ANA PAULA NASCIMENTO DE LIMA

**Efeitos do estresse agudo de contenção sobre a caracterização
fenotípica e funcional de células dendríticas em camundongos
Balb/c**

São Paulo

2014

ANA PAULA NASCIMENTO DE LIMA

**Efeitos do estresse agudo de contenção sobre a caracterização
fenotípica e funcional de células dendríticas em camundongos
Balb/c**

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

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Prof^a. Dr^a Cristina de Oliveira Massoco
Salles Gomes

São Paulo

2014

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.2941
FMVZ

Lima, Ana Paula Nascimento de
Efeitos do estresse agudo de contenção sobre a caracterização fenotípica e funcional de
células dendríticas em camundongos Balb/c / Ana Paula Nascimento de Lima. -- 2014.
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profª. Drª Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes.

1. Estresse. 2. Células dendríticas. 3. Neuroimunomodulação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do estresse de restrição sobre a regulação de células dendríticas", protocolado sob o nº 2568/2012, utilizando 60 (sessenta) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Cristina Massoco Salles Gomes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/9/2012.

We certify that the Research "Effects of restraint stress on regulation of dendritic cells", protocol number 2568/2012, utilizing 60 (sixty) mice, under the responsibility Profa. Dra. Cristina Massoco Salles Gomes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/19/2012.

São Paulo, 20 de setembro de 2012.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LIMA, Ana Paula Nascimento de

Título: Efeitos do estresse agudo de contenção sobre caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas em camundongos Balb/c

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A realização desta dissertação, assim como o sucesso de qualquer pós-graduação deve-se a uma boa relação entre orientador e orientado. E sem dúvida, tive muita sorte na “escolha” da Cris como orientadora. Sempre atenciosa, seja em responder um simples e-mail até ir à bancada ajudar em um experimento.

Obrigada pela confiança quando me aceitou prontamente como sua orientada sem nem me conhecer.

Obrigada pelos ensinamentos desde os mais básicos até os mais complexos.

Obrigada pela paciência em todos os momentos, seja na bancada ou na frente do computador.

E principalmente, obrigada pelo carinho e pela amizade ao longos destes dois anos.

Obrigada Cris!

Agradecimentos

Aos camundongos que contribuíram com a vida para que este trabalho fosse realizado.

Ao Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) onde este trabalho foi realizado.

Aos funcionários do biotério (VPT-FMVZ-USP): Dona Idalina, Claudia, Nelsinho, Luciana, Aline e Mauro.

Aos funcionários do LADTOX (VPT-FMVZ-USP), Herculano, Vagner e Nicolle, pelo apoio ao longo do mestrado e também pela amizade.

Ao grupo de neuroimunomodulação, em especial ao Daniel e ao Eduardo que me ajudaram e me ensinaram muito ao longo de todo o mestrado.

A todos os amigos da sala de pós-graduação em especial aqueles com quem mais convivi: Daniela, Edu, Gabi, Fernando Pípole, Lílian, Lu Cunha, Natália, Thaísa, Wanderley, Thiago Marinho, Mari, Rafa e Lílian.

A minha família que mesmo longe esteve sempre presente e me incentivando. Principalmente pai e mãe que possibilitaram minha vinda para São Paulo.

A Dani, Amanda e Fernando, minha família “paulista” pela convivência diária, amizade, amor e cuidado.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Patologia, por me fornecer quase todos os meios para execução deste trabalho.

E finalmente a FAPESP pelo apoio financeiro concedido por meio bolsa de estudos (2011/16261-2) e pelo projeto temático (09/51886-3) do qual este trabalho faz parte.

RESUMO

LIMA, A. P. N. **Efeitos do estresse agudo de contenção sobre a caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas em camundongos Balb/c.** [Effects of acute restraint stress on phenotypic and functional characterization of dendritic cells in Balb/c mice]. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os efeitos do estresse, que são fatores constantes e componentes importantes na vida de um indivíduo, provocam alterações sobre o sistema imunológico. Nossa hipótese foi de que o estresse agudo de contenção aplicado em três sessões em dias alternados pode alterar a expressão de marcadores de membrana e a função de células dendríticas (DCs) de camundongos Balb/c. Investigar os efeitos do estresse sobre as DC nos pareceu relevante uma vez que estas são importantes elementos de ligação entre as respostas imune inata e adaptativa, ou seja, são células apresentadoras de antígenos altamente especializadas com uma capacidade única para ativar linfócitos T. Inicialmente, foram realizados experimentos comportamentais e dosagens de hormônios relacionados à resposta ao estresse, a fim de caracterizar e validar o modelo de estresse agudo por contenção utilizado. Em seguida, DCs esplênicas e DCs geradas a partir de células precursoras da medula óssea foram analisadas quanto a expressão de marcadores fenotípicos CD11c, MHC-II, CD80, CD86, CD40 e CCR-7. O modelo de estresse agudo de contenção mostrou-se capaz de produzir alterações no comportamento e de ativar o eixo HPA e o SNS. A análise dos marcadores fenotípicos revelou um aumento da expressão de CD40 em DCs esplênicas de animais estressados, porém, não houve alterações nas DCs derivadas da medula óssea. O ensaio de proliferação demonstrou uma alteração na função de DCs na proporção de 1:1 no co-cultivo com esplenócitos. O presente trabalho, portanto, demonstrou que o estresse agudo de contenção, realizado em três sessões em dias alternados, é capaz de alterar alguns parâmetros relacionados ao fenótipo e à função de DCs esplênicas.

Palavras-Chave: Estresse, Células dendríticas, Neuroimunomodulação.

ABSTRACT

LIMA, A. P. N. **Effects of acute restraint stress on phenotypic and functional characterization of dendritic cells in Balb/c mice.** [Efeitos do estresse agudo de contenção sobre a caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas em camundongos Balb/c]. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The effects of stress which are constant factors and important components in an individual's life cause changes on the immune system. Our hypothesis was acute restraint stress in three sessions on alternate days can change the expression of membrane markers and the function of dendritic cells (DCs) in BALB/c mice. Evaluate the effects of stress on the DC seemed to be relevant since these are important elements linking innate and adaptive immune responses, i.e., cells are highly specialized antigen-presenting with a unique capacity to activate T cells. First of all, behavioral assessment and dosages of hormones related to stress response were conducted to characterize and to validate the model of acute restraint stress. Then, splenic DCs and DCs generated from bone marrow were analyzed for expression of phenotypic markers CD11c, MHC-II, CD80, CD86, CD40 and CCR-7. The model of acute restraint stress changed the behavior and activate the HPA axis and the SNS. The analysis of phenotypic markers revealed an increased expression of CD40 on splenic DCs from stressed animals, however, there were no changes in BM-dDCs. The proliferation assay showed a change in the function of DCs in the co-culture with splenocytes in a ratio of 1:1. Therefore, the present study indicated that acute restraint stress, conducted in three sessions on alternate days, is able to change some parameters related to the phenotype and function of splenic DCs.

Keywords: Stress, Dendritic cells, Neuimmunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK	Amônio-cloreto-potássio
ACTH	Hormônios adrenocorticotróficos, do inglês <i>adrenocorticotropic hormone</i>
APC	Célula apresentadora de antígeno, do inglês <i>antigen presenting cell</i>
AR	Receptor adrenérgico, do inglês <i>adrenergic receptor</i>
CA	Campo aberto
CCR	Receptor de quimiocina C-C
CD	do inglês, <i>cluster of differentiation</i>
CRH	Fator liberador de corticotrofinas, do inglês <i>corticotropin release hormone</i>
CFDA-SE	Diacetato de carboxifluoresceína succinimidil ester
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil ester
DC	Célula dendrítica, do inglês <i>dendritic cell</i>
DHBA	Diidroxibenzilamina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino, do inglês <i>gut-associated-lymphoid-tissue</i>
GC	Glicocorticoides
GM-CSF	Fator de crescimento estimulador de colônia de granulócitos e monócitos, do inglês <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GR	Receptor de glicocorticoides, do inglês <i>glucocorticoids receptor</i>
HBSS	do inglês <i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, do inglês <i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
iDC	Célula dendrítica imatura, do inglês <i>immature dendritic cell</i>
IMF	Intensidade média de fluorescência
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IFN γ	Interferon
LCE	Labirinto em cruz elevado

LPS	Lipopolissacarideo
mDC	Célula dendrítica madura, do inglês <i>mature dendritic cell</i>
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade-I
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade-II
MR	Receptor de mineralocorticoide
NA	Noradrenalina
OT-II	Receptores T-específicos para OVA
OVA	Ovalbumina
PBS	do inglês <i>saline-buffered-phosphate</i>
pH	potencial Hidrogeniônico
SI	Sistema imune
SNS	Sistema nervoso simpático
SNC	Sistema nervoso central
TCR	Receptor de linfócitos T
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumoral necrosis factor</i>
VU	Vocalização ultrassônica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Síndrome Geral da Adaptação.....	19
Figura 2 - Resposta ao estresse	21
Figura 3- Neuroimunomodulação: comunicação bidirecional entre o SNC e o SI	24
Figura 4 - Ciclo de vida e função das células dendríticas	28
Figura 5 - Estresse de contenção.....	33
Figura 6 - Esquema do delineamento experimental utilizado para a indução de estresse.....	33
Figura 7 - EthoVision® (Vídeo Tracking Motion & Behavior Recognition System Versão 2.3) - equipamento de rastreamento em vídeo, usado no procedimento experimental para análise de movimentos	35
Figura 8 - Aparato para vocalização ultrassônica.....	37
Figura 9 - Estratégia de análise fenotípica de linfócitos	42
Figura 10 - Estratégia de análise fenotípica de células dendríticas.....	43
Figura 11 - Esquema da geração de DCs a partir de precursores da medula óssea.	45
Figura 12 - Gráfico representativo da distância percorrida no campo aberto por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.	50
Figura 13 - Gráfico representativo da velocidade média percorrida no campo aberto por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.	50
Figura 14 - Gráfico representativo da porcentagem do número de entradas (A) e de permanência de tempo (B) na zona periférica do campo aberto por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.	51
Figura 15 - Gráfico representativo da porcentagem do número de entradas (A) e de permanência de tempo (B) na zona central do campo aberto por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.	51
Figura 16 - Gráfico representativo da frequência (A) e tempo (B) de atividade exploratória no campo aberto de camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.	52

Figura 17 - Gráfico representativo da distância percorrida no labirinto em cruz elevado por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.....	53
Figura 18 - Gráfico representativo da velocidade média dos animais no labirinto em cruz elevado por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.....	53
Figura 19 - Gráfico representativo da porcentagem do número de entradas (A) e de permanência de tempo (B) nos braços fechados do labirinto em cruz elevado por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.....	54
Figura 20 - Gráfico representativo da porcentagem do número de entradas (A) e de permanência de tempo (B) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.....	54
Figura 21 - Gráfico representativo da frequência (A) e tempo (B) de atividade exploratória no labirinto em cruz elevado de camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.....	55
Figura 22 - Gráfico representativo dos níveis séricos de corticosterona de camundongos Balb/c machos submetidos a uma, duas ou três sessões de estresse de contenção.	58
Figura 23 - Gráfico representativo dos níveis plasmáticos de adrenalina (A) e de noradrenalina (B) de camundongos Balb/c machos submetidos a três sessões de estresse de contenção.	59
Figura 24 - Gráfico representativo de população de linfócitos CD4 ⁺ CD28 ⁺ presentes no baço de animal do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da IFM de CD28 em população de linfócitos CD4 ⁺ CD28 ⁺ presentes no baço de animal do grupo controle.....	60
Figura 25 - Gráfico representativo de população de linfócitos CD8 ⁺ CD28 ⁺ presentes no baço de animal do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da IFM de CD28 em população de linfócitos CD8 ⁺ CD28 ⁺ presentes no baço de animal do grupo controle.....	60
Figura 26 - Representação de População de DCs (CD11c ⁺ MHC-II ⁺) de camundongos Balb/c machos submetidos a três sessões de estresse de	

contenção (A). Gráfico representativo da % de células CD11c ⁺ MHC-II ⁺ do grupo controle e do grupo estresse (B).	61
Figura 27 - Histograma representativo da expressão de CD80 em população de DCs (CD11c ⁺ MHC II ⁺) do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da %de células CD11c ⁺ MHC-II ⁺ CD80 ⁺ do grupo controle e do grupo estresse (B).	62
Figura 28 - Histograma representativo da expressão de CD86 em população de DCs (CD11c ⁺ MHC II ⁺) do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da % de células CD11c ⁺ MHCII ⁺ CD86 ⁺ do grupo controle e do grupo estresse (B).	62
Figura 29 - Representação de População de DCs (CD11c ⁺ MHC-II ⁺) de camundongos Balb/c machos submetidos a três sessões de estresse de contenção (A). Gráfico representativo da % de células CD11c ⁺ MHC-II ⁺ do grupo controle e do grupo estresse (B).	63
Figura 30 - Gráfico representativo da expressão de CD40 em população de DCs (CD11c ⁺ MHC II ⁺) do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da %de células CD11c ⁺ MHCII ⁺ CD40 ⁺ do grupo controle e do grupo estresse (B).	64
Figura 31 - Gráfico representativo da expressão de CCR-7 em população de DCs (CD11c ⁺ MHC II ⁺) do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da %de células CD11c ⁺ MHCII ⁺ CCR-7 ⁺ do grupo controle e do grupo estresse (B).	64
Figura 32 - Gráfico representativo de intensidade de fluorescência média (IFM) de MHCII ^{low} em iDCs e mDCs de animais de grupo controle e estresse (A). Gráfico representativo de intensidade de fluorescência média (IFM) de MHCII ^{high} em iDCs e mDCs de animais de grupo controle e estresse (B).	66
Figura 33 - Gráfico representativo de intensidade de fluorescência média (IFM) de CD80 em iDCs e mDCs de animais de grupo controle e estresse (A). Gráfico representativo de intensidade de fluorescência média (IFM) de CD86 em iDCs e mDCs de animais de grupo controle e estresse (B). ..	67
Figura 34 - Ilustração do delineamento do experimento 9.	68
Figura 35 - Gráfico representativo da % de divisão (1:1) de animais de grupo controle e estresse. (A). Gráfico representativo da % de divisão (1:10) de	

animais de grupo controle e estresse (B). Gráfico representativo da % de	
divisão (1:100) de animais de grupo controle e estresse (C).	69
Figura 36 - Gráfico representativo dos níveis de IL-10 em população de linfócitos de	
sobrenadante de co-cultivo de DCs com esplenócitos (1:1) do grupo	
controle e estresse.	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição de comportamentos exploratórios característicos de roedores.....	36
Quadro 2 - Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de fenotipagem.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos do estresse de contenção sobre o padrão de vocalização ultrassônica de frequência de 22 kHz em camundongos Balb/c machos.....	56
Tabela 1 - Efeitos do estresse de contenção sobre o padrão de vocalização ultrassônica de frequência de 22 kHz em camundongos Balb/c machos.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ESTRESSE	18
2.2 MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO DE ESTRESSE	22
2.3 NEUROIMUNOMODULAÇÃO	23
2.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS	27
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 ANIMAIS	32
4.2 ESTRESSE DE CONTENÇÃO AGUDO	32
4.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	34
4.3.1 Campo aberto	35
4.3.2 Labirinto em cruz elevado	36
4.3.3 Vocalização ultrassônica	36
4.4 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA	37
4.5 DOSAGEM DE NORADRENALINA E ADRENALINA	38
4.6 COLETA E FENOTIPAGEM DE DCs E LINFÓCITOS PRESENTES NO BAÇO	39
4.7 COLETA E CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA	44
4.8 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE ESPLÊNOCITOS	45
4.8.1 Genotipagem de camundongos OT-II	45
4.8.2 Coleta e separação de dendríticas esplênicas	46
4.8.3 Co-cultura de DCs esplênicas de animais submetidos a estresse de contenção com esplenócitos de animais	47
4.9 DOSAGEM DE INTERLEUCINA-10 PRESENTE NO SOBRENADANTE DO CO-CULTIVO DE DCs ESPLÊNICAS COM ESPLÊNOCITOS DE CAMUNDONGO OT-II	48
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	49
5.1 EXPERIMENTO 1: VALIDAÇÃO DO MODELO DE ESTRESSE AGUDO POR CONTENÇÃO ATRAVÉS DA ANÁLISE DO COMPORTAMENTO.....	49
5.1.1 Campo aberto.....	49
5.1.2 Labirinto em cruz elevado	52
5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DO MODELO DE ESTRESSE AGUDO POR CONTENÇÃO SOBRE A VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA	55
5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO NOS NÍVEIS CIRCULANTES DE CORTICOSTERONA	57
5.4 EXPERIMENTO 4: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO NOS NÍVEIS CIRCULANTES DE CATECOLAMINAS	58
5.5 EXPERIMENTO 5: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS.....	59
5.6 EXPERIMENTO 6: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE AS MOLÉCULAS CD80 E CD86 DE DCs ESPLÊNICAS	61
5.7 EXPERIMENTO 7: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE AS MOLÉCULAS CD40 E CCR-7 DE DCs ESPLÊNICAS	63
5.8 EXPERIMENTO 8: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE O FENÓTIPO DE BM-DCs IMATURAS E MADURAS.....	65
5.9 EXPERIMENTO 9: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE A FUNÇÃO DE APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS DE DCs ESPLÊNICAS	68
5.10 EXPERIMENTO 10: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE OS NÍVEIS DE IL-10 EM SOBRENADANTE DE CO-CULTURA DE DCs COM ESPLENÓCITOS.	70
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÕES	80
7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	80
7.2 CONCLUSÃO GERAL	80
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

O estudo da neuroimunomodulação busca investigar os mecanismos de comunicação entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune (SI). Dentre os elementos que envolvem essa comunicação se inclui a resposta ao estresse.

Essa resposta fisiológica é especialmente relevante durante as respostas imunes, sobretudo *in vivo*, devido à importância e à constante presença do estresse e de seus mediadores fisiológicos na vida de um indivíduo.

São muitas as evidências que sugerem que as alterações fisiológicas decorrentes dessa resposta (glicocorticoides, noradrenalina, células imunes ativadas, citocinas, quimiocinas) estão diretamente envolvidas com a modulação do sistema imune (GLASER et al., 1993; DHABHAR; MCEWEN et al., 1996; ASHWELL et al., 2000; ELENKOV; CHROUSOS, 2002; FRANCHIMONT, 2004; WEBSTER MARKETON; GLASER, 2008).

As células dendríticas (DCs), assim como outras células do sistema imunológico, são conhecidas por expressar receptores adrenérgicos e de glicocorticoides, e dessa forma responderem às mudanças nos níveis desses hormônios circulantes, como ocorre na resposta ao estresse (MOSER et al., 1995; BROKAW et al., 1998; MAINALI; TEW, 2004; VISWANATHAN et al., 2005).

Dessa forma, muitos estudos se concentraram em investigar as alterações e os mecanismos pelos quais a resposta ao estresse modula o funcionamento destas células.

A literatura atualmente demonstra que o estresse é capaz de alterar parâmetros fenotípicos e funcionais de DCs. No entanto, ainda é escasso na literatura estudos que relatem e evidenciem alterações mais específicas decorrentes do estresse agudo nestas células, peças fundamentais no processamento da resposta imune adaptativa (TRUCKENMILLER et al., 2005; TOMIYOSHI, 2007).

Portanto, visto a constante presença do estresse na vida de um indivíduo, torna-se crítica a elucidação dos mecanismos com que o estresse agudo psicológico atua regulando as DCs e afeta o sistema imune adaptativo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRESSE

Todos os organismos vivos mantêm um equilíbrio complexo e dinâmico, chamado de homeostase, que é constantemente desafiado por estímulos internos ou externos. E, quando sob ameaça, o organismo desencadeia uma resposta de resistência denominada estresse.

O termo estresse é originário da física que é definido como uma força exercida sobre um sistema que tende a deformar-se. Posteriormente, o termo foi adotado pelas ciências biológicas onde recebeu diferentes definições: (a) como uma condição ambiental severa; (b) um mecanismo de avaliação das condições ambientais; (c) uma resposta biológica frente a um estímulo; ou (d) uma resposta comportamental a determinado estímulo ambiental.

O pesquisador Hans Selye, que foi o pioneiro em abordar os princípios gerais da fisiologia e da fisiopatologia do estresse (SELYE, 1959), definiu estresse como a resposta não específica do organismo a qualquer demanda (SELEY, 1973). Demanda esta que engloba as condições que segundo ele possuem aspectos positivos e negativos. Os impactos positivos constituem o *eustress* (eu – do grego bom), enquanto que os negativos, o *distress* (dis – do latim mau).

Além disso, Selye também conceituou a síndrome geral da adaptação (Figura 1). Esta consiste em três fases:

1. Alarme: é a primeira reação do organismo frente a um estímulo estressor e gera a resposta imediata de “luta ou fuga”.
2. Resistência: com a exposição prolongada ao estímulo, o organismo se adapta e aumenta sua resistência frente ao mesmo estímulo.
3. Exaustão: o organismo mesmo adaptado não é capaz de manter-se indefinidamente desta forma e entra na fase de exaustão.

Figura 1- Síndrome Geral da Adaptação

Fonte: <http://stresshealthandlife.blogspot.com.br/p/stress-response.html>, acessado em 13 de janeiro de 2014.

Em geral, esses estímulos estressores, tratados inicialmente como demanda por Selye, podem ser atualmente agrupados em duas grandes categorias:

- (a) Estressores físicos, também chamados de sistêmicos. Exigem respostas fisiológicas imediatas do organismo sem a necessidade de consciência do estímulo pelo indivíduo. Como por exemplo, hemorragia, estresse ortostático, exposição ao calor e ao frio.
- (b) Estressores psicológicos, também chamados de psicogênicos ou de processivos. Dependem da percepção e da interpretação individual em resposta à ameaça iminente de uma condição adversa (medo, ansiedade, exposição a um ambiente incontrollável, etc.) (VAN DE KAR; BLAIR, 1999; KUMAR et. al., 2013).

Em 1985, Richard Lazarus afirmou que o estresse é único para cada indivíduo e depende da avaliação (percepção cognitiva). Ele descreveu dois tipos de respostas. O primeiro é a resolução de problemas que consiste em gerenciar o problema. O segundo é o enfrentamento focalizado na emoção, que consiste em gerenciar as emoções negativas resultantes do estresse.

Porém, além das diferenças individuais de como cada um percebe os eventos estressores ao longo de sua vida, sabe-se atualmente que, para os vários tipos de estímulos estressores, são necessárias, também, variáveis respostas ao estresse. Existindo, portanto, padrões de percepção e reatividade para cada situação estressora específica.

Por exemplo, um estresse físico como uma hemorragia ou frio intenso, exige, principalmente, de áreas do tronco encefálico e de determinadas áreas hipotalâmicas; enquanto que, um estresse psicológico como o encontro com um predador ou o confinamento recruta predominantemente áreas e mediadores relacionados à emoção (amígdala e córtex pré-frontal), ao aprendizado e memória (hipocampo), e à tomada de decisões (córtex pré-frontal) (JOËLS; BARAM, 2009). Cabe ressaltar, no entanto que, os padrões de respostas neurofisiológicas não devem ser vistos como separados e independentes, pois em cada situação ou evento estressor estão presentes aspectos físicos e psicológicos.

No início do século XX, Walter Cannon e colaboradores caracterizam pela primeira vez a resposta clássica de "luta ou fuga". Este conceito faz referência a uma resposta imediata que qualquer organismo tende a ter em uma situação de risco.

De modo geral, durante essa resposta, o indivíduo mobiliza uma grande quantidade de energia em um curto período de tempo em razão do aumento de fluxo sanguíneo, que aumenta a disponibilidade de oxigênio e de glicose. E resulta em uma série de respostas fisiológicas coordenadas capazes de provocar alterações no comportamento, na função autonômica, na secreção de hormônios, além da modulação da resposta imunológica.

Ademais, essas mobilizações fisiológicas e comportamentais complexas provocadas pelo estresse compõem um conjunto de mecanismos compensatórios que são benéficos e adaptativos, pois prepara o organismo para reagir de maneira rápida e eficiente aos agentes estressores (PACÁK; PALKOVITS, 2001). Quando prolongada ou sob condições específicas é capaz de provocar efeitos prejudiciais ao longo da vida de um indivíduo, causando alterações cognitivas e comportamentais, além de gerar uma predisposição a estados patológicos (VAN DE KAR; BLAIR, 1999; MCEWEN, 2000).

Essa resposta adaptativa é regulada por um mecanismo neuroendócrino-imuno que abrange o sistema nervoso central ao sistema imune. Estruturas do SNC

como o sistema límbico, componentes endócrinos como o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e as catecolaminas liberadas pela medula adrenal são os centros de controle desta resposta fisiológica. (VAN DE KAR; BLAIR, 1999; PACÁK; PALKOVITS, 2001).

Finalmente, quatro décadas após Hans Selye definir os primeiros conceitos sobre estresse, Bruce McEwen ao estudar as relações do estresse e o sistema imune, descreveu carga alostática como sendo o reflexo de como os mediadores fisiológicos do estresse afetam o sistema imunológico (MCEWEN, 2011).

A figura 2 resume a resposta ao estresse desde sua percepção pelo SNC até seus mecanismos alostáticos que buscam a adaptação do organismo ao estímulo estressor; e reúne todos os conceitos até então abordados.

Figura 2 - Resposta ao estresse

Fonte: McEwen (2011).

2.2 MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO DE ESTRESSE

A experimentação científica é necessária para a compreensão de mecanismos fisiológicos, bem como para o desenvolvimento de novos tratamentos e fármacos. Entretanto, em decorrência de fatores éticos e práticos, torna-se inviável o uso de seres humanos em determinados procedimentos experimentais.

Logo, os modelos animais são fundamentais para o avanço tecnocientífico e para a medicina humana e veterinária. Além disso, o uso de animais em experimentação possibilita um melhor refinamento e controle experimental devido a: manipulação e controle genético; período de vida curto dos animais; manipulação e observação direta de estruturas e fenômenos biológicos; melhor controle de variáveis; e menores custo e tempo dispendidos (KANTZ, 1980).

Atualmente são muitos os modelos animais de indução de estresse e são frequentemente desenvolvidos e utilizados para investigar alterações bioquímicas e comportamentais decorrentes de um evento estressor. E assim, possibilitam uma melhor compreensão de mecanismos e vias subjacentes do estresse adaptativo, bem como, do desenvolvimento de compostos e de terapias que auxiliem no tratamento de desordens relacionadas ao estresse.

Um bom modelo de indução de estresse, como qualquer modelo animal, deve ser capaz de produzir aspectos fisiológicos inerentes a resposta ao estresse e ainda, de mimetizar o máximo possível uma progressão natural de desordens correlacionadas ao estresse, como transtornos de estresse pós-traumáticos e transtornos de ansiedade.

São vários os modelos de indução de estresse, dentre eles podemos destacar: imersão em água fria (AGRAWAL et al., 2011), nado forçado (ARMARIO et al., 1995), isolamento social (DRONJAK; GAVRILOVIC, 2006), imobilização ou contenção (KLENEROVÁ et al., 2007) choque nas patas (JODAR et al., 1995), exposição a um predador (ADMEC et al., 2005) e alteração de ciclo claro/escuro (GALVÃO et al., 2009). E são classicamente divididos na literatura de acordo com a duração e números de eventos estressores, categorizados, portanto, em agudo (DONADIO et al., 2007), sub-crônico (ASOR et al., 2013) e crônico (BLANCHARD et al., 1998).

No entanto, dada a complexidade da resposta ao estresse e dos múltiplos fatores relacionados a ela, os diferentes modelos demonstram resultados variáveis quanto às alterações fisiológicas e comportamentais. Essas variações vão depender: da espécie e linhagem do animal; do tipo, da intensidade e da duração do agente estressor; e também do intervalo de tempo entre a indução de estresse e os testes comportamentais (JAGGI et al., 2011).

Cabe, portanto, ao pesquisador conhecer ou validar o modelo de indução de estresse mais adequado aos objetivos pretendidos em sua pesquisa.

Logo, em nosso estudo, foi utilizado o modelo de estresse de contenção. De acordo com a primeira revisão sobre o assunto da autoria de Paré e Glavin (1986), este modelo foi descrito inicialmente em meados de 1920 (GLAVIN et al., 1994). Atualmente, com um histórico extenso, é amplamente utilizado como uma ferramenta útil na investigação de aspectos fisiológicos, patológicos, farmacológicos, na imunologia e na neurobiologia comportamental.

Este modelo é preferível dentre outros por ser simples, indolor e não causar debilitação duradoura. (BUYNITSKY, 2009). E apesar de constituir um procedimento físico é um importante modelo de estresse psicológico, pois aproxima o animal a uma experiência de natureza psicológica devido à sensação de confinamento (GLAVIN et al., 1994; DHABHAR et al., 1997).

2.3 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

Após quase 40 anos que se propôs a existência de uma interação funcional entre o SI e o SNC, a psiconeuroimunologia busca responder as inúmeras questões sobre os possíveis mecanismos de comunicação entre os dois sistemas (Figura 3). Uma extensa literatura descreve que a modulação da resposta imune em condições estressantes é mediada por uma rede de sinalização complexa sendo capaz de modular desde células T (resposta imune adaptativa) a componentes da imunidade inata como monócitos, macrófagos e granulócitos (GLASER et al., 1993; DHABHAR; MCEWEN et al., 1996; ASHWELL et al., 2000; ELENKOV; CHROUSOS, 2002; FRANCHIMONT, 2004; WEBSTER MARKETON; GLASER, 2008).

E ainda demonstra que essas alterações imunes, variam de acordo com o tipo de estressor, a sua duração e a sua frequência, como já explicado no item 2.1 (AVITSUR et al., 2003; BARTOLOMUCCI et al., 2005; QUEIROZ et al., 2008). Entre esses estudos, estão diversos trabalhos do nosso grupo de pesquisa que já observou diferentes alterações em parâmetros da imunidade inata e da adaptativa decorrentes de vários modelos de estresse, seja de ordem física (PALERMO-NETO et al., 2003), ou psicológica (ALVES, 2005; KIELING, 2006; PINHEIRO, 2008).

Essas interações neuroimunes são consideradas essenciais para a sobrevivência durante uma situação de estresse ou de infecção. Logo, a maneira com que a ativação dessas vias altera e modula a resposta imune é atualmente bastante investigado.

Figura 3 - Neuroimunomodulação: comunicação bidirecional entre o SNC e o SI

Fonte: Glaser R. e Kiecolt-Glaser J.K. (2005).

Diversos estudos fornecem evidências da modulação da resposta imune pelo SNC por diferentes mecanismos, dentre eles, dois são atualmente considerados como principais: a via neuroendócrina (eixo HPA) e o sistema nervoso simpático (SNS).

A via neuroendócrina inicia a comunicação entre o SNC e o SI através da ativação do eixo HPA. O hipotálamo quando ativado, leva à secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na hipófise anterior, que por sua vez, induz a liberação de hormônios adrenocorticotróficos (ACTH).

Estes neuro-hormônios desempenham um papel crucial na montagem da resposta adaptativa ao estresse, pois estimulam a circulação no córtex adrenal que promove, portanto, a liberação sistêmica dos principais efetores do sistema de resposta neuroendócrino, os glicocorticoides (GCs).

Os GCs, por sua vez, são hormônios esteroides que regulam o eixo HPA através de um *feedback* negativo (VAN DE KAR; BLAIR, 1999; BOWMAN, 2005). Eles possuem importância primária nos estados de estresse, pois influenciam no metabolismo celular que geram alterações metabólicas necessárias para que o organismo seja capaz de responder fisiologicamente aos agentes estressores. As propriedades anti-inflamatórias dos glicocorticoides são conhecidas desde a década de 40. Desde então foram feitos muitos estudos investigando o papel regulatório desses hormônios sobre o SI. Sabe-se atualmente que eles podem modular tanto a expressão de citocinas como também na migração, na proliferação e na diferenciação de células imunes (RUSSO-MARIE, 1992, ASHWELL et al., 2000; ELENKOV, CHROUSOS, 2002). Existem dois tipos de receptores para GCs, os receptores de mineralocorticoides (MRs) e os receptores de glicocorticoides propriamente ditos (GRs). Os GRs são os receptores de GCs expressos em grande quantidade pelas células imunes de roedores (MARCHETTI et al., 2001; PADGETTI; GLASER, 2003). Logo, em situações de estresse, momento em que há grande disponibilidade de GCs, vai ocorrer uma modulação significativa do SI por estes hormônios (MARCHETTI et al., 2001; MÜLLER et al., 2002).

A outra importante via de comunicação entre os SNC e SI ocorre com a ativação do SNS. Essa via se inicia a partir da ativação de neurônios pré-ganglionares que resulta em secreção de acetilcolina, que induz, por sua vez, a ativação das fibras pós ganglionares que inervam vários órgãos, dentre eles estão os órgãos linfoides como o timo, o baço, linfonodos, GALT e medula óssea (FELTEN et al., 1985).

Essa ativação, geralmente aumenta os níveis circulantes de adrenalina (principalmente a partir da medula suprarrenal) e de noradrenalina (principalmente a

partir da ativação direta das fibras simpáticas), que em conjunto serão responsáveis por respostas como aumento do metabolismo, função cardiovascular e termo regulação (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Além disso, essas catecolaminas são moduladores importantes da resposta imune. Seus efeitos moduladores são mediados via receptores adrenérgicos (ARs) que, assim como GRs, estão largamente presentes em linfócitos, macrófagos e outras células imunes (ELENKOV; CHROUSOS, 2002), e estão envolvidos na regulação e na migração de linfócitos. (MCHALE, 1990).

Esses receptores metabotrópicos são divididos em dois grupos, α e β , e em subtipos $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. Todos os tipos apresentam padrões de sinalizações específicos que resulta em efeitos imunomodulatórios (GUERESCHI, 2013), além de sofrerem alterações em doenças autoimunes como esclerose múltipla, miastenia grave e artrite reumatoide (KARASZEWSKI et al., 1991; BAERWALD et al., 1992; ZOUKOS et al., 1992; XU et al., 1997).

Assim como o SNC regula o SI, esse último é capaz também de provocar alterações no primeiro por meio da produção e liberação de citocinas. Por exemplo, a interleucina-1 (IL-1) que é liberada principalmente por macrófagos e monócitos, não somente estimulam a liberação de interleucina-2 (IL-2) pelas células T helper, como também provocam a ativação do eixo HPA por estimular a liberação de CRH no hipotálamo (KAPLAN et al., 1989).

O papel desses mecanismos imunomodulatórios durante a resposta ao estresse tem sido abordado nos últimos anos em diferentes modelos de estresse, sobretudo, nos efeitos imunossupressores do estresse crônico.

Entretanto, a literatura ainda carece de estudos que investiguem os mecanismos neuroendócrinos do estresse agudo e de seus efeitos no sistema imune. Uma vez que, são cada vez mais consistentes as evidências que respostas fisiológicas ao estresse agudo podem ser benéficas (STEFANSKI; ENGLER, 1998; DHABHAR et al., 2000; VISWANATHAN et al., 2005; DHABHAR et al., 2010), seja atuando na regulação da expressão de citocinas e quimiocinas, e/ou elevando o recrutamento e a ativação de moléculas e células que participam das respostas imunes.

2.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS

As DCs, assim denominadas por Steinman e Cohn em 1973, são atualmente consideradas importantes elementos de ligação entre as respostas imune inata e adaptativa (POWELL et al., 2009). São vistas como as mais eficientes células apresentadoras de antígenos (APCs), com capacidade única de induzir resposta imune primária e ainda possibilitar que a memória imunológica se estabeleça. Sendo, portanto, de fundamental importância na manutenção e regulação da imunidade adaptativa com a apresentação de peptídeos ligados aos complexos de histocompatibilidade do tipo I (MHC - I) e do tipo II (MHC – II). E ainda com a produção de fatores regulatórios como citocinas, moléculas inibitórias e moléculas co-estimulatórias (BANCHEREAU et al., 2000; TRUNCKENMILLER et al., 2006; HAMMER, MA, 2013).

Elas não constituem uma população de células únicas, mas sim, um conjunto de subpopulações, que dependendo de tecido residente, se diferencia na expressão de receptores de membranas específicos, nas citocinas produzidas, e nas propriedades funcionais. Direcionando assim, as múltiplas formas de imunidade (REIS E SOUSA, 2004; GALLO; GALLUCCI, 2013).

Tendo uma participação importante em muitas situações clínicas como: transplantes, alergias, doenças autoimunes, resistência a infecções e tumores (BANCHEREAU, STEINMAN, 1998), as DCs estão presentes na pele, no trato respiratório e na mucosa do trato gastrointestinal e são altamente especializadas.

Seus precursores são células-tronco hematopoiéticas pluripotentes originados na medula óssea que ao sofrerem sucessivas diferenciações dão origem aos monócitos. O monócito, por sua vez, migra para os tecidos periféricos se diferenciando em DC imatura, onde atuam como células sentinelas com alta capacidade endocítica. Ainda como células imaturas adquirem o antígeno por contato direto com o antígeno ou por absorção das células vizinhas que contenha o antígeno. Em seguida, amadurecem e migram para os órgãos linfoides.

Já maduras, as DCs expressam em sua superfície níveis elevados de moléculas do MHC de classe II, moléculas co-estimulatórias CD40, CD58, CD80 e CD86, e apresentam antígeno às células T *helper* CD4 que irão ativar células imune

efetoras antígeno-específicas, como os linfócitos T citotóxicos CD8 e antígeno-não-específicas como os macrófagos, eosinófilos e as células natural killers via liberação de citocinas (DUPUIS, MCDONALD, 1997; BANCHEREAU et al., 2000; NORBURY, 2006). Ou podem ainda ser conduzidas a um estado de tolerância em que induzem nas células T um estado de anergia e consequentemente suprimem a resposta imune (RUTELLA; LEMOLI, 2004). A figura 4 ilustra o ciclo de vida e a função das DCs, desde seus precursores até a resposta dos linfócitos induzida por esse tipo de célula (BANCHEREAU, 2000).

Figura 4 - Ciclo de vida e função das células dendríticas

Legenda: Precursores de DCs migram para tecidos periféricos e as células imaturas entram em contato com diferentes tipos de antígenos, internalizando-os. Em seguida, migram para os tecidos linfóides onde amadurecem e apresentam os antígenos aos linfócitos T e B, ativando-os. Os linfócitos, por sua vez, como células imunes efetoras irão dar continuidade a resposta imune. Fonte: BANCHEREAU (2000).

As DCs, como importantes APCs, possuem dois tipos de mecanismo de sinalização para ativar ou suprimir as células T: (a) pela formação de um complexo ternário entre o complexo de histocompatibilidade maior, o antígeno e o receptor de células T (TCR); (b) e pela ação de moléculas co-estimulatórias da família de proteínas B7, como as B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), e da família dos receptores de interferon, como a CD40. A interação B7:CD28 é essencial para o início da resposta imune T-dependente, enquanto que a interação CD40:CD40L atua principalmente na amplificação da mesma resposta (HOWLAND, 2000). Além disso, um outro receptor importante na regulação de DCs é o CCR-7 (CD127) que em DCs maduras é expresso em grande quantidade e é importante para conduzir as DCs até os linfonodos (OHL et. al., 2004).

Muitos estudos se concentraram em investigar as alterações e os mecanismos pelos quais a resposta ao estresse modula a resposta imune visando investigar, em sua maioria, linfócitos e macrófagos, entretanto são poucos os estudos que buscaram avaliar estes efeitos nas DCs. Tomiyoshi (2007), ao investigar os efeitos do estresse psicológico sobre o sistema imune, se utilizou de um modelo proposto por Morgulis (2004) e demonstrou que o convívio com um parceiro doente em camundongos alterou não somente parâmetros comportamentais dos animais, como também o fenótipo de APCs presentes no baço, em linfonodos e em DCs diferenciadas *in vitro* a partir de precursores da medula óssea.

As DCs, como outras células do sistema imunológico são conhecidas por expressar receptores adrenérgicos e de glicocorticoides, e dessa forma podem ser moduladas devido às mudanças nos níveis de catecolaminas e glicocorticoides circulantes (VISWANATHAN et al., 2005). Estudos com células dendríticas murinas e humanas demonstram que, tanto *in vivo* como *in vitro*, o tratamento com dexametasona, um glicocorticoide sintético, provoca não somente alterações morfológicas evidentes nessas células como afeta a capacidade de ativar células T naive, diminuindo a expressão de moléculas co-estimulatórias e, portanto, reduzindo as suas propriedades imunoestimulatórias (BROKAW et al., 1998; MOSER et al., 1995; MAINALI; TEW, 2004).

Truckenmiller et al. (2005) investigaram os efeitos do corticosterona na eficiência das DCs para processar e apresentar antígenos expressos por vírus. E

demonstraram que níveis elevados de corticosterona, antes da infecção viral, age sobre os receptores glicocorticoides, deprime a formação do complexo peptídeo-MHC de classe I na superfície de DCs e ainda diminui a capacidade dessas células de ativar linfócitos T. Por outro lado, embora a noradrenalina (NA), também associada à resposta ao estresse, afete o SI, os seus mecanismos imunorregulatórios ainda não são completamente compreendidos.

Yanagawa et al. (2010), usando células de camundongos derivadas da medula óssea, observaram não somente um aumento da captação de antígenos pelas DCs em apenas um curto tratamento com NA, como também reverteram essa endocitose induzida pela NA com um antagonista $\alpha 2$ -AR. Sugerindo dessa forma que a NA parece estar envolvida na melhora da resposta imune após o estresse agudo. É dessa forma que as alterações fisiológicas induzidas pelo estresse são foco de trabalhos que investigam sua ação no funcionamento e regulação das DCs.

Porém, ainda é escasso na literatura estudos que relatem e evidenciem alterações, decorrentes do estresse agudo, na imunidade e ainda mais especificamente nas DCs, estas, peças fundamentais na regulação positiva e negativa da resposta imune adaptativa. Portanto, visto a constante presença de agentes estressores na vida de um indivíduo, torna-se crítica a elucidação dos mecanismos com que o estresse agudo psicológico atua regulando as DCs e afeta o sistema imune adaptativo como um todo.

A contribuição deste estudo é obter uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na modulação de DCs utilizando um modelo de estresse psicológico agudo em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência do estresse agudo sobre células dendríticas esplênicas e de células dendríticas geradas a partir de precursores da medula óssea utilizando um modelo de estresse agudo de contenção por três dias alternados em camundongos Balb/c.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Submeter os animais ao modelo de estresse agudo e a partir de então, avaliar os efeitos:

- no comportamento;
- nos níveis circulantes de corticosterona;
- nos níveis circulantes de adrenalina e noradrenalina;
- no fenótipo de linfócitos esplênicos;
- no fenótipo de DCs esplênicas;
- no fenótipo de DCs provenientes da medula óssea;
- na função de apresentação de antígenos de DCs esplênicas.
- nos níveis de interleucina-10 em sobrenadante de co-cultivo de DCs com esplenócitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos machos das linhagens Balb/c e OT-II machos (transgênicos com receptores de células T específicos para OVA), adultos, foram utilizados com 60 dias de vida, pesando aproximadamente 35g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os animais permaneceram alojados em gaiolas de polipropileno (43 x 23 x 16cm) e mantidos durante todo o experimento em ambiente controlado, com temperatura variando entre 20 e 24°C, umidade entre 60 e 70%, com ciclo claro/escuro (12h/12h ciclo claro entre 07:00 - 19:00h) e alimentados com ração Nuvilabe® para roedores e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram utilizados seguindo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ – USP (protocolo nº 2568/2012).

4.2 ESTRESSE DE CONTENÇÃO AGUDO

Como aparato de contenção de movimentos foi utilizado um tubo cônico para centrifugação (50 mL) com as duas extremidades fechadas, mas com orifícios que permitem a ventilação e a passagem da cauda do animal que não sofre dor nem compressão, conforme ilustrado na figura 5. Cada tubo de contenção individual permaneceu fixo sobre a bancada com o auxílio de fitas adesivas.

Neste estudo, foi avaliado um modelo de estresse agudo com um delineamento experimental que consistiu em três sessões de estresse de contenção em dias alternados e horários aleatórios (Figura 6). Todas as sessões tiveram duração de duas horas, qual já foi comprovado ser tempo suficiente para ativar o eixo HPA provocando o aumento dos níveis circulantes de corticosterona (LUCAS et al., 2007; GAGLIANO et al., 2008). Além disso, trabalhos anteriores verificaram que este tempo produz alterações imunes (THAKER et al., 2006).

Figura 5 - Estresse de contenção

Legenda: A imagem demonstra o aparato adaptado e utilizado para a indução do estresse conforme descrito no item 4.2.

Figura 6 - Esquema do delineamento experimental utilizado para a indução de estresse

Legenda: As sessões de estresse foram realizadas em três dias alternados e em diferentes horários com duração de duas horas cada uma.

4.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Para validar em nosso laboratório o modelo de estresse agudo induzido por contenção foram feitas análises comportamentais por meio de testes comportamentais no Campo Aberto (CA) e no Labirinto em Cruz (LCE), aparatos que permitem avaliar alterações na atividade locomotora, na ansiedade e na atividade exploratória do animal (HALL, 1934; MONTGOMERY, 1955; LISTER, 1987; FRUSSA-FILHO, 2010). O experimento consistiu na avaliação comportamental de animais que foram submetidos a um estresse de contenção repetido por três dias alternados, bem como, do grupo controle correspondente. Todos os experimentos comportamentais foram realizados em salas de comportamento situadas nas dependências do Biotério do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sempre durante o período da manhã (7:00 – 10:00h), a fim de minimizar possíveis interferências de alterações no ritmo circadiano. Antes de cada experimento e entre cada sessão, os aparatos foram limpos com uma solução a 5% de álcool em água. Procedimento este adotado com o objetivo de eliminar pistas olfativas do animal anterior, e assim, evitar possíveis interferências no comportamento dos animais avaliados.

Após a última indução de estresse, os animais foram diretamente avaliados no aparato do campo aberto e logo em seguida no LCE. Essa ordem deve-se ao fato de que animais avaliados no LCE imediatamente após a avaliação feita no campo aberto apresentam uma melhor taxa de exploração, facilitando assim as análises dos resultados (PADOVAN et al, 2000). E cada sessão teve duração de 5 minutos, que correspondeu a um *track*.

Os dois aparatos foram virtualmente subdivididos em zonas e cada sessão foi registrada e analisada com o auxílio do software *Ethovision*® versão XT-7 (Noldus Information Technology®, Leesburg, VA, USA) (Figura 7) que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo de análise de movimento e reconhecimento comportamental.

Figura 7 - Equipamento de rastreamento em vídeo, usado no procedimento experimental para análise de movimentos - *EthoVision®* (Vídeo Tracking Motion & Behavior Recognition System Versão 2.3.)

Legenda: As setas indicam: 1- Campo Aberto para camundongos, 2- Câmera filmadora acoplada ao computador, 3- Monitor de Vídeo e 4- Imagem digitalizada representada em *pixels*.

Fonte: (ALVES, G. J., 2005)

4.3.1 Campo aberto

No campo aberto (HALL, 1934), os animais foram individualmente alocados no centro de uma arena circular (40 cm de diâmetro x 20 cm de altura) elevada 60 cm do solo, onde era possível se deslocar livremente.

Na sala de experimentação (2 m x 2 m) cada sessão, com duração de 5 minutos, foi gravada por meio de uma câmera de vídeo mantida acima do aparato e conectada a um computador localizado em uma antessala.

Neste aparato foram analisados parâmetros relacionados com a atividade locomotora, exploratória e de ansiedade. A atividade locomotora foi avaliada por meio da distância total percorrida no aparato ao longo da sessão. A atividade exploratória foi analisada por meio da contagem do número de *rearing* realizados pelo animal e pelo tempo total deste comportamento ao longo da sessão. E os parâmetros de ansiedade foram avaliados através da análise do tempo de permanência do animal nas zonas central e periférica e pelo número total de entradas nestas zonas. Todos os comportamentos avaliados estão descritos na tabela 1.

4.3.2 Labirinto em cruz elevado

No LCE (MONTGOMERY, 1955), os animais foram também alocados individualmente no aparato feito de madeira com uma plataforma central (16 cm×16 cm) e com quatro braços, sendo dois fechados opostos (50 cm×10 cm×40 cm) e dois abertos opostos (50 cm×10 cm) dispostos em ângulo de 90° e distante 50 cm do chão. A medida de atividade exploratória foi contabilizada por meio da soma de três comportamentos típicos de roedores: *rearing*, *stretching* e *head-deeping*, assim como do tempo de total dos três comportamentos avaliados. Todos os comportamentos avaliados estão escritos no quadro 1.

Quadro 1 – Descrição de comportamentos exploratórios característicos de roedores.

Comportamento	Descrição
<i>Rearing</i> (levantar)	O animal permanece apoiado apenas sobre as duas patas traseiras com o objetivo de explorar verticalmente o ambiente em sua volta.
<i>Stretching</i> (esticar)	O animal estando no braço fechado do LCE projeta o corpo para o braço aberto, mantendo as patas traseiras no braços fechados.
<i>Head-deeping</i> (mergulho de cabeça)	O animal coloca a cabeça para fora do aparato para explorar o ambiente a sua volta.

4.3.3 Vocalização ultrassônica

Para verificar se durante o estresse de contenção o animal altera o padrão de vocalização ultrassônica foi realizado um experimento em uma sala com isolamento acústico com o auxílio de dois microfones ultrassônicos (modelo D940 *Pettersson Elektronik AB*®, Uppsala, Suécia) ajustados para duas escalas de frequências. Um para 22 kHz e outro para 40 kHz, posicionados em frente ao animal contido (figura 8) cm distantes do animal contido. As vocalizações foram gravadas

por cinco minutos como arquivos de som do tipo .wav (*Notebook HP Pavilion dv5 PC*, Palo Alto, CA, EUA) com o auxílio do *software Ultravox* durante o período matutino. Os parâmetros avaliados foram: o número de vocalizações; o tempo total, médio, máximo e mínimo de vocalizações; e o tempo médio, máximo e mínimo de silêncio, correspondentes às duas frequências avaliadas.

Figura 8- Aparato para vocalização ultrassônica

Legenda: Sala de vocalização ultrassônica do biotério do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).
Fonte: LIMA, A.P.N. (2013).

4.4 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

Para avaliar e confirmar a ativação do eixo HPA através do estresse agudo induzido por contenção foi coletado o sangue por decapitação para a dosagem de corticosterona. Os animais foram previamente habituados à guilhotina a fim de minimizar os efeitos do método de coleta na resposta ao estresse. Para isso, antes dos experimentos, cada animal foi levado para a sala de coleta diariamente por uma semana e colocado com a cabeça posicionada dentro da guilhotina, conforme feito no procedimento de eutanásia, por 30 segundos.

O sangue foi coletado em microtubos sem anticoagulante e as amostras foram centrifugadas a 400xg, durante 15 minutos e, o sobrenadante (soro)

armazenado a -80°C . A concentração de corticosterona foi determinada pelo método de ELISA por meio da utilização do kit comercial EIA Corticosterona (*Oxford Biomedical Research, USA*) conforme orientação do fabricante.

4.5 DOSAGEM DE NORADRENALINA E ADRENALINA

Os níveis de catecolaminas séricas foram dosados com o objetivo de avaliar a liberação de adrenalina e noradrenalina em decorrência do estresse de contenção, que assim como a corticosterona pode ter papel importante na comunicação entre o sistema nervoso e o sistema imune. Para isso também foram utilizadas amostras de soro obtidas conforme descrito no item 4.4.

Para a dosagem de noradrenalina e adrenalina foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) acoplado a detector eletroquímico (HPLC-ED; Shimadzu Modelo 20A ED DECADE SDC). O HPLC-ED é composto de um recipiente injetor (válvula) de 1 a 100 μL , bombas de fluxo quaternário, um sistema controlador (monitoramento de fluxo, pressão e temperatura) uma coluna medindo 15 x 4,6 mm, partícula de 5 μm , com filtro de linha e integrador. A técnica utilizada é de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico.

A fase móvel utilizada foi constituída por um tampão citrato 0,02 M, metanol/acetonitrila 96/3/1 (v/v), 0,12 nM EDTA sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico. O pH foi ajustado para 3,18 com ácido ortofosfórico (H_3PO_4). A fase móvel foi filtrada em um sistema à vácuo antes de ser instalada no HPLC e circulou no sistema por 12 horas (*overnight*) para equilíbrio da coluna, que operou num fluxo de 1 ml/min, sendo a temperatura do forno de 60°C . O detector foi mantido com um potencial de 0,8V no eletrodo de trabalho, (Range 20NA off set 20% E cel 0,8 V T 40°C).

Para o preparo das soluções padrões de monoaminas foi utilizado padrões de concentrações 1 nM de NOR, adrenalina e diidroxibenzilamina (DHBA) diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ e estocados em freezer -80°C por um período de até 2 meses. No momento da análise os padrões

foram descongelados e diluídos a 109 vezes em ácido perclórico 0,1 M. e injetados no HPLC diariamente, antes e ao final das dosagens dos homogenatos e os valores utilizados como referência.

Para adrenalina o limite de detecção foi igual a 80 pg/mL e de quantificação igual a 150 pg/mL e para noradrenalina, o limite de detecção igual a 100 pg/mL e limite de quantificação igual a 500 pg/mL de soro.

O equipamento foi padronizado diariamente, no início e ao término do trabalho, com uma solução de trabalho de neurotransmissores, seus metabólitos e PI (DHBA) empregando-se como diluente uma solução de ácido perclórico, 0,1M, contendo EDTA e metabissulfito de sódio.

4.6 COLETA E FENOTIPAGEM DE DCs E LINFÓCITOS PRESENTES NO BAÇO

Após a eutanásia cada animal teve seu baço removido e macerado com o auxílio de um êmbolo de seringa de 3 mL sobre a superfície de *cell strainers* e PBS, e então a suspensão celular foi centrifugada a 250xg por 7 minutos a 4°C. As células foram suspensas em solução tampão de lise ACK estéril por 5 minutos para que as hemácias fossem lisadas. Novamente, a suspensão foi centrifugada, suspendida em PBS e o número de células foi contado utilizando-se Azul de Tripan 0.4%. 1×10^6 células foram utilizadas na marcação com os anticorpos descritos na tabela 2 por 30 minutos a 4°C e na ausência de luminosidade direta. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes e ressuspendidas em 300 µL de PBS e submetidas à leitura em um citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (*Becton & Dickinson*). Para aquisição das amostras foi utilizado o *software CellQuestPro* e para a análise dos resultados foi utilizado o *software TreeStar FlowJo* versão 7.6.5 para *Windows*. Foram fenotipados dois tipos de populações presentes no baço: linfócitos e células dendríticas. Para os linfócitos foram obtidas a frequência e intensidade média de fluorescência (IMF) da molécula CD28 presentes nas populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Uma vez que a molécula CD28 presente nas células T interage com as moléculas coestimulatórias encontradas nas APCs e tem papel fundamental na

ativação linfocitária. A figura 9 representa a estratégia de análise utilizada para a seleção de linfócitos esplênicos. Foi selecionada como população de linfócitos a população de células com baixo tamanho (FSC) e baixa complexidade (SSC) de acordo com o *gate* delimitado na figura 9A. A partir dessa seleção foram determinadas duas populações distintas de linfócitos: $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$. A partir dessas populações analisou-se a porcentagem de células $CD28^+$, além de ser quantificada a intensidade de fluorescência média (IFM) dos marcadores imunofluorescentes. E para as células dendríticas foram obtidas a frequência e a intensidade de fluorescência (IFM) ou *Geometric Mean* dos marcadores CD80, CD86 CD40 e CCR-7 presentes na população $CD11c^+MHCII^+$ das amostras, moléculas estas que estão diretamente envolvidas na regulação e amadurecimento de DCs.

A figura 10 representa a estratégia de análise utilizada para a seleção das células dendríticas esplênicas. Foram selecionadas as células de maior tamanho (acima de 400 no eixo X”) para que fossem excluídos da análise os linfócitos, células predominantes no baço. A partir dessa seleção foram determinadas como DCs a população de células $CD11c^+/MHC-II^+$ em que foi analisada a porcentagem de células $CD80^+$ e $CD86^+$ além de quantificadas a intensidade de fluorescência média (*Geomean*) dos respectivos marcadores imunofluorescentes.

O quadro 2 demonstra os anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de fenotipagem.

Quadro 2 – Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de fenotipagem.

Especificidade	Clone	Origem	Marcação	Fabricante
Mouse anti - CD11c	N418	Armenian Hamster IgG	FITC	Biolegend
Mouse anti - CD11c	HL3	Mouse (BALB/c) IgG2a, κ	PE	BD
Mouse anti – MHC-II (I-A)	AF6120.1	Mouse (BALB/c) IgG2a, κ	PE	BD
Mouse anti – MHC-II (I-A)	NMR-4	Mouse (BALB/c) IgG2a, κ	PE-cy5	eBioscience
Mouse anti – CD80	16-10A1	Armenian Hamster IgG2, κ	APC	BD
Mouse anti – CD86	GL-1	Rat IgG2a, κ	PerCP	Biolegend
Mouse anti – CD40	HM40-3	Mouse (BALB/c) IgG2a, κ	Alexa Fluor	Biolegend
Mouse anti – CD127 (CCR-7)	4B12	Rat IgG2a, κ	APC	Biolegend
Mouse anti – CD4	RM4-5	Rat (DA) IgG2a, κ	APC	BD
Mouse anti – CD3e	145-2C11	Armenian Hamster IgG1, κ	PE	BD
Mouse anti – CD8a	53-6.7	Rat (LOU) IgG2a, κ	PerCP	BD
Mouse anti – CD28	53-6.7	Rat (LOU) IgG2a, κ	FITC	BD

Figura 9- Estratégia de análise fenotípica de linfócitos

Legenda: *Dotplot* representativo de população de linfócitos presentes no baço (A). *Dotplot* representativo de população de linfócitos CD3⁺CD4⁺ (B). *Dotplot* representativo de população de linfócitos CD3⁺CD8⁺ (C). Histograma representativo da IMF de linfócitos CD3⁺CD4⁺CD28⁺ (D). Histograma representativo da IMF de linfócitos CD3⁺CD8⁺CD28⁺ (E).

Figura 10- Estratégia de análise fenotípica de células dendríticas

Legenda: *Dotplot* representativo de DCs (CD11c⁺MHC-II⁺) (A). Histograma representativo da IMF de DCs esplênicas CD80⁺ (B). Histograma representativo da IMF de DCs esplênicas CD86⁺(C). Histograma representativo de DCs esplênicas CCR-7⁺(D). Histograma representativo de DCs esplênicas CD40⁺(E).

4.7 COLETA E CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA

Para verificar se precursores de DCs são modulados pelo estresse de contenção agudo, células da medula óssea de animais submetidos ao estresse foram coletadas e comparadas com as células de animais do grupo controle.

Foi utilizado o método proposto por Lutz et al. (1999) com algumas adaptações em que o fêmur e a tíbia foram coletados, cortados em suas extremidades e lavados com meio RPMI-1640 estéril com o auxílio de uma seringa também estéril. A suspensão obtida após a lavagem descrita foi centrifugada a 250xg por 7 minutos a 4°C. As hemácias foram lisadas com tampão de lise ACK e as células restantes foram novamente lavadas, contadas e mantidas em meio de cultura para células dendríticas (DC-RPMI), que consiste em meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – LGC Biotecnologia), L-Glutamina (Gibco) (2mM), 2-mercaptoetanol (Gibco) (5×10^{-5} M) e 3% de sobrenadante de células da linhagem NIH-3T3 (fibroblasto de camundongo), transformada com o plasmídeo que contém o gene murino codificante do fator de crescimento estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF) (QIN et al., 1997; SCHÜLER e BLANKSTEIN, 2002; OHL et al.; 2004). As células foram semeadas em placa de 24 poços na concentração de $7,5 \times 10^5$ células/poço em um volume final de 1 mL e mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. No terceiro dia de cultivo, mais 1 mL de DC-RPMI foi adicionado a todos os poços. No sexto dia, metade do meio de cultura dos poços foi retirado, centrifugado, ressuspensionado em DC-RPMI e devolvido a placa. No sétimo dia, para maturação das células nas últimas 24 horas de cultivo, foi adicionado 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS). As células que foram tratadas apenas com meio de cultura foram consideradas células dendríticas imaturas (iDCs) e as tratadas com LPS, maduras (mDCs). Está descrito na literatura que iDCs expostas a LPS aumentam a expressão de moléculas de membrana, como o MHC-II, e as moléculas co-estimulatórias, CD80 e CD86.

A figura 11 resume como foi realizada a coleta e a geração de DCs a partir de precursores da medula óssea.

Figura 11- Esquema da geração de DCs a partir de precursores da medula óssea.

Legenda: Processo de obtenção de BM-dDCs. Tíbia e fêmur direitos foram dissecados e suas extremidades foram cortadas e as células da medula óssea foram retiradas com uma lavagem de meio RPMI. Após a eliminação das hemácias, as células da medula óssea foram cultivadas por 8 dias na presença de GM-CSF para diferenciá-las em DCs.

Fonte: Modificado de MUCCIOLI *et al.* (2011).

4.8 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE ESPLÊNÓCITOS

Para que fosse avaliada a função de apresentação de antígenos das DCs de camundongos submetidos a estresse de contenção agudo foi realizado um ensaio de proliferação de esplenócitos. Para isso, foram utilizadas DCs esplênicas de animais submetidos ao estresse de contenção e seus controles e camundongos OT-II, conforme detalhado nos subitens a seguir:

4.8.1 GENOTIPAGEM DE CAMUNDONGOS OT-II

Os esplenócitos dos camundongos transgênicos OT-II expressam um

transgene que codifica receptores específicos para ovalbumina (OVA) (BARNDEN, et al., 1998) na maioria de seus linfócitos T CD4⁺. Antes de iniciar o experimento para a avaliação da função de apresentadora de antígeno das DCs foi necessário que se confirmasse o uso de camundongos homozigotos dominantes OT-II. Para isso foram coletadas amostras de sangue da cauda dos camundongos em tubos contendo PBS e EDTA. As hemácias do sangue foram lisadas e em seguida a suspensão de células foi marcada com anticorpos para receptores CD4 e V-alfa. Após uma incubação de 30 minutos as amostras foram lavadas e lida em citometria de fluxo. A partir dos resultados foram então selecionados dois animais homozigotos dominantes OT-II, seus respectivos baços coletados, macerados, e seus esplenócitos utilizados no experimento descrito no próximo item.

4.8.2 COLETA E SEPARAÇÃO DE DENDRÍTICAS ESPLÊNICAS

Os baços coletados, após eutanásia, foram armazenados em HBSS e levados ao fluxo laminar. Em seguida foram perfundidos com solução de HBSS e colagenase do tipo IV (20 u/mL), fragmentados e incubados por 30 minutos. Após o período de incubação, os mesmos foram macerados com o auxílio de *cell strainer* de 70 µm. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 200xg por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 5 mL de solução tampão. Logo em seguida, as células foram ajustadas para 1x10⁸ células/mL e submetidas ao processo de separação magnética por um kit específico (*MACS Miltenyl Biotec*).

Após a separação das DCs esplênicas, estas, na concentração de 1x10⁶ células /mL foram incubadas por 4 horas com 1 mg/mL de ovalbumina de grau II (SIGMA) em estufa de CO₂ 5% a 37°C para internalização da proteína. Em seguida, adicionou-se 1 µg/mL de LPS, para induzir a maturação das células e estas retornaram à estufa por mais 24 horas.

4.8.3 CO-CULTURA DE DCs ESPLÊNICAS DE ANIMAIS SUBMETIDOS A ESTRESSE DE CONTENÇÃO COM ESPLENÓCITOS DE ANIMAIS OT-II

Os esplenócitos coletados provenientes de animais OT-II (item 4.8.1) foram contados em câmara de Neubauer, o número de células ajustado, e em seguida corados com diacetato de carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE) (5 µg/mL) por 20 minutos a 37°C, e ao final da incubação adicionou-se 2 mL de soro fetal bovino. As células foram lavadas e semeadas na concentração de 2×10^5 células/poço em co-cultivo com as DCs nas seguintes razões: 1:1, 1:10 e 1:100. O experimento foi realizado em placas de 96 poços de fundo em U e as placas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. O CFSE se liga de forma covalente a moléculas intracelulares através da carboxifluoresceína, um corante fluorescente. Portanto, quando uma célula marcada com CFSE entra em divisão, a sua progênie carrega metade do número de moléculas marcadas com carboxifluoresceína, logo, cada divisão celular consegue ser avaliada através da diminuição correspondente da fluorescência celular por citometria de fluxo.

Após 96 horas, o sobrenadante do cultivo foi armazenado a -80°C, as células foram coletadas e a aquisição da proliferação foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (*Becton & Dickinson*). Para análise dos dados de fluorescência, foram considerados os valores da % de divisões celulares e o índice de proliferação das células. O índice de proliferação é o número total de divisões dividido pelo número de células que entraram em divisão. Este índice leva em conta as células que tiveram pelo menos uma divisão, ou seja, o valor reflete apenas as células respondentes. Para a aquisição dos resultados foi utilizado o software *Cellquest Pro* (BD). Para a análise dos resultados foi utilizado o software *Flowjo* (TreeStar) versão 10 e *Flowjo* versão 7.6.1 (*TreeStar*).

4.9 DOSAGEM DE INTERLEUCINA-10 PRESENTE NO SOBRENADANTE DO CO-CULTIVO DE DCs ESPLÊNICAS COM ESLENÓCITOS DE CAMUNDONGO OT-II

Os níveis de IL-10 do sobrenadante do co-cultivo de DCs com esplenócitos na concentração de 1:1 foram dosados com o objetivo de avaliar melhor a função de APC das DCs de animais submetidos a estresse de contenção. A IL-10 é uma citocina conhecida por ter efeito imunossupressor sobre APCs, tais como DCs. Para isso foi utilizado o kit *DuoSet®* Elisa mouse IL-10 (*R&D Systems*) conforme instrução do fabricante.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas foram calculadas utilizando o teste t de *Student* para comparação de dois grupos e ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de *Tukey* quando mais de dois parâmetros foram analisados. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. O software *Graphpad Prism* versão 6.0 foi utilizado para as análises estatísticas

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: VALIDAÇÃO DO MODELO DE ESTRESSE AGUDO POR CONTENÇÃO ATRAVÉS DA ANÁLISE DO COMPORTAMENTO

Foram utilizados 12 animais os quais foram separados aleatoriamente em dois grupos, controle (n=6) e estresse (n=6). No dia 1 do experimento os animais do grupo estresse foram submetidos à primeira sessão de estresse (2 horas). No dia 3 à segunda sessão. E no dia 5 à terceira sessão. Imediatamente após a última sessão de estresse, os animais de ambos os grupos foram submetidos ao teste de campo aberto e em seguida ao teste do labirinto em cruz elevado conforme descrito no item 4.3.1.

5.1.1 Campo aberto

Os resultados indicam que os animais submetidos às sessões de estresse agudo por contenção apresentaram alterações na atividade exploratória e nos níveis de ansiedade. Mais especificamente, no campo aberto foi observado que os animais estressados entraram e permaneceram mais tempo na zona periférica (Figura 14), menos tempo na zona central (Figura 15B) e diminuiu a frequência e o tempo de atividade exploratória (Figura 16) no mesmo aparato em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos em relação à velocidade média (Figura 13) dos animais, na distância total percorrida (Figura 12) e na porcentagem de entrada na zona central (Figura 16A).

Figura 12 - Gráfico representativo da distância percorrida no campo aberto por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.

Legenda: Os valores mostram a média $\pm$ SEM.

Figura 13 - Gráfico representativo da velocidade média percorrida no campo aberto por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.

Legenda: Os valores mostram a média $\pm$ SEM.

Figura 14 - Gráfico representativo da porcentagem do número de entradas (A) e de permanência de tempo (B) na zona periférica do campo aberto por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.

Legenda: Os valores mostram a média ± SEM. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (teste *t* de Student).

Figura 15 - Gráfico representativo da porcentagem do número de entradas (A) e de permanência de tempo (B) na zona central do campo aberto por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.

Legenda: Os valores mostram a média ± SEM. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (teste *t* de Student).

Figura 16- Gráfico representativo da frequência (A) e tempo (B) de atividade exploratória no campo aberto de camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.

Legenda: Os valores mostram a média $\pm$ SEM. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (*teste t de Student*).

5.1.2 Labirinto em cruz elevado

No labirinto em cruz elevado os dados foram coletados logo após o teste do campo aberto. E assim como no outro aparato, não houve diferenças na distância total percorrida (figura 17) e na velocidade média (figura 18) dos animais entre os grupos comparados. Em relação aos braços fechados, não houve diferença na porcentagem de entradas (figura 19A), porém a porcentagem de tempo de permanência (figura 19B) nessas áreas dos grupo de animais submetidos ao estresse foi maior quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). Os animais do grupo experimental também apresentaram aumento nas entradas (figura 20A) e na permanência (figura 20B) nos braços abertos ($p < 0,05$). Em relação a atividade exploratória (figura 21), diferente do campo aberto, no LCE não houve diferenças estatisticamente significantes entres os grupos comparados.

Figura 17 - Gráfico representativo da distância percorrida no labirinto em cruz elevado por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.

Legenda: Os valores mostram a média $\pm$ SEM. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (*teste t de Student*).

Figura 18 - Gráfico representativo da velocidade média dos animais no labirinto em cruz elevado por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.

Legenda: Os valores mostram a média $\pm$ SEM.

Figura 19 - Gráfico representativo da porcentagem do número de entradas (A) e de permanência de tempo (B) nos braços fechados do labirinto em cruz elevado por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.

Legenda: Os valores mostram a média $\pm$ SEM. (*) $p < 0,05$ em relação ao seu grupo controle (*teste t de Student*).

Figura 20 - Gráfico representativo da porcentagem do número de entradas (A) e de permanência de tempo (B) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado por camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.

Legenda: Os valores mostram a média $\pm$ SEM. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (*teste t de Student*).

Figura 21 - Gráfico representativo da frequência (A) e tempo (B) de atividade exploratória no labirinto em cruz elevado de camundongos Balb/c machos submetidos a estresse de contenção.

Legenda: Os valores mostram a média $\pm$ SEM.

5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DO MODELO DE ESTRESSE AGUDO POR CONTENÇÃO SOBRE A VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA

Neste experimento foram utilizados 14 animais, os quais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos, controle (n=7) e estresse (n=7). No grupo estresse, a vocalização ultrassônica foi avaliada durante os primeiros 5 minutos do primeiro episódio de contenção (dia 1). E cada animal do grupo controle teve sua vocalização medida durante cinco minutos onde permaneceu livre em uma caixa sem maravalha pra que os microfones não captassem ruídos adicionais à vocalização.

De acordo com os resultados, animais submetidos ao estresse de contenção não apresentaram alterações no padrão de vocalização ultrassônica nas frequências de 22 e 40 kHz (Tabelas 1 e 2, respectivamente) quando comparados com os animais do grupo controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 1 – Efeitos do estresse de contenção sobre o padrão de vocalização ultrassônica de frequência de 22 kHz em camundongos Balb/c machos.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Estresse
Número de vocalizações ultrassônica	90,00 ± 9,25	128,0 ± 31,2
Tempo total de vocalizações	14,41 ± 4,64	20,90 ± 6,12
Tempo médio de vocalizações	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,024
Tempo mínimo de vocalizações	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Tempo máximo de vocalizações	1,86 ± 0,98	0,83 ± 0,18
Tempo total de silêncio	285,6 ± 4,64	279,1 ± 6,12
Tempo médio de silêncio	3,41 ± 0,41	3,41 ± 1,03
Tempo mínimo de silêncio	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Tempo máximo de silêncio	34,89 ± 5,62	36,90 ± 9,72

Legenda: Os valores mostram a média ± SEM. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (*teste t de Student*).

Tabela 2 – Efeitos do estresse de contenção sobre o padrão de vocalização ultrassônica de frequência de 40 kHz em camundongos Balb/c machos.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Estresse
Número de vocalizações ultrassônicas	2,14 ± 0,70	2,43 ± 0,68
Tempo total de vocalizações	0,12 ± 0,04	0,14 ± 0,04
Tempo médio de vocalizações	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Tempo mínimo de vocalizações	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Tempo máximo de vocalizações	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02
Tempo total de silêncio	299,9 ± 0,04	299,9 ± 0,04
Tempo médio de silêncio	133,5 ± 32,50	143,5 ± 42,16
Tempo mínimo de silêncio	9,37 ± 6,27	24,66 ± 20,25
Tempo máximo de silêncio	215,0 ± 28,17	209,1 ± 28,23

Legenda: Os valores mostram a média ± SEM. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (*teste t de Student*).

5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO NOS NÍVEIS CIRCULANTES DE CORTICOSTERONA

Para este experimento foram utilizados 28 animais distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: controle (n=7), estresse de uma sessão (n=7), estresse de duas sessões (n=7) e estresse de três sessões (n=7). Uma semana antes do início do experimento, os animais foram habituados a sala de eutanásia, assim como à guilhotina, como explicado no item 4.4.

No dia 1 todos os animais dos três grupos experimentais foram submetidos ao estresse de contenção por duas horas. Ao final da sessão, os animais do grupo controle e do grupo estresse de uma sessão foram eutanasiados e os animais dos demais grupos foram realocados em suas gaiolas-moradia. No dia 3, os animais dos grupos estresse de duas e de três sessões foram novamente colocados na contenção por duas horas. E passadas 2 horas, os animais do grupo estresse de três sessões foi novamente realocados em suas moradias enquanto os do grupo de duas sessões foram eutanasiados e o sangue coletado. Finalmente, do dia 5 os animais do grupo estresse de três sessões foram submetidos a contenção da mesma forma que os dias anteriores e em seguida foram eutanasiados.

De acordo com os resultados obtidos, os animais submetidos a uma e a duas sessões de estresse apresentaram níveis séricos de corticosterona significativamente maiores que os animais do grupo controle e do grupo submetido a três sessões de estresse (Figura 22). Além disso, foi observado que os animais submetidos ao estresse repetido, na terceira sessão, já não apresentaram aumento no nível de corticosterona observado nos dias anteriores.

Figura 22 - Gráfico representativo dos níveis séricos de corticosterona de camundongos Balb/c machos submetidos a uma, duas ou três sessões de estresse de contenção.

Legenda: CON = controle; EST 1 = estresse de um dia; EST 2 = estresse de dois dias; EST 3 = estresse de três dias. Os valores mostram a média $\pm$ SEM dos experimentos, 6 animais por grupo, (*) $p < 0,05$ em relação ao seu relativo grupo controle (teste t de *Student*).

5.4 EXPERIMENTO 4: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO NOS NÍVEIS CIRCULANTES DE CATECOLAMINAS

Neste experimento foram utilizados 28 animais, sendo 13 para o grupo controle e 15 para o grupo estresse. Os animais do grupo experimental foram submetidos ao modelo de estresse nos dias 1, 3 e 5. E ao final da última sessão de estresse os animais experimentais, assim como o grupo controle que permaneceu em suas gaiolas durante todo o experimento, foram eutanasiados. A eutanásia, a coleta de sangue e o processamento das amostras foram realizadas pelos métodos já descritos.

Os resultados indicaram não haver diferenças entre os grupos quanto aos níveis de adrenalina circulante (Figura 23A). Em relação a noradrenalina, os resultados demonstraram que o estresse aumentou os níveis de noradrenalina (Figura 23B), sugerindo, portanto uma ativação do sistema nervoso periférico simpático.

Figura 23 - Gráfico representativo dos níveis plasmáticos de adrenalina (A) e de noradrenalina (B) de camundongos Balb/c machos submetidos a três sessões de estresse de contenção.

Legenda: Dados representados pela média $\pm$ SEM, * $p < 0,05$, analisados por test t de *Student*.

5.5 EXPERIMENTO 5: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS

Após a eutanásia (mesmos animais utilizados no experimento 4) no último dia de estresse conforme já explicado em itens anteriores, os animais tiveram os baços coletados e processados conforme descrito no item 4.6.

De acordo com os resultados a porcentagem linfócitos esplênicos CD4⁺CD28⁺ dos grupos controle e estresse não foram diferentes quando comparados entre si (Figura 24A), no entanto a IMF do marcador para CD28 nesta população foi estatisticamente menor no grupo estresse conforme o ilustrado no gráfico da figura 24B. E ao analisar a população de linfócitos CD8⁺CD28⁺ obteve-se diminuição na porcentagem de células CD8⁺CD28⁺ e de IFM do marcador para CD28 nesta mesma população de animais submetidos a estresse de contenção (Figuras 25).

Figura 24 - Gráfico representativo de população de linfócitos $CD4^+CD28^+$ presentes no baço de animal do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da IFM de CD28 em população de linfócitos $CD4^+CD28^+$ presentes no baço de animal do grupo

Legenda: Dados analisados por teste "t" de Student, * $p < 0,05$.

Figura 25 - Gráfico representativo de população de linfócitos $CD8^+CD28^+$ presentes no baço de animal do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da IFM de CD28 em população de linfócitos $CD8^+CD28^+$ presentes no baço de animal do grupo

Legenda: Dados analisados por teste "t" de Student, * $p < 0,05$.

5.6 EXPERIMENTO 6: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE AS MOLÉCULAS CD80 E CD86 DE DCs ESPLÊNICAS

Para este experimentos foram utilizados 12 animais, sendo 6 do grupo controle e 6 do grupo estresse. Após a eutanásia no último dia de estresse conforme já explicado em itens anteriores, os animais tiveram os baços coletados e processados de acordo com o item 4.6.

De acordo com os resultados, a porcentagem de células DCs, ou seja, a população $CD11c^+MHC-II^+$ dos grupos controle e estresse não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Figura 26). Assim como não foram observadas diferenças nas expressões de moléculas CD80 e CD86 entre as DCs de animais do grupo controle e do grupo estresse, conforme demonstrado nas figuras 27 e 28.

Figura 26 - Representação de População de DCs ($CD11c^+MHC-II^+$) de camundongos Balb/c machos submetidos a três sessões de estresse de contenção (A). Gráfico representativo da % de células $CD11c^+MHC-II^+$ do grupo controle e do grupo estresse (B).

Legenda: Dados analisados por teste "t" de Student.

Figura 27 - Histograma representativo da expressão de CD80 em população de DCs ($CD11c^+MHC\ II^+$) do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da %de células $CD11c^+MHC-II^+CD80^+$ do grupo controle e do grupo estresse (B).

Legenda: Dados analisados por teste teste "t" de *Student*.

Figura 28 - Histograma representativo da expressão de CD86 em população de DCs ($CD11c^+MHC\ II^+$) do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da % de células $CD11c^+MHCII^+CD86^+$ do grupo controle e do grupo estresse (B).

Legenda: Dados analisados por teste "t" de *Student*.

5.7 EXPERIMENTO 7: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE AS MOLÉCULAS CD40 E CCR-7 DE DCs ESPLÊNICAS

Neste experimentos foram utilizados 14 animais, sendo 7 do grupo controle e 7 do grupo estresse. Após a eutanásia no último dia de estresse conforme já explicado em itens anteriores, os animais tiveram os baços coletados e processados de acordo com o item 4.6.

De acordo com os resultados, a porcentagem de células DCs, ou seja, a população $CD11c^+MHC-II^+$ dos grupos controle e estresse não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Figura 28). No entanto nesta mesma população, no grupo estresse houve aumento da porcentagem de DCs expressando CD40 em sua superfície, assim como um aumento da IFM deste marcador (Figura 29), enquanto que para o marcador CCR-7 não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 30).

Figura 29 - Representação de População de DCs ($CD11c^+MHC-II^+$) de camundongos Balb/c machos submetidos a três sessões de estresse de contenção (A). Gráfico representativo da % de células $CD11c^+MHC-II^+$ do grupo controle e do grupo estresse (B).

A

B

Legenda: Dados analisados por teste "t" de Student.

Figura 30 - Gráfico representativo da expressão de CD40 em população de DCs (CD11c+MHC II+) do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da %de células CD11c+MHCII+CD40+ do grupo controle e do grupo estresse (B).

Legenda: Dados analisados por teste "t" de Student, * $p < 0,05$.

Figura 31 - Gráfico representativo da expressão de CCR-7 em população de DCs (CD11c+MHC II+) do grupo controle e do grupo estresse (A). Gráfico representativo da %de células CD11c+MHCII+CCR-7+ do grupo controle e do grupo estresse (B).

Legenda: Dados analisados por teste "t" de Student

5.8 EXPERIMENTO 8: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE O FENÓTIPO DE BM-DCs IMATURAS E MADURAS

Este experimento foi realizado concomitantemente aos experimentos 5 e 6. As DCs dos 12 animais conforme já descrito no item 4.7 foram diferenciadas de precursores da medula óssea em cultura na presença de GM-CSF. No oitavo dia de cultura, para avaliar o estágio de maturação *in vitro* das DCs coletadas e geradas a partir da medula óssea foi analisada a expressão de moléculas de superfície conforme o procedimento descrito no item 4.6

A figura 32 e 33 ilustram a IFM dos marcadores para MHC-II (populações *high* e *low*), e CD80 e CD86 respectivamente. Os resultados indicam que houve um aumento na IFM de CD80 e CD86 nas DCs maduras (tratadas com LPS), mas não uma diferença significativa na maturação entre os grupos controle e experimental.

Figura 32 - Gráfico representativo de intensidade de fluorescência média (IFM) de MHCII^{low} em iDCs e mDCs de animais de grupo controle e estresse (A). Gráfico representativo de intensidade de fluorescência média (IFM) de MHCII^{high} em iDCs e mDCs de animais de grupo controle e estresse (B).

A

B

Legenda: CON iDCs=Grupo controle de iDCs; EST iDCs=Grupo estresse de iDCs; CON mDCs=Grupo controle de mDCs; EST iDCs=Grupo estresse de mDCs. Dados analisados por teste ANOVA de uma via com pós-teste de *Tukey*.

Figura 33 - Gráfico representativo de intensidade de fluorescência média (IFM) de CD80 em iDCs e mDCs de animais de grupo controle e estresse (A). Gráfico representativo de intensidade de fluorescência média (IFM) de CD86 em iDCs e mDCs de animais de grupo controle e estresse (B).

A

CD 80

B

CD 86

Legenda: CON iDCs=Grupo controle de iDCs; EST iDCs=Grupo estresse de iDCs; CON mDCs=Grupo controle de mDCs; EST iDCs=Grupo estresse de mDCs. Dados analisados por teste ANOVA de uma via com pós-teste de *Tukey*.

5.9 EXPERIMENTO 9: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE A FUNÇÃO DE APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS DE DCs ESPLÊNICAS

Neste experimento foram utilizados os mesmos 14 animais do experimento 7 (item 5.7), sendo 7 animais por grupo. Os esplenócitos dos camundongos OT-II foram semeados em co-cultivo com DCs esplênicas de animais do grupo controle e do grupo estresse (conforme descrito no item 4.8). Após 4 dias, a proliferação dos linfócitos foi avaliada por citometria de fluxo e o sobrenadante do co-cultivo foi coletado para análise de IL-10. A figura 36 ilustra o delineamento experimental do experimento.

Figura 34 – Ilustração do delineamento do experimento 9.

Fonte: Legenda: As DCs dos animais do grupo controle e do grupo experimental foram incubadas com OVA por 4 horas e em seguida receberam LPS como estímulo de maturação. 24 horas depois as DCs maduras foram co-cultivadas com esplenócitos obtidos de animais OT-II marcados com CFSE. Após 96 horas, as células foram avaliadas quanto à proliferação por citometria de fluxo.

Apenas na proporção DCs:esplenócitos de 1:1 como pode ser visto na figura 35, foi possível visualizar um aumento na resposta de proliferação. No entanto, não foi possível observar diferenças significantes entre os grupos controle e estresse nas proporções 1:10 e 1:100.

Figura 35 - Gráfico representativo da % de divisão (1:1) de animais de grupo controle e estresse. (A). Gráfico representativo da % de divisão (1:10) de animais de grupo controle e estresse (B). Gráfico representativo da % de divisão (1:100) de animais de grupo controle e estresse (C).

Legenda: Dados analisados por teste "t" de Student, * p<0,05.

5.10 EXPERIMENTO 10: EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE OS NÍVEIS DE IL-10 EM SOBRENADANTE DE CO-CULTURA DE DCs COM ESPLÊNÓCITOS

De acordo com o resultado não foi observada nenhuma diferença entre os níveis de IL-10 do sobrenadante de co-cultivo de DCs com esplenócitos (1:1) do grupo controle e do grupo estresse, conforme demonstrado na figura 36.

Figura 36- Gráfico representativo dos níveis de IL-10 em população de linfócitos de sobrenadante de co-cultivo de DCs com esplenócitos (1:1) do grupo controle e estresse.

Legenda: Dados analisados por teste "t" de *Student*.

6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, propomos avaliar uma possível função moduladora da resposta ao estresse nas características fenotípicas e funcionais de DCs, que indicasse uma atuação direta dos componentes fisiológicos decorrentes da resposta aguda ao estresse. Logo, inicialmente foi essencial a caracterização do modelo de estresse psicológico agudo selecionado como um modelo capaz de alterar significativamente parâmetros comportamentais e validá-lo como um modelo para os estudos das interações entre SI e SNC. Essa avaliação mostrou-se necessária, uma vez que não há estudos que demonstrem os efeitos sobre o comportamento do modelo de indução de estresse em camundongos conforme proposto neste estudo (estresse de contenção agudo em 3 dias alternados).

Ainda sobre o modelo de indução de estresse, optou-se por um modelo de indução por contenção, por ser um tipo de estresse de natureza psicológica abrangente. Como já comentado (item 4.2), apesar desse tipo de estresse possuir um forte componente físico, a contenção, esse expõe o animal a uma situação inescapável, sendo considerado, portanto, um estresse de natureza psicológica.

Optou-se também por três sessões de contenção, por ter sido verificado, em experimentos-pilotos, dados mais robustos quanto às alterações comportamentais quando comparados com apenas uma sessão de estresse. Mais especificamente, os animais estressados testados logo após uma sessão de estresse não apresentaram diferenças no número de entradas e no tempo de permanência nas áreas definidas do CA e do LCE respectivamente, quando comparados com o grupo controle. Logo, sugere-se que são necessárias alterações na plasticidade do SNC que demandam um certo tempo para que se possa observar a influência dessa resposta fisiológica em testes comportamentais como o LCE e o CA. Dessa forma, as sessões foram realizadas em três dias alternados e em horários diferentes, a fim de evitar uma previsibilidade e tolerância à contenção pelo animal (KENNETT et al., 1987; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000) e, portanto, possibilitar a análise das alterações comportamentais, bem como testar a hipótese

de que o estresse de contenção de curta duração é capaz de provocar alterações em alguns parâmetros da imunidade.

O aumento de ansiedade que configura o chamado “estado de alerta” é uma das mais importantes alterações comportamentais direcionadas para a sobrevivência frente um estímulo estressor. Essa resposta comportamental adaptativa envolve vários mecanismos neurais. Autores sugerem que os neurônios hipotalâmicos quando ativados, secretam CRH, que não somente iniciam a ativação do eixo HPA, como são os principais facilitadores diretos da resposta comportamental (JOHNSON et al., 1992; LOWRY; MOORE, 2006). De fato, estudos em roedores já demonstraram que administração intraventricular destes neuro-hormônios além de estimular o eixo HPA, são os principais responsáveis pelo efeitos ansiogênicos do estresse (BRITATON et al., 1986).

Estudos demonstraram que roedores submetidos a estresse, físico ou psicológico, apresentam aumento de ansiedade quando testados no LCE e no CA (KENNETT et al., 1987; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). O CA e o LCE são dois aparatos de avaliação comportamental clássicos para análise de ansiedade e eficácia de fármacos ansiolíticos, bem como outros parâmetros comportamentais, como locomoção e exploração. Em ambos os testes, o roedor não-manipulado experimentalmente busca explorar o ambiente novo a ele apresentado ao mesmo tempo que possui o medo inato de áreas abertas, por ficar mais vulnerável a possíveis predadores. Sendo assim, o animal irá explorar todo o aparato, mas permanecerá um tempo maior nas áreas que considera mais protegidas, isto é, na zona periférica do campo aberto, e nos braços fechados do labirinto em cruz elevado. Estes são alguns parâmetros validados para medir ansiedade.

Em nosso estudo, os animais estressados permaneceram um tempo menor no centro do CA e nos braços abertos do LCE, sem que houvesse no entanto, um déficit locomotor. E para que se pudesse afirmar com maior veemência que nosso modelo de indução de estresse provoca alterações no comportamento, além da mensuração do número de entradas e do tempo de permanência em cada área, que evidencia claramente a diminuição da atividade exploratória do animal estressado, o presente estudo também realizou a mensuração de alguns

comportamentos típicos de exploração: o *rearing*, o *stretching* e o *head-deeping* (descritos no Quadro 1).

No CA, houve uma diminuição desses comportamentos dos animais estressados, enquanto que no LCE, os resultados não indicaram diferenças estatísticas significantes, mas sim, uma tendência de diminuição pelo grupo experimental. Logo, sugere-se que não foi observada essa diminuição no LCE, pelo fato de que os animais estressados, ainda que com ansiedade aumentada e ímpeto exploratório diminuído, quando testados no aparato em questão, o LCE (de formato mais complexo que o CA), apresentaram a mesma frequência desses comportamentos que o grupo controle. Dessa forma, diferenças sutis, mas não menos importantes, não são observadas. Portanto, de acordo com a avaliação comportamental, pode-se inferir que o estresse de contenção aumentou o estado de ansiedade dos animais.

Roedores produzem uma variedade de vocalizações, incluindo as inaudíveis para o humano, as chamadas vocalizações ultrassônicas (VUs). São vários os estudos que investigam o padrão destas vocalizações. Realizados na sua grande maioria em ratos, estes estudos analisam desde filhotes na resposta à separação materna (SCATTONI et al., 2008; KIRSTEN et al., 2012) até em adultos em contexto negativo (BURGDORF et al., 2008; AHRENS et al., 2009) ou positivo (BURGDORF et al., 2008).

As VUs de camundongos tem como função principal a sinalização dentro de um contexto social, ou seja, na manutenção de hierarquia social como na interação sexual. Em situações aversivas não-sociais, como por exemplo, contenção e choque elétrico, foi sugerido, há não muito tempo, que adultos não vocalizavam ultrassonicamente (PORTFORS, 2007). No entanto, recentemente um estudo demonstrou que camundongos machos adultos emitem sim VUs, tanto ao explorar um novo ambiente quanto quando são submetidos a estresse de contenção, e que o número de vocalizações varia de acordo com o histórico de vida social do animal, ou seja, aqueles que vivem em grupo apresentam um maior número de vocalizações que um animal mantido isolado (CHABOUT et al., 2012).

Nossos resultados não indicaram quaisquer diferenças na VU (22 kHz e 40 kHz) de animais contidos quando comparados com animais não-contidos ao longo dos 5 minutos de avaliação. Talvez este não tenha sido o momento mais

adequado para se verificar a diferença entre os grupos. Assim, experimentos mais abrangentes são necessários para que se possa utilizar a vocalização ultrassônica como uma ferramenta de avaliação de ansiedade em camundongos submetidos a condições estressantes.

A importância dos glicocorticoides na resposta ao estresse decorrentes da ativação do eixo HPA é um conceito já bem estabelecido na literatura. E uma vez que o nosso modelo de indução de estresse provocou alterações comportamentais típicas de resposta ao estresse, bem como ativação do eixo HPA, foi pertinente, conforme proposto, avaliar os níveis circulantes de corticosterona, principal glicocorticoide nos roedores.

Dessa forma, conforme exposto em nossos resultados, o experimento de dosagem de corticosterona foi delineado de forma que os níveis plasmáticos deste hormônio pudessem ser avaliados ao longo das três sessões de contenção. E de acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que o modelo de estresse utilizado ativou o eixo HPA. Vale ressaltar, que no terceiro dia de estresse, os níveis do glicocorticoide diminuem e equiparam-se estatisticamente aos basais o que poderia ser explicado por uma possível habituação. Contudo se sabe que a habituação ao estresse ocorre mais em modelos de estresse crônico. Em um contexto de estresse agudo ou de curta duração ocorre uma hipersecreção de glicocorticoides decorrentes de uma também secreção aumentada de CRH e ACTH, conforme já explicado anteriormente. E é evidente que após uma hipersecreção de hormônios ocorre uma depleção de seus precursores, bem como uma exaustação metabólica aguda de suas células secretoras. Portanto, apesar do modelo de estresse utilizado ser de apenas três dias é pertinente concluir que no terceiro dia, conforme visto nos resultados, os níveis de corticosterona retornam aos níveis basais em decorrência de uma hipocortisolemia aguda que diminuiu a biodisponibilidade do hormônio circulante.

A hipocortisolemia é um fenômeno bastante observado e investigado em estudos de estresse crônico e da síndrome do estresse pós-traumático eventos traumáticos em que demonstra que indivíduos que vivenciaram eventos traumáticos na infância como abuso sexual apresentam níveis de cortisol diminuídos em determinados períodos do dia. Além disso, outros estudos demonstram haver correlação entre hipocortisolemia e o desenvolvimento de síndrome de estresse pós-

traumático em indivíduos após passarem por traumas agudos como um acidente de carro.

O sistema nervoso autônomo quando ativado pela resposta ao estresse induz a secreção de catecolaminas resultando em um aumento não-específico da concentração de adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea. Portanto, a detecção e quantificação dessas catecolaminas no sangue são usualmente utilizadas como ferramentas de avaliação e verificação de uma resposta ao estresse. No entanto, para estudos feitos em camundongos a avaliação dos níveis plasmáticos de catecolaminas é vista como dispendiosa e desafiadora, visto que o volume de sangue obtido é muito pequeno. Além disso, muitas variáveis relacionadas ao método de coleta, forma e tempo de armazenamento e método de quantificação podem influenciar nos resultados.

Sabendo disso, em relação aos resultados das catecolaminas adrenérgicas e noradrenérgicas, os resultados apresentaram-se de certa forma coerentes com o esperado. Os níveis aumentados de noradrenalina do grupo estresse refletem a ativação do sistema nervoso simpático decorrente da indução de estresse. O que demonstra que o modelo de estresse de contenção utilizado é eficaz em provocar efeitos fisiológicos da resposta ao estresse. Por outro lado, os níveis de adrenalina permaneceram altos em ambos os grupos, fato que pode ser justificado pela forma de eutanásia dos animais. A decapitação provocou liberação sistêmica de adrenalina no grupo controle, enquanto que os animais submetidos ao estresse apresentaram essa liberação sistêmica expressiva de adrenalina duas horas antes quando colocados na contenção. Logo, com o estoque de adrenalina depletado do grupo estresse, foi visto um aumento de adrenalina de grandeza similar entre os dois grupos. Neste sentido, pode-se afirmar que o modelo de estresse utilizado neste estudo foi eficaz em ativar o eixo HPA e o SNS.

Existem evidências que sugerem que as alterações fisiológicas decorrentes da resposta ao estresse (glicocorticoides, noradrenalina, células imunes ativadas, citocinas, quimiocinas) atuam diretamente nos mecanismos de maturação e na eficiência das DCs, que por meio de receptores, detectam essas alterações e assim, integram essa nova informação, regulando portanto, a resposta imune.

Logo, o foco deste trabalho foi avaliar se o estresse psicológico de curta duração alteraria o fenótipo e a função de DCs.

Ao analisar o fenótipo de DCs esplênicas, bem como dos linfócitos esplênicos, buscamos compreender como o estresse agudo poderia influenciar nos mecanismos co-estimulatórios da ativação de linfócitos pelas DCs.

A expressão da integrina CD11c juntamente com a molécula MHC-II na membrana celular caracterizam, em camundongos, as DCs (INABA, 1997). Já foi visto que um evento estressor pode aumentar a expressão de MHC em células de micróglia. No entanto, assim como no modelo de estresse por convivência com doente (TOMIYOSHI, 2007), nossos resultados não indicaram diferenças entre os grupos na população CD11c⁺MHC-II⁺, quanto ao número de marcadores destas duas moléculas.

Estudos demonstram que a expressão de CD28 em células CD4⁺ e CD80 e CD86 em APCs diminuem durante o estresse crônico (KOUR; BANI, 2011). Em nossos resultados, utilizando o estresse agudo, foi observado uma diminuição de CD28 em CD4⁺, conforme ocorre no estresse crônico, no entanto, em DCs foi vista uma alteração na molécula co-estimulatória CD40, ou seja, estresse agudo provocou um aumento da expressão desse receptor na população de DCs no baço.

Os dois tipos de mecanismos co-estimulatórios, B7:CD28 e CD40:CD40L, apresentam funções opostas na ativação e diferenciação de T CD4⁺. Em condições de co-estimulação via B7:CD28 baixa ou ausente dificulta o desenvolvimento de respostas imunes do tipo T_H2 e favorece a resposta do tipo T_H1. Enquanto que na ausência de CD40:CD40L, o padrão de resposta do tipo T_H1 é que vai ser impedida ao passo que a do tipo T_H2 é favorecida (HOWLAND et al., 2000). Diante destas evidências, sugere-se que o estresse agudo de contenção no momento que provoca uma clara diminuição de CD28 nos linfócitos e um aumento de CD40 nas DCs, parece propiciar uma maior co-estimulação CD40:CD40L e conseqüentemente favorece o desenvolvimento de respostas do tipo T_H1. Para confirmar essa hipótese e melhor aprofundar nesta questão são necessários outros experimentos como análise de citocinas características a esse tipo de resposta como IL-2 e interferon gamma (IFN γ).

São fortes as evidências de que glicocorticoides (PIEMONTE et al., 1999; MAESTRONI et al., 2000; MATYSZACK et al., 2000) e catecolaminas (TABAROWSKY et al., 1996) podem interferir *in vitro* no processo de diferenciação dos precursores de DC presentes na medula óssea, bem como sua maturação.

Portanto, em nosso estudo, além das DCs esplênicas, precursores de DCs presentes na medula óssea de ambos os grupos foram mantidas em meio cultura suplementado com fator de diferenciação GM-CSF.

Conforme os resultados, BM-dDCs de animais estressados não apresentaram, alterações nos marcadores de membrana avaliados, CD80 e CD86, além disso, essas mesmas células quando estimuladas com LPS, conforme esperado, responderam aumentando a expressão de marcadores de CD80 e CD86, inferido pelo aumento da fluorescência média emitida por esses marcadores. Podemos concluir, portanto, que o estímulo estressor *in vivo* não alterou de forma significativa na geração de DCs e nem na sua maturação com LPS.

Tomiyoshi (2007), inicialmente ao avaliar os precursores de DCs da medula óssea de animais estressados também não obteve diferenças nas moléculas de CD80 e CD86 entre os grupos. No entanto, ao suplementar o meio de cultura com IL-4, além do GM-CSF, observou em relação as condições anteriores, um aumento no número de células expressando CD80 no grupo controle e uma diminuição deste mesmo parâmetro no grupo estresse. Logo, estudos subsequentes *in vitro* serão necessários para melhor investigar e comprovar se as DCs são moduladas direta ou indiretamente pelo estresse, e para esclarecer possíveis consequências dessa modulação do padrão de resposta imunológica.

Após a verificação de que o nosso modelo de estresse causou uma discreta alteração no fenótipo de DCs, buscamos analisar se também alteraria algum aspecto da funcionalidade dessas células. APC é talvez a função mais importante das DCs, logo, nossa investigação direcionou para verificar possíveis alterações na função de apresentação de antígeno destas células. Para isso, conforme explicado anteriormente (ver item 4.8), foi realizado um experimento a fim de analisar se haveria ou não alteração na apresentação de OVA por DCs esplênicas de animais estressados. E conforme os resultados, apenas no co-cultivo de DCs com esplenócitos na proporção de 1:1 que foi visto um aumento na proliferação de linfócitos de animais OT-II, isto é, apenas no co-cultivo em que havia um número relativo maior de DCs é que foi observado uma maior eficiência das DCs de animais do grupo experimental.

Sob o ponto de vista evolutivo, o estresse agudo é tido como uma resposta adaptativa, em que direciona o organismo para a resposta de “luta ou

fuga”, priorizando mobilizações fisiológicas essenciais para essa resposta de sobrevivência, sobrepujando outras respostas consideradas menos essenciais para o momento como digestão ou reprodução.

Em um contexto neuroimuno, o estresse agudo prioriza a ativação de parâmetros da imunidade inata. Imunidade esta, em que a maioria das alterações requerem um mínimo de tempo e energia, além de ser sujeita a um menor número de mecanismos inibitórios, para dessa forma ser eficaz rapidamente contra agentes invasores. (SAPOLSKY, 1998; DOPP et al., 2000). Por outro lado, a resposta imune específica, de modo geral, e em particular a proliferação de células efectoras específicas, requerem um maior tempo e demandam de mais energia.

Portanto, ao interpretar nossos resultados sob esse ponto de vista, esperávamos observar um índice proliferação maior do grupo controle quando comparado com o grupo estresse. No entanto, não observamos diferenças entre os grupos nas razões 1:10 e 1:100 mas um aumento na razão 1:1 na porcentagem de divisões do grupo estresse. Visto que o experimento foi realizado com esplenócitos e não somente com linfócitos, é complicado afirmar se houve ou não uma melhora de fato na função de APC pelas DCs. No entanto, esse experimento, bem como seus resultados indicam, que o modelo de estresse agudo de contenção é capaz de interferir em mecanismos envolvidos no funcionamento de DCs. Novos experimentos serão realizados a fim de esclarecer como o estresse agudo interfere na função de APC destas células, bem como na proliferação de células decorrentes deste mecanismo.

A IL-10 (interleucina anti-inflamatória) está bem estabelecida como uma citocina supressora que regula a atividade de células B e T. Em seus estudos com estresse e imunidade Kour e Bani (2011) observaram um aumento de IL-10 na proliferação de linfócitos de animais estressados cronicamente sugerindo que essa citocina seria um possível mediador da imunossupressão do estresse crônico.

Além disso, estudos recentes indicam que estresse psicológico é um indutor importante da IL-10, aumentando as evidências de que as citocinas da família da IL-10 são mediadores fundamentais na imunossupressão induzida pelo estresse (CURTIN et al., 2009). No nosso caso, o estresse agudo não se mostrou capaz de provocar alterações na IL-10. Ainda, é relevante comentar que foi realizado um experimento de dosagem de IL-12, que são citocinas importante na ativação de

células T, no entanto o método utilizado não foi capaz de detectar níveis significantes desta citocina. Langenkamp et al. (2000) e Maestroni (2002) demonstraram que o pico de produção destas citocinas em culturas *ex-vivo* acontece aproximadamente 10 horas após a estimulação antigênica e cessa após 24 horas. Experimentos futuros deverão levar este fator em conta em suas realizações.

A maioria dos estudos que investigaram os efeitos do estresse nas células imunes utilizaram modelos de estresse crônico e em um contexto de respostas inflamatórias elevadas, e raramente em condições “não-inflamatórias”, sem estimulação antigênica microbiana ou auto-imune. Diante disso, nosso estudo buscou analisar apenas se um estresse de curta duração e de baixa severidade sem desafios imunológicos *in vivo* poderia modular o controle homeostático do sistema imune, mais especificamente na DCs, objeto principal do deste estudo. No entanto, sabe-se que sem um desafio imunológico, em que o sistema imune não necessite elaborar uma resposta inflamatória é bem provável que não seja possível observar alterações tão evidentes neste sistema.

Em resumo, o presente trabalho, além de levantar novas questões acerca dos efeitos do estresse, contribuiu para uma melhor caracterização dos efeitos do modelo de estresse agudo de contenção e demonstrou que um evento estressor de curta duração é capaz de modular DCs. Células, que por sua vez, irão exercer influências sobre outras células e sobre mecanismos do sistema imune. No entanto, mais estudos serão necessários para melhor compreender essa modulação.

7 CONCLUSÕES

7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

Conclui-se a partir dos resultados obtidos que o modelo de estresse agudo de contenção:

- Aumentou os níveis de ansiedade e diminuiu a atividade exploratória.
- Não modificou o padrão de vocalização ultrassônica.
- Alterou os níveis plasmáticos de corticosterona.
- Alterou os níveis plasmáticos de noradrenalina.
- Diminuiu a expressão de CD28 de linfócitos T esplênicos.
- Aumentou de expressão de CD40 de DCs esplênicas.
- Parece favorecer o desenvolvimento de respostas do tipo T_H1 .
- Não alterou a expressão de CD80, CD86 e CCR-7 de DCs esplênicas.
- Não alterou a expressão de CD80 e CD86 em DCs geradas *in vitro* a partir de precursores da medula óssea.
- Aumentou o índice de proliferação de esplenócitos quando cultivados com DCs na proporção de 1:1.
- Não alterou a expressão de citocinas IL-10 em sobrenadante de co-cultivo de DCs com esplenócitos na proporção de 1:1.

7.2 CONCLUSÃO GERAL

Este estudo demonstrou que este modelo experimental de estresse agudo de contenção realizado em três sessões em dias alternados, ativou o sistema nervoso central, sendo capaz de provocar alterações de ordem comportamental e endócrina de camundongos Balb/c machos, corroborando com vários estudos sobre estresse em roedores. Corroborando com a hipótese inicial mostrou evidências de

que o estresse agudo é capaz de alterar, mesmo que de forma discreta, alguns parâmetros relacionados ao fenótipo e à atividade das células dendríticas, tais como a expressão de CD40 e na função de APC de DCs esplênicas. O estresse agudo no modelo empregado parece não interferir de forma tão contundente na regulação das células dendríticas.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A.; JAGGI, A. S.; SINGH, N. Pharmacological investigations on adaptation in rats subjected to cold water immersion stress. **Physiol Behav**, v. 103, n. 3-4, p. 321-9, Jun 1 2011.
- AHRENS, A.M., M. S.; MAIER, E.Y.; DUVAUCHELLE, C.L.; SCHALLERT, T. Repeated intravenous amphetamine exposure: Rapid and persistent sensitization of 50-kHz ultrasonic trill calls in rats. **Behav Brain Res**. v. 197, n. 1, p. 205–209, 2009.
- ALVES, G. J. **Efeitos da coabitação com um parceiro doente: avaliação das alterações comportamentais e da atividade imune inata e adquirida**. 78 p. (Doutorado). Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ARMARIO, A.; GAVALDA, A.; MARTI, J. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 8, p. 879-90, 1995.
- ASHWELL, J. D.; VACCHIO, M. S.; GALON, J. Glucocorticoids in T cell development and function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 309-45, 2000.
- ASOR, E.; BELHANES, H.; KAVUSHANSKY, A. ZUBEDAT, S.; KLEIN, E.; AVITAL, A.; BEN-SHACHAR, D. Early postnatal interference with the expression of multiple Sp1 regulated genes leads to disparate behavioral response to sub-chronic and chronic stress in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 10, p. 2173-83, 2013.
- AVITSUR, R.; STARK, J. L.; DHABHAR, F. S.; KRAMER, K. A.; SHERIDAN, J. F. Social experience alters the response to social stress in mice. **Brain Behav Immun**, v. 17, n. 6, p. 426-37, 2003.
- BAERWALD, C.; GRAEFE, C.; VON WICHERT, P.; KRAUSE, A. Decreased density of beta-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 19, n. 2, p. 204-10, 1992.
- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K.. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 767-811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, 1998.
- BARNDEN, M. J.; ALLISON, J.; HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. **Immunol Cell Biol**, v. 76, n. 1, p. 34-40, 1998.

BARTOLOMUCCI, A.; PALANZA, P.; SACERDOTE, P.; SGOIFO, A.; DANTZER, R.; PARMIGIANI, S. Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 1, p. 67-81, 2005.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; KLUSMAN, I.; FURUKAWA, I.; MONGE ARDITI, G. KABIERSCH, A. Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 40, n. 4-6, p. 613-8, 1991.

BIERHAUS, A.; WOLF, J.; ANDRASSY, M.; ROHLEDER, N.; HUMPERT, P. M.; PETROV, D.; FERSTL, R.; VON EYNATTEN, M.; WENDT, T.; RUDOLFSKY, G.; JOSWIG, M.; MORCOS, M.; SCHWANINGER, M.; MCEWEN, B.; KIRSCHBAUM, C.; NAWROTH, P. P. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 1920-5, 2003.

BOWMAN, R. E. Stress-induced changes in spatial memory are sexually differentiated and vary across the lifespan. **J Neuroendocrinol**, v. 17, n. 8, p. 526-35, 2005.

BRITTON K.T.; L. G.; KOOB, G.F. Corticotropin releasing factor and amphetamine exaggerate partial agonist properties of benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 in the conflict test. **Psychopharmacology**, v. 94, n. 3, p. 306-11, 1988.

BROKAW, J. J.; WHITE, G. W.; BALUK, P.; ANDERSON, G. P.; UMEMOTO, E. Y.; MCDONALD, D. M. Glucocorticoid-induced apoptosis of dendritic cells in the rat tracheal mucosa. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 19, n. 4, p. 598-605, 1998.

BURGDORF, J.; MOSKAL, J.R.; PFAUS, J.G.; BRUDZYSNKI, S.M.; PANKSEPP, J. Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. **Journal of Comparative Psychology**, v.122, p. 357-367, 2008.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFSKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, n. 7, p. 1089-98, 2009.

CHABOUT, J.; SERREAU, P. E. Y. E.; BELLIER, L.; AUBIN, T.; BOURGERON, T.; GRANON, S. Adult male mice emit context-specific ultrasonic vocalizations that are modulated by prior isolation or group rearing environment. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29401, 2012.

COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune interactions in stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 196-9, 2010.

CURTIN, N. M.; BOYLE, N. T.; MILLS, K. H.; CONNOR, T. J. Psychological stress suppresses innate IFN-gamma production via glucocorticoid receptor activation: reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 4, p. 535-47, 2009.

CURTIN, N. M.; MILLS, K. H.; CONNOR, T. J. Psychological stress increases expression of IL-10 and its homolog IL-19 via beta-adrenoceptor activation: reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 3, p. 371-9, 2009a.

DHABHAR, F.S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. **Ann N Y Acad Sci**, v. 917, p. 876-93, 2000.

DHABHAR, F. S. Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. **Ann N Y Acad Sci**, v. 840, p. 359-72, 1998.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. **J Immunol**, v. 156, n. 7, p. 2608-15, 1996.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. **Neuroendocrinology**, v. 65, n. 5, p. 360-8, 1997.

DHABHAR, F. S.; SAUL, A. N.; DAUGHERTY, C.; HOLMES, T. H.; BOULEY, D. M.; OBERYSZYN, T. M. Short-term stress enhances cellular immunity and increases early resistance to squamous cell carcinoma. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 1, p. 127-37, 2010.

DONADIO, MV, K. A.; COREZOLA, K.L.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; LUCION, A.B.; SANVITTO, G.L. Effects of acute stress on the day of proestrus on sexual behavior and ovulation in female rats: participation of the angiotensinergic system. **Physiol Behav**. v. 92, p. 591-600, 2014.

DOPP, J. M.; MILLER, G. E.; MYERS, H. F.; FAHEY, J. L. Increased natural killer-cell mobilization and cytotoxicity during marital conflict. **Brain Behav Immun**, v. 14, n. 1, p. 10-26, 2000.

DRONJAK, S.; GAVRILOVIC, L. Effects of stress on catecholamine stores in central and peripheral tissues of long-term socially isolated rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 6, p. 785-90, 2006.

DUPUIS, M.; MCDONALD, D. M. Dendritic-cell regulation of lung immunity. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 17, n. 3, p. 284-6, 1997.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. **Ann N Y Acad Sci**, v. 966, p. 290-303, 2002.

FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; CARLSON, S. L.; OLSCHOWKA, J. A.; LIVNAT, S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. **J Immunol**, v. 135, n. 2, p. 755s-765s, 1985a. Supplement.

FRANCHIMONT, D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1024, p. 124-37, 2004.

FRANK, M. G.; BARATTA, M. V.; SPRUNGER, D. B.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 1, p. 47-59, 2007.

FRUSSA-FILHO, R; Assessment of motor function in rodents behavioral models sharing simplicity and multifaceted applicability – part 1: The open Field test. **Animal Model as Tools in Ethical Biomedical Research**. v. 1, p. 286-303, 2010.

GAGLIANO, H.; FUENTES, S.; NADAL, R.; ARMARIO, A. Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary-adrenal responses. **Behav Brain Res**, v. 187, n. 2, p. 239-45, 2008.

GALLO, P. M.; GALLUCCI, S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. **Front Immunol**, v. 4, p. 138, 2013.

GALVAO MDE, O. SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; KAWAKAMI, S. E.; TUFIK, S.; SUCHECKI, D. Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 8, p. 1176-83, 2009a.

GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 3, p. 243-51, Mar 2005.

GLASER, R. PEARSON, G. R.; BONNEAU, R. H.; ESTERLING, B. A.; ATKINSON, C.; KIECOLT-GLASER, J. K. Stress and the memory T-cell response to the Epstein-Barr virus in healthy medical students. **Health Psychol**, v. 12, n. 6, p. 435-42, 1993.

GLAVIN, G. B. PARÉ, W. P.; SANDBAK, T.; BAKKE, H. K.; MURISON, R. Restraint stress in biomedical research: an update. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 18, n. 2, p. 223-49, 1994.

GUERESCHI, M. G.; ARAUJO, L. P.; MARICATO, J. T.; TAKENAKA, M. C.; NASCIMENTO, V. M.; VIVANCO, B. C.; REIS, V. O.; KELLER, A. C.; BRUM, P. C.; BASSO, A. S. Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 4, p. 1001-12, 2013.

HALL, C. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and unination as measures of individual differences in emotionality. **J Comp Psychol**, v. 18, p. 15, 1934.

HALLER, J. The link between stress and the efficacy of anxiolytics. A new avenue of research. **Physiol Behav**, v. 73, n. 3, p. 337-42, 2001.

HAMMER, G. E.; MA, A. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 743-91, 2013.

HOWLAND, K. C.; AUSUBEL, L. J.; LONDON, C. A.; ABBAS, A. K. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. **J Immunol**, v. 164, n. 9, p. 4465-70, 2000.

INABA, K. PACK, M.; INABA, M.; SAKUTA, H.; ISDELL, F.; STEINMAN, R. M. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. **J Exp Med**, v. 186, n. 5, p. 665-72, 1997a.

IWAKABE, K.; SHIMADA, M.; OHTA, A.; YAHATA, T.; OHMI, Y.; HABU, S.; NISHIMURA, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. **Immunol Lett**, v. 62, n. 1, p. 39-43, 1998.

JAGGI, A. S.; BHATIA, N.; KUMAR, N.; SINGH, N.; ANAND, P.; DHAWAN, R. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. **Neurol Sci**, v. 32, n. 6, p. 993-1005, 2011.

JODAR, L.; TAKAHASHI, M.; KANETO, H. Effects of footshock-, psychological- and forced swimming-stress on the learning and memory processes: involvement of opioidergic pathways. **Jpn J Pharmacol**, v. 67, n. 2, p. 143-7, 1995.

JOHNSON, E. O. KAMILARIS, T. C.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 16, n. 2, p. 115-30, 1992.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 459-66, 2009.

KANTZ, R. J. Animal model and human depressive disorders. Disorders **Neuroscience Biobehavior Rev.**, v. 5, p. 231-246, 1980.

KAPLAN, G.; SAMPAIO, E. P.; WALSH, G. P.; BURKHARDT, R. A.; FAJARDO, T. T.; GUIDO, L. S.; DE MIRANDA MACHADO, A.; CELLONA, R. V.; ABALOS, R. M.; SARNO, E. N. Influence of Mycobacterium leprae and its soluble products on the cutaneous responsiveness of leprosy patients to antigen and recombinant interleukin 2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 16, p. 6269-73, 1989.

KARASZEWSKI, J. W.; Reder, A. T.; Anlar, B.; Kim, W. C.; Arnason, B. G. Increased lymphocyte beta-adrenergic receptor density in progressive multiple sclerosis is specific for the CD8+, CD28- suppressor cell. **Ann Neurol**, v. 30, n. 1, p. 42-7, 1991.

KENNETT, G. A.; DOURISH, C. T.; CURZON, G. Antidepressant-like action of 5-HT1A agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. **Eur J Pharmacol**, v. 134, n. 3, p. 265-74, 1987.

KIELING, K. **Efeitos do estresse pré-natal sobre a atividade de linfócitos de uma prole de camundongos.** 130 p. (Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2006.

KLENEROVA, V. SIDA, P.; KREJCI, I.; HLINAK, Z.; HYNIE, S. Effects of two types of restraint stress on spontaneous behavior of Sprague-Dawley and Lewis rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 58, n. 1, p. 83-94, 2007.

KOUR, K.; BANI, S. Augmentation of immune response by chicoric acid through the modulation of CD28/CTLA-4 and Th1 pathway in chronically stressed mice. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 6, p. 852-60, 2011.

KUMAR, A.; RINWA, P.; KAUR, G.; MACHAWAL, L. Stress: Neurobiology, consequences and management. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 5, n. 2, p. 91-7, 2013.

LANGENKAMP, A.; MESSI, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nat Immunol**, v. 1, n. 4, p. 311-6, 2000.

LAZARUS, R. S.; DELONGIS, A.; FOLKMAN, S.; GRUEN, R. Stress and adaptational outcomes. The problem of confounded measures. **Am Psychol**, v. 40, n. 7, p. 770-85, 1985.

LI, M. WANG, Y.; GUO, R.; BAI, Y.; YU, Z. Glucocorticoids impair microglia ability to induce T cell proliferation and Th1 polarization. **Immunol Lett**, v. 109, n. 2, p. 129-37, 2007.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987.

LORTON, D. BELLINGER, D. L.; SCHALLER, J. A.; SHEWMAKER, E.; OSREDKAR, T.; LUBAHN, C. Altered sympathetic-to-immune cell signaling via β_2 -adrenergic receptors in adjuvant arthritis. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 764395, 2013.

LOWRY, C. A.; MOORE, F. L. Regulation of behavioral responses by corticotropin-releasing factor. **Gen Comp Endocrinol**, v. 146, n. 1, p. 19-27, 2006.

LUCAS, L. R. WANG, C. J.; MCCALL, T. J.; MCEWEN, B. S. Effects of immobilization stress on neurochemical markers in the motivational system of the male rat. **Brain Res**, v. 1155, p. 108-15, 2007.

LUTZ, M. B. KUKUTSCH, N.; OGILVIE, A. L.; RÖSSNER, S.; KOCH, F.; ROMANI, N.; SCHULER, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **J Immunol Methods**, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999.

MADDEN, K. S. Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. **Brain Behav Immun**, v. 17, p. S5-10, 2003. Supplement 1.

MAESTRONI, G. J. Dendritic cell migration controlled by alpha 1b-adrenergic receptors. **J Immunol**, v. 165, n. 12, p. 6743-7, 2000.

MAINALI, E. S.; TEW, J. G. Dexamethasone selectively inhibits differentiation of cord blood stem cell derived-dendritic cell (DC) precursors into immature DCs. **Cell Immunol**, v. 232, n. 1-2, p. 127-36, 2004.

MARCHETTI, B.; MORALE, M. C.; TESTA, N.; TIROLO, C.; CANIGLIA, S.; AMOR, S.; DIJKSTRA, C. D.; BARDEN, N. Stress, the immune system and vulnerability to degenerative disorders of the central nervous system in transgenic mice expressing glucocorticoid receptor antisense RNA. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 37, n. 1-3, p. 259-72, 2001.

MATYSZAK, M. K.; CITTERIO, S.; RESCIGNO, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 4, p. 1233-42, 2000.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Res**, v. 886, n. 1-2, p. 172-189, 2000.

MCEWEN, B. S.; TUCKER, P. Critical biological pathways for chronic psychosocial stress and research opportunities to advance the consideration of stress in chemical risk assessment. **Am J Public Health**, v. 101, p. S131-9, 2011. Supplement 1.

MCHALE, N. G.; THORNBURY, K. D. Sympathetic stimulation causes increased output of lymphocytes from the popliteal node in anaesthetized sheep. **Exp Physiol**, v. 75, n. 6, p. 847-50, 1990.

MONTGOMERY, K. C.; MONKMAN, J. A. The relation between fear and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, n. 2, p. 132-6, 1955.

MORGULIS MS, S. D., SA-ROCHA LC, PALERMO-NETO J. Cohabitation with a sick cage mate: Consequences on behaviour and on Ehrlich tumour growth. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, p. 49-57, 2004.

MOSER, M.; DE SMEDT, T.; SORNASSE, T.; TIELEMANS, F.; CHENTOUFI, A. A.; MURAILLE, E.; VAN MECHELEN, M.; URBAIN, J.; LEO, O. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 10, p. 2818-24, 1995.

MUCCIOLI, M. Generation and labeling of murine bone marrow-derived dendritic cells with Qdot nanocrystals for tracking studies. **Journal of Visualized Experiments JoVE**, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3197051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 de dez. 2013.

MÜLLER, M.; HOLLSBOER, F.; KECK, M. E. Genetic modification of corticosteroid receptor signalling: novel insights into pathophysiology and treatment strategies of human affective disorders. **Neuropeptides**, v. 36, n. 2-3, p. 117-31, 2002.

BHATIA, N.; MAITI, P. P.; CHOUDHARY, A.; TULI, A.; MASIH, D.; KHAN, M. M. U.; ARA, T.; JAGGI, A. S. Animal models in the study of stress: A review. **Int. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 5, p. 1147-1155, 2011.

NORBURY, C. C. Drinking a lot is good for dendritic cells. **Immunology**, v. 117, n. 4, p. 443-51, 2006.

OHL, L.; MOHAUPT, M.; CZELOTH, N.; HINTZEN, G.; KIAFARD, Z.; ZWIRNER, J.; BLANKENSTEIN, T.; HENNING, G.; FÖRSTER, R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 279-88, 2004.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr Rev**, v. 22, n. 4, p. 502-48, 2001.

PADGETT, D. A.; GLASER, R. How stress influences the immune response. **Trends Immunol**, v. 24, n. 8, p. 444-8, 2003.

PADOVAN, C. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, n. 2, p. 325-30, 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 Behav Immun**, v. 17, n. 1, p. 43-54, 2003.

PARÉ, W. P.; GLAVIN, G. B. Restraint stress in biomedical research: a review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 10, n. 3, p. 339-70, 1986.

PIEMONTE, L.; MONTI, P.; ALLAVENA, P.; SIRONI, M.; SOLDINI, L.; LEONE, B. E.; SOCCI, C.; DI CARLO, V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. **J Immunol**, v. 162, n. 11, p. 6473-81, 1999.

PINHEIRO, M. L. **Efeitos da separação materna sobre o comportamento, a imunidade inata e o crescimento tumoral**. 167 p. (Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2008.

PORTFORS, C. V. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 46, n. 1, p. 28-34, 2007.

POWELL, N. D.; BAILEY, M. T.; MAYS, J. W.; STINER-JONES, L. M.; HANKE, M. L.; PADGETT, D. A.; SHERIDAN, J. F. Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 2, p. 225-31, 2009.

QIN, Z.; NOFFZ, G.; MOHAUPT, M.; BLANKENSTEIN, T. Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. **J Immunol**, v. 159, n. 2, p. 770-6, 1997.

QUEIROZ, J. E. S.; TORELLO, C. O.; PALERMO-NETO, J.; VALADARES, M. C.; QUEIROZ, M. L. Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an in vivo challenge with *Listeria monocytogenes*: modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 7, p. 1056-65, 2008.

RABIN, B. S.; COHEN, S.; GANGULI, R.; LYSLE, D. T.; CUNNICK, J. E. Bidirectional interaction between the central nervous system and the immune system. **Crit Rev Immunol**, v. 9, n. 4, p. 279-312, 1989.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **N Engl J Med**, v. 329, n. 17, p. 1246-53, 1993.

REIS E SOUSA, C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 21-5, 2004.

RUSSO-MARIE, F. Macrophages and the glucocorticoids. **J Neuroimmunol**, v. 40, n. 2-3, p. 281-6, 1992.

RUTELLA, S.; LEMOLI, R. M. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. **Immunol Lett**, v. 94, n. 1-2, p. 11-26, 2004.

SAPOLSKY, R. **Why zebra don't get ulcers: an update guide to stress**, stress-related disease, and coping. New York: Freeman, 1998.

SCATTONI ML, G. S.; RICCERI L; CRAWLEY J.N. Unusual Repertoire of Vocalizations in the BTBR T+tf/J Mouse Model of Autism. **PLOS ONE**, v. 3, n. 8, 2008.

SCHÜLER, T.; BLANKENSTEIN, T. Naive CD8(+) but not CD4(+) T cells induce maturation of dendritic cells. **J Mol Med (Berl)**, v. 80, n. 8, p. 533-41, 2002.

SELEY, H. The evolution of the stress concept. **American Scientist**, v. 61, p. 692-9, 1973.

SELYE, H. **Stress: a tensão da vida**. São Paulo: IBRASA, 1959.

STEFANSKI V; Engler, H. Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. **Physiol Behav**, v. 64, n. 5, p. 733-41, 1998.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J Exp Med**, v. 137, n. 5, p. 1142-62, 1973.

TABAROWSKI, Z.; GIBSON-BERRY, K.; FELTEN, S. Y. Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow. **Acta Histochem**, v. 98, n. 4, p. 453-7, 1996.

THAKER, P. H. HAN, L. Y.; KAMAT, A. A.; AREVALO, J. M.; TAKAHASHI, R.; LU, C.; JENNINGS, N. B.; ARMAIZ-PENA, G.; BANKSON, J. A.; RAVOORI, M.; MERRITT, W. M.; LIN, Y. G.; MANGALA, L. S.; KIM, T. J.; COLEMAN, R. L.; LANDEN, C. N.; LI, Y.; FELIX, E.; SANGUINO, A. M.; NEWMAN, R. A.; LLOYD, M.; GERSHENSON, D. M.; KUNDRA, V.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; LUTGENDORF, S. K.; COLE, S. W.; SOOD, A. K. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. **Nat Med**, v. 12, n. 8, p. 939-44, 2006.

TOMIYOSHI, M. Y. **A influência do convívio com parceiro doente sobre parâmetros fisiopatológicos de células dendríticas**. 101 p. (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2007.

TRUCKENMILLER, M. E.; BONNEAU, R. H.; NORBURY, C. C. Stress presents a problem for dendritic cells: corticosterone and the fate of MHC class I antigen processing and presentation. **Brain Behav Immun**, v. 20, n. 3, p. 210-8, 2006.

TRUCKENMILLER, M. E.; PRINCIOTTA, M. F.; NORBURY, C. C.; BONNEAU, R. H. Corticosterone impairs MHC class I antigen presentation by dendritic cells via reduction of peptide generation. **J Neuroimmunol**, v. 160, n. 1-2, p. 48-60, 2005.

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

VAN DE KAR, L. D.; BLAIR, M. L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. **Front Neuroendocrinol**, v. 20, n. 1, p. 1-48, 1999.

VISWANATHAN, K.; DAUGHERTY, C.; DHABHAR, F. S. Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. **Int Immunol**, v. 17, n. 8, p. 1059-69, 2005.

WEBSTER MARKETON, J. I.; GLASER, R. Stress hormones and immune function. **Cell Immunol**, v. 252, n. 1-2, p. 16-26, 2008.

XU, B. The importance of beta-adrenergic receptors in immune regulation: a link between neuroendocrine and immune system. **Med Hypotheses**, v. 56, n. 3, p. 273-6, 2001.

XU, B.; YI, Q.; PIRSKANEN, R.; MATELL, G.; ENG, H.; LEFVERT, A. K. Decreased beta2-adrenergic receptor density on peripheral blood mononuclear cells in myasthenia gravis. **J Autoimmun**, v. 10, n. 4, p. 401-6, 1997.

YANAGAWA, Y.; MATSUMOTO, M.; TOGASHI, H. Enhanced dendritic cell antigen uptake via alpha2 adrenoceptor-mediated PI3K activation following brief exposure to noradrenaline. **J Immunol**, v. 185, n. 10, p. 5762-8, 2010.

ZOUKOS, Y. et al. beta-Adrenergic receptor density and function of peripheral blood mononuclear cells are increased in multiple sclerosis: a regulatory role for cortisol and interleukin-1. **Ann Neurol**, v. 31, n. 6, p. 657-62, 1992.