquelas em fase G1 e reduzindo aquelas em fase G2;
- ✓ Aumentou a permanência na zona animal estranho e reduziu o tempo na zona companheira doente em um labirinto em T;
- ✓ Aumentou os níveis de interação social;
- ✓ Não modificou os níveis de corticosterona sérica dos animais desafiados ou não por contenção;
- ✓ Reduziu os níveis de adrenalina e noradrenalina plasmáticos;

Observamos, ainda:

- ✓ Que houve a redução do *burst* oxidativo basal de neutrófilos provenientes de animais que conviveram com dois doentes, e reversão destas alterações quando da convivência de um doente com dois sadios;
- ✓ Que a ausência de contato físico não foi relevante para reverter às alterações induzidas pela convivência;
- ✓ Que a falta de contato visual não foi relevante para reverter as alterações induzidas pela convivência;
- ✓ Que os estímulos olfativos foram relevantes para as alterações induzidas pela convivência sobre o *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos, crescimento tumoral, alterações comportamentais, dosagem plasmática de noradrenalina e de adrenalina e níveis hipotalâmicos de noradrenalina.

Tomados em seu conjunto, pode-se dizer que a convivência por 14 dias com um animal portador de um tumor ascítico de Ehrlich produziu relevantes alterações no comportamento, em parâmetros neuroquímicos e de atividade imune de camundongas. Nossos resultados sugerem que a percepção do odor da doente esteja diretamente relacionada com as alterações relatadas. Mais especificamente postulou-se, neste trabalho, que compostos voláteis liberados pelo animal injetado com células do tumor de Ehrlich, provavelmente feita através da urina, tenham sido percebidos pelas camundongas CAD induzindo as alterações neuroimunes agora descritas. Nesse, sentido, o odor da urina de uma companheira doente, seria percebido como um estímulo aversivo, produzindo estresse nos conspecíficos.

REFERÊNCIAS

ABEL E. L. Alarm substance emitted by rats in the forced-swim test is a low volatile pheromone. **Physiology & Behavior**, v. 50, n. 4, p. 723-727, 1991.

ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, n. 3, p. 167-176, 2000.

ADER R, COHEN N. Behaviorally conditioned immunosuppression. **Psychosomatic Medicine**, v. 37, n. 4, p. 333-340, 1975.

ADES, C.; MENDES, F. D. C. Uma aproximação às vocalizações do muriqui (*Brachyteles arachnoides*). **Temas em Psicologia**, v. 3, p. 135-149, 1997.

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, p. 62-70, 2008.

ALVES G. J., PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação: influências do sistema imune sobre o sistema nervoso central. **Revista Neurociências da Universidade Federal de São Paulo**, *no prelo*, 2010.

ALVES G. J., PALERMO-NETO, J. Sobre a comunicação dos animais. **Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária**, *no prelo*, 2010.

ALVES G. J., VISMARI L., LAZZARINI R.; MERUSSE J. L. B., PALERMO-NETO J. Odor cues from tumor-bearing mice induces neuroimmune changes. **Behavior, Brain, Research**, *no prelo*, 2010.

ALVES G. J., QUINTEIRO-FILHO W., PALERMO-NETO J. Neuroimunomodulação e a sua relevância em Medicina Veterinária. **Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária**, v.46, p. 19-26, 2009.

ALVES G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 4, p. 363-369, 2007.

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. 172-179, 2006.

ALVES G. J.; PALERMO-NETO, J. Convivência com doentes: reflexos neuroimunes. **Neurociências**, v. 3, n. 2, p. 93-97, 2006.

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.

ANDY, S.; STILL, R. **Birds, mammals and reptiles of the galapagos islands**: an identification guide. **2. ed. rev.** Yale University Press, 2006, p. 168.

ARAKAWA, H.; BLANCHARD, D. C.; ARAKAWA, K.; DUNLAP, C.; BLANCHARD, R. J. Scent marking behavior as an odorant communication in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1236-1248, 2007.

ARAKAWA, H.; ARAKAWA, K.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Scent marking behavior in male C57BL/6J mice: sexual and developmental determination. **Behavioural Brain Research**, v. 182, n. 1, p. 73-79, 2007.

ARAKAWA H, ARAKAWA K, BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ. A new test paradigm for social recognition evidenced by urinary scent marking behavior in C57BL/6J mice. **Behavioural Brain Research**, v.190, n.1, p. 97-104, 2008.

ARAKAWA H., ARAKAWA K., DEAK T. Acute illness induces the release of aversive odor cues from adult, but not prepubertal, male rats and suppresses social investigation by conspecifics. **Behavioral Neuroscience**, v.123, n. 5, p. 964-978, 2009.

ARAKAWA H., ARAKAWA K., DEAK T. Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: a role for inflammatory processes. **Hormones and behavior**, v. 57, n.3, p.330-341, 2010.

ARONOV, D.; ANDALMAN, A. S.; FEE, M. S. A specialized forebrain circuit for vocal babbling in the juvenile songbird. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 630-634, 2008.

ARVOLA, A. Vocalization in the guinea-pig, *Cavia aperea f. porcellus* L., **Annales Zoologici Fennici**, v. 11, p. 1-96, 1974.

BARNETT, S. A. Behaviour of wild rats in the laboratory. **Medical & Biological Illustration**, v. 6, n. 2, p. 104-111, 1956.

BARNETT, S. A. Exploratory behaviour. **British Journal of Psychology**, v. 49, p. n. 4, p. 289-310, 1958.

BARFIELD, R. J.; GEYER, L.A. Sexual behavior: ultrasonic postejaculatory song of the male rat. **Science**, v. 176, n. 41, p. 1349-1350, 1972.

BARFIELD, R. J.; GEYER, L. A. The ultrasonic postejaculatory vocalization and the postejaculatory refractory period of the male rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 88, n. 2, p. 723-734, 1975.

- BARKER, J. F.; HERMAN, W. S. Effect of photoperiod and temperature on reproduction of the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 22, n. 12, p. 1565-1568, 1976.
- BARTOLOMUCCI A., PALANZA P., PARMIGIANI S., PEDERZANI T., MERLOT E., NEVEU P. J., DANTZER R. Chronic psychosocial stress down-regulates central cytokines mRNA. **Brain Research Bulletin**, v.62, n. 3, p. 173-178, 2003.
- BARTOLOMUCCI A., CAROLA V., PASCUCCHI T., PUGLISI-ALLEGRA S., CABIB S., LESCH K. P., PARMIGIANI S., PALANZA P., GROSS C. Increased vulnerability to psychosocial stress in heterozygous serotonin transporter knockout mice. **Disease Models & Mechanisms**, no prelo, 2010.
- BARTON, R. Animal communication: do dolphins have names? **Current Biology**, v. 16, n. 15, p. R598-R599, 2006.
- BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, n. 2, p. 69-77, 2003.
- BASU A., KRADY J.K., LEVISON S.W. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78, n. 2, p. 151-156, 2004.
- 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.
- BEARHOP, S.; FIEDLER, W.; FURNESS, R.W.; VOTIER, S. C.; WALDRON, S.; NEWTON, J.; BOWEN, G. J.; BERTHOLD, P.; FARNSWORTH, K. Assortative mating as a mechanism for rapid evolution of a migratory divide. **Science**, v. 21, n. 310, p. 502-504, 2005.
- BEAUCHAMP G. K., YAMAZAKI K. Chemical signalling in mice. **Biochemical Society transactions**, v. 31, p. 147-151, 2003.
- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 2, p. 141-149, 2001.
- BEOLCHINI F.; DUPRE E.; LOY A. Territorial behavior of *Talpa romana* in two different habitats: food resources and reproductive needs as potential causes of variation. **Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 61, n. 4, p. 193-201, 1996.
- BEDNARSKI D. Caring for caregivers. **Nephrology Nursing Journal: Journal of the American Nephrology Nurses' Association**, v. 36, n. 4, p. 369- 417, 2009.
- BERRYMAN, J. C. Guinea pig vocalizations, their structure, causation and function. **Zeitschrift für Tierpsychologie**, v. 41, p. 80-106, 1976.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.

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.

BÍMOVÁ B., ALBRECHT T., MACHOLÁN M., PIÁLEK J. Signalling components of the house mouse mate recognition system. **Behavioural Processes**, v. 80, n. 1, p. 20-27, 2009.

BJÖRKQVIST K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiology & Behavior**, v.73, n.3, p. 435-42, 2001.

BORELLI, K. G.; BLANCHARD, D. C.; JAVIER, L. K.; DEFENSOR, E. B.; BRANDÃO, M. L.; BLANCHARD, R. J. Neural correlates of scent marking behavior in C57BL/6J mice: detection and recognition of a social stimulus. **Neuroscience**, v. 162, n. 4, p. 914-923, 2009.

BORGIA, G. Sexual selection and the evolution of mating systems. In: BLUM, M. S.; BLUM, N. A. (Ed.). **Sexual selection and reproductive competition in insects**. New York: Academic Press, 1979. p. 19-80.

BOWERS, J. M.; ALEXANDER, B. K. Mice: individual recognition by olfactory cues. **Science**, v. 158, n. 805, p. 1208-1210, 1967.

BRASIL NETO, J. P. Uma interação promissora entre a neurociência básica e a terapêutica em psiquiatria. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 2, p. 61, 2001.

BRENNAN P. A, ZUFALL F. Pheromonal communication in vertebrates. **Nature.**, v.444, n. 7117, p. 308-315, 2006.

BROAD K. D., KEVERNE E. B. More to pheromones than meets the nose. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 128-129, 2008.

BROUG-HOLUB, E.; PERSONS, J. H.; SCHORNAGEL, K.; MASTBERGEN, S. C.; KRAAL, G. Effects of stress on alveolar macrophages: a role for the sympathetic nervous system. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 19, n. 5, p. 842-848, 1998.

BROWN, C.; LALAND, K.; KRAUSE, J. **Fish cognition and behavior**. London: Blackwell Scientific, 2006. p. 328.

BROWN G.W, PRUDO R. Psychiatric disorder in a rural and an urban population: 1. Aetiology of depression. **Psychological Medicine**, v.3, p.581-99, 1981.

BROWN, R. E. What is the role of the immune system in determining individually distinct body odours? **International Journal of Immunopharmacology**, v. 17, n. 8, p. 655-661, 1995.

BROWN R. E. Effects of social isolation in adulthood on odor preferences and urine-marking in male rats. **Behavioral and Neural Biology**, v. 44, n. 1, p. 139-43, 1985.

BROWN R.E., McDonald D.W. Social odours in mammals, Vol. 1–2. Oxford: Clarendon Press. p. 220, 1985.

BURGHARDT, G. M. Darwin's legacy to comparative psychology and ethology. **American Psychologist**, v. 64, n. 2, p. 102-110, 2009.

CAMACHO-ARROYO, I.; LÓPEZ-GRIEGO, L.; MORALES-MONTOR, J. The role of cytokines in the regulation of neurotransmission. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2009.

CASTIGLIONI, D. S.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. Ciclo Reprodutivo do caranguejo violinista *Uca rapax* (Smith) (*Crustacea, Brachyura, Ocypodidae*) habitante de um estuário degradado em Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 2, p. 331-339, 2006.

CEDERBERG, D.; SIESJÖ, P. What has inflammation to do with traumatic brain injury? **Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery**, v.26, n. 2, p. 221-6, 2010.

CHENEY, D. L.; SEYFARTH, R. **How monkeys see the world**. Chicago: University of Chicago Press, 1990. p. 252.

CHOMSKY, N. Linguagem e mente. In: falta autor do livro **Novas perspectivas lingüísticas**. 3. ed. Petrópolis: Rio de Janeiro, 1973.

CHURCH R.M. Emotional reactions of rats to the pain of others. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.52, n.2, p.132-134, 1959.

COHEN, S.; HERBERT, T. B. Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. **Annual Review of Psychology**, v. 47, p. 113-142, 1996.

COLE, S. W.; KEMENY, M. E. Psychosocial influences on the progression of HIV infection. In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. (Ed.). **Psychoneuroimmunology**. 3rd ed. Falta local: Academic Press, 2001. v. 2, p. 583-612.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Environmental and Nutrition Disease**. In: Pathologic Basis of the Disease. 6ed., W.B. Saunders, p. 403-457, 2000.

COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune interactions in stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 196-199, 2010.

CUOMO, V.; CAGIANO, R.; DE SALVIA, M. A.; RESTANI, P.; GALIMBERTI, R.; COLONNA, S.; RACAGNI, G.; GALLI, C. L. Ultrasonic vocalization in rat pups as a marker of behavioral development: an investigation of the effects of drugs influencing brain opioid system. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 10, n. 5, p. 465-469, 1988.

CURNO O., BEHNKE J. M., MCELLIGOTT A. G., READER T. , BARNARD C. J. Mothers produce less aggressive sons with altered immunity when there is a threat of disease during pregnancy. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 276, n. 1659, p. 1047-1054, 2009.

DAGLI, M. L. Z. **Disseminação linfática do Tumor de Ehrlich**: estudo experimental. 1993. 162 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

DANTZER, R.; BLUTHE, R. M. Vasopressin involvement in antipyresis, social communication, and social recognition: a synthesis. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 6, p. 243-255, 1992.

DARWIN, C. **The expression of the emotions in man and the animals** (1872). Chicago: University of Chicago. 1965.

DAVIES V.J., BELLAMY D. The olfactory response of mice to urine and effects of gonadectomy. **The Journal of endocrinology**, v. 55, n.1, p. 11-20, 1972.

DAVIS, B. L.; MACNEILAGE, P. F. Acquisition of correct vowel production: a quantitative case study. **Journal of Speech and Hearing Research**, v. 33, n. 1, p. 16-27, 1990.

DAWKINS, R.; KREBS, J. R. Animal signals: information or manipulation? In: KREBS, J. R.; DAVIES, N. B. (Ed.). **Behavioural ecology: an evolutionary approach**. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 1978.

DAWKINGS, R. **O rio que saía do Éden**: uma visão darwiniana da vida. São Paulo: Rocco, 1994.

DAWSON G. R., CRAWFORD S. P., COLLINSON N. , IVERSEN S. D. , TRICKLEBANK M. D. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. **Psychopharmacology**, v.118, n. 3, p. 316-323, 1995.

DEAK T., BELLAMY C., D'AGOSTINO L.G. Exposure to forced swim stress does not alter central production of IL-1. **Brain Research**, v. 972, n.1-2, p. 53-63, 2003.

DEAG, L. M. O comportamento social dos animais. São Paulo: EPU/IEDUSP, 1981.

DE CRESPIGNY, F. E.; HOSKEN, D. J. Sexual selection: signals to die for. **Current Biology**: CB, v. 9, n. 17, p. 853-855, 2007.

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

DELANCEY, S. On functionalism. In: DeLANCEY, S. **Lectures on functional syntax**: seminar for the LSA Summer Institute. Falta local: University of California at Santa Barbara, 2001.

DEMOLIN, D.; HASSID, S.; METENS, T.; SOQUET, A. Real-time MRI and articulatory coordination in speech. **Comptes Rendus Biologies**, v. 325, n. 4, p. 547-556, 2002.

DEMOLIN, D. The integration of phonetics and phonology. **Estudos Lingüísticos**, Campinas, v. 34, p. 95-104, 2005.

DEMOLIN, D.; HAUDE, K.; STORTO, L. Aerodynamic and acoustic evidence for the articulation in complex nasals. **Revue Parole**, v. 40, p. 235-238, 2007.

DEPUTTE, B. L. Ethological study of yawning in primates. **Ethology**, v. 98, p. 221-245, 1994.

DESCARTES, R. **Descartes philosophical letters**. Trad. A. Kenny. Oxford: Oxford University Press, 1970. p. 270.

DESJARDINS, C.; MARUNIAK, J. A.; BRONSON, F. H. Social rank in house mice: differentiation revealed by ultraviolet visualization of urinary marking patterns. **Science**, v. 182, n. 115, p. 939-941, 1973.

DIMATTINA, C.; WANG, X. Virtual vocalization stimuli for investigating neural representations of species-specific vocalizations. **Journal of Neurophysiology**, v. 95, p. 1244-1262, 2006.

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

DONALD, M. **Origins of the modern mind: three stages in the evolution of culture and cognition**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 1991.

DONG Q., SALVA A., SOTTAS C. M., NIU E., HOLMES M., HARDY M. P. Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 6, p. 973-981, 2004.

DORIGO, M.; STÜTZLE, T. **Ant colony optimization**. Falta local: MIT Press, 2004. p. 305.

DRICKAMER, L. C. Urine marking and social dominance in male house mice (*Mus musculus domesticus*). **Behavioural Processes**, v. 53, n. 2, p. 113-120, 2001.

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

DUNBAR, R. **Grooming, gossip and the evolution of language**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University, 1998.

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.

ELIADES, S. J.; WANG, X. Neural substrates of vocalization feedback monitoring in primate auditory cortex. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1102-1106, 2008

ELSBACH P., WEISS J. A reevaluation of the roles of the O₂-dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes. **Reviews of Infectious Diseases**, v.5, n. 5, p. 843-53, 1983.

ENSMINGER, M. E. **Produccion equina**. Buenos Aires: El Ateneo, 1969. p. 471.

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

FANSELOW M. S. Odors released by stressed rats produce opioid analgesia in unstressed rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 99, n. 3, p. 589-592, 1985.

FEITOSA, F. B. Neurociências e comportamento: ampliando vertentes investigativas no campo das relações interpessoais. **Neurociencias**, v. 5, n. 2, p. 57-120, 2009.

FILE S.E., HYDE J.R. Can social interaction be used to measure anxiety? **British Journal of Pharmacology**, v. 62, n.1, p. 19-24, 1978.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1, p. 35-53, 2003.

FISHER, R.A. **The genetical theory of natural selection**. Oxford, UK.: Clarendon Press, 1930.

FITCH, W. T. The evolution of speech: a comparative review. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 4, n. 7, p. 258-267, 2000.

FOERSTER K., DELHEY K., JOHNSEN A., LIFJELD J. T., KEMPENAERS B. Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. **Nature**, v. 425, n. 6959, p.714-717, 2003.

FORRAY M.I., GYSLING K. Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 47, n.1-3, p. 145-160, 2004.

FRANCHETTO, B.; LEITE, Y. **Origens da linguagem**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2004.

FREDMAN, L.; CAULEY, J. A.; HOCHBERG, M.; ENSRUD, K. E.; DOROS, G. Mortality associated with caregiving, general stress, and caregiving-related stress in elderly women: results of caregiver-study of osteoporotic fractures. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 30, p 1-7, 2010.

FURUKAWA, Y. Cell cycle regulation of hematopoietic stem cells. **Hum Cell**, v.11, n. 2, p. 81-92, 1998.

GALLAGHER S., PHILLIPS A.C., EVANS P., DER G., HUNT K., CARROLL D. Caregiving is associated with low secretion rates of immunoglobulin A in saliva. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 4, p.565-72, 2008.

GALEF B.G. JR., WHISKIN E. E. Learning socially to eat more of one food than of another. **Journal of comparative psychology**, v. 109, n. 1,p. 99-101, 1995.

GALEF B.G. JR, CLARK M. M. Social factors in the poison avoidance and feeding behavior of wild and domesticated rat pups. **Journal of comparative and physiological psychology**, v.75, n. 3, p.341-357, 1971.

GARDNER, C. R. Distress vocalization in rat pups. A simple screening method for anxiolytic drugs. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 14, n. 3, p. 181-187, 1985.

GEISLER, D. B.; EHRET, G. Auditory perception vs. recognition: representation of complex communication sounds in the mouse auditory cortical fields. **The European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 1027-1040, 2004.

GHAZANFAR, A. A.; HAUSER, M. D. The neuroethology of primate vocal communication: substrates for the evolution of speech. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 3, n. 10, p. 377-384, 1999.

GIVÓN, T. English grammar: a function-based introduction. Amsterdam Philadelphia: John Benjamins Publishing Company, 1993. v. 1.

- 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.
- GOURÉVITCH, B.; EGGERMONT, J. J. Spatial representation of neural responses to natural and altered conspecific vocalizations in cat auditory cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 97, p. 144-158, 2007.
- GOWATY P.A., STEINICHEN R., ANDERSON W.W. Indiscriminate females and choosy males: within- and between-species variation in *Drosophila*. **Evolution**, v. 57, n. 9, p. 2037-2045, 2003.
- GOWATY P.A. Reproductive compensation. **Journal Compilation European Society for Evolutionary biology**, v. 21, p. 1189–1200, 2008.
- GRACCEVA, G.; VENEROSI, A.; SANTUCCI, D.; CALAMANDREI, G.; RICCERI, L. Early social enrichment affects responsiveness to different social cues in female mice. **Behavioural Brain Research**, v. 196, n. 2, p. 304-309, 2009.
- GAVRILOVIC L., SPASOJEVIC N., DRONJAK S. Chronic individual housing-induced stress decreased expression of catecholamine biosynthetic enzyme genes and proteins in spleen of adult rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 4, p. 265-9, 2010.
- GROSSEN, N. E.; KELLEY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 81, n. 2, p. 307-310, 1972.
- HAENSEL, S. M.; MOS, J.; OLIVIER, B.; SLOB, A. K. Sex behavior of male and female Wistar rats affected by the serotonin agonist 8-OH-DPAT. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 40, n. 2, p. 221-228, 1991.
- HALPERN M., MARTÍNEZ-MARCOS A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 3, p. 245-318, 2003.
- HASKÓ G, SZABÓ C. Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. **Biochemical Pharmacology**, v.56, n. 9, p. 1079-1087, 1998.
- 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. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.
- HAUSER, M.; MARLER, P. **Animal communication**. In: WILSON, R.; KEIL, F. (Ed.). **The MIT encyclopedia of cognitive sciences**. Cambridge: MIT Press, 2002. p. 22-23.

HAUSER, M. D.; CHOMSKY, N.; FITCH, W. T. 'The faculty of language: what is it, who has it, and how did it evolve?' **Science**, v. 298, p. 1569-1579, 2002.

HAUSER, M. D. **The evolution of communication**. Cambridge, MA.: MIT Press, 1996.

HOFER, M. A.; BRUNELLI, S. A.; MASMELA, J.; SHAIR, H. N. Maternal interactions prior to separation potentiate isolation-induced calling in rat pups. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, n. 5, p. 1158-1167, 1996.

HOFFMANN, F.; MUSOLF, K.; PENN, D. J. Freezing urine reduces its efficacy for eliciting ultrasonic vocalizations from male mice. **Physiology & Behavior**, v. 96, n. 4, p. 602-605, 2009.

HOUSEKNECHT, C. Sonographic analysis of vocalizations of three species of mice. **Journal of Mammalogy**, v. 49, p.555-560, 1968.

HSIEH T., HALICKA D., LU X., KUNICKI J., GUO J., DARZYNKIEWICZ Z., WU J. Effects of resveratrol on the G(0)-G(1) transition and cell cycle progression of mitogenically stimulated human lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 297, n. 5, p. 1311-1317, 2002.

HURST, J. L. Urine marking in populations of wild house mice, *mus domesticus* Ratty.III. Communication between the sexes. **Animal Behavior**, v. 40, p. 230-233, 1990.

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.

HURST, J. L.; THOM, M. D.; NEVISON, C. M.; HUMPHRIES, R. E.; BEYNON, R. J. MHC odours are not required or sufficient for recognition of individual scent owners **Proceedings Biological Sciences**, v. 272, n. 1564, p. 715-724, 2005.

IRAOLA J. A., ALONSO G. The influence of flavored solution concentration on the poisoned-partner effect. **Neurobiology of learning and memory**. v. 63, n. 2, p.149-54, 1995.

IRWIN, M. Depression and immunity. In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. (Ed.). **Psychoneuroimmunology**. 3rd ed. Faltá local: Academic Press, 2001. v.2. p. 383-398.

JECKEL C. M. , LOPES R. P. , BERLEZE M. C., LUZ C., FEIX L., ARGIMON I. I., STEIN L. M., BAUER M. E. Neuroendocrine and immunological correlates of chronic stress in 'strictly healthy' populations. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 1, p. 9-18, 2010.

- JESSOP J.J., GALE K., BAYER B. M. Time-dependent enhancement of lymphocyte activation by mitogens after exposure to isolation or water scheduling. **Life Science**, v. 43, n. 14, p. 1133-1140, 1988.
- 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.
- JOHNSON J. D., O'CONNOR K. A., WATKINS L. R., MAIER S.F. The role of IL-1beta in stress-induced sensitization of proinflammatory cytokine and corticosterone responses. **Neuroscience**, v. 127, n. 3, p. 569-577, 2004.
- JORDAN, W. C.; BRUFORD, M. W. New perspectives on mate choice and the MHC. **Heredity**, v. 81, p. 127-133, 1998.
- KALIN, N. H.; SHELTON, S. E.; BARKSDALE, C. M. Separation distress in infant rhesus monkeys: effects of diazepam and Ro 15-1788. **Brain Research**, v. 408, n. 1, p. 192-198, 1987.
- 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.
- KESSLER R.C. The effects of stressful life events on depression. **Annual Review of Psychology**, v. 48, p.191-214, 1997.
- KIECOLT-GLASER JK, MARUCHA PT, MALARKEY WB, Mercado AM, Glaser R. Slowing of wound healing by psychological stress. **Lancet**, v.346, n.8984, p. 1194-1196, 1995.
- KIKUSUI T., TAKIGAMI S., TAKEUCHI Y., MORI Y. Alarm pheromone enhances stress-induced hyperthermia in rats. **Physiology & Behavior**, v. 72, n. 1-2, p. 45-50, 2001.
- KLOPFER, P. H.; HATCH, J. J. Experimental considerations? In: SEBEOK, T. A. (Ed.). **Animal communication**. Bloomington: University Of Indiana Press, 1968.
- KOHM A. P, SANDERS V. M. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. **Immunology Today**, v. 21, n. 11, p. 539-42, 2000.
- KOHM A.P., SANDERS V.M. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n.4, p. 487-525, 2001.
- KREBS, J. R.; DAVIES, N. B. **Introduction to behavioral ecology an evolutionary approach**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1996.

KVETNANSKY R. Stressor specificity and effect of prior experience on catecholamine biosynthetic enzyme phenylethanolamine N-methyltransferase. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1032, p. 117-129, 2004.

LAZZARINI, R.; SAKAI, M.; COSTA-PINTO, F.A.; PALERMO-NETO, J. Diazepam decreases leukocyte-endothelium interactions in situ. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 1, p. 1-8, 2010.

LEON M. Maternal pheromone. **Physiology & Behavior**, v. 13, n. 3, p. 441-453, 1974.

LEVINE E. S., LITTO W. J., JACOBS B. L. Activity of cat locus coeruleus noradrenergic neurons during the defense reaction. **Brain research**, v. 531, n.1-2, p. 189-195, 1990.

LEROY, S. A.; WENSTRUP, J. J. Spectral integration in the inferior colliculus of the mustached bat. **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, p. 8533-8541, 2000.

LI, W.; HARDWICK, M. J.; ROSENTHAL, D.; CULTY, M.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor overexpression and knockdown in human breast cancer cells indicate its prominent role in tumor cell proliferation. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 4, p. 491-503, 2007.

LIGEIRO DE OLIVEIRA A. P., LAZZARINI R., CAVRIANI G., QUINTEIRO-FILHO W. M., TAVARES DE LIMA W., PALERMO-NETO J. Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p.1164-1171, 2008.

LIGEIRO DE OLIVEIRA A. P., FIALHO DE ARAUJO A. M., LAZZARINI R., SILVA Z. L., DE NUCCI G., MUSCARÁ M.N. Effect of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats, **Neuroimmunomodulation**, v.11, p. 181–190, 2004.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92(2), p. 180-5, 1987.

LISTER R. G., LINNOILA M. Alcohol, the chloride ionophore and endogenous ligands for benzodiazepine receptors. **Neuropharmacology**, v. 12, p. 1435-1440, 1991.

LUCIN, K. M.; WYSS-CORAY, T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? **Neuron**, v. 64, n. 1, p.110-122, 2009.

LYONS, J. **Language and linguistics: an introduction**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981.

MACNEILAGE, P. F.; DAVIS, B. L. **The evolutionary emergence of language**. HURFORD, J. R. J.R.; KNIGHT, C.; STUDDERT-KENNEDY, M. G. (Ed.). Cambridge: University Press, 1990.

MACNEILAGE, P. F. The frame/content theory of evolution of speech production. **The Behavioral and Brain Sciences**, v. 21, n. 4, p. 499-511, 1998.

MACKAY-SIM A., LAING D.G. Discrimination of odors from stressed rats by non-stressed rats. **Physiology & Behavior**, v. 24, n. 4, p. 699-704, 1980.

MACKAY-SIM A., LAING D. G. The sources of odors from stressed rats. **Physiology & Behavior**, v. 27, n. 3, p. 511-513, 1981.

MAIER, S. F. Bi-directional immune-brain communication: Implications for understanding stress, pain, and cognition. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.17, n. 2, p. 69-85, 2003.

MARQUES, D. C.; MARQUES, J. R.; FERREIRA, P. M. **Criação de bovinos**. 4. ed. Belo Horizonte: falta editora, 1981. 479 p.

MARUCHA, P. T.; SHERIDAN, J. F.; PADGETT, D. Stress and wound healing. In: Ader R, Felten DL, Cohen N, editors. **Psychoneuroimmunology**. 3rd ed. Falta local: Academic Press, 2001.v. 2. p. 613-626.

MARUNIAK J. A., OWEN K., BRONSON F. H., DESJARDINS C. Urinary marking in male house mice: responses to novel environmental and social stimuli. **Physiology & Behavior**, v. 12, n.6, 1035-1039, 1974.

MAYNARD-SMITH, J. **The evolution of sex**. Cambridge: Cambridge University Press, 1978. p. 222.

MAYNARD-SMITH, J.; HARPER, D. **Animal signals**. Oxford: Oxford University Press, 2003. p.166.

MCCANN, S. M.; ONO, N.; KHORRAM, O.; KENTROTI, S.; AGUILA, C. The role of brain peptides in neuroimmunomodulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 496, p. 173-181, 1987.

MCGREGOR, P. K. Communication. In: The Behavior of Animals: Mechanisms, Function and Evolution. In: BOLHUIS, J. J.; GIRALDEAU, L. A. (Ed.). **Mechanisms, function and evolution**. Oxford: Blackwell, 2005. p. 226-250.

MCINTOSH, T. K.; DAVIS, P. G.; BARFIELD, R. J. Urine marking and sexual behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). **Behavioral and neural biology**, v. 26, n. 2, p.161-168, 1979.

MCKENZIE-QUIRK, S. D.; MICZEK, K. A. Social rank and social separation as determinants of alcohol drinking in squirrel monkeys. **Psychopharmacology**, v. 201, n. 1, p. 137-145, 2008.

- MENDES, F. D.; ADES, C. Vocal sequential exchanges and intragroup spacing in the Northern Muriqui *Brachyteles arachnoides hypoxanthus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.76, n. 2, p. 399-404, 2004.
- MEREDITH, M. Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiology & Behavior*, v. 56, n. 2, p. 345-354, 1994.
- MERRIL, J. E. Production and influence of inflammatory cytokines in disease of the adult central nervous system. In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. (Ed.). **Psychoneuroimmunology**. 3rd ed. Falta local: Academic Press; 2001. v. 1. p. 547-561.
- MICZEK, K. A.; WEERTS, E. M.; VIVIAN, J. A.; BARROS, H. M. Aggression, anxiety and vocalizations in animals: GABAA and 5-HT anxiolytics. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 38-56, 1995.
- MILLER, R. **Understanding the ancient secrets of the horse's mind**. Falta local: The Russell Meerdink Company Ltd, 1999. 138 p.
- MILLS, P. J.; YU, H.; ZIEGLER, M. G.; PATTERSON, T.; GRANT, I. Vulnerable caregivers of patients with Alzheimer's disease have a deficit in circulating CD62L- T lymphocytes. **Psychosomatic Medicine**, v. 61, p. 168-174, 1999.
- MOLES A., COSTANTINI F., GARBUGINO L., ZANETTINI C., D'AMATO F. R. Ultrasonic vocalizations emitted during dyadic interactions in female mice: a possible index of sociability? **Behavioural Brain Research**, v. 182, n. 2, p. 223-230, 2007.
- MOLEWIJK HE, VAN DER POEL AM, MOS J, VAN DER HEYDEN JA, OLIVIER B. Conditioned ultrasonic distress vocalizations in adult male rats as a behavioural paradigm for screening anti-panic drugs. **Psychopharmacology**, v. 117, p. 32-40, 1995.
- MONDAL T.K., BHATTA D., BISWAS S., PAL P. Repeated treatment with *S. aureus* superantigens expands the survival rate of Ehrlich ascites tumor bearing mice. **Immunological Investigations**, v. 31, n. 1, p.13-28, 2002.
- MONTICELLI P. F.; TOKUMARU, R. S.; ADES, C.; MENDES, F. D. Características individuais na vocalização de aflição de filhotes de cobaia doméstica: uma primeira análise. In: CONGRESSO INTERNO DO NÚCLEO DE PESQUISA EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO, 7., 1997, São Paulo. **Anais 1997**. v. 1, p. 50.
- MONTICELLI, P. F.; TOKUMARU, R. S.; ADES, C. Isolation induced changes in Guinea Pig *Cavia porcellus* pup distress whistles. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.76, n. 2, p. 368-372, 2008.
- MONTICELLI, P. F.; ADES, C.; AMADO, M. A. Aspectos acústicos da domesticação: chamados de alerta e de corte no preá *Cavia aperea* e na cobaia *Cavia porcellus*. In: ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA, 17., 1999, Botucatu. **Anais...** 1999. v. 17. p. 90.

MORGAN, S. M.; BUTZ, H. V. M.; DOWNES, S. R.; MERCER, A. R. The effects of queenlessness on the maturation of the honey bee olfactory system. **Behavioural Brain Research**, v. 91, n. 1, p. 115-126, 1998.

MORGULIS, M. S.; 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.

MORROW-TESCH, J. L.; MCGLONE, J. J.; SALAK-JOHNSON, J. L. Heat and social stress effects on pig immune measures. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 10, p. 2599-2609, 1994.

MORROW-TESCH J, ANDERSSON G. Immunological and hematological characterizations of the wasting pig syndrome. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 4, p.976-983, 1994.

MOSS S. F., BLASER M. J. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, v.2, n. 2, p. 90-97, 2005.

MOYER, W. W. Countercontrol in hypnotic control group. *Psychology of Respiration*, v. 39, n. 3 Pt 2, p. 1083-1089, 1976.

NAIR, S. M. **Endangered Animals of India and their conservation (in tamil)**. 3rd ed. Falta local: National Book Trust Groves, Johns Hopkins University Press, 1992. p. 110.

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.

NYBY, J.; WHITNEY, G.; SCHMITZ, S.; DIZINNO, G. Postpubertal experience establishes signal value of mammalian sex odor. **Behavioral Biology**, v. 22, n. 4, p. 545-552, 1978.

NUNEZ A. A., NYBY J., WHITNEY G. The effects of testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone on male mouse (*Mus musculus*) ultrasonic vocalizations. **Hormones and behavior**, v. 11, n. 3, p. 264-272, 1978.

OKANOYA, K. Language evolution and an emergent property. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 17, p. 271-276, 2007.

OLIVIER, B.; MOS. J.; MICZEK, K. A. Ethopharmacological studies of anxiolytics and aggression. **European Neuropsychopharmacology: the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 1, n. 2, p. 97-100, 1991.

OLVECZKY, B. P.; ANDALMAN, A. S.; FEE, M. S. Vocal experimentation in the juvenile songbird requires a basal ganglia circuit. **PLoS Biology**, v. 3, n. 5, p. 153, 2005.

OTHERO, G. A. A comunicação animal: uma forma de linguagem? **Cadernos do IL** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, v. 30, p. 239-251, 2005.

OTHERO, G. A. Linguista puro vs. linguista computacional: revisitando a distinção entre linguista de poltrona e linguista aplicado. **Domínios de Lingu@gem – Revista Eletrônica de Linguística** v. 2, n. 1, 2008. Disponível em:

<<http://www.dominiosdelinguagem.org.br/pdf/Texto%207.pdf>>. Acesso em: 02/02/2010.

OYA H., KAWAMURA T., SHIMIZU T., BANNAI M., KAWAMURA H., MINAGAWA M., WATANABE H., HATAKEYAMA K., ABO T. The differential effect of stress on natural killer T (NKT) and NK cell function. **Clinical and experimental immunology**, v. 2000, n.121, p.384-90, 2000.

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, p. 43-54, 2003.

PALERMO-NETO, J.; COSTA-PINTO, F. A. Cognição imune-neural: relações entre comportamento e imunidade. **Neurociências**, v. 5, n. 4, p. 186-249, 2009.

PALERMO-NETO, J.; GUIMARÃES, R. K. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats. **Life Sciences**, v. 68, n. 6, p. 611-623, 2000.

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.

PANÉS J., PERRY M., GRANGER D.N. Leucocit–endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention, **British Journal of Pharmacology**, v. 26, p. 537–542, 1999.

PANKSEPP, J.; VILBERG, T.; BEAN, N. J.; COY, D. H.; KASTIN, A. J. Reduction of distress vocalization in chicks by opiate-like peptides. **Brain Research Bulletin**. v. 3, n. 6, p. 663-667, 1978.

PELLOW S., FILE S. E. Pro- and anti-convulsant drug effects in combination with the convulsant benzodiazepine Ro 5-4864. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v.37, n. 8, p. 560-563, 1985.

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.

PENCE, D. B.; BERGAN, J. F. Hypopi (Acari:Hypoderatidae) from owlsn (Aves:Strigiformes:Strigidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 5, p.828-834, 1996.

PENNISI, E. Animal behavior. New data reveal the sisterhood of lions. **Science**, v. 293, p. 690-693, 2001.

PETRULIS, A. Neural mechanisms of individual and sexual recognition in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Behavioural brain research**, v. 200, n. 2, p. 260-267, 2008.

PEREIRA, J. H. **Curso básico de teoria da comunicação**. 4. ed. Editora Quartet, 2007. 128 p.

PERINAT, A. **Comunicación animal, comunicación humana**. Siglo XXI, 1993. 258 p.

PETRIE, M.; COTGREAVE, P.; PIKE, T. W. Variation in the peacock's train shows a genetic component. **Genetica**, v. 135, n. 1, p. 7-11, 2007.

PINKER, S.; JACKENDOFF, R. **'The faculty of language: what's special about it?'** Press, Cambridge, UK Science, v. 293, n. 5530, p. 589, 2001.

PINKER, S.; JACKENDOFF, R. **The faculty of language: what's special about it? Cognition**, v. 95, n. 2, p. 201-236, 2005.

PORTFORS C. V. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 46, n. 1, 28-34, 2007.

PTACEK M. B. The role of mating preferences in shaping interspecific divergence in mating signals in vertebrates. **Behavioural Processes**, v. 51, n.1-3, p. 111-134, 2000.

RAUSER CL, MUELLER LD, ROSE MR Aging, fertility, and immortality.. **Experimental gerontology**, v.38, n. 1-2, p. 27-33, 2003.

RAMER-QUINN DS, BAKER RA, SANDERS VM. Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. **Journal of immunology**, v.159, n. 10, p. 4857-4867, 1997.

REBY, D.; MCCOMB, K. Anatomical constraints generate honesty: acoustic cues to age and weight in the roars of red deer stags. **Animal Behaviour**, v. 65, p. 317-329, 1989.

RETTORI, V. Neuroimmune interactions. **Experimental Physiology**, v.92, n. 5, p.799-800, 2007.

RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, n. 2, p. 167-176, 2003.

RIGHI, D. A.; XAVIER, F. G.; PALERMO-NETO, J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on rat innate immunity: a flow cytometric study. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 148-152, 2008 .

ROBBINS, J. Lessons from the wolf. **Scientific American** , v. 290, n. 6, p. 76-81, 2004.

RÖDL, T.; BERGER, S.; ROMERO, L. M.; WIKELSKI, M. Tameless and stress physiology in a predator-naïve island species confronted with novel predation threat **Proceedings Biological sciences / The Royal Society**, v. 274, n. 1609, p. 577-582, 2007.

RODRIGUES, M. L.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PINTO, R. M.; LINS, F. P.; RIEHL VAZ, M. G.; DE ABREU, A. P.; DE SOUZA, P. C. Natural helminth infection in *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766), by *Acuaria mayori* Lent, Freitas and Proença, 1945 (Nematoda: Acuariaoidea) in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 41-43, 2005.

ROTHWELL N. J., LUHESHI G. N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. **Trends in Neurosciences.**, v. 2000, v. 23, n. 12, p. 618-625, 2000.

SAMSON J., SHEELADEVI R., RAVINDRAN R., SENTHILVELAN M. Stress response in rat brain after different durations of noise exposure. **Neuroscience research**, v. 57, n. 1, p. 143-147, 2006.

SÁ-ROCHA, V. M.; SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. **Physiology & Behavior**, v. 88, p. 108-115, 2006.

SAWCHENKO P.E., SWANSON L.W. Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. **Science**, v. 214, n. 4521, p. 685-687, 1981.

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

SCHUSTERMAN, R. J.; THOMAS, J. A.; WOOD, F. G. **Dolphin cognition and behavior: a comparative approach** book. Fala local: editora, 1986. p. 394.

SCOTT-PHILLIPS, T. C. Defining biological communication. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 21, p. 387-395, 2008.

SCHLEIDT W. M. Tonic communication: continual effects of discrete signs in animal communication systems. **Journal of Theoretical Biology**, v. 42, n. 2, p. 359-386, 1973.

SEBOK T. A. Animal communication. **Science**, v. 147, p. 1006-1014, 1965.

SEYFARTH, R.; CHENEY, D. L.; MARLER, P. Monkey responses to three different alarm calls: evidence of predator classification and semantic communication. **Science**, v. 210, p. 801-803, 1980.

SEYLE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, v. 122, p. 625-631, 1955.

SEYFARTH, R.; CHENEY, D. L. Meaning and mind in monkeys. **Scientific American**, v. 12, p. 122-128, 1992.

SIROVIĆ, A.; HILDEBRAND, J. A.; WIGGINS, S. M. Blue and fin whale call source levels and propagation range in the Southern Ocean. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 122, n. 2, p. 1208-1215, 2007.

SMITH, W. J. **The behavior of communicating**. Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 1977.

SOLTIS, J.; LEIGHTY, K. A.; WESOLEK, C. M.; SAVAGE, A. The expression of affect in African elephant (*Loxodonta africana*) rumble vocalizations. **Journal of Comparative Psychology**, v. 123, n. 2, p. 222-225, 2009.

SPANEL P., SMITH D., HOLLAND 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.

STAPLES L. G., HUNT G.E., VAN NIEUWENHUIJZEN P. S., MCGREGOR I. S. Rats discriminate individual cats by their odor: possible involvement of the accessory olfactory system. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1209-1217, 2008.

STORMSHAK, F.; BISHOP, C. V. Estrogen and progesterone signaling: genomic and nongenomic actions in domestic ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 299-315, 2008.

STRIER, K. B.; BOUBLI, J. P.; GUIMARÃES, V. O.; MENDES, S. L. The mureiqui population of the Estação Biológica de Caratinga, Minas Gerais, Brazil: updates. **Neotropical Primates**, v. 10, n. 3, 115-119, 2002.

STRANGE, K. S.; KERR, L. R.; ANDREWS, H. N.; EMERMAN, J. T.; WEINBERG, J. Psychosocial stressors and mammary tumor growth: an animal model. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, p. 89-102, 2000.

- TAHERA Y., MELTSEY I., JOHANSSON P., CANLON B. Restraint stress modulates glucocorticoid receptors and nuclear factor kappa B in the cochlea. **Neuroreport**, v. 17, n. 9, p. 879-882, 2006.
- THEUNISSEN, F. E.; SHAEVITZ, S. S. Auditory processing of vocal sounds in birds. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 16, p. 400-407, 2006.
- THOMAS, D. A.; TAKAHASHI, L. K.; BARFIELD, R. J. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by intruders during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 97, n. 3, p. 201-206, 1983.
- TOMIYOSHI MY, SAKAI M, BALEEIRO RB, STANKEVICIUS D, MASSOCO CO, PALERMO-NETO J, BARBUTO JA. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2009 May;23(4):558-67.
- TORNATZKY W, MICZEK KA. Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. **Physiology & Behavior**, v. 5, p. 983-93, 1993.
- TORRES, A. P.; JARDIM, W. R. **Criação de cavalos e outros eqüinos**. São Paulo: Nobel, 1987. p. 655.
- VAN DER POEL, A. M.; NOACH, E. J.; MICZEK, K. A. Temporal patterning of ultrasonic distress calls in the adult rat: effects of morphine and benzodiazepines. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 97, n. 2, p. 147-148, 1989.
- VISINTAINER M.A., VOLPICELLI J.R., SELIGMAN M.E. Tumor rejection in rats after inescapable or escapable shock. **Science**, v.216, n. 4544, p. 437-439, 1982.
- VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. **Revista de Psiquiatria Clínica** (São Paulo), v. 35, n. 5, p. 196-204, 2008.
- VOGEL W. H., JENSH R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. **Neuroscience Letters**, v. 87, n. 1-2, p. 183-188, 1988.
- WALLACE, M. N.; SHACKLETON, T. M.; ANDERSON, L. A.; PALMER, A. R. Representation of the purr call in the guinea pig primary auditory cortex. **Hearing Research**, v. 204, p. 115-126, 2005.
- WANG, X. On cortical coding of vocal communication sounds in primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 11843-11849, 2000.

WHEELER J.W. Insect and mammalian pheromones. **Lloydia**, v.39, n. 1, p. 53-59, 1976.

WEST, S. A.; GRIFFIN, A. S.; GARDNER, A. Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 20, n. 2, p. 415-432, 2007.

WHALE R., BHAGWAGAR Z., COWEN P.J. Zolmitriptan-induced growth hormone release in humans: mediation by 5-HT_{1D} receptors? **Psychopharmacology**, v. 145, n. 2, p. 223-226, 1999.

WHITE, N. R.; PRASAD, M.; BARFIELD, R. J.; NYBY, J. G. 40- and 70-kHz vocalizations of mice (*Mus musculus*) during copulation. **Physiology & Behavior**, v. 63, n. 4, p. 467-473, 1998.

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. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 329, n. 7468, p.712, 2004.

WILSON, S. Sintaxe comum e conexões imunoneuroendócrinas. **Neurociências**, v. 5, n. 4, p. 186-249, 2009.

WILSON, E. O. **Sociobiology: the new synthesis**. 25. ed. Washington: Belknap Press, 2000. v. 1, p. 697.

WINSLOW, J. T.; INSEL, T. R. Infant rat separation is a sensitive test for novel anxiolytics. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 15, n. 6, p. 745-757, 1991.

WITTGENSTEIN, L. **Tractatus lógico-phphilosophicus**. São Paulo: EDUSP, 1994. p. 225.

YEE J. R., PRENDERGAST B. J. Sex-specific social regulation of inflammatory responses and sickness behaviors. **Brain, Behavior, and Immunity**, *no prelo*, 2010.

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.