GLAUCIE JUSSILANE ALVES

*Coabitação com um parceiro doente:
consequências sobre o comportamento, a atividade
imune inata e o crescimento tumoral*

São Paulo

2005

GLAUCIE JUSSILANE ALVES

***Coabitação com um parceiro doente:
conseqüências sobre o comportamento, a atividade
imune inata e o crescimento tumoral***

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

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. João Palermo Neto

**São Paulo
2005**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1536 FMVZ	<p>Alves, Glaucie Jussilane</p> <p>Coabitação com um parceiro doente: conseqüências sobre o comportamento, a atividade imune inata e o crescimento tumoral / Glaucie Jussilane Alves. – São Paulo : G. J. Alves, 2005.</p> <p>199 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2005.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto.</p> <p>1. Neuroimunomodulação. 2. Convivência com um doente. 3. Tumor de Ehrlich. 4. Imunidade inata. 5. Estresse. 6. Citometria de fluxo. I. Título.</p>
----------------	--

e-mail para contato com os autores: glauciealves@hotmail.com
jpalermo@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Coabitação com um parceiro doente: consequências sobre a atividade de neutrófilos e sobre o crescimento tumoral", protocolo nº604/2005, utilizando 96 camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Cohabitation with a sick cage-mate:: consequences on neutrophyl activity and tumor growth", protocol number 604/2005, utilizing 96 mice, under the responsibility of Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALVES, Glaucie Jussilane

Título: Coabitação com um parceiro doente: conseqüências sobre o comportamento, a atividade imune inata e o crescimento tumoral

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. _____
Assinatura _____

Instituição _____
Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Assinatura _____

Instituição _____
Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Assinatura _____

Instituição _____
Julgamento _____

A Deus por nunca me deixar sozinha.

Aos meus pais, Márcia e Nivalter por tanto carinho e compreensão, pelo suporte emocional e material, o que me permitiu buscar objetivos tão almejados, e pelo encorajamento nos horas difíceis, que me mostrou que a vida não pode ser menor que a imaginação e a capacidade de amar. Vocês tornam meus dias mais felizes!

A Gleids, cujo acaso, ou o destino, fez nos irmãs, mas nossos corações nos fizeram amigas. Minha sincera admiração.

Ao Klauber e ao Douglas pela amizade em todos os momentos.

Ao Mel, pela paz, pelo apoio e por todo seu amor.

Agradecimentos nunca são suficientes. O sentimento é maior do que as palavras. Serei sempre grata ao meu orientador, Professor Doutor João Palermo Neto pelo carinho, amizade e atenção que vem me orientando nesse árduo e, ao mesmo tempo, prazeroso percurso pelos caminhos da pesquisa incentivado descobertas e pontuado as direções.

AGRADECIMENTOS

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

A Dra. Maria Silvia F. de Azevedo Morgulis e a Dra. Cristina de Oliveira M. Salles Gomes e ao Dr. Fábio Ribeiro da Silva por suas preciosas colaborações na elaboração desta dissertação.

Ao Professor Mauricio Garcia e a Professora Maria Martha Bernardi pelo apoio irrestrito e por terem me incentivado a seguir no caminho do conhecimento.

Ao Professor Doutor Luciano Felício (VPT-FMVZ-USP), pelo apoio durante a realização deste projeto.

Ao Professor Doutor Luiz Carlos de Sá Rocha (VPT-FMVZ-USP) pelos conselhos dados sempre com muita criatividade, e pela atenção dispensada.

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

Aos Professores da Disciplina de Toxicologia em especial a Professora Doutora Silvana Gorniák pela gostosa convivência durante a realização do curso, o qual auxiliou na realização desta dissertação.

Ao Doutor Frederico Costa-Pinto pelos ensinamentos e pelo apoio durante a realização desta dissertação.

Ao Doutor Alexandre Salgado Basso por tantas dúvidas tiradas.

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

Aos funcionários do Biotério (VPT-FMVZ-USP): Claudia, Idalina, Rosiris, Herculano, Nelson e Luis por toda a dedicação.

Às funcionárias das secretarias (VPT-FMVZ-USP): Silvia, Claudia e Cristina pelas gentilezas.

Aos funcionários da biblioteca (VPT-FMVZ-USP): Aninha, Helena, Solange, Mara, Claudia, Margareth e Elza, pela correção da tese e auxílio em todos os momentos.

Ao Departamento de Reprodução Animal (VRA) na pessoa do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga e, em especial, à Érica do laboratório de dosagens hormonais (LDH) pelas dosagens de corticosterona.

Ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas do VPT, em especial ao Marco Aurélio Gattamorta, pela replicação da *Staphylococcus aureus* utilizada neste trabalho.

Nada nascemos sabendo, mas tudo poderemos aprender se tivermos dedicação e grandes amigos como os que tenho. **Muito obrigada!** Luciana Vismari, Elaine, Eva, Domênica, Moniquinha, Dario, Maria Isabel, Ana Leda, Marcos Gata Morta, Edson, Altamir, Nato, Dudu, Ricardo Lazzarini, Vanessa, Ana Leda, Renato, Andréia, Isis, Adriana, Fabiana Godói, Luciana Mirotti, Helena, Marcos, Maria Rita, Benito, Letícia, Portela, Renata, Daniel, Soraya, João Paulo, Julia, Wanderley, Milena, Caio e Vivi.

A CAPES/DS e a FAPESP números 99/04228-7 e 0414128-0 pelo apoio financeiro concedido.

*A verdadeira viagem de descoberta não
consiste em procurar novas paisagens, mas em
ter novos olhos.*

Marcel Proust

RESUMO

ALVES, G. J. **Coabitação com um parceiro doente: consequências sobre o comportamento, a atividade imune inata e o crescimento tumoral.** [Cohabiting with a sick mate: consequences on behavior, innate immune activity, and tumor growth]. 2005. 199 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A atividade do sistema nervoso central (SNC) afeta aquela do sistema imune e esta por sua vez, através de produtos originados em células imunes, como por exemplo, as citocinas modificam a atividade cerebral e, portanto, alguns comportamentos. O ato de conviver com pessoas portadoras de um tumor ou de patologias crônicas debilitantes tem sido estudado por vários pesquisadores, os quais têm relatado evidências que mostram ser algumas condições psicológicas experimentadas por “*caregivers*” associadas com variações de comportamento e de imunidade. Manifestações de estresse têm sido intensamente estudadas nestas pessoas. Neste sentido, e guardado os devidos cuidados com as extrapolações, não existe um modelo animal especificamente desenvolvido para analisar, em laboratório, as eventuais alterações imunes que possam ocorrer em animais que convivem com um outro doente. Este foi o objeto do presente trabalho. Mais especificamente, avaliou-se a existência de uma possível interação neuroimune em camundongas que coabitaram com outras portadoras de um tumor de Ehrlich, através da análise de parâmetros hematológicos, imunológicos, hormonais, comportamentais e neuroquímicos. Os resultados obtidos mostraram que a convivência por 11 dias com um animal portador do tumor de Ehrlich produziu em camundongas: 1) leucopenia; 2) diminuição do *burst* oxidativo induzido por PMA e por *S. aureus* e da porcentagem e, também da intensidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos; 3) aumento do *burst* oxidativo e redução da porcentagem, mas não alterou a intensidade de fagocitose de macrófagos ativados pelo ONCO-BCG; 4) diminuição da resistência ao crescimento de um tumor de Ehrlich, isto é, aumentou a concentração de células tumorais/ml de líquido ascítico e o número total de

células tumorais; 5) redução do número de leucócitos circulantes em animais inoculados com o tumor de Ehrlich; 6) diminuição dos níveis hipotalâmicos de noradrenalina e aumento daqueles de dopamina e de MHPG; 7) aumento do “*turnover*” de noradrenalina no hipotálamo e de dopamina no córtex frontal; 8) aumento dos efeitos da anfetamina sobre alguns parâmetros da atividade locomotora dos animais observados no campo aberto; 9) potencializou os efeitos de um tratamento com diazepam, reduzindo ainda mais o *burst* oxidativo induzido por PMA e por *S. aureus* assim como os efeitos do fármaco sobre a porcentagem e a intensidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos. No entanto, esta convivência não modificou a média do número de eritrócitos, a porcentagem do hematócrito e o volume corpuscular médio, assim como a atividade de macrófagos peritoneais residentes e, não interferiu com os níveis de corticosterona sérica dos animais. Em seu conjunto, os presentes resultados mostraram que a convivência com animais portadores de um tumor ascítico de Ehrlich produziu alterações comportamentais, neuroquímicas e imunológicas, que guardam grande similaridade com sinais e sintomas relatados em *caregivers*. Estas alterações foram interpretadas como decorrentes de uma situação de estresse psicológico prolongado vivenciado pelas camundongas companheiras de conspecíficas portadoras de um tumor. Mais especificamente, postulou-se, neste trabalho, sejam as alterações observadas decorrentes de um aumento de atividade catecolaminérgica no SNC e/ou de ativação do SNAS. A semelhança dos resultados obtidos em companheiras de animais doentes com aqueles de *caregivers* permitiu sugerir, tomados os devidos cuidados com extrapolações, seja o modelo experimental agora usado de alguma utilidade para a compreensão da situação vivenciada por estes *caregivers*.

Palavras chave: Neuroimunomodulação. Convivência com um doente. Tumor de Ehrlich. Imunidade inata. Estresse. Citometria de Fluxo. I.

ABSTRACT

ALVES, G. J. **Cohabiting with a sick mate: consequences on behavior, innate immune activity, and tumor growth.** [Coabitação com um parceiro doente: consequências sobre o comportamento, a atividade imune inata e o crescimento tumoral]. 2005. 199f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The activity of the central nervous system (CNS) affects the immune system, which by means of products molecules synthesized by its cells, modify the activity of the CNS, and, consequently, animal behavior. People that care for and support the needs of patients bearing tumors or with chronic, debilitating diseases, have been studied by many groups, with evidences pointing towards an association between some psychological conditions experienced by caregivers and changes in behavior and immunity. Stress-associated symptoms have been intensely studied in these people. Thus, taking into account the required grounds reasonable comparisons, there was no description of a suitable model for laboratory analysis of possible changes in immunity of animals cohabiting with a sick cage-mate. Therefore, the objective of this study was to establish a suitable model for this purpose. We particularly aimed on possible neuroimmune interaction in female mice that had cohabited with Ehrlich tumor-bearing mice, using for comparison hematological, immune, hormonal, behavioral, and neurochemical parameters. The results of this study show that cohabiting with a sick mate – mice bearing the Ehrlich tumor – for 11 days induced, in female mice: 1) leukopenia; 2) decrease in PMA- or *S. aureus*-induced oxidative burst, and also of the percentage and intensity of phagocytosis by circulating neutrophils; 3) increase in oxidative burst and reduction in the percentage, but did not influence intensity of phagocytosis by ONCO-BCG-activated macrophages; 4) decrease in the resistance to the progression of the Ehrlich tumor, shown by the enhanced concentration of tumor cells per ml of the ascitic fluid, and total number of tumor cells; 5) reduction in the number of circulating leukocytes in

animals injected with the Ehrlich tumor; 6) diminished hypothalamic levels of noradrenaline and increased those of dopamine and MHPG in the same region; 7) increased the turnover of noradrenaline in the hypothalamus, and of dopamine in the frontal cortex; 8) enhanced the effects of amphetamine on several parameters of motor activity observed in the open field arena; 9) potentiated the effects of diazepam, reducing the PMA- or *S. aureus*-induced oxidative burst, and on the percentage and intensity of phagocytosis by circulating neutrophils even further. Nonetheless, cohabiting with the sick mate did not alter the red cell count, the hematocrit, or the mean cell volume, nor did it influence the activity of resident peritoneal macrophages or interfere with serum corticosterone levels. Altogether, these findings show that cohabiting with animals bearing the ascitic Ehrlich tumor caused behavioral, neurochemical, and immunological changes compatible with those presented and described by caregivers. These changes are interpreted as related to a sustained, long-term situation of psychological stress experienced by the conspecific female healthy mates of the tumor-bearing mice. In particular, we postulate in this study that the changes observed might be driven by the increased catecholaminergic activity in the CNS and/or by the activation of the sympathetic branch of the autonomic nervous system (SANS). The resemblance of the results obtained here and those seen in human caregivers allows the careful suggestion that this model may be relevant to help understanding the situation experienced by caregivers.

Keywords: Neuroimmunomodulation. Cohabiting with a sick mate. Ehrlich tumor. Innate immunity. Stress. Flow cytometry.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	- Hormônio adrenocorticotrópico
ATCC25923	- Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>
BCG	- Bacilo Calmet Guerin
BDZ	- Benzodiazepínico
CD	- Agrupamento de diferenciação
DA	- Dopamina
DCFH-DA	- 2'7' diacetato de diclorofluoresceína
DOPAC	- Ácido 4,4-diidroxifenilacético
ERO	- Espécie reativa de oxigênio
FITC	- Isoticianato fluorescentes
FSC	- Feixe óptico de luz que indica tamanho da célula
GM-CSF	- Fator estimulante de colônia
HPLC	- Cromatografia líquida de alta performance
H₂O₂	- Peróxido de hidrogênio
HHA	- Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HPA	- Eixo hipotálamo-pituitária -adrenal
HVA	- Ácido homovanílico
IL	- Interleucina
IgG	- Imunoglobulina G
IFN	- Interferon
LPS	- Lipopolissacarídeo
MAO	- Enzima monoamina oxidase
MHPG	- 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenoglicol
MPO	- enzima mieloperoxidase
NA	- Noradrenalina
NADPH	- Diidronicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
NADPH-oxidase	- Enzima ligada a produção de espécies reativas de oxigênio
NK	- Célula exterminadora natural
NO	- Óxido Nítrico
Onco-BCG	- Cepa atenuada do bacilo Camette-Guerin
OVA	- Ovalbumina
IFN	- Interferon
PBR	- Receptor benzodiazepínico periféricos
PE	- Phicoeritrina
PI	- Iodeto de propídio
PMA	- Miristato-acetato de forbol
PMN	- Células polimorfonucleares
PPG	- Propilenoglicol
SAPI	- <i>Staphylococcus aureus</i> conjugada com iodeto de propídio
SI	- Sistema Imunológico
SNA	- Sistema Nervoso Autônomo
SNAS	- Sistema Nervoso Autônomo Simpático
SNC	- Sistema Nervoso Central
SSC	- Feixe óptico de luz que indica a granulosidade da célula
Th	- Linfócito T auxiliar

TNF	- Fator de necrose tumoral
5HT	- Serotonina
5HIAA	- 5 hidroxi indolacético
6-OHDA	- 6-hidroxi-dopamina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	NEUROIMUNOMODULAÇÃO	22
2.2	CONVIVÊNCIA COM DOENTES	40
2.3	ESTUDOS SOBRE CITOMETRIA DE FLUXO, MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS.....	51
3	OBJETIVOS	64
3.1	OBJETIVO GERAL.....	64
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
4	MATERIAIS E MÉTODOS	66
4.1	ANIMAIS.....	66
4.1.1	Formação dos Grupos	67
4.2	FÁRMACOS.....	68
4.2.1	Diazepam	68
4.2.2	Sulfato de d-anfetamina	69
4.3	BIOLÓGICOS.....	70
4.4	CORANTES CELULARES.....	70
4.5	MEDICAMENTOS, REAGENTES E SOLUÇÕES	71
4.5.1	Reagentes e Estímulos para Análise do <i>Burst</i> Oxidativo	72
4.5.2	O Citômetro de Fluxo	75

4.6	PROCEDIMENTOS	76
4.6.1	Obtenção e Manutenção de Células do Tumor de Ehrlich	76
4.6.2	Hemograma	77
4.6.3	Medida da Atividade Celular	78
4.6.4	Avaliação do <i>Burst</i> Oxidativo e da Fagocitose de neutrófilos e de Macrófagos por Citometria de Fluxo	79
4.6.5	Avaliação do Crescimento do Tumor de Ehrlich	82
4.6.6	Dosagem dos Níveis Séricos de Corticosterona Plasmática	83
4.6.7	Dosagens Neuroquímicas	86
4.6.8	Medida da Atividade Geral	89
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	94
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	95
5.1	EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH.....	95
5.2	EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE REALIZADA POR NEUTRÓFILOS DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH	99
5.3	EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO <i>EX VIVO</i> E POR CITOMETRIA DE FLUXO, DO <i>BURST</i> OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES, EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH	107

5.4	EXPERIMENTO 4 – AVALIAÇÃO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ATIVADOS PELO ONCO-BCG, EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH.....	111
5.5	EXPERIMENTO 5 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE UM TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO MESMO TUMOR.....	115
5.6	EXPERIMENTO 6 – AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH, 11 DIAS APÓS SEREM INOCULADOS COM 5×10^6 CÉLULAS DO MESMO TUMOR.....	118
5.7	EXPERIMENTO 7 – DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH.	122
5.8	EXPERIMENTO 8 – DOSAGEM DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS NO HIPOTÁLAMO E NO CÓRTEX FRONTAL DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH.....	124
5.9	EXPERIMENTO 9 – MEDIDA DE ATIVIDADE GERAL DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH, APÓS ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ANFETAMINA.	132

5.10	EXPERIMENTO 10 – AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO, DO <i>BURST</i> OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH, APÓS RECEBERAM UMA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE DIAZEPAM.....	143
6	DISCUSSÃO	149
7	CONCLUSÕES	173
	REFERÊNCIAS	175

1 INTRODUÇÃO

É de amplo conhecimento que as relações entre os sistemas nervoso central e imune é bi-direcional e intensa. Sabe-se que a atividade do sistema nervoso central (SNC) afeta aquela do sistema imune e que esta por sua vez, através de produtos originados em células imunes, como por exemplo, as citocinas modificam a atividade cerebral e, portanto, alguns comportamentos. Estudos conduzidos no campo da psiconeuroimunologia têm mostrado, neste sentido, que a susceptibilidade e a recuperação de doenças são fortemente influenciadas pela atividade do SNC (BESENDOVSKY et al., 1996; DANTZER et al., 1989).

O ato de conviver com pessoas portadoras de um tumor ou de patologias crônicas debilitantes tem sido estudado por vários pesquisadores, os quais têm relatado evidências que mostram que certas condições psicológicas experimentadas por estes “*caregivers*” estão associadas com variações de parâmetros indicativos de imunidade. A depressão e o estresse são dois estados emocionais que têm sido intensamente estudados nestas pessoas. Estes estudos têm trazido crescentes e recentes evidências que confirmam a relevância de fatores psicosociais de “*caregivers*” em uma variedade de doenças como depressão, doenças cardiovasculares e câncer Wu et al (1999). A análise da relação entre mudanças comportamentais em “*caregivers*” e resistência às doenças surge, assim, como uma importante via de acesso para uma melhor compreensão do desenvolvimento de algumas doenças nestes indivíduos. Wu et al. (1999) investigaram, em humanos, os efeitos de um estresse psicosocial no desenvolvimento de um tipo de tumor, tendo verificado a existência de uma correlação positiva ou direta entre níveis de estresse e desenvolvimento do tumor. Neste sentido, alterações da função imune são consideradas muito relevantes quando resultam em sintomas clínicos ou em alterações anatomopatológicas significantes.

A literatura médica descreve um grande número de casos que mostram ser pessoas que cuidam de indivíduos doentes ou “*caregivers*” mais susceptíveis às doenças (THOMPSON et al., 2004). Neste sentido, e guardado os devidos cuidados com as extrapolações, não existe um modelo animal especificamente desenvolvido para analisar, em laboratório, as eventuais alterações imunes que possam ocorrer em animais que convivem com um outro doente. Este é, pois, o objeto do presente trabalho.

Mais especificamente, pretende-se avaliar a existência de uma possível interação neuro-imune em camundongas que coabitaram com outras portadoras de um tumor de Ehrlich, através da análise de parâmetros hematológicos, imunológicos, hormonais, comportamentais e neuroquímicos.

Desta forma questionamos: 1) A convivência com um conspecífico doente modificaria o comportamento de camundongos? 2) Que tipo de alteração comportamental produziria? 3) Interferiria com a imunidade celular? 4) Modificaria o “*burst oxidativo*” de neutrófilos e de macrófagos? 5) Se o animal objetivo deste estudo fosse inoculado com um tumor após a convivência com o doente, seria possível detectar alterações no crescimento tumoral? 6) Se o animal que convive com o animal doente recebesse uma terapia com um fármaco ansiolítico como o diazepam haveria, reversão do quadro imunológico observado? 7) A convivência com um animal doente modificaria os efeitos de um estimulante do SNC, como a anfetamina? Em resumo 8) Haveriam relações entre as alterações observadas no SNC e aquelas encontradas no sistema imune? Em caso positivo, 9) Como ocorreriam? Estas e outras perguntas de igual relevância foram o objetivo do presente trabalho.

Escolhemos o tumor de Ehrlich como ferramenta para este trabalho por ser ele facilmente induzido e mensurado em camundongos e, também por elicitar uma forte resposta imune. Estas propriedades têm feito deste tumor um interessante modelo de análise dos efeitos de fármacos ou de alterações em eventos externos, como por exemplo, do estresse.

Nesse sentido, nosso grupo de trabalho já observou, por exemplo, que animais que conviveram com outros portadores de um tumor ascítico de Ehrlich apresentavam tanto diminuição do número de leucócitos circulantes como alterações de comportamento (MORGULIS et al., 2004). Assim, pareceu-nos interessante verticalizar um pouco mais a análise deste fato usando técnicas mais avançadas para análise da atividade do SNC e a citometria de fluxo para as avaliações de imunologia celular. Neste sentido, optamos por usar a citometria de fluxo para os ensaios de imunidade inata deste trabalho por ser ela uma metodologia que possibilita, em poucos minutos, uma avaliação de vários parâmetros da atividade celular, em um grande número de células.

2 REVISÃO DA LITERATURA

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

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

Nas últimas décadas a interação entre o sistema imunológico (SI) e o sistema nervoso central (SNC) têm despertado o interesse de inúmeros grupos de pesquisa. Este interesse e os trabalhos que vêm sendo obtidos resultaram na concepção de uma grande área de pesquisa conhecida, de modo mais amplo, como Psiconeuroimunologia ou Neuroimunomodulação. Esta área se presta ao estudo dos mecanismos através dos quais estes sistemas trocam informações, influenciando-se mutuamente, com evidentes implicações fisiológicas e patológicas.

Segundo a definição de Ader (2000), a psiconeuroimunologia vem a ser a ciência que estuda as interações entre o comportamento, as funções neurais e endócrinas, e os processos imunes; parte da premissa de que a adaptação seja o produto de um único e integrado sistema orgânico em que cada uma de suas partes evoluiu para executar uma função especializada. Conseqüentemente, a imunorregulação não pode ser entendida completamente sem que se leve em consideração o organismo como um todo e os meios externos e internos no qual as respostas imunes ocorrem.

A compreensão dos mecanismos fisiológicos importantes na regulação dos sistemas imunológico e nervoso tem constituído desde há muito tempo o principal foco de atenção de grande parte da pesquisa biomédica. Porém, muita da atenção despendida anteriormente para

o entendimento destes processos, feita de maneira fragmentada, vem cedendo espaço para um estudo mais sintético das complexas relações existentes entre eles. De fato veio à tona a percepção de que são partes de uma rede de controle muito mais ampla (COSTA-PINTO, 2004).

A influência da atividade do sistema neuroendócrino sobre o sistema imunológico foi explicada magistralmente por Hans Selye em um artigo que se tornou um marco na história do estudo do estresse (REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004).

Selye descreveu o desenvolvimento de uma síndrome decorrente da exposição de um animal a um conjunto muito diversificado de estímulos nocivos que incluía exposição ao frio, injúria tecidual, excesso de exercícios e intoxicações, entre tantos outros. Os achados característicos dessa síndrome foram hipertrofia das glândulas adrenais, aparecimento de úlceras gástricas e, curiosamente para a época, atrofia de órgãos linfóides, incluindo-se aqui o timo, o baço e os linfonodos. Como tais achados eram independentes do agente empregado, Selye concluiu que representavam uma resposta orgânica à injúria, denominando-os coletivamente de ‘síndrome de adaptação geral’, que posteriormente passou a ser chamada de estresse. Desse trabalho nasciam dois conceitos fundamentais sobre o estresse: 1) a resposta aos estressores parecia ser adaptativa, representando uma tentativa do organismo de acomodar-se a uma nova situação, e 2) ela não dependia do estímulo, era estereotipada (SEYLE, 1936). Como essa síndrome pode ser gerada por estímulos físicos e psicológicos, e como tem decorrências tanto comportamentais quanto endócrinas, incluindo-se aqui a influência destas sobre a atividade de órgãos linfóides, e conseqüentemente sobre o sistema imunológico, parece natural supor que o SNC e o SI interajam na preparação do organismo para acomodar mudanças impostas pelo estressor.

Um dos pioneiros no desenvolvimento da psiconeuroimunologia foi George Salomon que iniciou a pesquisa clínica nesta área examinando a história de vida e as características de

personalidade de seus pacientes relacionando-as com doenças autoimunes. O mais conhecido de seus estudos refere-se à análise que fez de pacientes com artrite reumatóide e do risco desta doença para os parentes dos mesmos; analisou, em especial, a presença ou ausência nestas pessoas de um fator reumatóide, um anticorpo anti IgG característico da artrite reumatóide. Observou que embora alguns dos parentes dos indivíduos acometidos pela doença autoimune se apresentassem positivos para o fator reumatóide, não desenvolviam a doença; curiosamente, estes pacientes apresentavam níveis baixos de ansiedade, depressão, ou alienação, e desenvolviam uma boa relação com esposa, familiares e amigos. Convencido da necessidade de confirmar estes dados e de realizar pesquisas nesta área Salomon fundou um laboratório de “psiconeuroimunologia”, para analisar mais detalhadamente a influência de efeitos comportamentais, sociais e endócrinos sobre a função imune; avaliou principalmente a resposta orgânica a antígenos bacterianos, e à inoculação de tumores tendo verificado existência de correlações positivas entre as variáveis estudadas (para revisão veja SOLOMON; AMKRAUT, 1981). Algum tempo depois, adapta seus conceitos de psiconeuroimunologia às pesquisas clínicas relacionada com o HIV e com a AIDS (ADER, 2000).

Atualmente, sabe-se que diversos estímulos provenientes do SNC são capazes de modular uma resposta imune. Desta forma, o sistema endócrino e em especial, o eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal (HPA), é um dos responsáveis por vários elos de ligação entre estes dois sistemas (LICINIO; FROST, 2000; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; STRANGE et al., 2000). Sabe-se, também, que as endorfinas, o Sistema nervoso Autônomo (SNA) (BLALOCK, 1989) e também medicamentos de ação central, como os benzodiazepínicos (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003; MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999; SCHLUMPF et al., 1990) e o haloperidol (LOURENÇO; DORCE; PALERMO-NETO, 2005) interferem com a resposta imune.

A ativação do eixo HPA, e a conseqüente produção dos glicocorticóides, durante o estresse são um dos principais mecanismos responsáveis pelas alterações da resposta imune encontradas no decorrer deste processo. Sabe-se serem os glicocorticóides capazes de inibir a transcrição de inúmeras citocinas, como de interleucina 1 (IL-1), IL-13, IL-5, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulante de colônia (GM-CSF) (GUYRE et al., 1988). Além disso, os glicocorticóides não interferem apenas com a síntese de citocinas; existem outros mecanismos também descritos para eles que incluem a diminuição de receptores para IL-4 (SO et al., 2002) e a diminuição da migração/quimiotaxia de eosinófilos (SUGIMOTO et al., 2003) e de neutrófilos (VAN OVERVELD et al., 2003).

Desta forma, Zhou et al. (1993) mostraram que ratos submetidos a situações estressantes, como, por exemplo, choque nas patas, apresentavam um aumento dos níveis plasmáticos de ACTH, corticosterona e IL-6. Estes mesmos autores mostraram a importância dos hormônios para este fato, em especial dos glicocorticóides, pois ratos adrenalectomizados e submetidos à mesma situação de estresse, apresentaram uma menor resposta ao estressor, mensurada pelo menor aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 (ZHOU et al., 1993). Neste sentido, Cao; Lawrence (2002) mostraram que camundongos submetidos a um estresse agudo por frio e contenção tinham aumento dos níveis séricos de corticosterona, IL-6 e Interferon- γ (IFN- γ), e também, um maior número de bactérias (*Listeria monocytogenes*) viáveis em órgãos como baço e fígado após uma infecção experimental; relataram, desta forma, a importância do estresse na modulação dos processos imunológicos e no desenvolvimento de uma infecção.

Além disso, Fonseca; Massoco; Palermo-Neto (2002) mostraram que um estresse aplicado em fêmeas gestantes, interferia com parâmetros comportamentais e com a atividade de macrófagos da prole. Mais especificamente, estes autores observaram que uma prole de camundongos estressada pré-natalmente apresentava uma maior atividade locomotora

avaliada no campo aberto e um menor índice de espraçamento de macrófagos peritoneais. Além disso, estes mesmos autores mostraram que este estresse aplicado durante a fase pré-natal interferia com a responsividade de alguns parâmetros da resposta imune da prole de camundongos submetidos a um estresse pós-natal, ou seja, mostraram que havia um aumento da produção de H_2O_2 e uma diminuição do índice de fagocitose no grupo de animais estressados pré e pós natalmente quando estes eram comparados ao grupo de animais estressados apenas pós natalmente (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002).

Outra abordagem tem se mostrado extremamente interessante na compreensão da influência de núcleos do SNC sobre respostas imunológicas em curso: aquela que faz uso de lesões experimentais. Nesse sentido, a contribuição do grupo de Jankovic foi muito relevante, ao demonstrar que lesões do *locus ceruleus*, núcleo do tronco encefálico que tem a maior concentração de neurônios noradrenérgicos do SNC, levavam a uma diminuição tanto da produção de anticorpos contra albumina como do número de células T CD4⁺ circulantes e, ainda, a uma atrofia do timo e a uma supressão de hipersensibilidade tardia à albumina (JOVANOVA-NESIC; NIKOLIC; JANKOVIC, 1993; NIKOLIC; JOVANOVA-NESIC; JANKOVIC, 1993). Esses fatos, corroborados pelas descrições da existência de uma inervação simpática de órgãos linfóides Felten et al. (1985), e da influência dessa inervação sobre a maturação de células T, e da presença de receptores β -adrenérgicos em linfócitos (com distribuição diferente entre subtipos dessas células) Elenkov et al. (2000), têm reforçado a importância do sistema nervoso simpático sobre a evolução de respostas imunológicas.

Sabe-se, também, que estímulos estressores interferem com a resposta imunológica, modificando, por exemplo, o balanço entre a imunidade do tipo Th1 e Th2 (KIECOLT-GLASER et al., 2001). Iwakabe et al. (1998) mostraram que camundongos submetidos a um estresse por contenção apresentavam aumento dos níveis séricos de corticosterona, diminuição da atividade de células NK e da produção de IFN- γ , enquanto a produção de IL-4

não se apresentava diminuída, mostrando, estes achados, um deslocamento do balanço Th1/Th2 induzido pelo estresse, isto é, um direcionamento para Th2. Este desequilíbrio pode ser de grande relevância, pois uma resposta imunológica do tipo Th2 foi relatada como sendo capaz de tornar indivíduos mais susceptíveis a determinados tipos de doenças, em especial, às alergias (BASHIR et al., 2004; BASSO et al., 2003; COSTA-PINTO et al., 2005; MORAFO et al., 2003). Neste sentido, um estudo realizado por Portela et al. (2001) mostrou que ratos previamente sensibilizados por ovalbumina (OVA), submetidos a estresse por choque nas patas e subsequente desafio com OVA, desempenhavam um menor tempo em interação social com outro rato e apresentavam maior número de leucócitos no lavado broncoalveolar, quando comparados a animais não estressados; relataram, desta forma, uma clara correlação entre estresse e resposta anafilática pulmonar.

Estudos baseados na complexa relação entre SNC, SI e endócrino também têm sido realizados para elucidar alguns mecanismos envolvidos com a progressão de tumores. Sakai (2004) descreveu um aumento do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos que receberam tratamento com diazepam *in vivo* (3,0 mg/kg). Palermo-Neto; Massoco; Robespierre de Souza, (2003), relataram alterações comportamentais e imunológicas produzidas por estresse físico e psicológico em camundongos adultos. Neste trabalho os autores mostraram que um estresse psicológico, gerado pelo ato de observar um outro animal receber choque inescapável, produzia respostas estressantes em tudo similares àquelas geradas pelo choque inescapável. Tanto o animal que recebia o choque inescapável na pata como o que presenciava a estimulação aversiva apresentaram um aumento do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich, que foi avaliado através do número de células tumorais e do volume do fluido ascítico. Estes mesmos autores observaram, também, uma redução dos índices de espraçamento e de fagocitose de macrófagos peritoneais obtidos destes animais e uma diminuição da atividade locomotora dos mesmos no campo aberto. Em outro trabalho,

mostrou-se que camundongos estressados durante a fase pré-natal apresentaram aumento dos níveis de ansiedade, diminuição dos índices de espraio e fagocitose por macrófagos peritoneais e, também, aumento do crescimento do Tumor de Ehrlich em sua forma sólida e ascítica (PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001). Strange et al. (2000) mostraram que camundongos machos submetidos a estresse psicossocial e inoculados com um tumor andrógeno responsivo (AR SC115) apresentavam menor resposta à quimioterapia e, também, uma menor sobrevivência, dependendo dos efeitos observados e do tipo de estresse aplicado. Estas evidências justificam a grande preocupação dos pesquisadores com esta área de pesquisa, também chamada de psico-oncologia. Desta forma, outros trabalhos têm sido realizados em seres humanos buscando avaliar a necessidade de se completar os tratamentos convencionais (quimioterapia e radioterapia, por exemplo) com outros ligados ao uso de psicofármacos e/ou a um acompanhamento psicológico que, de alguma forma, auxiliem o paciente a reduzir seus níveis de ansiedade, apresentando, quem sabe, uma melhor qualidade de vida (ANDERSEN et al., 2004; DAVIDSON; MILBURN; WILSON, 2004).

Como já comentado, além do eixo HPA, um outro importante mecanismo ativado durante o estresse está ligado ao Sistema Nervoso Autônomo (SNA); a estimulação deste sistema leva à liberação de noradrenalina nos terminais nervosos simpáticos e à secreção de adrenalina pela adrenal (MAIER, 2003). Sabe-se, a este respeito, que as fibras simpáticas apresentam íntimo contato com os órgãos linfóides como acontece, por exemplo, no baço que apresenta intensa inervação simpática (MADDEN; FELTEN, 1995). Além disso, outros órgãos e células, como o pulmão (RUGG; BARNETT; NAHORSKI, 1978), macrófagos alveolares (HENRICKS et al., 1988) e os linfócitos circulantes (FELTEN et al., 1987), possuem alta densidade de marcação para β_2 -adrenoceptores.

Na tentativa de melhor compreender estes mecanismos neuroimunes ligados ao SNA, (BROUG-HOLUB et al., 1998) mostraram que ratos submetidos a um estresse apresentavam

maior liberação de IL-1 β por macrófagos alveolares. Mostraram, também, que este efeito era revertido quando os animais recebiam um pré tratamento que bloqueava a atividade do SNA de maneira inespecífica ou, também, de forma mais específica isto é, bloqueando-se os β_2 -adrenoceptores, minutos antes da aplicação de um estresse. Além disso, mostraram que os animais estressados não apresentaram níveis elevados de corticosterona ou ACTH, dados que reforçavam a participação do SNA no fenômeno que analisaram.

Ainda sobre o papel do SNA nos processos neuroimunes, Del Rey et al. (2002) estudaram animais que foram inoculados com um superantígeno chamado *Staphylococcal Enterotoxin B* (SEB). Estes animais apresentaram dois dias após a inoculação um aumento tanto da proliferação de linfócitos T esplênicos como dos níveis plasmáticos de IL-2; estes mesmos autores relataram que as alterações destes parâmetros diminuía quando os animais eram previamente tratados por via sistêmica com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), uma substância que induz denervação simpática (DEL REY et al., 2002). Neste contexto, em animais tratados com 6-OHDA por via intra-cérebro-ventricular (i.c.v.), observou-se uma diminuição tanto dos níveis de adrenalina e noradrenalina na região do hipotálamo, como, também da proliferação de linfócitos sanguíneos e de esplenócitos, da produção de IL-2 e de IFN- γ e da expressão de mRNA de IL-2 em esplenócitos (PACHECO-LOPEZ et al., 2003). Neste mesmo trabalho, os autores observaram que estes efeitos imunológicos não estavam correlacionados com a ativação de eixo HPA e que eram eliminados através da realização de simpatectomia periférica, evidenciando-se, mais uma vez, a importância dos mecanismos simpáticos na modulação de uma resposta imune (PACHECO-LOPEZ et al., 2003).

Por outro lado, durante a década de 70 Hugo Besendovsky começou a avaliar a interação entre os sistemas neuroimune e endócrino. Em 1975, demonstrou que a imunização com diferentes antígenos era capaz de induzir mudanças neuroendócrinas e de atividade no

SNC. Nascia então o outro braço da neuroimunomodulação: o estudo dos efeitos de produtos originários de processos imune/inflamatórios sobre a atividade do SNC.

Assim, a busca de um substrato molecular que suportasse e justificasse a interação entre os sistemas endócrino e imunológico foi, e continua sendo, foco de estudo de muitos grupos de pesquisa que trabalham em neuroimunomodulação; buscaram, especificamente, entender a ‘sintaxe’ da conversa entre esses sistemas (BLALOCK, 1994). Já está bem aceito, nos dias atuais, que células do sistema imunológico possuem β -adrenoceptores (MADDEN; SANDERS; FELTEN, 1995), assim como o fato de que têm a capacidade de sintetizar alguns hormônios, entre eles o ACTH (BLALOCK; HARBOUR-MCMENAMIN; SMITH, 1985). Por outro lado, já se demonstrou que citocinas como a IL-1 podem ser sintetizadas dentro do SNC, tendo ali importante papel em funções anteriormente descritas como sendo exclusivas do sistema nervoso como, modulação de emoções, de comportamentos e da memória (SCHNEIDER et al., 1998). Um trabalho realizado por Costa-Pinto et al. (2005) mostrou aumento de marcação fós em áreas do sistema nervoso central relacionadas com o comportamento ansioso e com a emoção (como o núcleo paraventricular do hipotálamo e o núcleo central da amígdala) após um único desafio intranasal com OVA em camundongos tornando alérgicos ao antígeno.

Neste sentido, partindo-se do princípio que há influência de mediadores originários do sistema imunológico sobre o SNC induzindo a ativação do eixo HPA, a resposta por eles desencadeada passa, então, a fazer parte do repertório de respostas adaptativas chamadas coletivamente de síndrome de adaptação geral ao estresse, que classicamente estavam apenas relacionadas a estímulos físicos ou psicológicos. Como definido por Blalock (1984) o sistema imunológico funcionaria como um sistema sensorial adicional, difuso, dinâmico e em constante adaptação que capacitaria o SNC a receber estímulos e mensagens que, de outro modo, não seriam percebidos pelas vias sensoriais clássicas.

Os estudos sobre os efeitos de citocinas e de outras moléculas importantes na regulação de respostas no SNC passaram a compreender duas facções ou enfoques diferentes e complementares: a tentativa de isolamento de moléculas e das vias essenciais para a sinalização do SI para o SNC, e o estudo das alterações comportamentais no contexto em que se inserem, ou seja, como parte do repertório de comportamentos expressados pelos animais. Neste sentido, começou a ficar cada vez mais claro que as alterações de comportamento decorrentes da sinalização pelo sistema imunológico quando de uma infecção não se tratavam de manifestação de depressão inespecífica do SNC, mas, sim, de um conjunto de adaptações comportamentais muito bem organizadas dentro do contexto em que os animais estavam inseridos.

A primeira tentativa de estruturação conceitual acerca do comportamento de animais doentes veio de Benjamin Hart, que compilou informações de diversas espécies animais acometidos por uma ampla gama de processos patológicos (HART, 1988). Ele agrupou alguns achados comuns a todas as espécies e processos estudados, que incluíam febre, letargia ou prostração, perda de apetite e diminuição do consumo de água, diminuição de locomoção em geral, (mas com maior importância daquela dirigida à exploração ambiental) redução de autolimpeza (evidente em roedores) entre outros. A opinião de Hart foi clara: o conjunto de alterações apresentadas por animais doentes, coletivamente denominado de comportamento doentio, estava longe de ser resultado de uma depressão geral e inespecífica do SNC; correspondia, sim, a um conjunto organizado de modificações fisiológicas e comportamentais, isto é, existia uma base biológica (e não patológica) para o comportamento dos animais doentes. No mesmo trabalho são listadas possíveis vantagens (aparentemente paradoxais) de alterações comportamentais para os animais acometidos de doenças, tais como diminuição do gasto energético fisiológico com a digestão de comida (anorexia), menor perda de calor e exposição a possíveis predadores (prostração) e geração de um ambiente menos favorável à

proliferação de patógenos, favorecida pela atividade de células imunológicas (febre) (HART, 1988). Mesmo se evitarmos uma análise dos fenômenos descritos baseados na presunção de sua função, um fato torna-se claro: as alterações são adaptativas, e contribuem para uma recuperação mais rápida e para a sobrevivência do animal acometido. Dois exemplos clássicos e elegantes dessa afirmação são descritos a seguir. Lagartos, que obviamente não desenvolvem febre na acepção clássica do termo por serem pecilotermos, depois de inoculados com um patógeno bacteriano (*Aeromonas hydrophila*), procuram aumentar sua temperatura corpórea por meio da busca de locais mais aquecidos para permanecer, fenômeno denominado de ‘febre comportamental’; se privados da chance de optar por esses locais quentes, estes animais apresentam níveis de mortalidade muito maiores que animais colocados à temperatura mais alta que a fisiológica (KLUGER; RINGLER; ANVER, 1975). Camundongos que receberam um agente infeccioso por via intraperitoneal (*Listeria monocytogenes*) e cuja anorexia foi contornada por alimentação forçada por gavagem sobreviveram, em média, metade do tempo que aqueles alimentados *ad libitum* e submetidos ao mesmo procedimento de passagem de sonda gástrica (MURRAY; MURRAY, 1979). Importante notar que todas as alterações descritas pela instalação de um processo infeccioso podem ser desencadeadas por administração de algumas citocinas ou por outros mediadores inflamatórios e imunológicos. Apesar de Hart referir-se por diversas vezes ao comportamento de animais doentes, o termo ‘comportamento doentio’ foi cunhado apenas alguns anos mais tarde por Stephen Kent, trabalhando no grupo de (DANTZER; BLUTHE, 1992). Neste trabalho o autor discorre sobre a compreensão dos mecanismos que geram as alterações comportamentais e analisa os possíveis interesses eventualmente gerados por este fato (desenvolvimento de terapias para a reversão do estado doentio). O autor usou pela primeira vez o termo para se referir ao conjunto de alterações comportamentais que acompanham grande número de processos patológicos que ocorriam aparentemente, sem ligação

fisiopatológica; referiu-se, ainda, a comportamentos modificados durante a doença dentre os quais “ocorrência de alterações no padrão do sono e perda aparente do interesse por atividades cotidianas e positivas, tais como a busca por alimento, contato social, interesse sexual e outros. Fala o autor da geração de um estado denominado de anedonia, caracterizado pela falta de busca do prazer somada à incapacidade aparente de percebê-lo ou apreciá-lo” (KENT et al., 1992).

Nascida, então, da análise de processos infecciosos de várias origens, a história do comportamento doentio foi inicialmente marcada pelo estudo principalmente do efeito sobre o comportamento de produtos bacterianos - e dentre eles certamente o lipossacarídeo de parede de Bactérias gram-negativas, ou LPS, foi e é o mais utilizado – e de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF α cuja relevância está bem descrita nos processos inflamatórios. Daquele ponto em diante foram incluídas na ampla gama dos processos que podem gerar alterações comportamentais outras situações patológicas como crescimento de neoplasias e doenças autoimunes; somando-se estas ao que já havia sido descrito para os processos infecciosos.

A criação do arcabouço teórico do conceito de comportamento doentio foi precedida de uma enxurrada de estudos sobre os efeitos comportamentais de citocinas e do LPS. Esse conjunto de estudos abordava praticamente todos os componentes do comportamento doentio, gerando uma vasta, porém controversa literatura. Mostrou-se, assim, que a redução induzida por administração de LPS no consumo de alimentos (MCCARTHY; KLUGER; VANDER, 1984) dava-se mediante a produção de IL-1 estimulada por ele (MCCARTHY; KLUGER; VANDER, 1985). Este fenômeno foi posteriormente, confirmado em várias espécies de animais de experimentação e mediante outros estímulos, como em infecções pelo vírus da influenza (SWIERGIEL et al., 1997) ou na vigência de tumores (OPARA et al., 1995) em ambos casos, os sintomas estavam relacionados a níveis elevados de IL-1 (PLATA-

SALAMAN, 1997; PLATA-SALAMAN; OOMURA; KAI, 1988). De maneira previsível, uma redução duradoura como essa descrita acima no consumo de alimentos levava a uma perda rápida da massa corpórea, recuperada após o restabelecimento do animal (BLUTHE; DANTZER; KELLEY, 1992; SWIERGIEL; SMAGIN; DUNN, 1997; SWIERGIEL et al., 1997). Deste modo, animais doentes não estão incapacitados de realizar tarefas ou de responder a estímulos ambientais; apenas não o fazem dada a baixa prioridade que estas tarefas têm em um determinado contexto.

Foi demonstrado que, se colocadas em uma temperatura amena (22° C), fêmeas lactantes que receberam LPS deixam de construir ninhos de forma bem mais intensa do que quando são mantidas a 6° C, sugerindo estes achados que a esta temperatura (6° C), os cuidados com a prole mereçam maior prioridade que a 22° C (AUBERT; KELLEY; DANTZER, 1997). Demonstrou-se, ainda, que a supressão da busca por leite adocicado, apesar de suprimida por IL-1 em animais com acesso livre à comida, é muito menos afetada por esta citocina em camundongos que passaram por restrição calórica. Desta forma, parece que não há incapacidade de busca pelo alimento ofertado, mas apenas uma menor prioridade por esta tarefa nos animais alimentados normalmente e tratados com IL-1 (LARSON et al., 2002). Estes resultados parecem estar de acordo com a primeira descrição de alterações comportamentais específicas induzida por LPS em ratos e que não foram atribuíram a uma depressão generalizada do SNC (MILLER, 1964). De fato, animais nessas condições, apesar de apresentarem diminuição da expressão de vários comportamentos, incluindo-se aqui um comportamento ativo de pressionar uma barra para receber água ou comida, não apresentaram dificuldade em pressioná-la para interromper um estressor moderado (especificamente, fazer parar uma plataforma giratória sobre a qual eram colocados). Deste modo, indutores do comportamento doentio, como citocinas, não necessariamente levam à redução de atividade geral, por depressão do SNC, isto é, da função motora; de fato, este efeito é influenciado por

resultado da expressão (ou não) do comportamento em tela e por sua consequência para o animal doente. Resultados recentes de nosso grupo parecem corroborar o caráter motivacional e adaptativo das alterações comportamentais em animais doentes. Daniel Cohn, estudou as alterações causadas pelo LPS em camundongos dominantes e submissos acondicionados em duplas estáveis. Este autor descreveu um efeito maior dessa molécula em animais dominantes, que apresentaram letargia e diminuição da busca pela interação social (com um submisso tratado com salina) do que nos submissos, quando a situação era invertida, ou seja, quando o submisso recebia LPS e o dominante solução salina (COHN, 2003). Assim, as obrigações sociais de um animal subordinado a outro dentro da dupla talvez impeçam a expressão do comportamento doentio, refletindo este fato uma maior prioridade do animal, naquele momento para outras atividades. Além disso, o modelo utilizado pelo autor foi útil em evidenciar possíveis decorrências sociais do comportamento doentio; em algumas duplas, a administração de LPS no animal dominante resultou em uma desestabilização da hierarquia existente, levando a situações de conflito, nas quais o animal previamente submisso expressava comportamento agressivo em relação ao dominante doente (incomum em duplas estáveis) chegando até mesmo a evidenciar embates físicos, com aparecimento de lesões nos camundongos previamente dominantes (COHN, 2003). Em seu conjunto, quer nos parecer seja possível afirmar que os comportamentos apresentados por um animal, que são passíveis de influência por contingências imunológicas, devam ser encarados como estratégias homeostáticas de cada indivíduo, em função da espécie e do momento da história de vida do indivíduo.

Um dos campos desta área da neuroimunomodulação onde existe pouco consenso diz respeito às vias através das quais o SI sinalizaria o SNC. Adrian Dunn revisou e agrupou possíveis mecanismos dessa sinalização, dentre eles destacam-se: 1) uma ação direta dos mediadores do SI nos locais onde a barreira hematoencefálica é mais permeável, como nos

órgãos circumventriculares (que recebem esse nome por se localizarem nas proximidades dos ventrículos cerebrais e cujo endotélio é fenestrado, não apresentando junções oclusivas entre as células); 2) uma ação de mediadores do SI em aferências periféricas do SNC, como nas terminações do nervo vago, (sem sombra de dúvidas o mais estudado quanto à capacidade de sinalização de respostas inflamatórias ou imunológicas para o SNC) e 3) uma ação de mediadores do SI em locais que funcionariam como interface entre o sistema imunológico e o SNC, sem a necessidade da transferência direta do mediador para dentro deste (por exemplo, citocinas ligando-se a seus receptores no endotélio da microvasculatura cerebral, gerando mensageiros lipídicos como os prostanóides que podem transitar através de barreiras) (DUNN, 2002).

O contato íntimo estabelecido entre macrófagos, células dendríticas e mastócitos com as ramificações do nervo vago fazem com que essas células, que respondem à estimulação com produção e secreção de uma ampla gama de mediadores inflamatórios (incluindo-se aqui as citocinas, os derivados do ácido araquidônico e as aminas vasoativas), possam servir de ponte entre sinais locais (parácrinos), e o nervo vago (GOEHLER et al., 1999). Assim, vários experimentos buscaram o esclarecimento da importância do vago nessa via de sinalização por citocinas, mediante sua eliminação cirúrgica. Tanto as respostas comportamentais (BRET-DIBAT et al., 1995) como a febre derivada da administração de IL-1 (WATKINS et al., 1995) mostraram-se suprimidas (ao menos parcialmente) pela vagotomia subdiafrágmatica; esta vagotomia também se mostrou eficaz na prevenção da redução dos níveis NA hipotalâmica e na ativação do eixo HPA (FLESHNER et al., 1995). Em muitos casos, a resposta comportamental parecia estar dissociada da endócrina. No entanto, as evidências relativas à relevância desta sinalização vagal em cada uma das respostas comportamentais após IL-1, ainda é controversa (KONSMAN; TRIDON; DANTZER, 2000).

Neste sentido, e de maneira geral, parece que a dependência de mecanismos nervosos ou humorais na sinalização do SI para o SNC quando de um comportamento doentio estaria relacionada a muitas variáveis, tais como via de administração da molécula estudada (processos localizados tendem a depender mais de vias nervosas), parâmetro comportamental estudado (alterações endócrinas são mais influenciadas por mecanismos humorais), além, obviamente, do mediador estudado e da sua concentração (doses baixas não alcançam níveis séricos suficientes). Mesmo assim, parece cada vez mais claro que se trata de um sistema com alta redundância, em que vários mecanismos podem gerar respostas semelhantes, e que várias respostas dependem de mais de um mecanismo de sinalização (DUNN, 2002; KONSMAN; TRIDON; DANTZER, 2000).

De maneira comparável, as consequências da expressão de um comportamento sobre o estado do sistema imunológico pode funcionar como um modulador do próprio comportamento e vice versa, sugerindo novamente este fato que o sistema imunológico seja uma aferência de importância para o SNC. Neste contexto, experimentos recentes em nosso laboratório utilizando camundongos que conviveram com animais doentes (portadores da forma ascítica do tumor transplantável de Ehrlich) por 11 dias desenvolveram leucopenia e, apesar de apresentarem níveis normais de corticosterona, mostraram-se mais propensos ao desenvolvimento do mesmo tumor experimental, ao fim do período de convívio com o companheiro doente (MORGULIS et al., 2004).

Estes e outros dados de literatura suportam, a existência de comunicações diretas e bidirecionais entre o SNC e o SI. A figura 1 mostra um esquema ilustrativo desta interação. Os trabalhos nesta área têm contribuindo de forma marcante para o entendimento da regulação/modulação das respostas adaptativas do organismo frente a um estresse ou a uma patologia. Neste contexto apesar de recente, enquanto área organizada do conhecimento, a neuroimunomodulação acumulou um corpo de dados e de conhecimentos suficientes para

justificar a idéia agora inequívoca de que existem extensas relações entre os sistemas imunológico e neuroendócrino. Tais relações neuroimunes não devem ser desprezadas ou subestimadas em qualquer área da pesquisa biomédica, pois podem ser responsáveis por fenômenos ainda pouco compreendidos, e considerados como anedóticos ou como artefatos em passado recente (COHEN, 2004; MAESTRONI, 2004). Quer nos parecer como já afirmado por Ader (2000) que o envolvimento de outras áreas da pesquisa ou da clínica com a psiconeuroimunologia será mais intenso quando forem mais bem identificadas e manipuladas as variáveis que governam os processos imunoregulatórios.

O presente trabalho lançou mão de conceitos de neuroimunomodulação para sua concepção e para interpretação dos dados obtidos.

Figura 1 - Esquema ilustrativo da interação entre sistema nervoso, sistema imune e sistema endócrino

2.2 CONVIVÊNCIA COM DOENTES

As pessoas que têm uma doença avançada e progressiva, ou que se encontram no estágio final de uma doença fatal conhecem as várias faces do sofrimento, e sabem que é difícil estar doente. A incontrolável deterioração do corpo é uma situação deplorável e triste. Muitas pessoas detestam a ajuda de outrem, mas todas querem a companhia de alguém quando estão muito doentes. Estes acompanhantes, por sua vez, experimentam uma situação estressante que pode se prolongar por muito tempo.

Os oncologistas recomendam sejam administrados cuidados especiais a pacientes que apresentam câncer em estado avançado. Destes pacientes, apenas 27% são internados; o restante deles recebe estes cuidados em casa (FINUCANE, 2002). Neste sentido, Flanagan (2001) afirma que a literatura médica está repleta de exemplos do impacto que uma doença, como o câncer, pode ter sobre os acompanhantes e, principalmente sobre os familiares do doente.

Quando o familiar está internado, os *caregivers* (familiares que cuidam do doente) ficam freqüentemente ansiosos, conversando a todo instante com os médicos para informar-se sobre o tratamento e o prognóstico do paciente, requerendo atenção de médicos e enfermeiras para saber o que eles podem fazer para ajudar o doente. É natural, nestes momentos, que muitos se impacientem e que haja uma forte sensação de ansiedade e de impotência. Mesmo assim e apesar disto, estas pessoas (*caregivers*) desempenham um papel crucial no apoio emocional do paciente e na evolução do processo que apresentam; geralmente, por saber disto, dão prioridade ao familiar enfermo, prestando menor atenção a si mesmos (DALEY, 1984; DOCKTER et al., 1988; VERHAEGHE et al., 2005).

Thompson et al. (2004) citando dados da “Alzheimer’s Association” dos Estados Unidos (www.alz.org) informam que o número de familiares que cuidam em casa de pessoas com doença de Alzheimer tem triplicado nos últimos dez anos naquele país. Segundo os autores, cerca de 70 a 80% dos pacientes com doença de Alzheimer nos Estados Unidos vivem hoje em suas casas, com suas famílias que lhes provêm os cuidados de que precisam. Desconhecemos estudos semelhantes em nosso país. No entanto, acreditamos seja possível inferir igual ou maior porcentagem de enfermos graves que são cuidados em casa não apenas pela observação informal de nossa realidade, mas pela constatação indiscutível do elevado custo de uma internação e do precário sistema previdenciário nacional; quem estuda o assunto sabe que o tempo médio de permanência nos hospitais vem caindo consistentemente ao longo dos anos em nosso país e que existe, da parte dos médicos e dos especialistas em saúde, em movimento deliberado no sentido da desospitalização. Assim, cerca de dez anos atrás, o tempo médio de permanência nos hospitais era de seis dias; hoje, 60% dos pacientes ficam menos de cinco horas (LOTTENBERG, 2005). A desospitalização reduz custos, democratiza os serviços, aumentando a rotatividade, e minimiza efeitos indesejáveis, como as infecções hospitalares. No entanto, e segundo Hosaka e Sugiyama (2003) se cuidar de um paciente em casa reduz os gastos públicos com medicamentos e internações, por outro lado, os *caregivers* acabam tornando-se também pacientes, visto que o ato de conviver com um indivíduo que apresenta uma doença crônica é uma situação ansiogênica e desgastante: exige do *caregiver*, muitas vezes, dedicação integral.

Hampe (1975) foi a primeira pesquisadora a estudar as necessidades e preocupações de esposas de pacientes gravemente doentes. Baseado nos achados de Hampe, Molter desenvolveu um modelo de questionário para estudar os *caregivers* chamado de “*Critical Care Family Needs Inventory*” (CCFNI; MOLTER, 1979) o qual tem sido usado por pesquisadores do mundo inteiro (LESKE, 1991; NEABEL; FOTHERGILL-

BOURBONNAIS; DUNNING, 2000). Outros modelos de questionários foram feitos a seguir como o GHQ-30 “*General health Questionnaire-30*”; POMS “*Profile of Mood States*” e, dentre tantos outros o MMSF “*Mini-Mental State Examination*”. A maioria destes questionários é usada em pesquisas realizadas com *caregivers* (HOSAKA; SUGIYAMA, 2003; SCHULZ et al., 2004).

Dore e Romans (2001) usando questionários como estes, analisaram o comportamento de muitos *caregivers*. Mostraram, que alguns deles apresentavam hiperatividade e que outros se tornavam excessivamente falantes e impulsivos; entretanto, o comportamento mais comum que observaram foi a depressão. A maioria dos *caregivers* analisados havia interrompido suas atividades sociais e as relações que mantinham com os amigos e com a família, resultando este fato em perda de amizades. Para Navaie-Waliser, Spriggs e Feldman (2002) *caregivers*, em especial quando mulheres, apresentam alterações no seu comportamento habitual, diminuindo suas atividades sociais, o que resulta em níveis elevados de estresse causado pelo isolamento social, fato este que se complica muitas vezes por uma instabilidade financeira adicional; de fato, elas não têm mais condições de trabalhar e de receber, seus proventos por ter que dedicar muitas horas de seus dias aos pacientes que cuidam. Complica esta situação, a constatação diária do impacto da doença sobre a saúde financeira do casal e da família. Vedhara et al. (2000), por outro lado, descreveram a importância do apoio social, como fator de diminuição do estresse psicológico em pacientes infectados com o vírus HIV, em mulheres com depressão pós-parto e em pacientes com câncer. Não relataram, no entanto, o impacto deste apoio nos familiares que o proporcionam. Neste sentido, coube a Plant (1995) demonstrar que um estado de estresse psicológico crônico é claramente observado nos familiares que cuidam destes doentes.

Nos últimos cinquenta anos tem se observado um aumento exponencial das pesquisas dedicadas à análise do estresse psicológico; com isto, tem ocorrido um aperfeiçoamento

concomitante e refinado da compreensão deste fenômeno (VEDHARA et al., 2000). Uma das principais áreas deste desenvolvimento é aquela que conceitua o estresse psicológico como um processo. Estes estudos buscam distinguir nesta situação, os eventos estressores que podem mudar a fisiologia do indivíduo, os mediadores psicossociais (fatores que permitem a avaliação da natureza do tratamento e da resposta emocional e/ou da resposta comportamental eliciada) e a resposta ao estresse propriamente dita (tipicamente avaliada por mudanças físicas e/ou emocionais eliciadas como resposta ao estressor).

Dois pontos importantes devem ser levantados quando se faz uso de modelos para análise do estresse. Em primeiro lugar, é útil não classificar o estresse como o estímulo estressor ou como uma simples resposta, mas sim como um processo, onde existe um estímulo e uma resposta a este estímulo. Gatchell e Baum (1983) descreveram o estresse como sendo “um processo complexo pelo qual um organismo reage a eventos ambientais internos ou externos ou a eventos psicológicos que representam um desafio ou perigo a esse organismo”. Deve-se também considerar a complexidade do contexto e o tipo do estímulo estressor. Por exemplo, estímulos aversivos de natureza física como aplicação de choques nas patas, contenção, frio, e ruído, são considerados como estressantes independentemente do indivíduo a eles submetido ou do observador (PARÈ; GLAVIN, 1993). Outras situações mais sutis e de natureza psicológica, como, por exemplo, a presença de um predador, a ausência de um reforço positivo ou a convivência com um doente podem ser mais ou menos estressantes dependendo do indivíduo e de sua história anterior. Kihara et al. (1992) mostraram que muitos tipos de estresse psicológico podem tornar as pessoas física ou mentalmente doentes. Redwine et al. (2004) compilaram dados de muitas pesquisas sobre o papel do estado psicológico na saúde mental de cônjuges que cuidam de pacientes com demência senil. Segundo estes autores, o aumento e persistência de elevados níveis de estresse nesta situação e seus reflexos sobre sistema imune dos *caregivers* podem ser um fator relevante para explicar o aumento de

morbidade que acontece nesta população. Schulz et al. (2004) avaliaram o estado clínico dos principais grupos de *caregivers*: dos familiares e/ou cônjuges que visitavam o doente com muita frequência e dos outros parentes que só os visitavam quando estes estavam internados. Os cônjuges e os parentes mais próximos apresentaram altos níveis de depressão ou elevada ansiedade quando comparados aos outros familiares. Allen, Goldscheider e Ciambrone (1999) avaliaram os casais e verificaram que deles, são as esposas que com maior frequência convivem com o doente. Flanagan (2001) cita Wilson (1991) que analisou as esposas de maridos que recebiam quimioterapia; este autor observou que quando estes pacientes superavam seus sintomas, eram suas esposas que os apresentavam, em especial, náusea e vômito. Segundo o autor o estresse psicológico dessas esposas havia sido gerado pela convivência diária com o sofrimento de seus companheiros. Thompson et al. (2004) relataram que *caregivers* do sexo masculino quando comparados a outros do sexo feminino, (ambos com cônjuges doentes) apresentavam menores níveis de depressão, estresse, ansiedade, e hostilidade. Avaliando os cônjuges pelo sexo, não foram encontradas, no entanto diferenças entre os dois grupos em parâmetros sanguíneos avaliados por citometria de fluxo como, por exemplo, na relação de células B, células T, células T supressoras e células T ativadas.

Dados da literatura obtidos a partir de estudos com seres humanos e com animais mostraram que muitas variáveis estão envolvidas na compreensão do impacto dos efeitos de diferentes eventos sobre o bem estar; as variáveis apontadas pelos autores como sendo altamente relevantes são: 1) o tipo de evento; 2) a idade no qual o evento é experimentado; 3) algumas características das pessoas ou dos animais como experiência prévia, temperatura, gênero, genética; 4) a presença de apoio social durante a exposição ao evento (KESSLER, 1997).

Ressalte-se, neste momento, que um grande número de evidências experimentais e epidemiológicas têm mostrado a relevância das relações entre estresse/ansiedade e ocorrência

de alterações da função imune. Recentemente, uma meta-análise de estudos conduzidos em seres humanos procurou avaliar as relações entre estresse/ansiedade e parâmetros imunológicos. Mostrou-se, neste sentido, que o estresse e a ansiedade estavam associados significativamente com (1) leucocitose, (2) redução do número de células NK e de linfócitos T, (3) aumento das relações CD4/CD8 e (4) moderada diminuição na atividade de células T e NK (ZORRILLA et al., 2001). Células NK são muito responsivas a estados emocionais e a intervenções psicosociais (SOLOMON 2003; LANIER, 1998).

Com base em trabalhos realizados por seu grupo Esterling, Kiecolt-Glaser e Glaser (1996) sugeriram que o estresse crônico gerado pela perda de um doente altera a função imune por até dois anos, incluindo-se aqui as células NK, o rIFN-gama e o rIL-2. Os autores neste trabalho não encontraram diferenças na citotoxicidade de células NK de *caregivers* quando este teste era realizado na ausência de um estímulo por citocinas. Estudo similar em animais têm mostrado que o estresse crônico tem um efeito significativo na proliferação de células T e na secreção de IL-2; porém, este estresse não afetou a citotoxicidade de células NK (ODIO; BRODISH; RICARDO, 1987). Outros resultados deste trabalho sugeriram, no entanto, que o estresse crônico estaria relacionado indiretamente à atividade das células NK havendo, neste caso redução da citotoxicidade apenas após estimulação por citocinas. Alguns trabalhos mostram que pessoas que experimentam um estresse crônico têm maior ativação do eixo HPA, fato indicado através dos níveis elevados de cortisol, noradrenalina e adrenalina (MCKINNON et al., 1989). Está ativação, por liberar hormônios e/ou neurotransmissores, afeta os órgãos linfóides e, por certo, a atividade das células NK. Neste caso, é possível que os receptores de células NK para estes agonistas endógenos possam estar alterados ou bloqueados, ocasionando este fato, uma redução da ligação com citocinas específicas e necessárias para a ativação destas células (especialmente IFN-gama e IL-2) (BLACK et al., 1994). A ajuda psicológica em *caregivers*, como, por exemplo, o uso de terapias psicológicas

mostrou-se, neste sentido, de fundamental importância: *caregivers* que recebiam menores níveis de apoio social apresentaram após um ano maior *down regulation*, de receptores para interleucinas e/ou neurotransmissores em células NK que aqueles que recebiam este apoio.

Hosaka e Sugiyama (2003) coletaram sangue de *caregivers* que faziam psicoterapia (esposas de pacientes com doença mental) na primeira e no final da quinta (última) sessão de terapia em grupo; avaliaram nestas mulheres e, por citometria de fluxo, a expressão de células NK. Comparado-se o sangue da primeira sessão com aquele da última, observaram um aumento significativo na atividade de células NK após as intervenções psicológicas. Foram avaliados, também, através de questionários o estado de saúde mental e geral destes “*caregivers*”, tendo sido observadas diminuições nos níveis de ansiedade, hostilidade e de fadiga após a última sessão de terapia. Ficou claro, assim, para os autores que a melhora na função imune estava relacionada com o bem estar psicológico dos indivíduos e com a terapia. Muitos outros estudos têm demonstrado que intervenções psicológicas são efetivas em aliviar o desconforto psicológico e em aumentar a função imune de *caregivers*. Schulz et al. (2004) sugeriram que uma intervenção clínica no indivíduo que cuida de um doente (terapia) seria de grande benefício para o seu bem-estar mental e físico por reduzir ou eliminar, a depressão e a ansiedade que provavelmente acompanham estas pessoas.

Sabe-se que a circulação de linfócitos entre o sangue e os tecidos linfóides, depende da expressão de moléculas de adesão específicas, incluindo-se aqui a glicoproteína de membrana L-selectina conhecida, também, como CD 62L. Estas moléculas celulares de adesão são relevantes, pois permitem que células imunes agreguem-se aos locais da inflamação auxiliando a migração celular, e propiciando o acúmulo das mesmas no local inflamado. A deficiência de CD 62L têm sido associada com alterações da migração de linfócitos e com redução da resposta imune. Mills et al. (1999) avaliaram o sangue de *caregivers* através de citometria de fluxo e, também, as concentrações de catecolaminas no plasma, através de

ensaio radioenzimático. Observaram que os *caregivers* tinham menores níveis de linfócitos CD8+ e CD4+, e menores níveis de L selectina negativa (CD8+ CD62L-) e (CD4+ CD62L-); no entanto, não detectaram diferenças nos níveis de CD62+ tanto em CD8 como em CD4. Observaram, ainda, que os níveis de adrenalina estavam significativamente maiores nos *caregivers*. Neste sentido, os autores propuseram que os altos níveis de adrenalina observados nos *caregivers* induziam a redução que observaram do número de células T CD62L- na circulação (MILLS et al., 1999).

Redwine et al. (2004) também concluíram que a resposta imune de indivíduos que conviviam com um doente poderia estar desregulada por alterações na atividade do SNAS em resposta ao estresse fato que teria implicações para a saúde destes indivíduos. Para os autores, a relação positiva que encontraram entre quimiotaxia e quimiocinas e níveis de adrenalina nos *caregivers* sugeriam que a elevação dos níveis basais de adrenalina levaria a um aumento na infiltração de células imunes na camada íntima dos vasos sanguíneos, o que poderia contribuir, até mesmo, para o aparecimento da arteriosclerose.

Bauer et al. (2000) relataram que cônjuges de pacientes portadores do mal de Alzheimer apresentavam níveis elevados de cortisol na saliva, indicando este achado a ocorrência de uma ativação do eixo HPA, associada a uma diminuição da imunidade mediada por células, como demonstrado *in vitro* através da redução da proliferação de linfócitos induzida por mitógenos e da produção de IL-2. Também observaram uma redução da sensibilidade dos linfócitos aos glicocorticóides, isto é, os linfócitos de *caregivers* aparentavam ser mais resistentes aos esteróides. Contudo, os autores mostraram que *caregivers* com altos níveis de estresse apresentavam, também, altos níveis plasmáticos de noradrenalina, confirmando e sugerindo este achado a ocorrência concomitante de ativação do SNAS nestes indivíduos. Neste sentido, Redwine et al. (2004) mostraram que *caregivers* têm uma redução da função dos receptores beta-adrenérgicos em linfócitos tanto em número como

em sensibilidade. Esta diminuição de função dos receptores beta-adrenérgicos foi acompanhada por uma diminuição da sensibilidade destas células aos efeitos estimulantes da adrenalina e da noradrenalina, isto é, aos efeitos decorrentes da estimulação do SNAS. Segundo os autores, esta perda da função (*down regulation*) de beta-receptores, como discutido acima para células NK, poderia ter conseqüências no curso da atividade das células imunes, como por exemplo, quando de sua migração.

Engler et al. (2004) investigaram, em ratos, o papel dos mecanismos adrenérgicos na modulação neuroendócrina e sua interferência na circulação dos leucócitos diante de uma situação de estresse social; relataram que as catecolaminas apresentavam um importante papel na redistribuição dos leucócitos sanguíneos durante este estresse. Neste contexto, mostrou-se que a mobilização de células ligadas à resposta imune inata é regulada por mecanismos adrenérgicos. A mobilização de fagócitos e de células NK pelas catecolaminas indicaria, assim, uma conexão funcional entre o SNC e a resposta imune inata. Sabe-se, neste sentido, que em uma situação de estresse persistente e de longo prazo, o aumento da atividade catecolaminérgica pode promover uma desregulação da função imune, (como por exemplo, a já sugerida *down regulation* de receptores β_2) o que propiciaria o aparecimento de doenças.

A incorporação de modelos experimentais com animais para o estudo de fenômenos específicos da esfera humana, tem sido de grande relevância em neurociências e em neuroimunomodulação (WILNER, 1991). De fato, por questões éticas, nem sempre, é possível submeter pessoas a um dado procedimento experimental. Esta relevância é mantida mesmo se for considerado como certo o fato de não ser nenhum dos modelos animais capazes de mimetizar a totalidade da situação observada em seres humanos. Neste sentido, uma coisa é estudar uma espécie com o interesse focado nessa espécie; outra coisa é estudar essa espécie usando-a para compreender o que acontece com o organismo em geral. Ou seja, generalizar. Isso é comum especialmente quando estudamos organismos mais simples tentando aplicar os

resultados obtidos para processos semelhantes observados em seres humanos. Contudo, quando o estímulo tem origem psicológica, torna-se difícil fazer esta afirmação, visto que um mesmo estímulo pode ser considerado aversivo/ estressante por alguns indivíduos, mas não para outros. Se esta assertiva é verdadeira entre os animais *per se* e entre os seres humanos, *per se* que dizer, então, quando se pretende comparar os efeitos de um mesmo ou semelhante estímulo em animais e em humanos?

A base de raciocínios como os agora discutidos já estavam nos escritos de Aristóteles, (1985), que estabeleceu uma regra lógica fundamental para o pensamento científico que se desenvolveu posteriormente: o que predica do gênero, se predica da espécie, o inverso não sendo possível. No entanto, este mesmo autor, no mesmo trabalho, diz que o que diferencia a espécie do gênero é-lhe específico, por isso a dificuldade do caminho inverso.

O trabalho apresentado nesta dissertação, portanto, difere de muitos outros no sentido de basear-se na análise de um modelo animal de um fato que já tem resultados comprovados em seres humanos. Arquiteta a avaliação das possíveis alterações causadas em animais pela convivência com coespecíficos portadores de uma doença letal. A figura 2 mostra o modelo a ser usado. Pressupomos avaliar as possíveis alterações imunes e neurológicas causadas no animal “companheiro” de um animal portador de um tumor de Ehrlich, guardando os devidos cuidados com as extrapolações. De fato, embora esse “*impetus generalizandi*” seja bastante compreensível, esta pretensão constitui um salto arriscado e, portanto, será aqui tratada com muita cautela.

Figura 2 - Esquema ilustrativo do grupo experimental utilizado nesta dissertação. O animal companheiro será o objeto experimental deste trabalho

2.3 ESTUDO SOBRE CITOMETRIA DE FLUXO, MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS

a) Princípios básicos de citometria de fluxo

Citometria de fluxo é uma técnica que mensura e analisa simultaneamente as múltiplas características de partículas simples, geralmente de células, suspensas em um sistema de fluxo desenvolvido de forma tal a permitir que estas células passem por um ponto de luz; ou seja, consiste em um fluxo contínuo de células suspensas em uma solução isotônica que passam por um foco de luz (laser). Quando as células passam por este ponto de luz; sua imagem (sombra) e sua fluorescência são registradas por um leitor óptico. Estas são, posteriormente, enviadas para um sistema eletrônico que converterá o sinal óptico recebido em outro, eletrônico que possibilita a leitura dos dados por um computador. Outra importante característica da citometria de fluxo é o fato de que as análises das células que estão presentes na suspensão são feitas separadamente, célula por célula, isto é, este procedimento não faz simplesmente uma análise da média dos valores obtidos para toda população. Todas as células são analisadas individualmente porque passam, uma a uma, pelo foco de luz.

Dentre os parâmetros possíveis de serem medidos por citometria de fluxo, citam-se o tamanho, a granulosidade, a complexidade interna e a fluorescência relativa das células. Esta capacidade de medir múltiplos parâmetros celulares pela incidência de luz e, também, por fluorescência torna possível separar fisicamente subpopulações celulares. Devido a isto, o uso da citometria de fluxo como um instrumento de diagnóstico tem aumentado muito nos últimos anos, quer em biologia, quer em medicina.

As aplicações da citometria de fluxo têm sido numerosas, permitindo a realização de pesquisas verticalizadas em diversos parâmetros celulares como: quantidade de ácidos nucléicos, atividade enzimática, fluxo de cálcio, potencial de membrana e pH. Além disso, também é possível usar fluorocromos ligados a anticorpos mono e policlonais para estudar a densidade, a função e a distribuição de células e de receptores.

O citômetro de fluxo consiste basicamente em uma fonte de luz, um sistema de lentes para focalizar a luz no fluxo de células, componentes ópticos que focalizam luzes com diferentes cores nos detectores e eletrodos que amplificam e processam o sinal e um computador.

Conforme já dito, este aparelho além de analisar diferentes parâmetros celulares, também possibilita separar células de acordo com as diferenças físicas existentes entre elas. O processo de identificar células que estão passando pelo fluxo do aparelho, separando-as individualmente é chamado de “sorting”, que pode ser de 2 tipos: eletromagnético ou mecânico. O FACSCalibur utilizado no presente trabalho possui o sistema de sorting mecânico.

Após a separação das células em populações distintas, torna-se possível analisá-las do ponto de vista microscópico, bioquímico e/ou funcional.

O citômetro de fluxo como se vê na figura 3 é composto basicamente, por 3 sistemas principais, que são: um sistema fluídico, um sistema óptico e um sistema eletrônico.

- O sistema fluídico consiste de um fluxo de única direção que pode ser chamado de fluído de bainha e que controla a direção e regula o fluxo e a velocidade das células através do foco de luz.

- O sistema óptico é composto por um laser que pode ter diferentes comprimentos de onda, sendo o mais comum, aquele que usa o comprimento de onda de 480 nm. Além disso, há também um conjunto de filtros ópticos para focalizar e direcionar a luz.
- O sistema eletrônico é responsável por converter o sinal óptico em um sinal eletrônico que será analisado por um computador.

Dentro do sistema óptico existem 2 parâmetros para análise das células que são de extrema importância, e que são chamados de canais ópticos. São eles, o “Forward Scatter” (FSC) que indica o tamanho da célula e que ocorre quando o feixe de luz, que passa pela célula, é detectado por um sensor posicionado horizontalmente ao feixe e o “Side Scatter” (SSC), que indica a granulosidade da célula e que ocorre quando o feixe de luz, após incidir sobre a célula, é lançado, ou projetado sobre sensores posicionados perpendicularmente ao laser. Estes 2 canais não dependem de fluorescência; no entanto, também existem canais de fluorescência. O aparelho utilizado neste trabalho possui 3 canais de fluorescência; portanto, é possível analisar com ele até 5 parâmetros para cada evento simultaneamente, ou seja, FSC, SSC e outros 3 ligados aos canais de fluorescência. Para verificar-se a fluorescência é necessária a utilização de fluorocromos. Dentre os mais comuns, podem ser citados o isoticianato fluorescente (FITC), que emite uma fluorescência verde e a ficoeritrina (PE), que emite uma fluorescência vermelha.

O citômetro de fluxo não é, no entanto, um aparelho simples. Como todo aparelho sofisticado seu uso exige um conhecimento básico dos seus princípios de funcionamento para que seja possível não apenas operar o aparelho corretamente, mas também e principalmente entender com precisão o significado dos resultados obtidos.

No entanto, satisfeitos estes quesitos, pode-se usar do aparelho para análises muito interessantes, como por exemplo, para análise da fagocitose por células imunes. Além disto, o *burst* oxidativo expresso na geração de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos e por neutrófilos estimulados pode ser monitorado quantitativamente por citometria de fluxo usando-se como reagente o 2'7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), o *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo (PI) e o miristato-acetato de forbol (PMA) (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989). Keton e Brandt (1965) descreveram originalmente um método fluorométrico para a mensuração do peróxido de hidrogênio em solução aquosa. Este método é baseado na oxidação do DCFH-DA não fluorescente, pelo peróxido de hidrogênio e pela peroxidase, que o transforma em um composto fluorescente que não pode difundir-se para fora da célula. Por esta razão, é possível detectar a oxidação do DCFH-DA nos neutrófilos e macrófagos usando-se análises unicelulares pela citometria de fluxo.

Foi demonstrado que a oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio gerado (HIRABAYASHI; TANIUCHI; KOBAYASHI, 1985). A formação e a liberação do peróxido de hidrogênio por leucócitos polimorfonucleares estimulados por *S.aureus* e PMA foram observados em taxas estreitamente correlacionadas àquelas associadas com a fagocitose (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989; ROOT et al., 1975).

A vantagem de utilizar-se o DCFH que emite uma fluorescência verde quando combinado com o peróxido de hidrogênio é que a capacidade de fagocitose realizada tanto por macrófagos como por neutrófilos pode ser avaliada conjuntamente com o *burst* oxidativo, pois a bactéria a ser fagocitada pode ser marcada com iodeto de propídeo que emite uma fluorescência vermelha.

Em nossos laboratórios, a técnica de citometria de fluxo já foi utilizada para avaliar o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais ou de neutrófilos em vários trabalhos (COSTA, 2004; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003; SILVA, 2003; STANKEVICIUS, 2004).

b) Os Macrófagos

O macrófago foi descrito por Metchnikoff em 1905 que o referiu como uma célula com capacidade fagocitária. Foi entretanto, somente a partir dos estudos de MacKness et al. (1970), que se reconheceu a importância da atividade secretora destas células. Inicialmente classificado como pertencente ao sistema reticuloendotelial (ASCHOFF, 1924), o macrófago foi, posteriormente, incorporado ao sistema mononuclear fagocitário (VAN FURTH et al., 1972).

Os macrófagos podem ser incluídos no grupo dos mais antigos tipos celulares do reino animal (OTTAVIANI; FRANCESCHI, 1997). De fato, algumas formas primitivas de vida, inclusive alguns protozoários, já exibiam células com características similares às de macrófagos de mamíferos (MURAMATSU, 1993).

O macrófago caracteriza-se por ser uma célula grande, irregular, com 25-50 μm de diâmetro, apresentando núcleo excêntrico de formato arredondado ou riniforme tendo dois nucléolos evidentes e cromatina dispersa. No seu abundante citoplasma, são facilmente identificados os complexos reticulares de Golgi junto à carioteca e grandes grânulos azurófilos e freqüentes vacúolos periféricos, que refletem as atividades pinocíticas e fagocíticas desta célula (DOUGLAS; HASSAN, 1990).

Como membro do sistema mononuclear fagocítico, os macrófagos são derivados da medula óssea (VAN FURTH, 1989), a partir de células precursoras de macrófagos e neutrófilos a CFU-GM (METCALF, 1973). A primeira célula da linhagem macrofágica da

medula óssea é o monoblasto, ainda pouco diferenciado e cuja divisão dá origem aos pró-monócitos. O pró-monócito, ao dividir-se, dá origem aos monócitos, que permanecem na medula óssea por aproximadamente 24 horas, encaminhando-se então, para a corrente sanguínea óssea, na forma de monócitos circulantes, que aí permanecem por aproximadamente 24 horas, dirigindo-se, então, para a corrente sanguínea, na forma de monócitos circulantes, que permanecem nesta circulação por cerca de 70 horas (WHITELAW, 1966). Estas células diferenciam-se nos tecidos, sendo denominados de células de Küpfer no fígado, de macrófagos alveolares no pulmão, de macrófagos peritoneais no peritônio, de células de micróglia no SNC e de osteoclastos no sistema ósseo (AUGER; ROSS; MACKIE, 1991). Nestes tecidos e cavidades, os macrófagos, algumas vezes, ficam relativamente quiescentes como células residentes, com pequena atividade funcional. A baixa capacidade de espraçamento, fagocitose e de secreção basal de determinados produtos tais como lisozima, proteinases neutras e ácidas e espécies reativas de oxigênio conferem ao macrófago residente uma fraca capacidade microbicida e fungicida (COHN, 1968; TAKEMURA; WERB, 1984).

Sabe-se desde então, que estas células mantêm-se relativamente dormentes nos tecidos até que sinais indutivos apropriados levem à sua ativação (COSTA ROSA et al., 1995). Neste sentido, quando os macrófagos residentes encontram corpos estranhos, eles expõem diversas integrinas presentes na membrana celular, que participam do processo de sua ativação; dentre estas, destacando-se os receptores CR3, LFA-1 e ICAM-1 que reconhecem outras moléculas e componentes de matrizes extracelulares, aumentando a capacidade de espraçamento e de fagocitose destas células. Nesta situação, os macrófagos passam a ser denominado de ativados (ADAMS e HAMILTON, 1984). Esta ativação envolve diferentes estágios; (COHN, 1968; NATHAN, 1987; GORDON, 1986; WERB et al., 1986) que permitem caracterizar estas células como:

A) *macrófagos inflamatórios* – são estimulados por fatores inflamatórios não específicos e possuem elevada atividade secretora – como por exemplo, de proteinases neutras– bem como espraçamento e fagocitose e baixa atividade tumoricida ou microbicida. Estas células podem ser obtidas experimentalmente, através da administração de diversas substâncias, tais como tioglicolato, carragenina, gotas de biogel de poliacrilamina e lipossacarídeos de membrana de bactérias (HOPPER, 1986). Entretanto, deve-se ressaltar que macrófagos obtidos a partir do uso de diferentes agentes têm algumas diferenças nos padrões de substâncias que secretam (WERB; BANDA; JONES, 1980).

B) *macrófagos ativados* – são estimulados por fatores imunológicos, via produtos derivados de linfócitos; apresentam baixa atividade secretora de proteinases neutras, porém possuem alta atividade em secretar metabólitos reativos de oxigênio como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Estas células têm relevante atividade tumoricida e microbicida (ADAMS; COHN, 1968; HAMILTON, 1984; JORES et al., 1995; KARNOVSKY; LAZDINS, 1978; NORTH, 1978). Além disso, a ativação dos macrófagos envolve a interação de citocinas com receptores presentes nas membranas destas células, levando a uma série de eventos moleculares, que incluem hidrólise de fosfatidilinositol, formação de diacil-glicerol, alterações nas concentrações de cálcio citossólico, ativação de proteína quinase C, fosforilação de proteínas e alterações da transcrição gênica (ADAMS; HAMILTON, 1992). Experimentalmente, pode-se induzir ativação de macrófagos, infectando-se os animais com microrganismos como, por exemplo, *Staphilococcus aureus*, micobactérias (Bacilo Calmet Guerin – BCG), ou *Trypanossoma cruzi*; podem, ainda, ser estimulados com o uso de citocinas, produzidas por linfócitos T ativados (TAKEMURA; WERB, 1984).

Neste estado de ativação, os macrófagos secretam substâncias importantes para a resposta imunológica como os componentes do sistema complemento, as citocinas (em especial IL-1 e o TNF- α) e, conforme citado, as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio.

De fato, na transformação de monócitos em macrófagos e na resposta a várias substâncias estimulantes de membrana, ocorre à produção e liberação de várias substâncias, dentre elas as espécies reativas de oxigênio (ERO), resultantes de uma seqüência de reações bioquímicas que conforme já mencionado, caracterizam-se pelo alto consumo de oxigênio, e que são conhecidos como *burst* respiratório (COHN, 1968). O aumento do metabolismo de oxigênio resulta em diversos metabólitos, dentre os quais os mais estudados são o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é, pois, uma espécie de oxigênio (ERO), produzindo *in vivo* durante o metabolismo de células aeróbicas como produto de secreção de fagócitos ativados (BADWEY et al., 1983; ROOT; METCALF, 1977). Sua produção é importante para a intensificação das atividades microbica e tumoricida dos neutrófilos e, também, dos macrófagos ativados (NATHAN, 1983). Por outro lado, nos macrófagos não ativados, o sistema da oxidase encontra-se latente e dissociado entre o citosol e a membrana celular, não ocorrendo a produção destas espécies reativas do oxigênio.

Além das EROS, os macrófagos ativados secretam espécies reativas de nitrogênio. Os metabólitos reativos de nitrogênio participam também da atividade microbica e tumoricida dos macrófagos. Dentre eles, o óxido nítrico é a principal molécula efetora da atividade microbica e tumoricida e citotóxica contra microrganismos intracelulares, e alguns parasitas extracelulares, vírus e tumores (AKAIKE; SUGA; MAEDA, 1998; BOGDAN, 1997; CUI et al., 1994; JORENS et al., 1995; KRONCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1998). Sabe-se, a este respeito, que o NO é um dos mediadores mais importante da inflamação, tendo sido, primeiramente, descrito como um fator derivado das células endoteliais que causam vasodilatação através da indução de um relaxamento na musculatura do endotélio vascular. No entanto, têm inúmeras outras ações nos processos inflamatórios (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Como na maioria das atividades biológicas, existe no organismo a necessidade de restabelecimento do equilíbrio inicial. Para tanto, existem nos seres vivos, diversos fatores que controlam a exacerbação de uma resposta adaptativa exagerada, de modo tal a evitar que ela seja deletéria. Deste modo, macrófagos, além de liberar para o meio substâncias estimulatórias e ativadoras, liberam, também, substâncias com propriedades de desativação. Neste sentido, sabe-se que além dos macrófagos, outras células secretoras liberam fatores de desativação macrofágica, dentre as quais, os fibroblastos, os linfócitos, células tumorais, neutrófilos, e até mesmos alguns parasitas. De fato, Szuro-Sudol e Nathan (1982) mostraram que alguns produtos liberados por células tumorais tinham a capacidade de inibir a produção de H_2O_2 por macrófagos ativados por BCG ou caseinato de sódio.

Diversos trabalhos do nosso e de outros laboratórios têm demonstrado que a aplicação de estresse quer na fase pré-natal quer na fase adulta, altera a capacidade funcional dos macrófagos (BROWN et al., 1993; FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003). Detalhes sobre resultados destes trabalhos já foram colocados no item 2.1. e, portanto, não serão aqui repetidos.

Portanto, diante da importância das interações entre os Sistemas Nervoso e Imune, e do envolvimento dos macrófagos em tal contexto, fica claro que alterações em estados emocionais por induzirem a ansiedade e/ou estresse podem afetar a atividade de macrófagos (ESKANDARI; STERNBERG, 2002; MORGULIS et al., 2004; PERSOONS et al., 1995). É possível, pois, que o fato de conviver com um animal doente venha a produzir modificações nestes parâmetros. Este fato será investigado neste trabalho.

c) Os Neutrófilos

Em muitas espécies animais os neutrófilos correspondem a aproximadamente metade dos leucócitos circulantes; são diferenciados de outros polimorfonucleares por apresentarem núcleos multilobulados e grânulos citoplasmáticos distintos. Estes incluem grânulos primários ou azurófilos, secundários ou específicos e grânulos terciários, os quais contêm enzimas, proteínas e glicosaminoglicanas que se acredita participem de muitas funções do neutrófilo (HELLEWELL; WILLIAMS, 1994). Em esfregaços de sangue, os grânulos dos neutrófilos não se apresentam azul, como os dos eosinófilos, daí o nome que receberam: neutrófilos (BAINTON, 1988).

De uma maneira geral os neutrófilos, juntamente com os macrófagos, exercem um papel importante na defesa orgânica contra microrganismos. Sendo assim, a migração desta célula dentro dos tecidos é considerada como crucial e de grande importância para a sobrevivência dos organismos (LEHRER et al., 1988). Crianças com anormalidades na migração de neutrófilos apresentaram infecções repetitivas (BEATTY et al., 1984) e animais “depletados” experimentalmente de neutrófilos circulantes mostraram-se incapazes de combater bactérias gram-negativas presentes em seus pulmões (REHM et al., 1980).

Os neutrófilos podem ser atraídos quimiotaticamente por bactérias e por corpos estranhos presentes nas áreas de inflamação, juntamente com mastócitos e basófilos. Em seqüência, ocorre à fagocitose e em consequência desta, os microrganismos fagocitados são mortos por proteínas citotóxicas derivadas de grânulos citoplasmáticos e/ou por produção local de espécies reativas de oxigênio (STITES; TERR, 1991). Sabe-se que estas células também estão envolvidas na síntese e liberação de citocinas (IL-1, IL-6 E TNF- α) e que modulam os efeitos de linfócitos T e B (LLOYD; OPPENHEIN, 1992). Portanto, é possível dizer que os neutrófilos tenham 2 funções relacionadas a resposta imune-inflamatória: uma

função ligada à fagocitose e à desgranulação e a outra relacionada à liberação de citocinas imunomodulatórias.

É de amplo conhecimento que os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) como, por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil, ânion superóxido e oxigênio *singlet* (BADWEY; KARNOVSKY, 1983; PICK; MIZEL 1981; WEISS et al., 1981); estas ERO como discutido ainda são produzidas *in vivo* durante o metabolismo de células aeróbicas ou são produto de secreção de fagócitos ativados (BADWEY et al., 1983; ROOT; METCALF, 1975). Em ambos os casos, resultam de uma sequência de reações bioquímicas que se caracterizam pelo alto consumo de oxigênio conhecido como *burst* oxidativo.

As espécies reativas do oxigênio geradas pelos neutrófilos desempenham um papel importante como oxidantes microbicidas, ou como mediadores da inflamação e da lesão tecidual. Uma vez estimulados, a maior parte do oxigênio consumido por neutrófilos é convertida em ânion superóxido pela enzima NAPH oxidase. A produção das espécies reativas do oxigênio inicia-se com a redução do oxigênio a superóxido, com a NADPH atuando como doador de elétrons. Desta maneira, a produção de NADPH constitui etapa limitante do processo de produção de espécies reativas do oxigênio pelos neutrófilos, como citado por (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003).

O ânion superóxido produzido sob estímulo de neutrófilos é rapidamente convertido em H_2O_2 e radical hidroxil (ALLEN, 1982), que contribuem para a atividade microbicida desta célula, seja dentro do fagolisossomo seja no meio extracelular. A quantidade de H_2O_2 produzida no fagolisossomo de neutrófilos não é suficiente para eliminar totalmente as bactérias e outros microrganismos. Contudo, a enzima mieloperoxidase (MPO) produzida nos grânulos azurofílicos quando combinada com a H_2O_2 gera hipoclorito que apresenta uma atividade antimicrobiana mais eficaz. Assim, uma das técnicas mais utilizadas para análise de

atividade neutrofílica é a mensuração da atividade da MPO, pois vários trabalhos já demonstraram que o sistema dependente dessa enzima é mais eficaz contra bactérias, fungos e parasitas do que aquele relacionado à ação dos radicais de oxigênio sozinho (ODA et al., 1995).

A mensuração dos níveis de liberação de peróxido de hidrogênio é considerada como um parâmetro relevante de avaliação da ativação de fagócitos (NATHAN, 1987; ROOT, 1975). Esta mensuração pode ser realizada através da oxidação do “phenol red” dependente de peroxidase (Horseradish peroxidase-HRPO), sendo este método utilizado, por exemplo, para análise da ativação de células da cavidade peritoneal (PICK; MIZEL, 1981; ROBINSON; BADWEY, 1994).

Diferentes trabalhos indicam que estas espécies reativas derivadas do oxigênio têm participação nos processos de inflamação, morte celular e tecidual, transformação neoplásica, aterosclerose e envelhecimento (HAMMOND et al., 1985).

Através da produção de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase-dismutase, os neutrófilos protegem-se dos efeitos nocivos das espécies reativas do oxigênio. Além disso, também produzem compostos antioxidantes como as vitaminas E e C (CHESON et al., 1976; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; PEREIRA et al., 1995).

Com relação ao papel imunorregulatório dos neutrófilos, é possível relacionar esta atividade com a produção de IL-1 por estas células (DINARELLO, 1991; GOH et al., 1989; LORD et al., 1991; TIKU et al., 1986). A IL-1, que possui inúmeras atividades biológicas, também é produzida por polimorfonucleares (PMN) em duas formas, a IL-1 α e a IL-1 β . Estas proteínas podem ser transcritas em PMN dentro de 2 a 6 horas após a estimulação com LPS, IL-1 α ou GM-CSF (Fator estimulador de colônia granulócito macrófago) (LORD et al., 1991).

Durante o processo inflamatório, a IL-1 produzida por neutrófilos pode servir para inúmeras funções, incluindo-se entre elas, a estimulação da síntese e liberação de proteínas de fase aguda, o aumento da ativação de células T e B e a indução de outras citocinas regulatórias como as IL-6, IL-8 e o GM-CSF (DINARELLO,1991).

Em resposta a estimulação com LPS os neutrófilos circulantes também sintetizam e liberam outras citocinas imunoregulatórias tais como TNF- α (DUBRAVEC et al., 1990) e GM-CSF (LINDEMANN et al., 1989). A produção pelos neutrófilos de TNF- α e de IL-1 pode ter funções regulatórias, principalmente na formação do edema inflamatório, devido ao aumento da permeabilidade vascular induzido por estas citocinas (ABE et al., 1990).

Neste sentido, é possível inferir que os neutrófilos e outros PMN tenham como principais funções fagocitar e destruir restos celulares, liberar mediadores inflamatórios e secretar citocinas, atuando direta e significativamente sobre a direção e a evolução de resposta imune, são, portanto, elementos ativos da resposta imune/inflamatória (CASSATELLA, 1995).

A vantagem de estudar os neutrófilos utilizando-se de citometria de fluxo reside no fato de que a maioria das funções de neutrófilos pode ser avaliada usando-se um pequeno volume de sangue, o que é de grande importância metodológica, além de possibilitar a redução de mudanças causadas na função das células por artefatos, que normalmente ocorre nos procedimentos de purificação (EEDEN et al., 1999).

Os neutrófilos têm sua atividade modulada também pelo eixo HPA e pela atividade dos SNAS em situações de estresse e de ansiedade. Assim, como os macrófagos, também os neutrófilos poderão ter suas funções alteradas pela convivência com um doente. Esta possibilidade será assim, também, um objeto da presente Dissertação.

3 OBJETIVOS

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

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar parâmetros de imunidade inata e de atividade do SNC em camundongas que conviveram por 11 dias com outros camundongos, inoculados com tumor ascítico de Ehrlich.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da convivência com um animal doente sobre parâmetros hematológicos.
- Avaliar os efeitos da convivência com um animal doente sobre a atividade de neutrófilos e de macrófagos medida por citometria de fluxo.
- Avaliar os efeitos da convivência com um animal doente sobre os níveis de corticosterona sérica.

- Avaliar os efeitos da convivência com um animal doente sobre os níveis e “turnover” de noradrenalina, dopamina e serotonina no córtex pré-frontal e no hipotálamo.
- Avaliar os efeitos da convivência com um animal doente sobre a resistência ao crescimento de um tumor ascítico de Ehrlich.
- Avaliar os efeitos da inoculação de um tumor ascítico de Ehrlich em camundongos que convivem com um animal doente sobre parâmetros hematológicos.
- Avaliar os efeitos do tratamento agudo com diazepam em camundongos que conviveram com um animal doente sobre a atividade de neutrófilos medida por citometria de fluxo.
- Avaliar as alterações comportamentais induzidas por anfetamina em animais que conviveram com um animal doente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongas adultas da linhagem Swiss, com 7 a 9 semanas de idade, provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram utilizados seguindo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ-USP (Protocolo de aprovação – n ° - 640/2005).

Antes do início dos experimentos, os animais foram alojados, por um período de 5 dias, em gaiolas de propileno (28 x 17x 12 cm) em número de 2 animais por gaiola para adaptação às condições do biotério experimental. Estas gaiolas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26° C) e umidade (65 a 70 %) foram controladas por meio de aparelhos de ar condicionado, ventilação e sistema de exaustão; a iluminação da sala era artificial, e obedeceu a um ciclo de claro-escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores NUTRILABOR GUABI®. Ração e água foram fornecidas *ad libitum* durante todos os experimentos. Após o período de adaptação, procedeu-se à realização dos experimentos como descrito em sequência.

4.1.1 Formação dos Grupos

Escolheram-se camundongas para os experimentos porque as fêmeas desta espécie são menos agressivas que os machos, quando colocadas em grupos (PALANZA, 2001). Neste sentido, as presenças de comportamento agressivo e/ou de lesões produzidas por encontros agonísticos poderiam representar variáveis intercorrentes. As camundongas foram separadas em pares de acordo com o peso corporal sendo deixadas em coabitação durante 5 dias. No sexto dia (dia 0 dos experimentos) os pares de animais foram divididos ao acaso em dois grupos iguais: um controle (C) e um experimental (E). Um camundongo de cada par do grupo C foi inoculado com PBS i.p. (0,1 ml/10g) e um camundongo de cada par do grupo E foi inoculado i.p. com uma suspensão de células do tumor de Ehrlich em PBS (5×10^6 céls/animal). As outras camundongas de cada par, “companheiras” dos animais inoculados, não foram manipuladas, sendo o objeto deste estudo. No 11º dia, os diferentes procedimentos experimentais foram realizados com as “companheiras”. A figura 3 ilustra este procedimento.

Figura 3 - Esquema ilustrativo da formação dos grupos experimentais deste trabalho

4.2 FÁRMACOS

Transcreve-se abaixo de modo especificado os fármacos utilizados neste trabalho.

4.2.1 Diazepam (Cristália do Brasil[®])

Agonista de receptores benzodiazepínicos centrais e periféricos (DOBLE, 1999; WEIZMAN; GAVISH, 1993).

O tratamento foi realizado na forma aguda, escolhendo-se a dose de 1 mg/kg, que foi administrada por via intra peritoneal (i.p.); a administração do fármaco foi feita uma única vez. Justifica-se a escolha da dose empregada de diazepam pelo fato de variar a dose ansiolítica deste benzodiazepínico em animais e em humanos de 1 a 2 mg/kg (HARDMAN; LIMBIRD, 2001). Ainda, em experimentos anteriores realizados em nossos laboratórios esta dose mostrou-se capaz de interferir com a atividade de macrófagos de camundongos ativados pelo OncoBCG (MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999) e com a resistência de hamsters ao *M.bovis* (RIGHI et al., 1999; UGAZ et al., 1999).

4.2.2 Sulfato de d-anfetamina (Sigma[®] Companhia Química, USA)

Exerce um potente efeito sobre o SNC por liberar aminas biogênicas estocadas no terminal nervoso, produzindo efeitos simpatomiméticos; produz, ainda, inibição da MAO e tem ações em receptores pós sinápticos para monoaminas (HARDMAN; LIMBIRD, 2001). Em função destes efeitos, aumenta a atividade locomotora exploratória de animais (DOMINGUES-JUNIOR et al., 2000), podendo mesmo induzir comportamento esteriotipado (COSTA; FRUSSA-FILHO; FELICIO, 2001). Estes efeitos dependem da dose e do estado de ativação do SNC dos animais.

O tratamento com anfetamina foi realizado de forma aguda, empregando-se as doses de 1 ou 2 mg/kg, por via intra peritoneal (i.p.); justifica-se a escolha destas doses de anfetamina, pelo fato de produzirem um aumento da atividade locomotora de camundongos no campo aberto (OLIVEIRA et al., 2004).

Com o objetivo de reduzir possíveis alterações decorrentes de variações biológicas rítmicas nos parâmetros fisiológicos dos animais, os tratamentos com diazepam e anfetamina quando feitos foram realizados no período da manhã, entre 08:00 e 9:00 horas.

4.3 BIOLÓGICOS

- **Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (DIFCO®)** - bactéria marcada com Iodeto de Propídio (Sigma, St Louis, MO) utilizada para avaliar a atividade fagocítica realizada por macrófagos peritoneais e de neutrófilos sanguíneos.
- **VACINA ONCO-BCG (INSTITUTO Butantã de São Paulo®)** – vacina de *Mycobacterium bovis* atenuada da cepa Moreaux, envasada na concentração de 40 mg de bacilo para 5 ml de veículo, e preparada conforme SOERENSEN et al. (1985). Foi usada para ativar os macrófagos peritoneais.

4.4 CORANTES CELULARES

- **Azul de TRIPAN (Merck®)** a 0,1 %
Utilizado para corar as células colhidas do lavado peritoneal.
- **ROSENFELD (Merck®)**
Utilizado para corar as células colhidas do lavado peritoneal na técnica de sorteio (*sorting*) da citometria de fluxo.

4.5 MEDICAMENTOS, REAGENTES E SOLUÇÕES

- Diacetato 2',7'-Diclorofluoresceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR)- empregado na citometria de fluxo. Este reagente foi mantido congelado (-20° C), e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso;
- EDTA (Sigma[®])- utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3 mM, com o objetivo de interromper a reação após o período de incubação das amostras;
- Heparina (Liquemine[®]-Roche)- utilizado para evitar a coagulação das amostras de sangue após a coleta;
- Iodeto de Propídio (PI) (Sigma[®])- utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha das amostras captadas pelo citômetro;
- Kit de corticosterona Coat-a-Count (DPC[®])- Kit de radioimunoensaio para dosagem de corticosterona;
- NaCl 0,2% e 1,6%- Soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras;
- NaCl 0,85% e NaCl 0,9% - Soluções utilizadas na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;
- PBS (Phosphate-buffered saline, pH=7,2-7,4)-Solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose;
- PBS glicosado - Solução utilizada na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;

- Propilenoglicol (Nuclear[®])- solvente utilizado para a diluição do diazepam; e usado como solução controle para o diazepam (0,1ml/10g) diluído em Ringer Simples;
- PMA - Miristato-acetato de forbol-(Calbiochem[®])- utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo de macrófagos e neutrófilos.

4.5.1 Reagentes e Estímulos para Análise do *Burst* Oxidativo

a) Preparo das Soluções:

- **PBS-** (Phosphate-buffered saline, pH=7,2-7,4)- Solução estoque 10x concentrada:

-Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O (Merck [®])	42,96g
-NaH ₂ PO ₄ .1 H ₂ O (Nuclear [®])	3,6g
-NaCl (Labsynth [®])	82,0g
-H ₂ O destilada qsp	1000ml

- **PBS 1x:**

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

- **PBS glicosado:**

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

- **Soluções Salina 0,2%, 0,85%, 0,9% e 1,6%:**

Pesou-se 2g, 8,5g, 9g e 16g respectivamente de NaCl e completou-se cada solução com 1000 ml de H₂O destilada.

b) Preparo dos Reagentes:

- **DCFH-DA 25 mM-Soluções Estoque**

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

- **Solução de DCFH-DA**

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

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

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

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

E assim por diante...

- **Solução de EDTA 3mM**

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

c) Preparo dos Estímulos:

- **Solução de PMA**

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

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

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

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

- cultivar bactérias viáveis em ágar sangue por 48 horas;
- colocar as colônias de bactérias em tubos de ensaio estéreis, em um fluxo laminar próprio para bactérias;
- ressuspendê-las em NaCl 0,85% e centrifugá-las por 10 minutos a 2500 rpm;
- “inativar” as bactérias a 60°C por 30 minutos;
- lavar 3 x com NaCl 0,85% e após cada lavada, centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm;
- ajustar a concentração das bactérias de modo tal que sua leitura no espectrofotômetro (Uv/Visível) a uma absorbância de 620 nm tenha um valor que varie entre 2.4 a 2.7. Estes valores, nesta absorbância, são aqueles em que as bactérias, em suspensão, apresentam uma turbidez que corresponde ao n ° 8 escala de Mc.Farland. Para a leitura no citômetro é necessário que as bactérias estejam nestas concentrações.
- preparar uma solução de iodeto de propídio a 5 %;
- centrifugar nas mesmas condições, desprezar o sobrenadante e adicionar 25 µl da solução de iodeto de propídio a 5%;
- incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro; lavar a suspensão de bactéria marcada mais 3x com NaCl 0,85% e centrifugando após cada lavagem por 10 minutos a 2500 rpm;
- ressuspender a bactéria em 5 ml de PBS glicosado (livre de Ca^{++} e Mg^{++});
- “aliquotar” em eppendorfs de 2 ml, proteger da luz e congelar ‘a -80°C;
- descongelar imediatamente antes do uso.

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

4.5.2 O Citômetro de Fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry Sistem, San Jose, Ca, USA) conectado com um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). A figura 4 mostra este equipamento.

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades *FSC* – *Forward Scatter* e *SSC side Scatter* do aparelho que avaliam o tamanho e a complexidade interna, dos mesmos respectivamente. A fluorescência verde do DCFH foi mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1) sendo aquela de cor vermelha do *S. aureus* marcado com o iodeto de propídeo mensurada a 585 ± 42 nm (FL2). A fluorescência verde emitida pelo DCFH foi usada para estimar o *burst* oxidativo das células analisadas em diferentes situações de estimulação. A fagocitose foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelo PI. A porcentagem de fagocitose (porcentagem de neutrófilos e macrófagos que fagocitaram as bactérias) foi calculada através do número de neutrófilos e macrófagos fluorescentes divididos pelo número total destas células e multiplicado por 100. As fluorescências do PI e do DCFH foram analisadas utilizando-se compensação de fluorescências para corrigir quaisquer interferências de sinais emitidos pelos mesmos. Através do Cell Quest Pro[®] foram analisadas as populações de interesse em cada experimento (neutrófilos ou macrófagos peritoneais), excluindo-se as populações de linfócitos e monócitos por meio da análise dos *gates*. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo *branco* usado como controle de refração basal da célula a ser analisada.

Figura 4 - Citômetro de fluxo modelo FACScalibur da Becton Dickinson acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple utilizado no presente trabalho para avaliar a atividade de macrófagos e neutrófilos. As setas indicam: 1- Injeção da amostra, 2-Painel de controle do citômetro e 3-Gráficos dos dados adquiridos.

4.6 PROCEDIMENTOS

Transcreve-se abaixo de modo especificado os procedimentos utilizados neste trabalho.

4.6.1 Obtenção e Manutenção de Células do Tumor de Ehrlich

Após eutanásia em câmara de CO₂, procedeu-se à colheita do fluido ascítico de um camundongo doador, portador de um Tumor ascítico de Ehrlich com 11 dias de evolução. A suspensão de células obtida deste animal foi centrifugada a 1000 rpm, por 5 minutos sendo ressuspensa por três vezes em PBS. Realizou-se, então, a contagem e avaliação de viabilidade das

células tumorais assim obtidas usando-se para tal o azul de Tripán (1:200) e empregando-se uma câmara de Neubauer.

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

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

4.6.2 Hemograma

a) Coleta de Sangue para o hemograma

No experimento 5.1 a coleta de sangue foi realizada após os 11 dias de convivência com o animal doente, e, no experimento 5.5 esta coleta foi feita 11 dias após a inoculação do tumor ascítico de Ehrlich no animal companheiro. Em ambos os casos, a coleta realizada imediatamente após eutanásia dos animais em câmara de CO₂. O sangue foi coletado através da veia porta hepática das camundongas, com auxílio de seringas e agulhas previamente umedecidas em solução aquosa de etilenodiamino-tetracética-dissódica (EDTA) a 10%. Em seguida, uma amostra deste sangue foi diluída no Diluidor Cell DA-500 para determinação do número de eritrócitos,

número de leucócitos, volume médio corpuscular, hemoglobina e hematócrito dos animais, o que foi feito através do Contador de Células Cell CC530/550.

4.6.3 Medida da Atividade Celular

a) Obtenção de neutrófilos sanguíneos

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

b) Obtenção dos macrófagos da cavidade

No dia do experimento (11º dia), as fêmeas companheiras foram sacrificadas após anestesia profunda em câmara de CO₂, sendo colocadas logo após em decúbito dorsal; uma pequena excisão foi, então, feita na região abdominal de cada uma delas. A cavidade peritoneal exposta foi, lavada com 5 ml de PBS estéril a 4°C e os macrófagos foram coletados em sequência após massagem vigorosa dos órgãos abdominais realizada para que um maior número de células se desprendesse e fosse aspirada junto com o PBS injetado. Imediatamente após a coleta, as amostras foram colocadas em banho de gelo. Após a obtenção do lavado peritoneal, foi realizado

um teste de viabilidade celular com o auxílio do corante Azul de Tripan. Só lavados celulares que apresentaram viabilidade superior a 90% foram utilizados nos experimentos. A contagem diferencial para polimorfonucleares foi realizada, com auxílio do corante Panótico. Apenas os lavados celulares com quantidades superiores a 90% de mononucleares foram utilizados. Para tanto, foi realizada a quantificação total das células em câmara de Neubauer; o número de células encontradas foi ajustado para 2×10^5 células/100µl através do uso de PBS. Esta foi a quantidade de células considerada como padrão para a realização dos experimentos que se descreve a seguir.

c)_Ativação dos macrófagos da cavidade peritoneal

Sete dias antes da coleta de macrófagos da cavidade peritoneal das camundongas, a migração destas células foi estimulada pela aplicação intra-peritoneal (ip) de 0,5 ml de Onco-BCG por animal, cinco dias após, repetiu-se o procedimento usando-se, desta feita, 0,25 ml por animal de Onco-BCG. Esta substância é classicamente conhecida como ativadora de macrófagos; experimentos realizados em nosso laboratório após emprego do mesmo procedimento produziram excelentes resultados (COSTA, 2004; STANKEVICIUS, 2004).

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

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

Após o sacrifício dos animais em câmara de CO₂, o sangue foi coletado; uma bateria de 6 tubos foi, então, montada e numerada de “A” até “E” para cada animal, e como mostra a figura 5.

Cada tubo (de acordo com a letra), recebeu uma substância diferente, obedecendo-se sempre a uma mesma ordem.

Figura 5 - Representação esquemática da sequência de reagentes utilizados nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose onde: Tubo A=PBS; Tubo B=DCFH; Tubo C= SAPI; Tubo D=DCFH+SAPI e Tubo E=DCFH+PMA

Desta forma, todos os tubos de “A” a “E” receberam alíquotas, que correspondem a 2×10^5 cel/100µl de sangue. O mesmo procedimento foi realizado na preparação das amostras utilizadas para avaliar os macrófagos, porém ao invés de sangue foi adicionado 100µl de líquido peritoneal colhidos dos animais (2×10^5 células). Os tubos com as letras “B”, “D” e “E” receberam 200µl da solução de DCFH-DA 3 mM cada. Todos os tubos de letra “C” e “D” receberam 100µl da solução de SAPI (100ng). Os tubos de letra “E”, por sua vez, receberam 100µl de PMA (100ng).

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

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

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

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

No experimento que utilizou líquido peritoneal (para análise da atividade dos macrófagos) desprezou-se o sobrenadante após a centrifugação; as células foram, então, ressuspensas por agitação manual e foram adicionadas em 1 ml de EDTA gelado; após estes procedimentos as amostras com líquido peritoneal estavam prontas para serem lidas no citômetro.

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

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

macrófagos de acordo com o respectivo experimento. Este valor de média geométrica foi fornecido pelo aparelho sendo utilizado para indicar a intensidade de fluorescência das células.

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

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

4.6.5 Avaliação do Crescimento do Tumor de Ehrlich

Para avaliação do crescimento do Tumor Ascítico de Ehrlich as camundongas foram sacrificadas após anestesia profunda em câmara de CO₂, ao final de 11 dias da inoculação do tumor. Desses animais foi coletado o líquido ascítico para mensuração do volume e do número de células tumorais nele presentes e também a concentração (células tumorais/ml de fluido ascítico) de acordo com o proposto por Dagli (1993). A figura 6 mostra este procedimento experimental.

Figura 6 - Esquema ilustrativo da formação dos grupos experimentais dos experimentos em que se avaliou o crescimento tumoral em camundongas companheiras

4.6.6 Dosagem dos Níveis Séricos de Corticosterona Plasmática

a) Coleta de sangue para obtenção do soro

Os animais foram profundamente anestesiados em câmara de CO_2 , para a coleta de sangue e posterior obtenção do soro para a dosagem dos níveis séricos de corticosterona. Trata-se do glicocorticóide mais abundante na circulação de camundongos, sendo considerado como um ótimo indicador da função adrenocortical nesta espécie animal. O sangue foi coletado após os 11 dias de convivência com o animal portador do tumor de Ehrlich e foi deixado à temperatura ambiente para a retração do coágulo; o sangue dos animais dos grupos experimentais e controles foi, então, centrifugado sob refrigeração (2.500 rpm/20 minutos em temperatura ambiente) para

obtenção do soro. Este soro foi armazenado em eppendorfs de polietileno em freezer a -80°C até o momento da realização das dosagens hormonais. As amostras foram coletadas à mesma hora do dia (entre 08:00 e 09:00 hs) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano sobre os níveis séricos de corticosterona.

b) Dosagem de Corticosterona

As amostras de soro dos animais foram retiradas do freezer, sendo mantidas a temperatura ambiente ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) para o descongelamento. As dosagens para a quantificação de corticosterona foram realizadas por radioimunoensaio em fase sólida utilizando-se o kit comercial Coat-a-Count (DPC[®]) específico para corticosterona.

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

c) Curva padrão

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

d) Soro controle

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

Os seguintes parâmetros de validação foram registrados:

Sensibilidade do método: 93%-dose (8,85ng/ml);

coeficiente de Variação Baixo: 13,73%;

coeficiente de Variação Alto: 12,46%;

limite de Detecção: 8,85ng/ml.

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

4.6.7 Dosagens Neuroquímicas

a) Coleta e processamento dos tecidos

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

Antes das dosagens os tecidos cerebrais foram homogeneizados por sonicação (caneta sonicadora), durante 2 ou 3 minutos sobre uma cuba de gelo seco, com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA, utilizado como padrão interno para as dosagens de monoaminas. O DHBA (3,4 diidroxibenzilamina) foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas das monoaminas a serem dosadas (COSTA; FRUSSA-FILHO; FELICIO, 2001).

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

A Dopamina (DA), seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC), a Noradrenalina (NA) e seu metabólito 3-metoxifeniletlenoglicol (MHPG), a Serotonina (5HT) e o seu metabólito o ácido 5 hidroxí indolacético (5HIAA) foram dosadas por HPLC, com detector eletroquímico. Foram calculadas também as relações

NOR/MHPG e DOPAC/DA, HVA/DA e de 5HT/5HIAA, consideradas como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de NOR, DA e de 5HT, respectivamente.

b) Dosagens neuroquímicas

As dosagens das aminas cerebrais e de seus metabólitos foram realizadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) a partir de método previamente descrito em nossos laboratórios (FELICIO et al., 1996). A figura 7 mostra o equipamento citado.

O sistema de HPLC-ED (SHIMATZU Modelo 6 A) usado, é composto por uma bomba, um amortecedor de impulsos, uma válvula injetora de 20µl, um detector eletroquímico, um forno de coluna para manutenção da temperatura, um registrador e um integrador (Modelo Chromatopac), todos marca SHIMATZU. A coluna cromatográfica utilizada foi a C-18 (SUPELCO) medindo 220 x 4,6 mm com filtro de linha.

A técnica utilizada foi a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico. Esta técnica fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção.

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

A fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo e deaerado por 30 minutos com um fluxo de hélio antes de ser colocada no HPLC. Após sua instalação no sistema cromatográfico, a fase móvel permaneceu por uma noite circulando em um sistema fechado de modo tal a permitir a estabilização do aparelho, com fluxo constante de 1,2 ml/min. O detector eletrolítico foi mantido

com potencial de +0,83 V no eletrodo de trabalho. A temperatura para amostragem no HPLC foi mantida em 25°C.

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

As substâncias foram reconhecidas segundo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, através de comparação com os padrões de concentrações conhecidas. O tempo total de passagem de cada amostra foi de 20 min. O limite de detecção do aparelho foi de 1,0 ng/ml e o limite de quantificação de 10,0 ng/ml para os diferentes neurotransmissores quantificados.

Para todas as dosagens foram estabelecidas curvas de calibração tendo sido calculados os coeficientes de correlação linear (r^2) sendo considerados adequados valores r^2 , superiores 0,9.

Para o estabelecimento da precisão intra-ensaio do método cromatográfico foram calculados os coeficientes de variação (CV%) das diferentes concentrações dos neurotransmissores analisados e foram considerados adequados valores com CV% inferiores a 15%.

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

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

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

Figura 7 - Sistema HPLC-ED (SHIMATZU modelo 6A) utilizado no presente para dosagens neuroquímicas. As setas indicam: 1- Injeção da amostra, 2- Visor do painel de controle e 3- Detector eletroquímico.

4.6.8 Medida da Atividade Geral

a) Campo aberto

O campo aberto foi utilizado para medir a atividade geral dos animais. Trata-se de uma arena circular de madeira medindo 40,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura pintada na cor cinza grafite. O fundo da arena circular é dividido, virtualmente, por 3 círculos concêntricos em 3 partes iguais: zona central, média e periférica.

A medida de atividade dos animais no campo aberto foi feita por intermédio de um sistema indireto, ETHOVISION (VIDEO TRACKING MOTION & BEHAVIOR

RECOGNITION SYSTEM® VERSÃO 1.90) descrito abaixo, sempre no mesmo período do dia (entre as 8:00 hs e 14:00 hs), tendo sido avaliada colocando-se cada animal, individualmente, na arena do aparelho (centro da arena) por 5 minutos, tomando-se o cuidado de intercalar os animais dos diferentes grupos para observação, buscando-se assim, minimizar possíveis efeitos decorrentes de variações circadianas na atividade dos animais. Com a finalidade de evitar influência de odores, a arena foi limpa com uma solução aquosa de álcool a 5 % imediatamente antes da introdução de cada animal.

Como indicativos da atividade no campo aberto foram registrados os seguintes parâmetros em cada zona do aparelho:

- Distância percorrida: corresponde à distância gasta pelo animal no ato de entrar sucessivamente com as quatro patas em uma das divisões (zonas) do piso da arena, locomovendo-se (cm).
- Número de movimentos iniciados: corresponde ao número de vezes em que o animal inicia movimentos na arena.
- Tempo em movimento: quanto tempo em segundos, o animal se movimentou no interior das zonas do campo aberto(s).

b) Sistema de observação computadorizada-etho vision

Para as análises comportamentais, foi utilizado o aparelho Ethovision® (Noldus Information Technology®, Wageningen, The Netherlands) que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo, análise de movimento e reconhecimento comportamental. O sistema é composto pelo programa Etho Vision Pro-Color 1.9 e pelos itens de “hardware”: câmera filmadora (CCD-Iris color Sony), monitor de vídeo (Sony), computador (Pentium 133, 16 MB de memória RAM, 1,2 GB de disco rígido) com placa de captura de vídeo (TARGA+Truevision, 2D

NTSC), monitor SVGA, teclado e mouse, além de cabos e conectores. A figura 8 mostra este sistema.

Figura 8 - Etho Vision® -(Video Tracking Motion & Behavior Recognition System Versão 1.90)- equipamento de rastreamento em vídeo, usado no procedimento experimental para análise de movimentos
As setas indicam: 1- Campo Aberto para camundongo, 2-Câmera filmadora acoplada ao computador, 3- Monitor de vídeo e 4- Imagem digitalizada representada em *pixels*

c) Rastreamento do animal e análise do movimento

A partir de imagens recebidas pela câmera filmadora e digitalizadas na placa de captura, o programa gera coordenadas (x e y) provenientes do centro de gravidade do animal, em intervalos de tempo determinados, obedecendo a uma taxa de amostragem de 6,66 amostras por segundo¹. As coordenadas são geradas pelo método de subtração-ideal para rastrear um animal branco em uma arena cinza, no qual o sistema subtrai a imagem de cada amostra dos pontos da imagem de referência (imagem do campo aberto, vazio, isto é sem o animal, e captada antes do experimento).

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

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

Antes do início dos experimentos foi necessário configurar o limiar de ruído- diferença mínima de intensidade entre o fundo (*background*) e o animal- a fim de ignorar possíveis ruídos no sinal de vídeo durante o processamento subseqüentes de imagens. Esse ajuste depende da intensidade de iluminação da arena e é feito automaticamente.

A iluminação da sala durante as observações foi do tipo difusa, tendo sido obtida colocando-se uma placa semi-opaca de acrílico branco abaixo da fonte luminosa, a fim de espalhar a luz uniformemente em todas as direções e minimizar o aparecimento de reflexos e sombras. Outro fator importante para eliminar os reflexos foi o contraste perfeito entre a arena e o animal, fato alcançado pintando-se as superfícies do campo aberto de cor cinza grafite.

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

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

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

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

d) Compilação e análise dos dados

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

uma série de etapas de organização e de cálculos de porcentagens de tempo e de número de ocorrências dos parâmetros em cada zona.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

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

5.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

Conforme descrito em 4.1.1 foram utilizados 32 camundongos os quais foram separados em pares, de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E). No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. No 11º dia as amostras de sangue dos animais companheiros dos animais inoculados com PBS ou tumor de Ehrlich foram coletadas para a determinação do hemograma conforme descrito no item 4.6.2.

Resultados

A tabela 1 mostra e as figuras 9, 10, 11 e 12 ilustram os efeitos sobre o hemograma da convivência por 11 dias com portadores do tumor de Ehrlich. A análise estatística dos dados obtidos mostrou a existência de diferenças significantes entre elas ($p < 0,05$) em especial sobre o número de leucócitos. Mais especificamente, a convivência por 11 dias com portadores de um tumor diminuiu o número de leucócitos. Não se observaram diferenças significantes no hematócrito, no número de eritrócitos e no volume corpuscular médio.

Tabela 1 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a média do número de eritrócitos (em mm^3) e de leucócitos (em mm^3) bem como sobre os valores de hematócrito (em %) e volume corpuscular médio (μ^3)

GRUPOS	ERITRÓCITOS (mm^3)	LEUCÓCITOS (mm^3)	HEMATÓCRITO (%)	VCM (μ^3)
CONTROLE	$7,18 \pm 0,44$	$5,74 \pm 1,28$	$46,5 \pm 2,45$	$64,73 \pm 1,36$
EXPERIMENTAL	$6,22 \pm 1,72$	$4,34 \pm 0,76 *$	$43,46 \pm 7,59$	$64,36 \pm 1,51$

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão.

* estatisticamente diferente do controle para $p < 0,05$, $N = 8$ animais; teste "t" de Student.

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

Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Figura 9 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a média do número de eritrócitos (em mm^3)

Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 10 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a média do número de leucócitos (em mm³)

Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 11 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a média dos valores de hemoglobina (em g/dL)

Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 12 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a média do volume corpuscular médio (μ^3)
Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.
Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste "t" de Student).

5.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE REALIZADA POR NEUTRÓFILOS DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

Foram utilizados 32 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E) conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. No 11º dia as amostras de sangue dos animais companheiros dos animais inoculados com PBS ou tumor de Ehrlich foram coletadas como descrito em 4.6.3.a para a realização da determinação do *burst* oxidativo (induzido por PMA e por *S. aureus*) e da fagocitose, ambos realizados por neutrófilos e avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita no item 4.6.4.

Resultados

Os citogramas que ilustram os dados relativos ao SSC vs FSC de leucócitos do sangue dos camundongos são apresentados a seguir (Figuras 13A, 14A, 15A e 16A) bem como os histogramas que ilustram a fluorescência destas células frente aos diferentes estímulos utilizados (Figuras 13B, 14B, 15B e 16B). Citogramas e histogramas semelhantes foram utilizados para a análise individual das populações celulares de neutrófilos do sangue periférico dos animais controles e experimentais. Estas populações foram identificadas ao microscópio óptico após uma separação mecânica realizada pelo FACSCALIBUR e a devida coloração pelo Giemsa. Cada população celular teve uma pureza de aproximadamente 98%; na figura 13A a população R1 corresponde aos neutrófilos, a R2 aos monócitos e a R3 aos linfócitos. Todo o procedimento de separação por *sorting* e a identificação das diferentes

populações celulares foi realizado e padronizado em nossos laboratórios por Massoco e Palermo-Neto (2003). Desta forma, os citogramas observados nas figuras 13A à 16A em diante correspondem ao *burst* oxidativo e à fagocitose destas populações celulares frente aos estímulos utilizados, ou seja, DCFH, PMA e *S.aureus*, respectivamente. As figuras 13B à 16B correspondem aos histogramas de fluorescência das populações de neutrófilos obtidas também frente aos estímulos utilizados, ou seja, DCFH, PMA e *S. aureus* respectivamente. A figura 16B, especificamente, ilustra os histogramas relacionados à análise da fagocitose (porcentagem e intensidade). Desta forma, a figura 16B-1 representa o histograma do controle negativo, isto é apenas dos neutrófilos em PBS. Como pode ser verificado na abscissa destas figuras não existem células emitindo fluorescência acima de 10^1 o que foi considerado como limite da técnica de citometria usada (M1). Na figura 16B -2 observar-se a porcentagem de neutrófilos que realizaram fagocitose empregando-se o mesmo limite (M1); especificamente, a fluorescência observada acima de 10^1 corresponde aos neutrófilos que realizaram fagocitose. Na figura 16B-2 está representada a intensidade de fluorescência emitida pelos neutrófilos que fagocitaram a *S. aureus*.

As populações de leucócitos sangüíneos observados no citômetro foram padronizadas da seguinte maneira: região R1=linfócitos; região R2= monócitos; região R3= neutrófilos.

Figura 13 - Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos após a incubação com o DCFH de animais do grupo controle
R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.

Figura 14 -Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos após a incubação com o PMA de animais do grupo controle
R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.

Figura 15 - Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos incubados com o *S.aureus* realizando fagocitose
R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.

Citograma do tubo A

Citograma do tubo C

Figura 16A - Citogramas de leucócitos circulantes de camundongos incubados com PBS (**TUBO A**) e citograma de leucócitos circulantes de camundongos incubados com *S.aureus* realizando fagocitose (**TUBO C**) em animais do grupo controle

(1)

(2)

Figura 16B- Histograma de neutrófilos de animais do grupo controle incubado com *S. aureus* realizando fagocitose

(1) Histograma de células controle isto é, incubadas apenas com PBS.

(2) Histograma da porcentagem de neutrófilos incubados com *S.aureus* realizando fagocitose.

Importante informar que estes citogramas e histogramas têm por único objetivo ilustrar o que foi visto por meio do citômetro durante as análises, ou seja, as populações celulares distintas, suas diferentes respostas e, conseqüentemente, as diferentes intensidades de fluorescência emitidas pelas células provenientes de animais dos 2 grupos frente aos diferentes estímulos. Estas figuras têm, assim caráter ilustrativo; no entanto, é importante que se saiba que todos os dados colhidos neste trabalho foram obtidos a partir de análises feitas desta forma pelo citômetro de fluxo.

Uma vez que as figuras 17, 18, 19, 20 e 21 ilustram os valores percentuais de variação de média de *burst* em relação aos dados dos grupos controle, optou-se por mostrar os dados que as originaram na forma de tabelas; desta forma a tabela 2 mostra os resultados do presente experimento e aqueles referentes aos efeitos da convivência com o animal doente por 11 dias sobre o *burst* oxidativo espontâneo e sobre aqueles induzidos por PMA e *Staphylococcus aureus*, bem como outros relativos à fagocitose desta bactéria realizada por neutrófilos.

A figura 16 ilustra a intensidade de fluorescência decorrente do *burst oxidativo* basal de neutrófilos (apenas com DCFH) e aqueles induzidos por PMA e *S.aureus* após os 11 dias de convivência com o animal com tumor e avaliados por citometria de fluxo. O *burst* oxidativo dos neutrófilos dos animais do grupo experimental foi reduzido significativamente quando induzido pelo PMA ($P<0,05$). De igual forma, a convivência com animais doentes por 11 dias foi capaz de reduzir ($p<0,05$) o *burst* oxidativo dos neutrófilos dos animais do grupo experimental após indução por *S.aureus*. Com relação ao *burst* oxidativo espontâneo, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 2 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o *burst oxidativo* e sobre a fagocitose de neutrófilos medidos, por Citometria de Fluxo

Condição	Controle	Experimental
DCFH	23,4 ± 5,6	21,7 ± 3,6
PMA	35,1 ± 7,6	27,3 ± 6,5*
<i>Burst</i> induzido pela <i>S.aureus</i>	56,1 ± 17,9	39,4 ± 6,6*
% de fagocitose	67,7 ± 15,2	40,9 ± 4,9*
Intensidade de fagocitose	18,2 ± 6,4	16,2 ± 1,1*

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (média ± desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos circulantes.

*estatisticamente diferente do controle para $p < 0,05$, $N = 8$ animais, teste “t” de Student

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

Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Figura 17 - Efeitos da convivência com portadores de um tumor de Ehrlich, durante 11 dias sobre o *burst oxidativo* basal de neutrófilos

Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 18 - Efeitos da convivência com portadores de um tumor de Ehrlich, durante 11 dias sobre o *burst oxidativo* de neutrófilos induzido por PMA

Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 19 - Efeitos da convivência com portadores de um tumor de Ehrlich, durante 11 dias sobre o *burst oxidativo* de neutrófilos induzido por *S. aureus*

Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

A porcentagem de fagocitose e a intensidade de fagocitose da *S.aureus* de animais do grupo controle e daqueles em que coabitaram com animais portadores de um tumor estão ilustradas nas figuras 20 e 21.

Observa-se que a convivência com o animal inoculado com células de um tumor de Ehrlich produziu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de fagocitose da *S. aureus* conjugada com PI em relação aos animais do grupo controle, ou seja, a convivência

com o animal com tumor produziu uma diminuição na % de neutrófilos que estão fazendo fagocitose, em relação ao número total de neutrófilos do *gate*. Observou-se, também, uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da intensidade de fagocitose dos animais do grupo experimental em relação aos animais do grupo controle, isto é, a fluorescência foi menor, em função de ser a mesma emitida pela bactéria fagocitada.

Figura 20 - Efeitos da convivência com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a porcentagem de fagocitose de neutrófilos

Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 21 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a intensidade de fagocitose de neutrófilos

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

Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

5.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO *EX VIVO* E POR CITOMETRIA DE FLUXO, DO *BURST* OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES, EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH

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

No 11º dia foram colhidas as amostras de líquido peritoneal dos animais companheiros para a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose dos macrófagos residentes que foram avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita em 4.6.4.

Resultados

A Tabela 3 mostra e as Figuras 22, 23, 24, 25 e 26 ilustram os efeitos da convivência com o animal doente sobre a atividade de macrófagos peritoneais residentes após avaliações por citometria de fluxo. A análise estatística dos resultados mostrou que a convivência com o animal doente não alterou o *burst* oxidativo desencadeado pelo PMA ($p > 0,05$) e pelo *S. Aureus* ($p > 0,05$). Também não alterou a porcentagem de fagocitose ($p > 0,05$), ou a intensidade de fagocitose ($p > 0,05$).

Não foram observadas diferenças na fluorescência de células marcadas apenas com DCFH.

Tabela 3 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o *burst oxidativo* e a fagocitose de macrófagos peritoneais residentes, medidos por Citometria de Fluxo

Condição	Controle	Experimental
DCFH	14,8 ± 4,9	13,3 ± 4,4
PMA	17,1 ± 3,3	16,5 ± 4,5
Burst induzido pela <i>S.aureus</i>	7,4 ± 2,6	7,2 ± 2,8
% de fagocitose	21,4 ± 6,3	23,8 ± 9,5
Intensidade de fagocitose	17,4 ± 4,0	18,0 ± 1,5

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (média ± desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de macrófagos circulantes

p > 0,05, N = 8 animais; teste "t" de Student.

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

Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Figura 22 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o *burst oxidativo* de macrófagos peritoneais residentes

Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 23 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o burst oxidativo induzido por PMA em macrófagos peritoneais residentes
 Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.
 Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste "t" de Student).

Figura 24 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o burst oxidativo induzido por *S. aureus* em macrófagos peritoneais residentes
 Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.
 Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste "t" de Student).

Figura 25 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a porcentagem de fagocitose de macrófagos peritoneais residentes
Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **Experimental** = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.
 Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste "t" de Student).

Figura 26 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores do tumor de Ehrlich, sobre a intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais residentes
 Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste "t" de Student)
Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **Experimental** = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.
 Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste "t" de Student).

5.4 EXPERIMENTO 4 – AVALIAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ATIVADOS PELO ONCO-BCG, EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH.

Foram utilizados 32 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E) conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. No 4º dia do experimento injetou-se, por via i.p. 0,5 ml/por animal de Onco-BCG; no 9º dia do experimento, injetou-se nos mesmos animais por via i.p. 0,25 ml/por animal de Onco-BCG para a ativação de macrófagos.

No 11º dia foram colhidas as amostras de líquido peritoneal dos animais companheiros conforme descrito em 4.6.3.c para a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose por macrófagos peritoneais que foram avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita em 4.6.4

Resultados

A Tabela 4 mostra e as figuras 27, 28, 29, 30 e 31 ilustram os efeitos da convivência com o animal doente sobre a atividade de macrófagos peritoneais ativados pelo Onco-BCG e avaliada por citometria de fluxo. A análise dos dados mostrou que a convivência com o animal doente promoveu um aumento na intensidade da cor verde dos macrófagos, mostrando este fato que tanto o PMA quanto o *S. Aureus* induziram um aumento no burst oxidativo destas células ($p < 0,05$). Observou-se também, que a convivência com o animal doente

reduziu a porcentagem de fagocitose ($p < 0,05$), mas não alterou a intensidade de fagocitose ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças na fluorescência de células marcadas apenas com DCFH.

Tabela 4 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, durante 11 dias sobre o *burst oxidativo* e a fagocitose de macrófagos peritoneais, ativados pelo Onco-BCG, e medidos por Citometria de Fluxo

Condição	Controle	Experimental
DCFH	16,56 ± 5,33	15,31 ± 3,86
PMA	51,45 ± 21,60	71,34 ± 17,74*
<i>Burst</i> induzido pela <i>S.aureus</i>	5,81 ± 1,28	7,57 ± 2,20*
% de fagocitose	90,06 ± 14,72	71,22 ± 19,36*
Intensidade de fagocitose	21,01 ± 4,62	18,9 ± 4,22

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (média ± desvio padrão) correspondente ao *gate* da população de macrófagos circulantes

* $p < 0,05$, N = 8 animais, teste "t" de Student.

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

Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Figura 27 - Efeitos da convivência com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o *burst oxidativo* de macrófagos peritoneais, ativados pelo Onco-BCG e medidos por citometria de fluxo

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 28 - Efeitos da convivência com outros portadores do tumor de Ehrlich, durante 11 dias sobre o *burst oxidativo* induzido por PMA em macrófagos peritoneais, ativados pelo Onco-BCG e medidos por citometria de fluxo

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 29 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o *burst oxidativo* induzido por *S. aureus* em macrófagos peritoneais, ativados pelo Onco-BCG e medidos por citometria de fluxo

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 30 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a porcentagem de fagocitose de macrófagos peritoneais, ativados pelo Onco-BCG e medidos por citometria de fluxo

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p < 0,05$ (teste "t" de Student).

Figura 31 - Efeitos da convivência por 11 dias com outros portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a intensidade de fagocitose de macrófagos peritoneais, ativados pelo Onco-BCG e medidos por citometria de fluxo

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste "t" de Student).

5.5 EXPERIMENTO 5 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE UM TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO MESMO TUMOR

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

No 11º dia do experimento os animais companheiros dos grupos C e aqueles do grupo E foram inoculados com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p; sendo os animais de cada grupo alojados em número de 8 em gaiolas de propileno (medindo 41 x 34 x 16 cm), após 11 dias procedeu-se à verificação do crescimento tumoral nos camundongos dos grupos C e E conforme descrito em 4.6.5. A figura 6 mostra este delineamento.

Resultados

A tabela 5 mostra e as figuras 32, 33 e 34 ilustram os efeitos da convivência por 11 dias com outros portadores do tumor de Ehrlich sobre o crescimento de um tumor ascítico de Ehrlich.

A análise estatística mostrou a existência de diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os dados obtidos após a convivência com o animal doente, durante 11 dias no relativo ao crescimento tumoral avaliado por meio dos seguintes parâmetros: concentração de células tumorais ($p < 0,05$), número total de células tumorais ($p < 0,05$); no entanto, não foram

encontradas diferenças no volume de líquido ascítico ($p > 0,05$). Especificamente, observou-se que a convivência por 11 dias com outros portadores do tumor de Ehrlich aumentou a concentração e o número de células totais da ascite de animais companheiros também inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich, isto é, a convivência com o animal doente diminuiu a resistência ao crescimento tumoral.

Tabela 5 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o volume (em ml), concentração e número total de células da ascite após inoculação do tumor ascítico de Ehrlich (5×10^6 células/animal)

Grupos	Volume (ml)	Concentração (nº de células/ml 1×10^7)	Células Totais (nº de células/animal 1×10^7)
Controle	$9,6 \pm 3,36$	$15,16 \pm 0,91$	$143,65 \pm 42,47$
Experimental	$10,0 \pm 2,07$	$19,76 \pm 3,55^{**}$	$198,3 \pm 55,42^*$

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão

* estatisticamente diferente do controle para $p < 0,05$, N = 8 animais, teste "t" de Student.

** estatisticamente diferente do controle para $p < 0,01$, N = 8 animais, teste "t" de Student

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

Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Figura 32 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o volume da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células)

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

Figura 33 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o número de células/ml ($\times 10^7$) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células). Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, ** $p < 0,01$ (teste “t” de Student).

Figura 34 - Efeitos da convivência por 11 dias com outros portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o número de células totais ($\times 10^7$) da ascite de camundongos induzida pela inoculação com TAE (5×10^6 células). Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, * $p < 0,05$ (teste “t” de Student).

5.6 EXPERIMENTO 6 – AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH, 11 DIAS APÓS SEREM INOCULADOS COM 5×10^6 CÉLULAS DO MESMO TUMOR

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

No 11º dia do experimento os animais companheiros dos grupos C e aqueles do grupo E foram inoculados com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p.; após 11 dias procedeu-se à verificação do hemograma dos camundongos dos grupos C e E conforme descrito em 4.6.2. A figura 6 mostra este delineamento.

Resultados

A tabela 6 mostra e as figuras 35, 36, 37 e 38 ilustram os efeitos da convivência por 11 dias com portadores do tumor de Ehrlich no hemograma dos animais, 11 dias após a inoculação com 5×10^6 células do mesmo tumor.

A análise estatística dos dados obtidos mostrou a existência de diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os dados quanto ao número de leucócitos. Mais especificamente, observou-se redução do número de leucócitos nos animais companheiros do grupo E.

Tabela 6 - Efeitos da convivência com um animal portador de um tumor de Ehrlich, por 11 dias sobre o desenvolvimento do mesmo tumor verificando a média do número de eritrócitos (em mm^3) e de leucócitos (em mm^3) bem como sobre os valores do hematócrito (em %) e volume corpuscular médio (μ^3)

GRUPOS	ERITRÓCITOS (mm^3)	LEUCÓCITOS (mm^3)	HEMATÓCRITO (%)	VCM (μ^3)
CONTROLE	$7,98 \pm 1,13$	$20,36 \pm 6,34$	$55,51 \pm 11,97$	$68,58 \pm 6,79$
EXPERIMENTAL	$7,99 \pm 1,12$	$14,61 \pm 2,32^*$	$53,03 \pm 8,08$	$66,22 \pm 2,41$

os dados representam a média $\pm$ desvio padrão

* estatisticamente diferente do controle para $p < 0,05$, $N = 8$ animais, teste "t" de Student correlacionado com Welch test.

Controle = animais que conviveram com o animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com o animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Figura 35 – Efeitos da convivência com um animal portador de um tumor de Ehrlich, por 11 dias sobre o desenvolvimento do mesmo tumor verificando a média do número de eritrócitos (em mm^3)
 Controle = animais que conviveram com os animais tratados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.
 Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste "t" de Student).

Figura 36 - Efeitos da convivência com um animal portador de um tumor de Ehrlich, por 11 dias sobre o desenvolvimento do mesmo tumor verificando a média do número de leucócitos (em mm³)
Controle = animais que conviveram com os animais tratados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.
Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p < 0,05$ (teste "t" de Student com correção de Welch).

Figura 37 – Efeitos da convivência com um animal portador de um tumor de Ehrlich, por 11 dias sobre o desenvolvimento do mesmo tumor verificando a média dos valores do hematócrito (em %)
Controle = animais que conviveram com os animais tratados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.
Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste "t" de Student).

Figura 38 – Efeitos da convivência com um animal portador de um tumor de Ehrlich, por 11 dias sobre o desenvolvimento do mesmo tumor verificando a média do volume corpuscular médio (μ^3)
Controle = animais que conviveram com os animais tratados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p > 0,05$ (teste "t" de Student).

5.7 EXPERIMENTO 7 – DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA EM ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH

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

No 11º dia, as amostras de sangue dos animais companheiros dos 2 grupos foram coletadas para a determinação dos níveis séricos de corticosterona conforme descrito no item 4.6.6.a.

Resultados

A figura 39 ilustra os efeitos da convivência com camundongos portadores do tumor de Ehrlich, durante 11 dias sobre os níveis séricos de corticosterona. Não se verificaram alterações significativas nos níveis séricos deste hormônio entre os animais dos 2 grupos.

Figura 39 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; **Experimental** = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

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

5.8 EXPERIMENTO 8 – DOSAGEM DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS NO HIPOTÁLAMO E NO CÓRTEX FRONTAL DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DE UM TUMOR DE EHRLICH

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

No 11º dia os animais companheiros dos animais inoculados com PBS ou tumor de Ehrlich foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂; após este procedimento, foi colhido o cérebro para remoção do córtex frontal e do hipotálamo conforme descrito em 4.6.7.a. Foram dosados os seguintes neurotransmissores noradrenalina, dopamina e serotonina, bem como seus metabólitos 4-hidroxi 3-metoxifeniletlenoglicol (MHPG) e ácido acético 3,4 diidroxifenilacético (DOPAC); ácido 4 hidroxi 3-metil homovanílico (HVA) e ácido 5 hidroxi 3-indolacético (5HIAA) respectivamente conforme descrito em 4.6.7.b. Desta forma, foi possível inferir nos dados de “turnover” destes neurotransmissores nestes animais.

Resultados

A tabela 7 mostra e as figuras 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49 ilustram os efeitos da convivência com camundongos portadores do tumor de Ehrlich, durante 11 dias sobre os níveis e *turnover* de neurotransmissores, medidos no hipotálamo ou no córtex cerebral.

Como pode ser observada, a convivência com o animal portador do tumor diminuiu os níveis hipotalâmicos de noradrenalina e aumentou aqueles de dopamina, nesta mesma região em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$). Aumentou, os níveis de MHPG ($p < 0,05$)

nesta região e também, o “*turnover*” hipotalâmico de noradrenalina ($p < 0,05$). Análise adicional dos resultados evidenciou um aumento dos níveis de DA no córtex frontal ($p < 0,05$), em relação aos animais do grupo controle. Não se observaram alterações para os outros parâmetros bioquímicos analisados no córtex frontal; os valores de noradrenalina no córtex frontal estavam abaixo do nível de detecção da metodologia. Finalmente, não se observaram alterações significantes no hipotálamo e no córtex frontal com relação a concentrações de serotonina e 5HIAA, assim como no relativo à relação a serotonina/5HIAA.

Tabela 7 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre os níveis e “turnover” hipotalâmicos e corticais de noradrenalina; dopamina e serotonina

PARÂMETROS	HIPOTÁLAMO		CÓRTEX FRONTAL	
	C	E	C	E
NOR	2844,2 ± 385	2512,10 ± 277*	—	—
MHPG	2896,30 ± 537	3405,60 ± 331*	—	—
MHPG/NOR	0,85 ± 0,36	1,37 ± 0,20*	—	—
DA	317,36 ± 46	407,88 ± 141*	1726,80 ± 509	2420,80 ± 1075*
HVA	98,39 ± 14	97,91 ± 12	230,18 ± 91	261,17 ± 121
DOPAC	46,44 ± 3	54,35 ± 11	115,55 ± 41	113,66 ± 68
HVA/DA	0,31 ± 0,06	0,26 ± 0,07	0,15 ± 0,03	0,18 ± 0,09
DOPAC/DA	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,065 ± 0,01
HVA+DOPAC/DA	0,33 ± 0,14	0,35 ± 0,11	0,23 ± 0,06	0,26 ± 0,1
5HT	1181,60 ± 118	1185,00 ± 135	719,46 ± 134	756,83 ± 170
5HIAA	270,57 ± 27	286,11 ± 38	147,39 ± 29	141,84 ± 37
5HIAA/5HT	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,21 ± 0,06	0,20 ± 0,04

os dados representam a média ± desvio padrão em ng/g

* estatisticamente diferente do controle para $p < 0,05$, N = 8 animais, teste “t” de Student para dados paramétricos e teste “U” de Mann-Whitney para dados não paramétricos.

Controle = animais que conviveram com os animais tratados com PBS;

Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Os traços contínuos indicam valores abaixo do limite de detecção da metodologia.

Figura 40 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre os níveis hipotalâmicos de NOR

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, * $p < 0,05$ em relação ao controle; Teste "U" de Mann-Whitney

Figura 41 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre os níveis hipotalâmicos de MHPG

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, * $p < 0,05$ em relação ao controle; Teste "t" de Student.

Figura 42 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o “turnover” de NOR

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo, * $p < 0,05$ em relação controle Teste “U” de Mann-Whitney

Figura 43 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre os níveis hipotalâmicos e corticais de dopamina

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo, * $p < 0,05$ em relação ao controle; Teste “t” de Student para a dopamina do hipotálamo e teste “U” de Mann-Whitney para a dopamina do córtex-frontal.

Figura 44 - Efeito da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o “turnover” de dopamina
 Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo, $p>0,05$ em relação ao controle; Teste “t” de Student

Figura 45 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores do tumor de Ehrlich, sobre o “turnover” de dopamina
 Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo, $p>0,05$ em relação ao controle; Teste “t” de Student para a HVA/DA do hipotálamo e teste “U” de Mann-Whitney para HVA/DA do córtex-frontal.

Figura 46 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o “turnover” de dopamina

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo. $p>0,05$ em relação ao controle; Teste “t” de Student.

Figura 47 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, durante 11 dias, sobre os níveis hipotalâmicos e corticais de 5HT

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.

Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo, $p>0,05$ em relação ao controle; Teste “t” de Student.

Figura 48 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre os níveis hipotalâmicos e corticais de 5HIAA

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p>0,05$ em relação ao controle; Teste "t" de Student.

Figura 49 - Efeitos da convivência por 11 dias com outros portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o "turnover" de 5HT

Controle = animais que conviveram com os animais injetados com PBS; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, $p>0,05$ em relação ao controle; Teste "t" de Student.

5.9 EXPERIMENTO 9 – MEDIDA DE ATIVIDADE GERAL DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH, APÓS ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ANFETAMINA

Foram utilizados 64 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E) conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. No 11º dia os camundongos companheiros do grupo controle foram divididos em dois sub grupos: C₁ e C₂. O mesmo foi feito com os animais companheiros do grupo experimental (E) que foram subdivididos em E₁ e E₂.

Os animais dos grupos C₁ e E₁ foram tratados com 1 mg/kg de anfetamina; e aqueles dos grupos C₂ e E₂ com 2 mg/kg de anfetamina como descrito em 4.2.2. Quinze minutos após as administrações, os animais foram colocados individualmente no centro da arena do campo aberto que registra a atividade geral como descrito no item 4.6.9.a., cada animal foi observado por 5 minutos.

Resultados

A tabela 8 mostra e as figuras 50 a e 50 b ilustram os efeitos das duas doses de anfetamina sobre a atividade locomotora, em campo aberto, de animais que conviveram por 11 dias com outros portadores de um tumor de Ehrlich; avaliou-se a locomoção nas diferentes zonas do campo aberto. Como pode ser observado, a administração de anfetamina na dose de 2,0 mg/kg aumentou significativamente a locomoção total dos animais bem como aquela realizada na zona central em relação àquelas observadas no grupo controle. Neste sentido

observou-se, também, a existência de diferenças nos efeitos produzidos pela dose de 1,0 mg/kg no relativo à locomoção dos animais do grupo experimental que apresentou alguma tendência de diminuição na zona central do aparelho (12% de redução) e aumentou de forma significativa na zona periférica do mesmo.

Tabela 8 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, após administração aguda de diferentes doses de anfetamina, sobre a locomoção de camundongos avaliados no campo aberto

LOCOMOÇÃO (cm)	Anfetamina			
	1 mg/kg		2 mg/kg	
	C	E	C	E
Total	2110,0 ± 337,1	2212,3 ± 224,9	2658,9 ± 489,7	3161,9 ± 723,9*
Zona Central	323,5 ± 154,8	268,6 ± 85,6	230,0 ± 63,9	338,1 ± 175,2*
Zona Média	995,2 ± 276,7	883,1 ± 228,6	901,9 ± 277,7	1203,1 ± 512,5
Zona Periférica	791,2 ± 412,9	1145,5 ± 365,0*	1526,9 ± 540,6	1570,9 ± 715,3

Os dados representam as médias ± desvio padrão em cm

* estatisticamente diferente do controle para $p < 0,05$, N = 8 animais, teste “t” de Student para dados paramétricos e teste “U” de Mann-Whitney para dados não paramétricos.

Controle = animais que conviveram com os outros tratados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg.

Experimental = animais que conviveram com os outros inoculados com o tumor de Ehrlich e que foram inoculados com anfetamina na dose de 1 ou 2 mg/kg.

Figura 50A- Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, após administração aguda de diferentes doses de anfetamina, sobre a atividade locomotora de camundongos, avaliado a locomoção total e nas zonas central e média do campo aberto. **Controle** = animais que conviveram com os outros injetados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg; **Experimental** = animais que conviveram com os outros inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg. Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo, * $p < 0,05$ em relação ao controle; Teste “t” de Student e teste “U” de Mann-Whitney para a zona central na dose de 1 mg/kg.

ZONA PERIFÉRICA

Figura 50B - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, após administração aguda de diferentes doses de anfetamina, sobre a atividade locomotora de camundongos, avaliado na zona periférica do campo aberto

Controle = animais que conviveram com os outros injetados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg; **Experimental** = animais que conviveram com os outros inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg.

Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, * $-p < 0,05$ em relação ao controle; Teste "t" de Student e teste "U" de Mann-Whitney para a zona central na dose de 1 mg/kg.

A tabela 9 mostra e as figuras 51A e 51B ilustram os efeitos das duas doses de anfetamina após os animais terem convivido por 11 dias com outros portadores do tumor de Ehrlich, sobre o tempo gasto em movimento no interior do campo aberto. Analisando-se os dados podemos observar que nos animais tratados com 1,0 mg/kg de anfetamina apresentaram uma redução do tempo gasto em movimento na zona média e um aumento na zona periférica do aparelho. Ao analisar a dose de 2,0 mg/kg de anfetamina, não se observaram diferenças significantes entre os animais companheiros e aqueles do grupo controle.

Tabela 9 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o tempo gasto em movimento por camundongos avaliados no campo aberto após administração aguda de diferentes doses de anfetamina

Tempo gasto em cada zona (s)	Anfetamina			
	1 mg/kg		2 mg/kg	
	C	E	C	E
Zona Central	51,14± 30,1	37,62± 16,1	32,72 ± 5,9	38,41 ± 19,6
Zona Média	128,35 ± 39,32	96,45 ± 28,49*	96,79 ± 31,4	107,9 ± 30,7
Zona Periférica	120,5 ± 60,2	165,92 ± 37,9*	170,5 ± 32,0	154,8 ± 49,3

Os dados representam as médias ± desvio padrão em cm

* estatisticamente diferente do controle para $p<0,05$, N = 8 animais, teste “t” de Student para dados paramétricos e teste “U” de Mann-Whitney para dados não paramétricos.

Controle = animais que conviveram com os outros tratados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg.

Experimental = animais que conviveram com os outros inoculados com o tumor de Ehrlich e que foram inoculados com anfetamina na dose de 1 ou 2 mg/kg.

ZONA CENTRAL

Figura 51 A - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, após administração aguda de diferentes doses de anfetamina, sobre o tempo gasto em movimento por camundongos, avaliado na zona central do campo aberto

Controle = animais que conviveram com os outros injetados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg; Experimental = animais que conviveram com os outros inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg.

Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo, * – $p<0,05$ em relação ao controle; Teste “t” de Student e teste “U” de Mann-Whitney na zona central na dose de 1 mg/kg.

Figura 51 B - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, após administração aguda de diferentes doses de anfetamina, sobre o tempo gasto em movimento por camundongos, avaliado nas zonas média e periférica do campo aberto
Controle = animais que conviveram com os outros injetados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg; **Experimental** = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica.
 Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo, * $p < 0,05$ em relação ao controle; Teste “t” de Student e teste “U” de Mann-Whitney na zona central na dose de 1 mg/kg.

A tabela 10 mostra e as figuras 52A e 52B ilustram os efeitos das duas doses de anfetamina sobre o número de movimentos iniciados no interior do campo aberto por animais dos grupos controle e experimental. Observou-se que os animais do grupo experimental que receberam a dose de 1,0 mg/kg de anfetamina iniciaram menos movimentos na zona central e mais na zona periférica. Ao analisar a dose de 2,0 mg/kg de anfetamina, não se observaram

diferenças significantes entre os animais companheiros de portadores do tumor de Ehrlich e aqueles do grupo controle.

Tabela 10 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre o número de movimentos iniciados por camundongos avaliados no campo aberto após administração aguda de diferentes doses de anfetamina

NÚMERO DE MOVIMENTO	Anfetamina			
	1 mg/kg		2 mg/kg	
	C	E	C	E
Total	51,5 ± 11,7	55,1 ± 9,3	54,6 ± 8,6	54,6 ± 16,1
Zona Central	8,3 ± 4,3	5,5 ± 2,2*	4,2 ± 2,7	3,7 ± 2,1
Zona Média	57,7 ± 20,7	50,6 ± 15,2	20,6 ± 4,7	23,2 ± 6,8
Zona Periférica	16,1 ± 10,6	24,6 ± 10,6*	32,4 ± 6,7	31,6 ± 14,5

Os dados representam as médias ± desvio padrão em cm

* estatisticamente diferente do controle para $p < 0,05$, N = 8 animais, teste “t” de Student.

Controle = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg; Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich e que foram inoculados com anfetamina na dose de 1 ou 2 mg/kg.

TOTAL

Figura 52A - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, após administração aguda de diferentes doses de anfetamina, sobre o número de movimentos iniciados por camundongos, avaliada no total das zonas do campo aberto

Controle = animais que conviveram com os outros injetados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg; Experimental = animais que conviveram com os outros inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica e que foram inoculados com anfetamina na dose de 1 ou 2 mg/kg.

Os dados representam as médias ± desvio padrão de 8 animais por grupo; Teste “t” de Student.

Figura 52B - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, após administração aguda de diferentes doses de anfetamina, sobre o número de movimentos iniciados por camundongos, avaliada nas zonas central, média e periférica do campo aberto

Controle = animais que conviveram com os outros injetados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg ; Experimental = animais que conviveram com os outros inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica e que foram inoculados com anfetamina na dose de 1 ou 2 mg/kg.

Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo, *— $p < 0,05$ em relação ao controle; Teste “t” de Student.

A tabela 11 mostra e a figura 53A e 53B ilustram os efeitos das duas doses de anfetamina após os animais terem convivido por 11 dias com outros portadores do tumor de Ehrlich, sobre a velocidade média desenvolvida no interior do aparelho. Observou-se que os animais experimentais que receberam a dose de 1,0 mg/kg de anfetamina apresentaram um aumento na velocidade média nas zonas central e periférica. Ao analisar a dose de 2,0 mg/kg de anfetamina foi observado um aumento na velocidade média dos animais do grupo experimental em toda a arena e zonas central da mesma.

Tabela 11 - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, sobre a velocidade média de camundongos avaliados no campo aberto após administração aguda de diferentes doses de anfetamina

VELOCIDADE MÉDIA (cm/s)	Anfetamina			
	1 mg/kg		2 mg/kg	
	C	E	C	E
Total	7,0 ± 1,1	7,7 ± 1,2	8,8 ± 1,6	10,5 ± 2,4*
Zona Central	6,7 ± 1,7	8,4 ± 2,0*	7,2 ± 1,8	9,4 ± 2,8*
Zona Média	8,0 ± 9,6	9,6 ± 1,4*	9,5 ± 2,2	11,1 ± 2,8
Zona Periférica	6,8 ± 1,5	6,9 ± 1,3	9,7 ± 2,7	8,9 ± 1,9

Os dados representam as médias ± desvio padrão em cm

* estatisticamente diferente do controle para $p < 0,05$, N = 8 animais, teste “t” de Student.

Controle = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg.

Experimental = animais que conviveram com os animais inoculados com o tumor de Ehrlich e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg.

Figura 53A - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, após administração aguda de diferentes doses de anfetamina, sobre a velocidade média de camundongos, avaliada no total das zonas e nas zonas central e média do campo aberto
Controle = animais que conviveram com os outros injetados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg; **Experimental** = animais que conviveram com os outros inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica e que foram inoculados com anfetamina na dose de 1 ou 2 mg/kg. Os dados representam as médias±desvio padrão de 8 animais por grupo, - * $p < 0,05$ em relação ao controle; Teste “t” de Student.

ZONA PERIFÉRICA

Figura 53B - Efeitos da convivência por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich, após administração aguda de diferentes doses de anfetamina, sobre a velocidade média de camundongos, avaliada na zona periférica do campo aberto

Controle = animais que conviveram com os outros injetados com PBS e que foram inoculados com anfetamina nas doses de 1 ou 2 mg/kg. **Experimental** = animais que conviveram com os outros inoculados com o tumor de Ehrlich na forma ascítica e que foram inoculados com anfetamina na dose de 1 ou 2 mg/kg.

Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, .- * $-p < 0,05$ em relação ao controle; Teste "t" de Student.

5.10 EXPERIMENTO 10 – AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO, DO *BURST* OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS DE ANIMAIS QUE CONVIVERAM POR 11 DIAS COM OUTROS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH, APÓS RECEBERAM UMA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE DIAZEPAM

Foram utilizados 64 camundongos os quais foram separados em pares de acordo com o peso corporal em dois grupos iguais: um grupo controle (C) e um grupo experimental (E) conforme descrito em 4.1.1. No dia (0) do experimento um camundongo de cada par controle foi inoculado com PBS i.p. e um camundongo de cada par experimental foi inoculado com células do tumor de Ehrlich (5×10^6 céls/animal) i.p. No 11º dia os camundongos companheiros do grupo controle foram divididos em dois sub grupos: C₁ e C₂. O mesmo foi feito com os animais companheiros do grupo experimental (E) que foram divididos em E₁ e E₂.

Os animais dos grupos C₁ e E₁ foram tratados com solução de propilenoglicol a 40% (PPG 40%), enquanto que os do grupo C₂ e E₂ receberam 1 mg/kg de diazepam conforme descrito em 4.2.1. O sangue dos animais foi colhido 60 minutos após o tratamento para a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos que foram avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita em 4.6.3.a

Resultados

A administração de diazepam (1 mg/kg) em animais que conviveram por 11 dias com outros animais doentes diminuiu o *burst* oxidativo dos neutrófilos induzido pelo PMA e pela *S.aureus* ($F_{(3/28)} = 19,41$; $p < 0,001$ e ($F_{(3/28)} = 123,7$; $p < 0,001$ respectivamente). Com relação ao

burst oxidativo espontâneo, não foram verificadas diferenças entre os animais dos diferentes grupos. A tabela 12 mostra e as figuras 54-56 ilustram os resultados deste experimento.

Tabela 12 - Efeitos da administração de diazepam (1 mg/kg) sobre o *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos de animais conviveram por 11 dias com portadores de um tumor de Ehrlich

Condição	C ₁	E ₁	C ₂	E ₂
DCFH	7,9 ± 1,5	5,4 ± 2,2	7,2±1,2	5,6 ± 2,7
PMA	14,6 ± 2,7	7,9 ± 2,2***	15,4 ± 2,4	8,5 ± 3,4***
<i>Burst</i> induzido pela <i>S.aureus</i>	35,1 ± 8,3	6,4 ± 3,1***	49,8 ± 5,8	8,6±5,2***
% de fagocitose	85,6 ± 6,0	4,8 ± 4,9**	72,6 ± 20,9	1,0 ± 1,0***#
Intensidade de fagocitose	19,6 ± 2,9	10,8 ± 0,7***	14,0 ± 2,6	10,9 ± 0,8***

C₁ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram injetados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%)

E₁ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%).

C₂ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram injetados com diazepam (1mg/kg).

E₂ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com diazepam (1mg/kg).

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

#p<0,01 em relação às células do grupo controle

**p<0,01 em relação às células do grupo controle

***p<0,0001 em relação às células do grupo controle.

Figura 54 - Efeitos da administração de 1 mg/kg de diazepam sobre o *burst oxidativo* basal de neutrófilos de animais que conviveram por 11 dias com outros portadores do tumor de Ehrlich

C₁ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram injetados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%)

E₁ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%).

C₂ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram injetados com diazepam (1mg/kg).

E₂ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com diazepam (1mg/kg).

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

Figura 55 - Efeitos da dose 1 mg/kg de diazepam sobre o *burst oxidativo* de neutrófilos induzido por PMA, em animais que receberam após 11 dias, convivendo com outros portadores do tumor de Ehrlich.

C₁ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram inoculados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%)

E₁ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%).

C₂ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram inoculados com diazepam (1mg/kg).

E₂ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com diazepam (1mg/kg). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, *** $p < 0,001$ (ANOVA).

Figura 56 - Efeitos da administração de 1 mg/kg de diazepam sobre o *burst oxidativo* de neutrófilos induzido por *S. aureus* em animais que conviveram por 11 dias com outros portadores do tumor de Ehrlich

C₁ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram injetados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%);

E₁ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%).

C₂ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram injetados com diazepam (1mg/kg).

E₂ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com diazepam (1mg/kg).

Os dados representam a média ± desvio padrão de 8 animais por grupo, ***p<0,001(ANOVA).

A figura 57 mostra os citogramas de leucócitos circulantes de camundongos do grupo controle e do grupo experimental, sendo que ambos foram tratados agudamente com diazepam (1mg/kg), sua análise permite observar alteração na fagocitose, pois é possível verificar uma ausência de expansão na população de neutrófilos no grupo experimental, a qual indicar menor atividade fagocítica.

Figura 57 - Citograma de leucócitos circulantes de camundongos incubados com o *S.aureus* realizando fagocitose em animais que conviveram por 11 dias com os animais saudáveis ou doentes e que foram tratados agudamente com diazepam (1mg/kg)

As porcentagens de fagocitose e a intensidade de fagocitose de *S.aureus* são mostradas na Tabela 12 são ilustradas pelas figuras 58 e 59.

Observou-se que o tratamento agudo com diazepam (1mg/kg) foi capaz reduzir significativamente ($KW_{(3/28)} = 26,6$; $p < 0,01$) a porcentagem de fagocitose da *S.aureus* conjugada com PI nos animais dos dois grupos. Porém, o tratamento com diazepam em animais que conviveram com animais inoculados com tumor de Ehrlich produziu um efeito bem maior. Observou-se, também, uma diminuição significativa ($KW_{(3/28)} = 24,0$; $p < 0,001$) na intensidade de fagocitose das bactérias dos animais do grupo experimental em relação aos animais do grupo controle.

Figura 58 - Efeitos da administração de 1 mg/kg de diazepam sobre a porcentagem de fagocitose de neutrófilos de animais conviveram por 11 dias com outros portadores do tumor de Ehrlich
C₁ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram injetados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%)
E₁ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%).
C₂ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram injetados com diazepam (1mg/kg).
E₂ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com diazepam (1mg/kg).
Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, ** $p < 0,01$, # $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis).

Figura 59 - Efeitos da administração de 1 mg/kg de diazepam sobre a intensidade de fagocitose de neutrófilos de animais conviveram por 11 dias com outros portadores do tumor de Ehrlich
C₁ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram injetados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%)
E₁ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com o veículo do diazepam (solução de PPG 40%).
C₂ = animais que conviveram com os animais tratados com PBS e que foram injetados com diazepam (1mg/kg).
E₂ = animais que conviveram com os animais inoculados com células do tumor de Ehrlich e que foram inoculados com diazepam (1mg/kg).
 Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo, *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis).

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho confirmam dados obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (MORGULIS et al., 2004) e acrescentam novas informações. Especificamente, os resultados obtidos mostraram que a convivência por 11 dias com um animal portador do tumor de Ehrlich produziu em camundongos: 1) leucopenia; 2) diminuição do *burst* oxidativo induzido por PMA e por *S. aureus* e, também, da porcentagem e da intensidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos; 3) aumento do *burst* oxidativo, redução da porcentagem de fagocitose, mas não alterou a intensidade de fagocitose de macrófagos ativados pelo ONCO-BCG; 4) diminuição da resistência ao crescimento de um tumor de Ehrlich, isto é, aumento da concentração de células tumorais/ml de líquido ascítico e do número total de células tumorais; 5) redução do número de leucócitos circulantes em animais inoculados com o tumor de Ehrlich; 6) diminuição dos níveis hipotalâmicos de noradrenalina e aumento daqueles de dopamina e de MHPG; 7) aumento do “*turnover*” de noradrenalina no hipotálamo e de dopamina no córtex frontal; 8) aumento dos efeitos da anfetamina sobre alguns parâmetros da atividade locomotora dos animais observados no campo aberto; 9) potencializou os efeitos de um tratamento com diazepam reduzindo, ainda mais, o *burst* oxidativo induzido por PMA e por *S. aureus*, assim como os efeitos do fármaco sobre a porcentagem e a intensidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos. No entanto, esta convivência não modificou a média do número de eritrócitos, a porcentagem do hematócrito e o volume corpuscular médio, assim como a atividade de macrófagos peritoneais residentes e, não interferiu com os níveis de corticosterona sérica dos animais. Analisando-se estes resultados em seu conjunto depreende-se que a convivência por 11 dias com um animal portador de um tumor de Ehrlich produziu relevantes alterações no comportamento e em parâmetros

neuroquímicos e de atividade imune inata de camundongos. Estas alterações serão, pois, interpretadas e discutidas dentro de um contexto de neuroimunomodulação.

Como apontado por Dantzer, (2001) indivíduos doentes apresentam letargia, menor atividade exploratória e outros sinais indicativos de depressão do SNC. Estes sinais e sintomas não específicos têm sido chamados em seu conjunto de “comportamento doentio” (DANTZER, 2001). No presente experimento, todos os animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich apresentavam, em maior ou menor intensidade, sinais e sintomas indicativos de comportamento doentio. De fato, embora não mostrados e quantificados neste trabalho, constatou-se que os animais inoculados com células tumorais apresentavam alterações comportamentais progressivamente maiores e caracterizadas, entre outras, por diminuição da atividade na gaiola, alterações na pelagem e na respiração (dispnéia), aumento do volume abdominal e caquexia. Estas alterações concordam com aquelas quantificadas e relatadas por Morgulis et al. (2004) e sugerem que as companheiras destes animais (os sujeitos experimentais deste trabalho) tenham convivido exclusivamente e por 11 dias com conspecíficos doentes e que apresentavam comportamento doentio que, conforme já comentado, progrediu em intensidade com o passar do tempo pós-inoculação das células tumorais. Cabe, portanto uma pergunta: poderia esta situação experimental ser tomada como semelhante àquela vivenciada por *caregivers*?

Embora a resposta simplista a esta questão seja negativa em função da impossibilidade de se reproduzir em camundongos, toda a gama de envolvimento emocional e de sofrimento experimentados pelos *caregivers*, é inegável perceber que as alterações comportamentais e de imunidade observadas no presente trabalho assemelham-se, e muito, àquelas relatadas em pessoas que acompanham doentes crônicos. Assim, entre outros, Dore e Roman, (2001) relataram hiperatividade em *caregivers*. Esterling et al. (1996) mostraram alterações da função imune em pessoas que cuidavam de familiares doentes. Mills et al. (1999) relataram

alterações em linfócitos e em moléculas de adesão de *caregivers*. Dados como estes, sugerem a existência de um mecanismo que possa ser comum e subserviente aos sinais e sintomas apresentados por *caregivers* e, também, pelas camundongas companheiras dos animais doentes analisados neste trabalho. Desta forma, guardando os devidos cuidados com extrapolações, quer nos parecer – em um primeiro momento - que tanto a situação humana como aquela do presente trabalho tenham um pano de fundo comum: a presença de elevados e persistentes níveis de estresse.

De fato, conforme amplamente revisado neste trabalho (item 2.2) *caregivers* apresentam altos níveis de estresse, avaliado por meio de questionários ou pela análise de parâmetros fisiológicos como, por exemplo, dos níveis de cortisol na saliva (BAUER, 2000; NAVAIE-WALISER; SPRIGGS; FELDMAN, 2002). Morgulis et al. (2004) mostraram evidências que sugeriram a presença de ansiedade e/ou estresse induzido por uma situação experimental idêntica à que foi empregada neste trabalho. Há, pois, que interpretar os presentes resultados dentro de um cenário em que o estresse desempenha um papel de relevância e, quem sabe, fundamental. Neste contexto, é inegável e de amplo conhecimento que o estresse produz alterações comportamentais, neuroendócrinas e imunes.

Talvez seja necessário comentar que, no contexto do presente trabalho, estresse não é compreendido apenas como um estímulo ou como uma resposta, mas como um processo. De fato, Gatchell e Baum (1983) já descreveram o estresse como sendo “um processo complexo pelo qual um organismo reage a eventos internos ou externos ou a eventos psicológicos que representem um desafio ou um perigo a este organismo”. Neste sentido, as situações indutoras de estresse podem progredir dentro de uma linha contínua que vai dos estressores físicos, de um lado, às complicadas condições que envolvem o estresse psicológico, de outro. Há pouca discordância entre os autores no que se refere aos processos que envolvem estressores de natureza física. Assim, por exemplo, um choque elétrico de 1 mA aplicado na pata de um

camundongo tem grande probabilidade de ser interpretado como sendo estressor por vários autores. A contrapartida humana desta situação, poderia ser encontrada segundo Lazarus e Cohen, (1977) na vivência de um cataclisma, que afeta grande número de pessoas da mesma maneira. Por outro lado, quando os estímulos estressores se tornam mais complexos começam a aparecer discordâncias em sua compreensão. Este fato é consequência não apenas da complexidade da situação envolvida (luto, confronto social, etc) mas, também, da dificuldade de discernir toda a gama de respostas dos sujeitos envolvidos. Assim, os chamados estressores psicológicos podem ser mais efetivos para alguns indivíduos do que para outros, induzindo respostas também diferenciadas; isto é, nesta dimensão, as respostas ao estresse psicológico variam mais em sua qualidade e intensidade que aquelas aos estressores físicos. De qualquer forma, é inegável que o estresse psicológico produz alterações de homeostase quer em animais de laboratório, quer em seres humanos (CHARMANDARI et al, 2005; PARÉ; GLAVIN, 1993; VEDHARA et al., 1999). Em especial, as seguintes condições exemplificam estressores de natureza psicológica em animais de laboratório: medo condicionado e predictibilidade, conflitos, novidade, encontros agonísticos e comunicação emocional (PARÉ; GLAVIN, 1993).

Nos últimos anos, os efeitos de estressores de natureza psicológica têm sido muito analisados em animais de laboratório. Um dos métodos utilizados para este estudo, é a chamada “caixa de comunicação”. Este procedimento proposto inicialmente por Kawasaki et al. (1965) e por Fuchimoto et al. (1973) foi usado nos anos 80 para investigar os efeitos de um estresse psicológico sobre o desenvolvimento de úlceras gástricas. Tipicamente, o procedimento emprega camundongos e uma caixa de plástico transparente dividida em 48 pequenos compartimentos (10 x 10 centímetros). Um choque de 1mA é aplicado através de grades metálicas na pata dos animais; porém, este estímulo aversivo só é proporcionado aos animais que se encontram em compartimentos alternados. Em outras palavras, 24

camundongos recebem o choque e outros 24 apenas presenciam aplicação do estímulo aversivo, isto é, não recebem choque, mas recebem estimulações visuais, olfativas e auditivas dos animais que recebem o choque. Nesta condição, os animais estimulados aversivamente foram chamados de “*senders*” e aqueles que não recebem o choque de “*responders*”. O uso deste procedimento mostrou o aparecimento de um elevado número de úlceras gástricas não apenas nos “*senders*” mas também e, principalmente, nos “*responders*” (ICHIMARU et al., 1980; 1984; ICHIMARU; GOMITA, 1987). Em alguns casos, mostrou-se até mesmo que a incidência de úlceras gástricas era maior nos “*responders*” (FUKUSHIMA et al., 1981). Análises adicionais conduzidas com este modelo mostraram que o *turnover* de noradrenalina no SNC estava aumentado não apenas nos *seanders*, mas também nos *responders* confirmando a presença de estresse nestes animais (IIMORI et al., 1982). Neste sentido, fármacos ansiolíticos como os benzodiazepínicos mostraram-se capazes de reduzir a incidência de ulceração gástrica nos *responders* (ICHIMARU et al., 1984), assim como o fizeram medicamentos usados para o tratamento de úlceras gástricas, como a cimetidina (ICHIMARU e GOMITA, 1987)

Em nossos laboratórios Palermo-Neto et al. (2003) empregaram uma variante deste método, para avaliar os efeitos de estressores psicológicos sobre o comportamento e a função imune de camundongos. Camundongos adultos foram submetidos, uma vez por dia, e durante seis dias às seguintes condições: choque escapável (0,2 mA) nas patas (ES), choque inescapável (0,2 mA) nas patas (IS) e animais que não recebiam o choque (PS) mas que presenciavam a aplicação do estímulo aversivo aos animais do grupo IS. Os autores observaram que os animais dos grupos IS e PS apresentaram aumento nos níveis de ansiedade medida no campo aberto e no *pluz maze*, diminuição da resposta imune inata e diminuição da resistência ao crescimento de um tumor ascítico de Ehrlich. Observaram, ainda, que estes efeitos não apareciam nos animais do grupo ES. Em seu conjunto, os resultados por eles

obtidos, evidenciaram que tanto um estímulo aversivo de natureza física como outro de natureza psicológica alteraram e, ao mesmo tempo, os níveis de estresse, a atividade de células imunes inatas e o crescimento de um tumor ascítico de Ehrlich.

Estas duas situações experimentais mostram, em seu conjunto, que algum tipo de comunicação emocional (visual, olfativa ou auditiva) deve existir entre os animais. De fato, como interpretar alterações comportamentais e/ou de imunidade inata em animais que apenas presenciaram a aplicação de uma estimulação aversiva em conspecíficos? As respostas a esta questão têm sugerido que um estresse de natureza psicológica deva responder pelas alterações observadas. Em assim sendo, um estresse de natureza semelhante, poderia ser tomado como responsável pelos achados do presente trabalho? Isto é, pelas alterações de homeostase dos animais que conviveram com conspecíficos doentes? Tudo indica que sim.

Neste contexto, excetuando-se o experimento de Morgulis et al. (2004), desconhecemos modelo anterior de trabalho que tenha se preocupado em analisar as consequências comportamentais, neuroquímicas, neuroendócrinas e/ou imunológicas produzidas pela convivência com animais doentes. Na verdade, e na maior parte das vezes, os autores sequer se preocupam em separar os animais submetidos a manipulações experimentais uns dos outros; isto é, embora procurem separar fisicamente animais de um grupo controle de outro chamado experimental, não cuidam de separar os experimentais dentro do mesmo grupo. Neste sentido, e à luz do que se discute, a existência de variações individuais permite sugerir que um mesmo procedimento experimental não vá atuar de maneira igual em todos eles e, desta forma, não apenas o comprometimento do estado de saúde dos animais, mas também comunicações emocionais entre eles poderiam interferir com os resultados obtidos. Mais que isto, estímulos visuais, olfativos e/ou auditivos provenientes de animais de um grupo experimental poderiam, até mesmo, interferir com variáveis experimentais a serem mensuradas em animais do grupo controle, se estes forem mantidos próximos daqueles.

Dados obtidos por Morgulis et al. (2004) confirmam nossa hipótese e sugerem que a convivência com os animais doentes tenha mesmo produzido estresse psicológico. De fato, aqueles autores observaram alterações comportamentais medidas no *plus-maze* (aumento de entradas nos braços abertos do aparelho) indicativas de ansiedade /estresse em camundongas companheiras de outras portadoras do tumor de Ehrlich. Estes dados são reforçados por outros provenientes deste trabalho. Mostramos, aumento do *turnover* hipotalâmico de noradrenalina e diminuição dos níveis de noradrenalina nesta mesma região em camundongas companheiras. Estes dados são compatíveis com outros de literatura, e, em especial com aqueles de Iimori et al.(1982) e atestam a presença de estresse psicológico no contexto do presente experimento.

De fato, situações indutoras de estresse ativam sistemas noradrenérgicos centrais e produzem aumento do *turnover* de noradrenalina medido através da análise dos níveis deste neurotransmissor e de seu principal metabólito o MHPG no SNC (CHARNEY et al, 1985; GLAVIN et al, 1983; PARÉ; GLAVIN, 1993). Em particular, áreas da região límbica como o hipotálamo, a amígdala e o hipocampo apresentam aumentos rápidos e de significativa magnitude no *turnover* de noradrenalina em resposta a estressores como, por exemplo, contenção e choque nas patas (TANAKA et al, 1982) e comunicação emocional (IIMORI et al, 1982). Em animais de laboratório, mostrou-se que o estresse aumenta a atividade de células do *locus coeruleus* (PAVCOVICH et al, 1990; SIMSON; WEISS, 1988); neste sentido, mostrou-se que a exposição de um cão a um gato (estresse psicológico) produziu um aumento robusto e rápido da atividade nervosa medida no *locus coeruleus* do gato (LEVINE et al, 1990). De acordo com Abercrombie, Keller e Zigmond (1988) o incremento do *turnover* de noradrenalina induzido pelo estresse é consequência de um aumento na atividade da enzima tirosina hidroxilase. Neste contexto, a magnitude da depleção dos níveis de noradrenalina após um estímulo estressor já foi correlacionada inversamente com as

alterações por ele produzidas em animais de laboratório; isto é, quanto menores os níveis de noradrenalina maiores foram às respostas ao estímulo estressor (GLAVIN et al, 1991). Assim, os resultados do presente trabalho em relação à noradrenalina e MHPG são coerentes com aqueles de literatura e permitem inferir presença de estresse nas companheiras dos animais doentes do presente trabalho.

Nossos resultados relacionados aos níveis e *turnover* de serotonina no hipotálamo e no córtex frontal não apontaram diferenças entre animais controles e companheiros de doentes. Esta ausência de resultados não invalida a sugestão feita acima relacionada à presença de estresse psicológico em animais do grupo experimental. De fato mostrou-se que situações estressoras induzidas por barulho ou contenção foram incapazes de alterar a atividade de neurônios serotoninérgicos no SNC (WILKINSON; JACOBS, 1998). Idêntico fato foi observado em um gato após a exposição a um cão (WILKINSON; JACOBS, 1998). Neste sentido, diversos experimentos têm mostrado que estressores ambientais ou psicológicos não alteram de forma significativa a atividade de neurônios serotoninérgicos centrais, embora produzam ativação comportamental e aumento da atividade catecolaminérgica central e do SNAS (JACOBS, 1990; JACOBS; FORNAL, 1995).

Neste sentido, também tem sido proposto um papel relevante para a dopamina na mediação da resposta orgânica aos estressores (CHARMANDARI et al., 2005; LE MOAL, 1995; PARÉ; GLAVIN, 1993; ROTH et al., 1988). Parece que dos sistemas dopaminérgicos, o mesolímbico e o mesocortical são aqueles que são ativados preferencialmente na vigência de estressores moderados (CARLSON et al., 1987) enquanto que, uma ativação mais global de toda a atividade dopaminérgica central ocorre apenas quando de uma estimulação mais severa (ABERCROMBIE et al., 1989). De modo geral, relata-se que um estresse agudo produza um aumento do *turnover* de dopamina e uma redução de seus níveis no SNC (PARÉ; GLAVIN, 1993). Alguns autores mostraram, no entanto, que os efeitos do estresse sobre a

atividade dopaminérgica central dependem não apenas da intensidade do estresse, como comentado acima, mas também da duração da situação indutora de estresse (LE MOAL, 1995; LE MOAL; SIMON, 1991). Assim, por exemplo, a exposição de um organismo a um estresse prolongado produziu efeitos sobre o sistema dopaminérgico que foram diferentes daqueles relatados após um estresse agudo; de fato, mostrou-se que os níveis de dopamina podem se encontrar até mesmo aumentados após uma situação de estresse crônico (KVETNANSKI et al., 1977; ROTH et al., 1982). Baseado nestes últimos resultados tem sido hipotetizado que o estresse crônico produza um aumento compensatório na biosíntese de dopamina, de forma tal a permitir a manutenção da homeostase dopaminérgica na vigência do prolongamento desta situação. Em especial, mostrou-se que a ativação de neurônios dopaminérgicos do córtex pré-frontal - que é parte do sistema dopaminérgico mesocortical - está associada a uma tentativa orgânica de inibir a atividade dos circuitos neurais ligados ao estresse (DIORIO et al, 1993). Esta hipótese, se verdadeira, pode ser a explicação para o aumento de dopamina, encontrado no presente trabalho no córtex frontal das camundongas companheiras. Por outro lado, observou-se uma tendência de aumento no *turnover* de dopamina (embora de forma não significativa) nos animais do grupo experimental do presente trabalho.

De acordo com Gustafsson et al. (1987) os neurônios dopaminérgicos possuem receptores para a corticosterona. Assim, o aumento dos níveis de glicocorticóides na presença de estresse poderia levar o sistema neural, a se opor à ativação induzida por este estresse e, assim restaurar o balanço homeostático. Neste contexto, é importante lembrar que o sistema dopaminérgico tubero infundibular inibe a liberação de CRH e, conseqüentemente, de ACTH e de glicocorticóides (MOORE; LOOKINGLAND; 1995). Mostrou-se, neste sentido, que a presença de estresse crônico ou um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona produziram alterações marcantes na atividade tanto de neurônios dopaminérgicos tubero

infundibulares como do eixo HPA (MOORE; LOOKINGLAND; 1995). A presença de um estresse prolongado, como já discutido acima, aumentou os níveis de dopamina no córtex frontal (LE MOAL, M., 1995; ROOGE-PONT, 1993) sugerindo este fato, uma inibição parcial da liberação de dopamina, quem sabe induzida pelos glicocorticóides. Se verdadeira, uma adaptação como esta que foi proposta para o sistemas dopaminérgicos na presença de um estresse prolongado poderia explicar os dados do presente trabalho relativos aos níveis séricos de corticosterona.

Assim como Morgulis et al. (2004) não observamos no presente experimento alterações nos níveis séricos de corticosterona das camundongas que coabitaram com animais doentes em relação àquelas do grupo controle. Este resultado, aparentemente paradoxal, poderia ser entendido à luz dos fenômenos discutidos acima. De fato, a situação experimental agora analisada é dinâmica e, portanto, não pode ser compreendida de uma maneira estática como indicado pela simples análise dos níveis séricos do glicocorticóide; isto é, mostramos neste trabalho um retrato das alterações medidas 11 dias após a convivência com o conspecífico doente, e não a progressão destas alterações. Desta forma, quer nos parecer que neste momento de análise já deva existir uma tentativa bem sucedida de adaptação do organismo ao contexto estressor. Esta adaptação poderia ser pensada como decorrência de aumento de atividade dopaminérgica tubero infundibular induzida pelo estresse crônico. De fato, Charmandari et al. (2005) mostraram que o estresse crônico aumenta a atividade dopaminérgica, reduz a secreção de CRH, levando a uma redução de atividade do eixo HPA. Este fato, poderia ter acontecido no presente experimento. No entanto, uma vez que os níveis séricos de corticosterona não diferiram entre os animais do grupo experimental e aqueles do grupo controle, como compreender as relevantes alterações comportamentais ou imunológicas observadas no presente experimento?

O organismo dos seres humanos e dos animais reage ao estresse ativando um repertório complexo de respostas fisiológicas e comportamentais que, se inadequadas ou excessivas ou, ainda mantidas por tempo prolongado, podem afetar adversamente o próprio comportamento, e várias funções fisiológicas dentre as quais aquelas ligadas às respostas imune/inflamatórias. Assim, camundongos que não apresentavam o gene para a síntese de CRH mostraram uma dicotomia para os efeitos induzidos pelo estresse; nestes animais, os efeitos relacionados à atividade do eixo HPA estavam ausentes, enquanto que muitos daqueles ligados à esfera comportamental e/ou imunológica permaneceram inalterados (DUNN; SWIERGEL, 1998). Estes achados levaram estes autores a sugerir que a ativação do eixo HPA induzida pelo estresse embora crítica, não seria essencial para alguns efeitos do mesmo. Usando uma abordagem diferente, Palermo-Neto et al. (2003) chegaram a uma conclusão semelhante. No experimento que fizeram e já descrito acima, os animais que escapavam do choque (ES) e aqueles que presenciavam a aplicação do choque (PS) apresentavam idênticos níveis séricos de corticosterona; porém, apenas os últimos (PS) mostraram alterações comportamentais e/ou de imunidade inata. Assim, pensar que os efeitos comportamentais e/ou imunológicos observados no presente experimento, devam depender apenas dos níveis de corticosterona é atitude por demais simplista.

Recentes dados no campo de estudo da neuroimunomodulação têm sugerido que existem vários caminhos, que não a ativação do eixo HPA, pelos quais o estresse pode afetar o comportamento e a função imune. As alterações entre sistema nervoso e sistema imune são extensas e podem incluir vários hormônios, as catecolaminas, outras aminas, neuropeptídeos e opióides. Assim, por exemplo, já se descreveu serem os estresses induzidos pela inalação de éter (VELLUCCI et al, 1977) pelo frio (RITTER; PELZER, 1978) e por imobilização (NAKAGAWA et al., 1981) capazes de ativar sistemas de neurotransmissão catecolaminérgica no SNC (IIMORE et al., 1982). O estresse psicológico induzido em uma

caixa de comunicação foi capaz de aumentar o *turnover* de noradrenalina no hipotálamo de maneira semelhante àquela descrita neste trabalho para os animais do grupo experimental. Neste sentido e, como comentado acima, o estresse ativa o *locus coeruleus* e a ativação deste núcleo é acompanhada por um aumento de atividade do SNAS. Esta ativação simpática responde por grande parte das modificações autonômicas periféricas induzidas pelo estresse como, por exemplo, aquelas detectadas no sistema cardiovascular e respiratório. Estas mudanças quando empreendidas de modo correto são importantes para o planejamento e execução de adaptações que podem ser relevantes para a sobrevivência dos organismos (SVENSSON, 1987). Neste sentido, sabe-se que algumas fibras do SNAS terminam em íntima conexão com órgãos e células do sistema imune (MADDEN; FELTEN, 1995). Já se descreveu uma supressão da proliferação de linfócitos sanguíneos independente da atividade do eixo HPA, tendo sido ela atribuída a ações desencadeadas pelos sistemas catecolaminérgicos centrais e periféricos (KELLER et al., 1988). Desta forma, embora não se possa descartar a participação de outros hormônios, peptídeos e/ou neurotransmissores nos presentes resultados comportamentais e imunológicos, quer nos parecer seja possível interpreta-los à luz de alterações induzidas pela condição experimental empregada neste trabalho nos níveis de catecolaminas no SNC e/ou na atividade do SNAS das camundongas companheiras.

Trabalho anterior realizado em nossos laboratórios analisou o comportamento de camundongas que coabitaram com conspecíficas portadoras do tumor de Ehrlich em duas situações experimentais usualmente empregadas para inferir níveis de ansiedade: campo aberto e labirinto em cruz elevado. No contexto daquela discussão definiu-se ansiedade como sugerido por (PELLOW et al., 1985), isto é, como uma resposta a uma situação na qual o comportamento é influenciado por duas forças motivacionais opostas: a curiosidade natural para explorar um ambiente novo x uma aversão por áreas abertas. Aumentos no número de

entradas ou no tempo gasto por roedores na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado indicam, comumente, a presença de níveis reduzidos de ansiedade nos animais (LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985). Os resultados observados naquela ocasião, como já comentado, mostraram que os animais do grupo experimental apresentaram um aumento do número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado sugerindo uma diminuição dos níveis e ansiedade dos mesmos. No entanto, Morgulis et al. (2004) analisando mais detalhadamente as diferenças encontradas entre os animais do grupo controle e experimental no (1) tempo gasto na exploração dos braços abertos e no conjunto de dados registrados nos braços fechados do labirinto em cruz elevado e, (2) na locomoção nas zonas centrais e tigmotáticas do campo aberto propuseram, ainda, uma outra interpretação aos dados comportamentais que registraram. Especificamente, sugeriram que a condição de convivência com o doente tenha aumentado a atividade locomotora dos animais nos aparelhos e não apenas os níveis de ansiedade dos mesmos. Para os autores, o aumento de atividade locomotora dos animais do grupo experimental poderia, até mesmo, estar mascarando alterações adicionais dos animais no *pluz maze*.

Conforme comentado acima, o estresse prolongado induzido pela convivência com um animal doente produziu um aumento da atividade noradrenérgica e aumentou os níveis de dopamina no SNC. Um aumento de atividade elétrica no *locus coeruleus* já foi também apontado como decorrência do estresse (PAVCOVICH et al, 1990; SIMSON; WEISS, 1988) que, também, interfere com a atividade de sistemas dopaminérgicos (CHARMANDARI et al., 2005; LE MOAL, 1995; PARÉ; GLAVIN, 1993; ROTH et al., 1988). Neste contexto, mostrou-se que a ativação de fibras noradrenérgicas do *locus coeruleus* está relacionada a um aumento de atividade locomotora em animais de laboratório (LE MOAL, 1995) e, também que os sistemas dopaminérgicos têm íntima relação com a função motora e, portanto, com a locomoção (DIORIO et al, 1993). Assim, parece mesmo possível que a convivência com um

animal doente tenha criado um padrão de alterações no SNC das camundongas que resultou em um aumento da atividade catecolaminérgica central e, conseqüentemente de sua atividade locomotora. Os dados do presente trabalho reforçam está premissa. De fato, mostramos não apenas dados neuroquímicos compatíveis com uma ativação catecolaminérgica, mas também outros que apontam ser a administração de anfetamina (1 e 2 mg/kg) capaz de produzir efeitos mais intensos nos animais do grupo experimental, isto é, naqueles que conviveram com conspecíficos portadores do tumor de Ehrlich.

A anfetamina é um fármaco que têm diferentes ações no SNC. Sua administração em animais de laboratório aumenta a atividade locomotora e produz comportamento estereotipado, dependendo estes efeitos de sua concentração no organismo dos animais. De modo geral, pode-se dizer que atua liberando catecolaminas, inibindo sua metabolização e, até mesmo, atuando em receptores pós-sinápticos (COSTA; FRUSSA-FILHO; FELICIO, 2001). Não é, pois de se espantar que a anfetamina tenha, no presente trabalho, aumentado a atividade dos animais no campo aberto de forma dose dependente. Sugeriu-se, neste sentido, que a anfetamina aumenta a atividade locomotora dos roedores por liberar dopamina em neurônios dopaminérgicos mesolímbicos (MOORE; BLOOM, 1978). De fato, a interrupção da transmissão dopaminérgica por inibição da síntese de dopamina, por bloqueio dos receptores dopaminérgicos ou por destruição dos nervos dopaminérgicos através do uso de 6-hidroxi-dopamina antagonizou os efeitos da anfetamina sobre a função locomotora. De importância, observamos no presente trabalho que os efeitos da dose de 2 mg/kg de anfetamina foram mais intensos nos animais experimentais; de igual forma, esta dose aumentou a atividade dos animais na zona central do campo aberto. A dose de 1 mg/kg de anfetamina, por sua vez, aumentou a atividade locomotora dos animais na zona periférica do campo aberto.

Por certo, poder-se-ia tentar analisar os presentes dados após o uso de anfetamina, no contexto daqueles ligados à expressão de ansiedade no campo aberto. No entanto, quer nos parecer que tal não possa ser feito visto que os efeitos estimulantes da anfetamina mascarariam ou confundiriam outros desencadeados pelo fármaco na esfera emocional. De fato, Dawson et al. (1995) já haviam sugerido que os efeitos da anfetamina sobre o comportamento de roedores no campo aberto deveriam ser interpretados mais como sendo decorrência de alterações de atividade locomotora do que dos níveis de ansiedade dos animais. Em assim sendo, os presentes resultados com anfetamina, em seu conjunto, ao mostrar maior sensibilidade dos animais do grupo experimental a este fármaco, apontam também para a existência de um aumento de atividade catecolaminérgica central em animais que conviveram com portadores do tumor de Ehrlich.

Um aumento da atividade catecolaminérgica central e, em especial, daquela medida no *locus coeruleus* já foi associada a alterações de atividade do SNAS (LEVINE et al., 1990). Assim, uma vez que existe uma íntima relação entre a atividade do SNAS e aquela da função imune é de se esperar que a convivência com animais portadores do tumor de Ehrlich tenha produzido, modificações na esfera imune dos animais companheiros. Esta constatação, observada primeiro por Morgulis et al. (2004) e agora verticalizada neste experimento, é discutida a seguir.

Desde a comunicação pioneira de Ader e Cohen (1975), tem havido um aumento do número de trabalhos científicos que analisam as relações entre estresse, funções neuroendócrinas e imunes. Uma recente análise dos efeitos de estressores sobre a função imune mostraram que esta condição está associada com (1) leucocitose, (2) reduções no número absoluto de células NK e no número relativo de células T, (3) aumentos marginais nas relações CD4/CD8, e (4) aumentos na função de células T e NK (ZORILLA et al., 2001). Outras observações mostraram que: (1) um estresse produzido pela exposição de animais a

altos níveis de ruído suprimiu as respostas mediadas por células T e B em ratos (SOBRIAN et al., 1997); (2) um choque na cauda diminuiu a intensidade de respostas anafiláticas em ratos (MARIC, 1991); (3) um choque inescapável aumentou o número de células no lavado broncoalveolar de ratos OVA-sensibilizados (PORTELA et al., 2001) e, (4) diminuiu a atividade de macrófagos peritoneais de camundongos (PALERMO-NETO et al., 2003). Em coerência com estes achados observamos no presente trabalho que a convivência com animais doentes produziu alteração no número de leucócitos circulantes e uma redução da atividade tanto de macrófagos peritoneais ativados por ONCO-BCG como de neutrófilos sanguíneos.

Os presentes resultados de leucopenia embora relevantes e concordes com os relatados por Morgulis et al. (2004) discordam daqueles da literatura que apontam leucocitose em resposta a situações estressoras e estimulação por catecolaminas (DHABHAR et al., 1995; SHAKHAR; BEM-ELIYAHU, 1998). Neste sentido, observou-se que a administração aguda de catecolaminas resultou em um aumento da saída de linfócitos dos linfonodos (MOORE, 1984), e do baço (ERNSTROM; SANDBERG, 1973). Mostrou-se, ainda, que a administração de catecolaminas estimula a saída de células NK do baço para a circulação (MURRAY, 1993). Estes trabalhos têm sugerido que as catecolaminas inibam a estadia e a acumulação de linfócitos no fígado e nos linfonodos. Neste contexto, Carlsson et al. (1997) mostraram que a pré-estimulação *in vitro* de células T com catecolaminas - que dessensibilizam os receptores β -adrenérgicos - resultou em um aumento da migração destas células para o baço e para os linfonodos após sua infusão intra venosa nos animais. Madden et al. (1994) também mostraram um aumento da migração de linfócitos pré-incubados com catecolaminas para os linfonodos em camundongos depletados de catecolaminas. Conversamente, mostrou-se que linfócitos de camundongos simpatectomizados - que não são capazes de apresentar *upregulation* de receptores β -adrenérgicos - deixam de migrar para os linfonodos após contato com catecolaminas. Em conjunto, estes resultados sugerem que a migração de

linfócitos entre os compartimentos orgânicos dependa, de alguma forma, da presença de receptores β -adrenérgicos e, principalmente, do número e da atividade destes receptores. Mais que isto, Carlsson (2001) observando que os efeitos de catecolaminas sobre o tráfico de leucócitos dependiam do subtipo de células analisadas, sugeriu que este fato deveria ser mais bem analisado. Assim, quer nos parecer que a discordância dos presentes resultados daqueles da literatura dependa, não apenas do tipo e da duração do estresse empregado, mas também do tipo de células analisadas. No presente trabalho, não se fez uma análise do sub tipo de células envolvidas com a leucocitose. No entanto, vale ressaltar que a convivência com o animal doente não modificou o hematócrito, o número de eritrócitos e o VCM, fatos que apontam para uma ação específica da situação experimental sobre os leucócitos.

Tanto o *burst* oxidativo induzido por PMA e por *Staphylococcus aureus* como a porcentagem e a intensidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos foram menores nos animais companheiros de animais doentes. Por outro lado, nenhuma alteração foi encontrada no *burst* espontâneo dos macrófagos dos animais experimentais, indicando este achado que o efeito da situação experimental só tenha se manifestado na vigência de uma estimulação destas células imunes. Uma vez que os níveis de corticosterona não diferiram entre os animais do grupo controle e experimental quer nos parecer que não se possa envolver o eixo HPA com os efeitos agora observados. Resta, portanto e, seguindo a linha de raciocínio do presente trabalho, discuti-los à luz de alterações agora relatadas na atividade catecolaminérgica.

Conforme já comentado os leucócitos possuem em sua superfície diferentes subtipos de adrenoceptores cuja expressão parece ser alterada pelo estado de ativação imunológica (CAZAUX et al., 1995). Aparentemente todos os leucócitos expressam receptores β -adrenérgicos em sua superfície com exceção dos clones Th2 (ELENKOV et al., 2000; MADDEN, 2003). A quantidade de receptores β presentes na superfície das células parece variar conforme o desenvolvimento do sistema imunológico e o grau de maturação das

mesmas; assim, por exemplo, os timócitos parecem ter menor número de β -adrenoceptores que os linfócitos T maduros. A presença de receptores α -adrenérgicos em leucócitos não é facilmente detectada em condições normais. Alguns autores sugerem seja sua expressão observada apenas em células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) de certos compartimentos (espaço peritoneal) ou, ainda, na presença de certas condições patológicas (ELLENKOV et al., 2000). Spengler et al., (1990), neste sentido, mostraram que macrófagos eliciados por LPS possuem receptores α -2-adrenérgicos em sua superfície.

As catecolaminas produzem vários efeitos imunomoduladores que podem ser tanto imunoestimulantes como supressores (ELLENKOV et al, 2000; MADDEN, 2003). A maioria dos trabalhos centram-se nos efeitos dos linfócitos e indicam que as catecolaminas exercem importante papel nas respostas Th1 e Th2. A estimulação de células β leva a uma predominância das respostas Th2 com aumento da produção de anticorpos e de IL-4, o que se faz através de um aumento da expressão de moléculas acessórias provenientes das células B (KASPROWICZ et al., 2000). Por outro lado, quando as células T crescem em condições promotoras de padrão Th1, o tratamento com β agonistas leva a um aumento da liberação de IFN- γ e de IL-12 (SWANSON et al., 2001). De modo geral, a maioria dos trabalhos indica que as catecolaminas promovam uma diminuição de citocinas Th1 e um aumento de citocinas Th2. Assim, é possível sugerir que os efeitos da condição experimental sobre o *burst* oxidativo induzido por PMA e por *S. aureus* observados neste trabalho, sejam consequência de alterações nos padrões de citocinas produzidas e/ou liberadas pelas células, na presença de um cenário em que predomina uma ativação catecolaminérgica. De fato, é de amplo conhecimento que as citocinas desempenham um papel relevante na produção de espécies reativas de oxigênio (STITES; TERR, 1991; LEHN et al., 1989). Reforça esta hipótese, a constatação de que os efeitos da situação experimental usada no presente trabalho só se manifestaram sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos ativados.

A fagocitose é um fenômeno complexo que se inicia pela ligação da partícula a ser fagocitada a receptores específicos presentes na superfície da célula imune. Existem vários receptores fagocíticos; dentre eles citamos o Fc γ R (receptores para a porção Fc da IgG ligada a partícula), receptores CR (receptores para alguns componentes do sistema complemento depositado em algumas superfícies das partículas), receptores lectina e receptores *scavenger*. A internalização da partícula é resultado de muitas vias de sinalização que, em seu conjunto, coordenam o rearranjo do citoesqueleto da célula imune e, portanto o englobamento desta. A fagocitose é, pois, um processo ativo induzido entre outros por produtos bacterianos ou tumorais, um processo em que as citocinas desempenham um papel importante (FIDLER, 1985; KELLER et al., 1990). Assim, por exemplo, mostrou-se que a fagocitose pode ser modulada *in vitro* e *in vivo* por citocinas, para diferentes estados de ativação funcional (LEHN et al., 1989; NATAN et al., 1971). Assim, os presentes achados experimentais ligados à fagocitose de neutrófilos sanguíneos podem, também, ter como explicação alterações induzidas pela convivência com o doente nos padrões de citocinas produzidas e/ou secretadas após o estímulo induzido pela bactéria fagocitada (*S. aureus*).

Dados de fagocitose de neutrófilos obtidos neste experimento após o uso do diazepam reforçam as sugestões, feitas acima. Observamos que os efeitos da convivência com o animal doente sobre a fagocitose de neutrófilos foram potenciados pelo tratamento com o diazepam. Neste sentido, diversos trabalhos de nosso grupo têm mostrado que o diazepam - ativando receptores benzodiazepínicos periféricos (PBR) presentes tanto nas glândulas adrenais como em neutrófilos - modifica o padrão de produção/secreção de citocinas e, portanto a fagocitose (MASSOCO, 2003; SILVA, 2003). Curiosamente, a interação entre o estresse de convivência com doente e o tratamento com diazepam ocorreu no presente trabalho em sentido oposto para o *burst* oxidativo induzido pelo PMA e pelo *S.aureus*. Já se descreveu a existência de uma estreita relação entre a ativação de PBR e a modulação da atividade de neutrófilos, em

especial, da produção de citocinas e de H_2O_2 (ZAVALLA et al., 1990). Em nossos laboratórios, mostrou-se que o diazepam (MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999; RIGHI et al., 1999; UGAZ et al., 1999) e o midazolan (MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003) aumentam o *burst* oxidativo de neutrófilos. Este aumento de “*burst*” não foi observado no presente experimento após o uso do diazepam, o que sugere um antagonismo ou impedimento induzido pela situação experimental usada neste trabalho. Ressalte-se, neste momento, que o *burst* oxidativo e a fagocitose são eventos diferentes, modulados de forma similar porem não idêntica por diferentes citocinas, e que não guardam necessariamente relações de causalidade. Em outras palavras, nem todas as situações experimentais ou fármacos que aumentam o *burst*, aumentam de igual forma a fagocitose.

Da mesma forma que interferiu com a atividade de neutrófilos circulantes, a convivência com o animal doente também mudou a atividade de macrófagos peritoneais. Dado relevante foi à observação de que os efeitos da situação experimental sobre os macrófagos só apareceram após a ativação com ONCO-BCG. De fato, a situação experimental não interferiu com o *burst* oxidativo e com a fagocitose dos macrófagos residentes, mas aumentou o *burst* oxidativo, diminuiu a porcentagem de fagocitose destes macrófagos ativados e não interferiu com a intensidade da fagocitose dos mesmos. Spengler et al. (1990) mostraram que macrófagos eliciados com LPS apresentam maior expressão de receptores α_2 adrenérgicos em sua superfície. Embora não se tenha feito neste trabalho estudos nesta direção, quer nos parecer seja possível inferir, mais uma vez o envolvimento dos receptores catecolaminérgicos (α_2 ou β) de superfície de macrófagos com os efeitos agora relatados nos animais do grupo experimental após a administração do ONCO-BCG. De fato, o ONCO-BCG ativa os macrófagos, entre outros, via produção de citocinas (COSTA-ROSA et al., 1994; EZECOWITZ et al., 1981); citocinas, como já comentado, regulam a expressão de receptores adrenérgicos na superfície de linfócitos (RADOJSIC et al., 1991); catecolaminas

estimulam receptores adrenérgicos em células imunes (ELENKOV et al., 2000); situações estressantes como aquelas do presente experimento produzem ativação de sistemas catecolaminérgicos centrais e do SNAS (NAKAGAWA et al., 1981; RITTER; PELZER, 1978; VELLUCCI et al, 1977).

Alterações da função imune são consideradas mais relevantes quando resultam em alterações patológicas, microbiológicas e/ou clínicas significantes. Células do tumor de Ehrlich eliciam uma forte resposta imune no hospedeiro (PESSINA et al., 1980; SEGURA et al., 1997) um fato que, junto com outras propriedades, tem feito deste tumor um interessante modelo para a análise dos efeitos de fármacos e/ou de eventos comportamentais sobre o crescimento tumoral. Uma resposta imune efetiva contra tumores requer a cooperação entre macrófagos e linfócitos T e B. Assim, a supressão de um ou mais destes componentes pode comprometer a imunocompetência alterando o crescimento tumoral. Observamos, neste trabalho, que a convivência com animais doentes diminuiu a resistência das camundongas ao desenvolvimento do tumor de Ehrlich. Especificamente, aumentou o número total de células tumorais presentes no líquido ascítico e a concentração de células tumorais neste líquido ascítico; porém, não modificou o volume de líquido ascítico. Este último achado sugere que a situação experimental não tenha modificado a permeabilidade vascular dos animais do grupo experimental.

Sakai, (2004) analisando as ações do diazepam, sugeriu uma relação entre os efeitos do fármaco no crescimento tumoral e aqueles por ele induzidos nas atividades de macrófagos. Palermo-Neto et al. (2003) empregam idêntico raciocínio para explicar os efeitos de um estresse inescapável (IS) e de outro de natureza psicológica (PS) sobre o crescimento deste tumor em camundongos. Quer nos parecer, pois, à luz de tudo que já comentamos que a convivência com o animal doente por representar uma situação de estresse psicológico prolongado e por ter modificado a atividade de células imunes inatas (em especial de

macrófagos) propiciou um aumento do crescimento tumoral. De fato, a atividade de macrófagos tem sido estudada em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Fecchio et al, (1990b) demonstraram ser esta variável um importante parâmetro a ser avaliado no estudo dos mecanismos ligados às interações entre o sistema imune e este tumor. Fármacos como os antagonistas de PAFF foram capazes de inibir o crescimento tumoral e, também, de aumentar a atividade de macrófagos estimulados por este tumor (FECCHIO et al., 1990a).

Finalmente, cabe comentar que ainda observamos neste trabalho um aumento do número de leucócitos circulantes em todos os animais em que este parâmetro foi analisado após a inoculação do tumor. No entanto, este aumento indicativo do quadro inflamatório peritoneal induzido pelo tumor, não ocorreu de forma idêntica nos animais dos dois grupos (companheiros de sadios e companheiros de doentes). Observamos, que a magnitude do aumento foi aproximadamente 30 % menor nos animais que conviveram com o doente, (redução esta, que foi significativa); este fato mostra, mais uma vez, que esta situação experimental interfere com o tráfico de células imunes pelos compartimentos orgânicos. Pode-se, até mesmo, pensar que as diferenças ligadas a esta migração possam ter interferido com a celularidade da cavidade peritoneal após o estímulo inflamatório das células tumorais ali inoculadas contribuindo este fato para o maior crescimento tumoral. De fato, já se observou redução dos níveis de L-selectina, uma molécula de adesão - em situações de estresse prolongado (MILLS et al., 1999).

Em seu conjunto, os presentes resultados mostram de forma inequívoca que a convivência com animais portadores de um tumor de Ehrlich produz alterações comportamentais, neuroquímicas e imunológicas. Neste contexto, é impossível deixar de compreendê-las como aquelas que acompanham *caregivers*. Em particular, visando uma comparação com os dados agora discutidos para camundongas, mostrou-se em seres humanos que: (1) a perda de um doente altera a atividade de células NK de IFN- γ e de rIL-2

(STERLING et al., 1996); (2) *caregivers* têm menores níveis de linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ (MILLS et al., 1999); (3) cônjuges de pacientes portadores de Alzheimer apresentam diminuição na proliferação de linfócitos induzida por mitógenos, assim como da produção de IL-2 (BAUER et al., 2000); (4) *caregivers* têm elevados níveis de estresse (DORE; ROMAN, 1991); (5) o estresse psicológico está associado a maiores níveis de catecolaminas na circulação (MCKINNON et al., 1989); (6) *caregivers* têm diminuição do número e da atividade de receptores β -adrenérgicos em linfócitos (REDWINE et al., 2004); e, entre tantos outros, (7) catecolaminas têm papel relevante na redistribuição de leucócitos durante o estresse (ENGLER et al., 2004).

Como se podem depreender estes relatos provenientes de *caregivers* são muito semelhantes àqueles descritos e discutidos neste trabalho em camundongas que conviveram com conspecíficas portadoras de um tumor. Esta semelhança de resultados permite sugerir, tomados os devidos cuidados com extrapolações, seja o modelo experimental agora usado de alguma utilidade para a compreensão da situação humana. Em assim sendo, futuros experimentos serão realizados na tentativa de melhor compreender os mecanismos subjacentes aos resultados agora encontrados nos animais do grupo experimental. Em especial, quer nos parecer seja de grande valia abordar nessas companheiras, os sub-tipos celulares envolvidos e, em especial, a atividade dos adrenoceptores presentes na superfície de neutrófilos e macrófagos, o tráfico de células pelos compartimentos orgânicos e os efeitos farmacológicos de substâncias que modificam os níveis séricos de corticosterona, principalmente daquelas que atuam – como agonistas ou antagonistas - de adrenoceptores. Finalmente, dentre tantas alternativas de abordagem levantadas no presente trabalho, parece-nos também importante analisar a evolução temporal de algumas alterações agora relatadas e, um possível efeito da condição experimental aqui empregada sobre as moléculas de adesão como, por exemplo, de L-selectina.

Parodiando o cancionero popular latinoamericano, a presente situação remete ao que se canta em Cuba segundo relatado, em outro contexto, por Nelson Vaz. O que observamos neste trabalho e o que ocorre em *caregivers* :“No és el mismo, pero és igual”.

7 CONCLUSÕES

Conclui-se a partir dos resultados obtidos que a convivência com animais doentes:

- Produziu leucopenia e não modificou a média do número de eritrócitos, a porcentagem dos valores do hematócrito e o volume corpuscular médio;
- Reduziu o *burst* oxidativo induzido por PMA e por *S. aureus*, assim como a porcentagem e a intensidade de fagocitose em neutrófilos sanguíneos e não modificou o *burst* oxidativo espontâneo destas células;
- Aumentou o *burst* oxidativo induzido por PMA e por *S. aureus*, e reduziu a porcentagem, mas não alterou a intensidade de fagocitose em macrófagos ativados por onco-BCG e não modificou aquele de macrófagos residentes não ativados;
- Não alterou os níveis séricos de corticosterona;
- Diminuiu os níveis de noradrenalina e aumentou o *turnover* de noradrenalina no hipotálamo; aumentou os níveis de dopamina no hipotálamo e no córtex frontal e não alterou quer os níveis quer o *turnover* de serotonina no córtex frontal e no hipotálamo.
- Diminuiu a resistência ao desenvolvimento de um tumor ascítico de Ehrlich, avaliado através do aumento da concentração de células tumorais/ml de líquido ascítico e do número de células tumorais totais e não modificou o volume de líquido ascítico.

- Reduziu em 30% a leucocitose induzida pela inoculação de um tumor ascítico de Ehrlich e não modificou os demais parâmetros do hemograma.
- Potenciou os efeitos de um tratamento com diazepam reduzindo, ainda mais, o *burst* oxidativo induzido por PMA e por *Staphylococcus aureus*, assim como os efeitos do fármaco sobre a porcentagem e a intensidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos;
- Produziu um aumento dose-dependente dos efeitos da anfetamina sobre alguns parâmetros da atividade locomotora dos animais medida no campo aberto.

Em seu conjunto, os presentes resultados mostram que a convivência com animais portadores de um tumor ascítico de Ehrlich produziu alterações comportamentais, neuroquímicas e imunológicas, que guardam grande similaridade com os sinais e sintomas relatados em *caregivers*. As alterações por nós observadas foram interpretadas como decorrentes de uma situação de estresse psicológico prolongado, vivenciado pelas camundongas companheiras de conspecíficas portadoras do tumor. Mais especificamente, postulou-se neste trabalho sejam as alterações observadas decorrentes de um aumento de atividade catecolaminérgica no SNC e/ou de ativação do SNAS. A semelhança dos resultados obtidos em companheiras de animais doentes com aqueles de *caregivers* permitiu sugerir, tomados os devidos cuidados com extrapolações, seja o modelo experimental agora usado de alguma utilidade para a compreensão da situação vivenciada por estes *caregivers*.

REFERÊNCIAS

ABE, Y.; SEKIYA, S.; YAMASITA, T.; SENDO, F. Vascular hyperpermeability induced by tumor necrosis factor and its augmentation by IL-1 and IFN-gamma is inhibited by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. **Journal of Immunology**, v. 145, p. 2902-2907, 1990.

ABERCROMBIE, E. D., KELLER, R.W., ZIGMOND, M.J. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. **Neuroscience**, v. 27, 897-904, 1988.

ABERCROMBIE, E. D., KEEFE, A., DIFRISHCHIA, D.; ZIGMOND, M.J. Differential effects of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. **Journal of Neurochemistry** v. 52, p. 1655-1658, 1989.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophages activation. **Annual Review of Immunology**, v.2, p.283-318, 1984.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. IN: LEWIS, C. E.; MCGEE, J.O.D. **In the natural immune system: The macrophage**. Oxford: IRL Press, 1992. p.75-105.

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression. **Psychosomatic Medicine**, v. 215, p. 1534-1536, 1982.

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

AKAIKE, T.; SUGA, M.; MAEDA, H. Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 217, p. 64-73, 1998.

ALLEN, R. C. Biochemiexcitation: chemiluminescence and study of biological oxygenation reactions. In: ADAM, W.; CILENTO, G. (Eds.) **Chemical and biological generation of excited states** New York: Academic Press, 1982, p. 309.

ALLEN, S. M.; GOLDSCHIEDER, F.; CIAMBRONE, D. A. Gender roles, marital intimacy, and nomination of spouse as primary caregiver. **Gerontologist**, v. 39, p. 150-158, 1999.

ANDERSEN, B. L.; FARRAR, W. B.; GOLDEN-KREUTZ, D. M.; GLASER, R.; EMERY, C. F.; CRESPI, T. R.; SHAPIRO, C. L.; CARSON, W. E., 3RD. Psychological, behavioral, and immune changes after a psychological intervention: a clinical trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, p. 3570-3580, 2004.

ARISTÓTELES. **Organon**. Tradução e notas: Pinharando Gomes. Lisboa: Guimarães, 1985.v.1.

ASCHOFF, L. Das reticulo-endotheliale system. **Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkund**, v. 26, p. 1-118, 1924.

AUBERT, A.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Differential effect of lipopolysaccharide on food hoarding behavior and food consumption in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 11, p. 229-238, 1997.

AUGER, M. J.; ROSS, F. M.; MACKIE, M. J. 8;21 translocation with duplication of the der(21) in a patient with myelomonocytic leukemia. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 51, p. 139-141, 1991.

BADWEY, J. A.; TAUBER, A. I.; KARNOVSKY, M. L. Properties of NADH-cytochrome-b5 reductase from human neutrophils. **Blood**, v. 62, p. 152-157, 1983.

BAINTON, D. F. In "**Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**". In: GALIN, I. M. ;GOLDSTEIN., R.; SNYDERMAN (Eds.). New York: Raven Press, 1988. p. 265-280.

BASHIR, M. E.; LOUIE, S.; SHI, H. N.; NAGLER-ANDERSON, C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 6978-6987, 2004.

BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, p. 69-77, 2003.

BAUER, M. E.; VEDHARA, K.; PERKS, P.; WILCOCK, G. K.; LIGHTMAN, S. L.; SHANKS, N. Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. **Journal of Neuroimmunology**, v. 103, p. 84-92, 2000.

BEATTY, P. G.; OCHS, H. D.; HARLAN, J. M.; PRICE, T. H.; ROSEN, H.; TAYLOR, R. F.; HANSEN, J. A.; KLEBANOFF, S. J. Absence of monoclonal-antibody-defined protein complex in boy with abnormal leucocyte function. **Lancet**, v. 1, p. 535-537, 1984.

BLACK, P. H. Central nervous system-immune interactions: Psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v.38, p.1-6, 1994.

BLALOCK, J. E. The immune system as a sensory organ. **Journal of Immunology**, v. 132, p. 1067-1070, 1984.

BLALOCK, J.E.; HARBOUR-MCMENAMIN, D.; SMITH, E. M. Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunology systems. **Journal of Immunology**,v. 35, n. 2 p. 858s-8612,1985. Supplement.

BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Physiological Reviews**, v. 69, p. 1-32, 1989.

BLALOCK, J. E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunology Today**, v. 15, p. 504-511, 1994.

BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. **Brain Research**, v. 573, p. 318-320, 1992.

BOGDAN, C. Of microbes, macrophages and nitric oxide. **Behring Institute Mitteilungen**, v., p. 58-72, 1997.

BRET-DIBAT, J. L.; BLUTHE, R. M.; KENT, S.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 9, p. 242-246, 1995.

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

BROWN, D.E.; SHERIDAN, J.; PEARL, D.; ZWILLING, B. S. Regulation of Mycobacterial growth by the hypothalamus-pituitary-adrenal axis: differential responses of BCG resistant and susceptible mice. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4793-4800, 1993.

CAO, L.; LAWRENCE, D. A. Suppression of host resistance to *Listeria monocytogenes* by acute cold/restraint stress: lack of direct IL-6 involvement. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, p. 132-143, 2002.

CARLSON, J.; HERRICK, K.; BAIRD, J.; GLICK, S. Selective enhancement of dopamine utilization in rat prefrontal cortex by food deprivation. **Brain Research**, v.400, p. 200-203, 1987.

CARLSON, S. Neural Influences on Cell Adhesion Molecules and Lymphocyte Trafficking. In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. **Psychoneuroimmunology**, 3a. ed. Academic Press, 2001, p. 231-239.

CARLSON, S.L.; FOX, S.; ABELL, K. L. Catecholamine modulation of lymphocyte homing to lymphoid tissues **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 11, p. 307-320, 1997.

CASSATELA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**, v. 16, p. 21-6, 1995.

CAZAUX, C. A.; STERIN-BORDA, L.; GORELIK, G.; CREMASCHI, G. A. Down-regulation of beta-adrenergic receptors induced by mitogen activation of intracellular signaling events in lymphocytes. **FEBS Letters**, v. 364, p. 120-124, 1995.

CHAMANDARI, E; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the Stress Response. **Annual Review of Physiology** , v.67, p.259-84, 2005

CHARNEY, D. S; HENINGER, G.R. Noradrenergic function and the mechanism of action of antianxiety treatment. I. The effect of long-term alprazolam treatment. **Archives of General Psychiatry**, v.42, p.458-467, 1985.

CHESON, B. D.; CHRISTENSEN, R. L.; SPERLING, R.; KOHLER, B. E.; BABIOR, B. M. The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 58, p. 789-796, 1976.

COHEN, N. Biological relevance of data variability. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 18, p. 495-496, 2004.

COHN, Z. A. The structure and function of monocytes and macrophages. **Advances in Immunology**, v. 9, p. 163-214, 1968.

COHN, Z. A. The activation of molecular phagocytes: fact, fancy and future. **Journal of Immunology**, v.121, p.813-816, 1978.

COHN, D. W. H. **Efeitos da administração de lipopolissacarídeo (LPS) de Escherichia coli sobre o comportamento de camundongos dominantes e submissos: uma abordagem etofarmacológica ao estudo do comportamento doentio**. 2003. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

COSTA, E. C. R. **Neuroimunomodulação: efeitos da morfina sobre o comportamento e a atividade de macrófagos**. 2004. f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

COSTA, F. G. **Relação neurotensina/dopamina: aspectos comportamentais e neuroquímicos**. 2001. 155f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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

COSTA-PINTO, F. A. **Correlatos neurais e comportamentais da asma alérgica experimental em camundongos**. 2004. 133 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, p. 52-60, 2005.

COSTA ROSA L. F.; MURPHY, C.; NEWSHOLME, P. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O₂ metabolism. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and activation of NADPH+-dependent 'malic' enzyme. **Biochemical Journal**, v. 1, n. 310, p. 709-714, 1995. Pt2.

COSTA ROSA, L. B. B. P.; SAFI, D. A.; CURI, R. Effect of thioglycollate and BCG stimuli on glucose and glutamine metabolism in rat macrophages, **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, p. 10-14, 1994.

CUI, S.; REICHNER, J. S.; MATEO, R. B.; ALBINA, J. E. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. **Cancer Research**, v. 54, p. 2462-2467, 1994.

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

DALEY, L. The perceived immediate needs of families with relatives in the intensive care setting. **Heart & Lung: the journal of critical care**, v. 13, p. 231-237, 1984.

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

DAVIDSON, P. L.; MILBURN, P. D.; WILSON, B. D. Biological adaptive control model: a mechanical analogue of multi-factorial bone density adaptation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 227, p. 187-195, 2004.

DEL REY, A.; KABIERSCH, A.; PETZOLDT, S.; BESEDOVSKY, H. O. Involvement of noradrenergic nerves in the activation and clonal deletion of T cells stimulated by superantigen in vivo. **Journal of Neuroimmunology**, v. 127, p. 44-53, 2002.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 1638-1644, 1995.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, v. 77, p. 1627-1652, 1991.

DIORIO, D.; VIAU, V.; MEANEY, M. J.; The role of medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 3839-47, 1993.

DOBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, p. 163-221, 1999.

DOCKTER, B.; BLACK, D. R.; HOVELL, M. F.; ENGLEBERG, D.; AMICK, T.; NEIMIER, D.; SHEETS, N. Families and intensive care nurses: comparison of perceptions. **Patient Education and Counseling**, v. 12, p. 29-36, 1988.

DOMINGUES-JUNIOR, M.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of treatment with amphetamine and diazepam on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 22, p. 555-574, 2000.

DORE, G.; ROMANS, S. E. Impact of bipolar affective disorder on family and partners. **Journal of Affective Disorders**, v. 67, p. 147-158, 2001.

DUBRAVEC, D. B.; SPRIGGS, D. R.; MANNICK, J. A.; RODRICK, M. L. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 87, p. 6758-6761, 1990.

DUNN, A. J. Mechanisms by which cytokines signal the brain. **International Review of Neurobiology**, v. 52, p. 43-65, 2002.

DUNN, A.; SWIERGEL, A. H. The role of cytokines in infection-related behavior. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 840, p. 577-585, 1998.

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

ENGLER, H.; DAWILS, L.; HOVES, S.; KURTH, S.; STEVENSON, J. R.; SCHAUENSTEIN, K.; STEFANSKI, V. Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. **Journal of Neuroimmunology**, v. 156, p. 153-162, 2004.

ERNSTROM, U.; SANDEBERG, G. Effects of alpha- and beta- receptor stimulation on the release of lymphocytes and granulocytes from the spleen. **Scandinavian Journal of Haematology**, v. 11, p. 275-286, 1973.

ESKANDARI, F.; STERNBERG, E. M. Neural-immune interactions in health and disease. **Annals of the New York Academy Science**, v. 966, p. 20-27, 2002.

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

EZEKOWITZ, R. A. B.; AUSTYN, P. D.; STAHL, G. D.; GORDON, S.; **Journal of Experimental Medicine**, v. 154, p. 60-76, 1981.

FECCHIO, D.; RUSSO, M.; SIROIS, P.; BRAQUET, P.; JANCAR, S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF-antagonists. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 12, p. 57-65, 1990a.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, p. 125-132, 1990b.

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

FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; BELLINGER, D. L.; CARLSON, S. L.; ACKERMAN, K. D.; MADDEN, K. S.; OLSCHOWKI, J. A.; LIVNAT, S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. **Immunological Reviews**, v. 100, p. 225-260, 1987.

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

FIDLER, I. Macrophages and Metastasis - biological approach to cancer therapy **Cancer Research**, v. 45, p. 4714, 1985.

FINUCANE, T. E. Care of patients nearing death: another view. **Journal of American Geriatrics Society**, v. 50, p. 551-553, 2002.

FLANAGAN, J. Clinically effective cancer care: working with families. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 5, p. 174-179, 2001.

FLESHNER, M.; GOEHLER, L. E.; HERMANN, J.; RELTON, J. K.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. **Brain Research Bulletin**, v. 37, p. 605-610, 1995.

FONSECA, E. S.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. **Physiology & Behavior**, v. 77, p. 205-215, 2002.

FUCHIMOTO, H.; SAKATA, T.; OGAWA, N.; GOMITA, Y. Olfactory bulb as cues in the communication of affect between rats. **Hukuoka Acta Medica**, v. 64, p. 41-46, 1973.

FUKUSHIMA, M.; SAKATA, T.; TSUTSUI, K.; GOMITA, Y.; ASANO, C. Circadian pattern of stress response to affective cues of foot shock. **Physiology & Behavior**, v.27, p.915-920, 1981.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GATCHELL, R. J.; BAUUM, A. An introduction to health psychology reading. Maryland: Addison-Wesley Publishing, 1983.

GLAVIN, G.; TANAKA, M.; TSUDA, A.; KOHNO, Y.; HOAKI, Y.; NAGASAKI, N. Regional rat brain noradrenaline turnover in response to restraint stress. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.19, p.287-290, 1983.

GLAVIN, G. Intramesolimbic dopamine D1 receptor activation reduced stress gastric lesions and gastric acid secretion. **Int. J. Exp. Clin. Gastroenterol.**, v.1, p.55-60, 1991.

GOEHLER, L. E.; GAYKEMA, R. P.; NGUYEN, K. T.; LEE, J. E.; TILDERS, F. J.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 2799-2806, 1999.

GOH, K.; FURUSAWA, S.; KAWA, Y.; NEGISHI-OKITSU, S.; MIZOGUCHI, M. Production of interleukin-1-alpha and -beta by human peripheral polymorphonuclear neutrophils. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 88, p. 297-303, 1989.

GORDON, S. Biology of the macrophage. **Journal of Cell Science Supplement**, v. 4, p. 267-286, 1986.

GUYRE, P. M.; GIRARD, M. T.; MORGANELLI, P. M.; MANGANIELLO, P. D. Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 30, p. 89-93, 1988.

GUSTAFSSON, J. A.; CARLSTEDT-DUKE, J.; POELLINGER, L. Biochemistry, molecular biology and physiology of the glucocorticoid receptor. **Endocrine Reviews**, v.8, p.185-234, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon, 1989.

HAMMOND, B.; HESS, M. L. The oxygen free radical system: potential mediator of myocardial injury. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 6, p. 215-220, 1985.

HARMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 2001, ed.10º, p.2148.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 12, p. 123-137, 1988.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, p. 53-58, 1989.

HELLIWELL, P. G.; WILLIAMS, T. J. The neutrophil. In: **Immunopharmacology of Neutrophils**. New York: Academic Pres., p. 1-4, 1994.

HENRICKS, P. A.; VAN ESCH, B.; VAN OOSTERHOUT, A. J.; NIJKAMP, F. P. Specific and non-specific effects of beta-adrenoceptor agonists on guinea pig alveolar macrophage function. **European Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 321-330, 1988.

HERNANDEZ-REIF, M.; IRONSON, G.; FIELD, T.; HURLEY, J.; KATZ, G.; DIEGO, M.; WEISS, S.; FLETCHER, M. A.; SCHANBERG, S.; KUHN, C.; BURMAN, I. Breast cancer patients have improved immune and neuroendocrine functions following massage therapy. **Journal of Psychosomatic Research**, v.57, n.1, p.45-52, 2004.

HOPPER, K. E. Kinetics of macrophage recruitment and turnover in peritoneal inflammatory exudates induced by Salmonella or thioglycollate broth. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 39, p. 435-446, 1986.

HOSAKA, T.; SUGIYAMA, Y. Structured intervention in family caregivers of the demented elderly and changes in their immune function. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 57, p. 147-151, 2003.

ICHIMARU, Y.; GOMITA, Y. A new screening method for anti-ulcer agents: psychological stress produced by intraspecies emotional communication. **Pharmacology**, v.34, p. 176-180, 1987.

ICHIMARU, Y.; MORIYAMA, M.; GOMITA, Y. A. Gastric lesions produced by conditioned emotional stimuli in the form of affective communication and effects of benzodiazepines. **Life Science**, v. 334, p. 187-192, 1984.

ICHIMARU, Y.; GOMITA, Y. A.; MORIYAMA, M.; OGAWA, N. Effects of psychotropic drugs on gastric lesions induced by conditioned emotional stimulus. **Journal of Pharmacology**, v.30, p.77, 1980.

IIMORI, K., TANAKA, M., KOHNO, Y.; IDA, Y.; NAKAGAWA, R.; HOAKI, Y.; TSUDA, A.; NAGASAKI, N. Psychological stress enhances noradrenaline turnover in specif brain regions in rats. **Pharmacology , Biochemistry and Behavior**. v. 16, 637-640, 1982.

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. **Immunology Letters**, v. 62, p. 39-43, 1998.

JACOBS, B. L.; FORNAL, C. A. Serotonin and Behavior. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. **Psychofarmacology the Fourth Generation of the Progress**, 4. ed. Raven, 1995, p. 461-469.

JACOBS, B. L. Locus coeruleus neuronal activity in behaving animals. In: Heal, D. J. Marsden, C. A. (Eds.). *The pharmacology of noradrenaline in the central nervous system*. New York: Oxford University Press, 1990, p. 248-265.

JIANG, C. G.; MORROW-TESCH, J. L.; BELLER, D.I.; LEVY, E.; BLACK, P. H. Immunosuppression in mice induced by cold water stress. **Brain Behaviour and Immunity**, v.4, p.278-291, 1990.

JORENS, P.G.; MATTHYS, K. E; BULT, H. Modulation of nitric oxide syntase activity in macrophages. **Mediators of Inflammation**, v.3, p.33-56, 1995.

JOVANOVA-NESIC, K.; NIKOLIC, V.; JANKOVIC, B. D. Locus ceruleus and immunity. II. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis and hypersensitivity skin reactions in rats with lesioned locus ceruleus. **The International Journal of Neuroscience**, v. 68, p. 289-294, 1993.

KAWASAKI, S.; TANI, H., AGARI, S.; SAKATA, T., KUWAHARA, H., OGAWA, N.; KAJI, M. The influence of conditional emotional stress on parainfluenza infection in mice. **Hukuoka Acta Medica**, v.56, p.969-971, 1965.

KARNOVSKY, M. L.; LAZDINS, J. K. The biochemical criteria for activated macrophages. **Journal of Immunology**, v.121, p.809-813, 1978.

KASPROWICZ, D. J.; KOHM, A. P.; BERTON, M. T.; CHRUSCINSKI, A. J.; SHARPE, A.; SANDERS, V. M. Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 680-690, 2000.

KELLER, R.; KEIST, R.; FREI, K. **European Journal of Immunology**, v. 20, p. 695, 1990.

KELLER, S. E.; SCHLEIFER, S. J.; LIOTTA, A. S.; BOND, R. N.; FARHOODY, N.; STEIN, M.: Stress-induced alterations of immunity in hypophysectomized rats. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.85, p.9297-9301, 1991.

KELLEY, A. E. Locomotion activity and exploration. In F. VAN HAARE (Ed.), **Methods in behavioral pharmacology**, 10a . ed., Elsevier, 1993, p.499-518.

KENT, S.; BLUTHE, R. M.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, p. 24-28, 1992.

KESSLER, R. C. The effects of stressful life events on depression. **Annual Review of Psychology**, v. 48, p. 191-214, 1997.

KIECOLT-GLASER, J. K.; MARUCHA, P. T.; ATKINSON, C.; GLASER, R. Hypnosis as a modulator of cellular immune dysregulation during acute stress. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 69, p. 674-682, 2001.

KIHARA, H.; TESHIMA, H.; SOGAWA, H.; NAKAGAWA, T. Stress and superoxide production by human neutrophils. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 650, p. 307-310, 1992.

KLUGER, M. J.; RINGLER, D. H.; ANVER, M. R. Fever and survival. **Science**, v. 188, p. 166-168, 1975.

KONSMAN, J. P.; TRIDON, V.; DANTZER, R. Diffusion and action of intracerebroventricularly injected interleukin-1 in the CNS. **Neuroscience**, v. 101, p. 957-967, 2000.

KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 113, p. 147-156, 1998.

- KVETNASKY, R.; PALKOVITS, M.; MITRO, A.; TORDA, T.; MIKULAJ, L. Catecholamines in individual hypothalamic nuclei of acutely and repeatedly stressed rats. **Neuroendocrinology**, v.23, p. 257-267, 1977.
- LANIER, L. L. NK cell receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 359-393, 1998.
- LARSON, S. J.; ROMANOFF, R. L.; DUNN, A. J.; GLOWA, J. R. Effects of interleukin-1beta on food-maintained behavior in the mouse. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, p. 398-410, 2002.
- LAZARUS, R.S; COHEN, J.B. Environmental stress. In: I. Attman and J.P. Wohlwill (Eds), **Human Behavior and the Environment: Current Theory and Research**, Volume 2 Plenum Presss, New York, p.89-127, 1977.
- LE MOAL, M. Mesocorticolimbic Dopaminergic Neurons Functional and Regulatory Roles. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. **Psychopharmacology the Fourth Generation of the Progress**, 4a. ed. Raven, 1995, p. 2002.
- LE MOAL, M; SIMON, H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. **Psychol. Rev**; v. 71, p. 155-234, 1991.
- LEHN, M.; WEISER, W. Y.; ENGELHORDN, S. GILLIS; RENOLD, H. G. **Journal of Immunology**, v. 143, p.3020-24, 1989.
- LEHRER, R. I.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; BABIOR, B. M.; CURNUTTE, J. T. Neutrophils and host defense. **Annals of International Medicine**, v. 109, p. 127-142, 1988.
- LESKE, J. S. Internal psychometric properties of the Critical Care Family Needs Inventory. **Heart Lung**, v. 20, p. 236-244, 1991.
- LEVINE, E. S.; LITTO, W.J.; JACOBS, B. L. Activity of cat locus coeruleus noradrenergic neurons during the defense reaction. **Brain Research**., v. 531, p. 189-195, 1990.
- LICINIO, J.; FROST, P. The neuroimmune-endocrine axis: pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1141-1148, 2000.

LINDEMANN, A.; RIEDEL, D.; OSTER, W.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W.; MERTELSMANN, R.; HERRMANN, F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 83, p. 1308-1312, 1989.

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

LLOYD, A. R.; OPPENHEIM, J. J. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunology Today**, v. 13, p. 169-172, 1992.

LORD, P. C.; WILMOTH, L. M.; MIZEL, S. B.; MCCALL, C. E. Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 87, p. 1312-1321, 1991.

LOTTENBERG, C.: Soluções estruturais para a saúde. In: Tendência e Debates, **Folha de São Paulo**, 15/05/2005, p. 2.

LOURENÇO, G. A.; DORCE, V. A. C.; PALERMO-NETO, J. Haloperidol treatments increased macrophage activity in male and female rats: influence of corticosterone and prolactin serum levels. **European Neuropsychopharmacology**, v.15, p.271-277, 2005.

MACKANESS, G. B. The monocyte in cellular immunity. **Seminars in Hematology**, v. 7, p. 172-184, 1970.

MADDEN, K. Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. **Brain, Behavior and Immunity**, v.17 (1), p.5-10, 2003.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. **Physiological Reviews**, v. 75, p. 77-106, 1995.

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

MADDEN, K. S.; FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L.; HARDY, C. A.; LIVNAT, S. Sympathetic nervous system modulation of the immune system. II. Induction of lymphocyte proliferation and migration in vivo by chemical sympathectomy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 94, p. 67-75, 1994.

MAESTRONI, G. Immunology needs the mind. **Nature Immunology**, v. 5, p. 763, 2004.

MAIER, S. F. Bi-directional immune-brain communication: Implications for understanding stress, pain, and cognition. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, p. 69-85, 2003.

MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, p. 11-19, 2003.

MARIC, I., DJURIC, V. J.; DIMITRIJEVIC, M.; BUKILIKA, M.; DJORDJEVIC, S.; MARCKOVIC, B. M.; JANKOVIC, G. D. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 59, p.159-166, 1991.

MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, p. 11-19, 2003.

MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects of peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice. **Life Sciences**, v. 65, p. 2157-2165, 1999.

MCCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. The role of fever in appetite suppression after endotoxin administration. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 40, p. 310-316, 1984.

MCCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 42, p. 1179-1182, 1985.

MCKINNON, W.; WEISSE, C. S.; REYNOLDS, C. P.; BOWLES, C. A.; BAUM, A. Chronic stress, leukocyte subpopulations, and humoral response to latent viruses. **Health Psychology**, v. 8, p. 389-402, 1989.

METCALF, D. Regulation of granulocyte and monocyte-macrophage proliferation by colony stimulating factor (CSF): a review. **Experimental Hematology**, v. 1, p. 185-201, 1973.

METCHNIKOFF, E. 1905. **Apud Auger & Ross**, 1992.

MILLER, N. E. Some psychophysiological studies of motivation and of the behavioral effects of illness. **Bull. Br. Psycho. Soc.**, v. 17, p. 1-20, 1964.

MILLS, P. J.; YU, H.; ZIEGLER, M. G.; PATTERSON, T.; GRANT, I. Vulnerable caregivers of patients with Alzheimer's disease have a deficit in circulating CD62L- T lymphocytes. **Psychosomatic Medicine**, v. 61, p. 168-174, 1999.

MOLTER, N. C. Needs of relatives of critically ill patients: a descriptive study. **Heart Lung**, v. 8, p. 332-339, 1979.

MOORE, T. C. Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances. **Immunology**, v. 52, p. 511-518, 1984.

MOORE, R. Y.; BLOOM, F. E. Central catecholamine neuron system: anatomy and physiology of the dopamine systems. **Annual Review of Neuroscience**, v.1, p.129-169, 1978.

MOORE, K. E; LOOKINGLAND, J. Dopaminergic Neuronal Systems in the Hypothalamus. **Psychopharmacology the Fourth Generation of the Progress**, 4. ed. Raven, 1995, p. 2002.

MORAFO, V.; SRIVASTAVA, K.; HUANG, C. K.; KLEINER, G.; LEE, S. Y.; SAMPSON, H. A.; LI, A. M. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 1122-1128, 2003.

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

MURAMATSU, S. In: COOPER, E.L.; NISBET-BROW, E. (Eds). **Development of Immunology**. Oxford University Press, 1993, p.198-216.

MURRAY, M. J.; MURRAY, A. B. Anorexia of infection as a mechanism of host defense. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, p. 593-596, 1979.

MURRAY, D.R.; POLIZZI, S. M.; HARRIS, T.; WILSON, N.; MICHEL, M. C.; MAISEL, A. S. Prolonged Isoproterenol treatment alters immunoregulatory cell traffic and function in the rat. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 7, p. 47-62, 1993.

NAKAGAWA, R.; TANAKA, M.; KOHONO, Y.; NODA, Y.; NAGASAKI, N. Regional responses to rat brain noradrenergic neurons to acute intense stress. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, 41, 729-732, 1981.

NATHAN, C. F. Mechanisms of macrophage antimicrobial activity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 620-630, 1983.

NATHAN, C. F. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 80, p. 1550-1560, 1987a.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 79, p. 319-326, 1987b.

NATHAN, M. L.; KARNNOVSKY; DAVID, J. **Experimental Biology and Medicine**, v. 133, 1356, 1971.

NAVAIE-WALISER, M.; SPRIGGS, A.; FELDMAN, P. H. Informal caregiving: differential experiences by gender. **Medical Care**, v. 40, p. 1249-1259, 2002.

NAVAIE-WALISER, M.; SPRIGGS, A.; FELDMAN, P. H. Informal caregiving: differential experiences by gender. **Medical Care**, v. 40, p. 1249-1259, 2002.

NEABEL, B.; FOTHERGILL-BOURBONNAIS, F.; DUNNING, J. Family assessment tools: a review of the literature from 1978-1997. **Heart Lung**, v. 29, p. 196-209, 2000.

NIKOLIC, V.; JOVANOVA-NESIC, K.; JANKOVIC, B. D. Locus ceruleus and immunity. I. Suppression of plaque-forming cell response and antibody production in rats with lesioned locus ceruleus. **The International Journal of Neuroscience**, v. 68, p. 283-287, 1993.

NORTH, R. J. The concept of the activated macrophage. **Journal of Immunology**, v. 121, p. 806-809, 1978.

ODIO, M.; BRODISH, A.; RICARDO JR., M. J. Effects on immune responses by chronic stress are modulated by aging. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 1, p. 204-215, 1987.

ODA, T.; KATORI, M.; HATANAKA, K.; NAGAI, Y. Inhibition of neutrophil migration by a selective inhibitor of matrix metalloproteinase: analysis by intravital microscopy. **Med. Inflamm.**, v. 4, p. 133-7, 1995.

OLIVEIRA, L.; ARAUJO, F.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z. L.; NUCCI, G.; MUSCARÁ, M. N. TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of Amphetamine on Immune-Mediated Lung Inflammatory Responses in Rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 416, p.1- 12, 2003.

OPARA, E. I.; LAVIANO, A.; MEGUID, M. M.; YANG, Z. J. Correlation between food intake and CSF IL-1 alpha in anorectic tumor bearing rats. **Neuroreport**, v. 6, p. 750-752, 1995.

OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. **Immunology Today**, v. 18, p. 169-174, 1997.

PACHECO-LOPEZ, G.; NIEMI, M. B.; KOU, W.; BILDHAUSER, A.; GROSS, C. M.; GOEBEL, M. U.; DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O.; SCHEDLOWSKI, M. Central catecholamine depletion inhibits peripheral lymphocyte responsiveness in spleen and blood. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, p. 1024-1031, 2003.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2001; 25-219-233.

PALERMO NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FAVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, p. 497-507, 2001.

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

PARÉ, W. P.; GLAVIN, G. B. Animal Models of Stress in Pharmacology. In: **Methods in behavioral pharmacology**, edited by: VAN HAAREN, F. Elsevier Science Publishers, 1993, p.413-441.

PAVCOVICH, L. A.; CANCELA, L. M.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V. A.; RAMIREZ, O. A. Chronic stress-induced changes in locus coeruleus neuronal activity. **Brain Research Bulletin**, v. 24, p. 293-296, 1990.

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

PEREIRA, B.; ROSA, L. F.; SAFI, D. A.; BECHARA, E. J.; CURI, R. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, p. 2093-2098, 1995.

PESSINA, B.; BAMBILLA, P.; MOCARELLI, P. Surface Antigens on Ehrlich ascites tumor cells, **Bio Medical Engineering**, v. 33, p. 105-109, 1980.

PERSOONS, J. H.; BERKENBOSCH, F.; SCHORNAGEL, K.; THEPEN, T.; KRAAL, G. Increased specific IgE production in lungs after the induction of acute stress in rats. The **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 95, p. 765-770, 1995.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

PLANT H. The experiences of families of newly diagnosed cancer patients-selected findings. In: RICHARDSON A.; WILSON-BARNETT, J. **Nursing Research in Cancer Care**. 1. ed. Scutari Press, London, 1995.

PLATA-SALAMAN, C. R. Anorexia during acute and chronic disease: relevance of neurotransmitter-peptide-cytokine interactions. **Nutrition**, v. 13, p. 159-160, 1997.

PLATA-SALAMAN, C. R.; OOMURA, Y.; KAI, Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. **Brain Research**, v. 448, p. 106-114, 1988.

PORTELA, P.; MASSOCO, C. O.; DE LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats. **Physiology & Behavior**, v. 72, p. 415-420, 2001.

RADOJCIC, T.; BAIRD, S.; DARKO, D.; SMITH, D.; BULLOCH, K. Changes in beta-adrenergic receptor distribution on immunocyts during differentiation: an analysis of T cells and macrophages. **Journal of Neuroscience Research**, v. 30, n. 2, p. 328-335 (1991).

REDWINE, L.; MILLS, P. J.; SADA, M.; DIMSDALE, J.; PATTERSON, T.; GRANT, I. Differential immune cell chemotaxis responses to acute psychological stress in Alzheimer caregivers compared to non-caregiver controls. **Psychosomatic Medicine**, v. 66, p. 770-775, 2004.

- REHM, S. R.; GROSS, G. N.; PIERCE, A. K. Early bacterial clearance from murine lungs. Species-dependent phagocyte response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 66, p. 194-199, 1980.
- REICHE, E. M.; NUNES, S. O.; MORIMOTO, H. K. Stress, depression, the immune system, and cancer. **The Lancet Oncology**, v. 5, p. 617-625, 2004.
- RIGHI, D. A.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of diazepam on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1145-1153, 1999.
- RITTER, S.; PELZER, N. L. Magnitude of stress-induced brain norepinephrine depletion varies with age. **Brain Research**, v. 15, p. 170-175, 1978.
- ROBINSON, J. M.; BADWEY, J. A. Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. **Immunology Series**, v. 60, p. 159-178, 1994.
- ROUGE-PONT, F.; PIAZZA, P. V.; KHAROUBY, M.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Higher and longer stress-induced increase in dopamine concentration in the nucleus accumbens of animal predisposed to amphetamine self-administration. A microdialysis study. **Brain Research**, v. 602, p. 169-174, 1993.
- ROOT, R. K.; METCALF, J.; OSHINO, N.; CHANCE, B. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 55, p. 945-955, 1975.
- ROTH, R.; TAM, S.; ISA, Y.; YANG, J. DEUTCH, A. Stress and the mesocorticolimbic dopamine systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 537, p. 138-147, 1988.
- ROTH, K. A.; MEFFORD, I. M.; BARCHAS, J. D. Epinephrine, norepinephrine, dopamine and serotonin: differential effects of acute and chronic stress on regional brain amines. **Brain Research**, v. 239, p. 417-424, 1982.
- RUGG, E. L.; BARNETT, D. B.; NAHORSKI, S. R. Coexistence of beta₁ and beta₂ adrenoceptors in mammalian lung: evidence from direct binding studies. **Molecular Pharmacology**, v. 14, p. 996-1005, 1978.
- SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 55-89, 2000.

SAKAI, M. **Efeitos do diazepam sobre o crescimento tumoral e imunidade de animais portadores do tumor ascítico de ehrlich**. 2004. 128f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SCHLUMPF, M.; PARMAR, R.; RAMSEIER, H. R.; LICHTENSTEIGER, W. Prenatal benzodiazepine immunosuppression: possible involvement of peripheral benzodiazepine site. **Developmental Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, p. 178-185, 1990.

SCHNEIDER, H.; PITOSI, F.; BALSCHUN, D.; WAGNER, A.; DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**, v. 95, p. 7778-7783, 1998.

SCHULZ, R.; BELLE, S. H.; CZAJA, S. J.; MCGINNIS, K. A.; STEVENS, A.; ZHANG, S. Long-term care placement of dementia patients and caregiver health and well-being. **The Journal of the American Medical Association**, v. 292, p. 961-967, 2004.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MARQUEZ, J. Early tumor effects on splenic Th lymphocytes in mice, **FEBS LETTERS**, v.414, p. 1-6, 1997.

SEYLE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, v.122, p.625-631, 1955.

SHAKHAR, G.; BEN-ELIYAHU, S. In vivo b-adrenergic stimulation supresses natural killer activity and compromisses resistance to tumor metastasis in rats. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 3251-3258, 1998.

SILVA, F. R.; LAZZARINI, R.; SÁ-ROCHA, L. C.; MORGULIS, M. S. F. A.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometry study. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, p. 97-104, 2003.

SIMON, P.; DUPUITS, R.; CONSTENTIN, J. Tigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmission. **Behavior Research and Therapy**, v. 61, p. 59-64, 1994.

SIMSON, P. E.; WEISS, J. M. Altered activity of the locus coeruleus in an animal model of depression. **Neuropsychopharmacology**, v.1, p. 287-295, 1988.

SOBRIAN, S. K.; VAUGHN, V.T.; ASHE, W. K.; MARKOVIC, B.; DJURIC, V.; JANKOVIC, B. D. Gestacional exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. **Environmental Research**, v. 73, p. 227-241, 1997.

SOLOMON, G. F.; AMKRAUT, A. A. Psychoneuroendocrinological effects on the immune response. **Annual Review of Microbiology**, v. 35, p. 155-184, 1981.

SOLOMON, G. Personal communication and findings. Immunology Nervous System Interaction. Retrieved on May 15, 2003, Disponível em: <[http:// www.PNIRS.org](http://www.PNIRS.org)>. Acesso em 02 mar. 2005.

SPENGLER, R. N.; ALLEN, R. M.; REMICK, D. G.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S., L. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. **Journal of Immunology**, v.145, p. 1430-1434, 1990.

STANKEVICIUS, D. **Ansiedade induzida pela picrotoxina: reflexos comportamentais, bioquímicos e sobre a atividade de macrófagos peritoneais**. 2004. 184 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

STITES, D. P.; TERR, A.L. In: **Basic human immunology**. Ed. Prentice Hall, 1991.

STRANGE, K. S.; KERR, L. R.; ANDREWS, H. N.; EMERMAN, J. T.; WEINBERG, J. Psychosocial stressors and mammary tumor growth: an animal model. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, p. 89-102, 2000.

SUGIMOTO, Y.; OGAWA, M.; TAI, N.; KAMEI, C. Inhibitory effects of glucocorticoids on rat eosinophil superoxide generation and chemotaxis. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 845-852, 2003.

SVENSSON, T.H. Peripheral, autonomic regulation of locus coeruleus coeruleus noradrenergic neurons in brain. Putative implications for psychiatry and psychopharmacology. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 1-10, 1987.

SWANSON, M. A.; LEE, W. T.; SANDERS, V. M. IFN- γ production by Th1 cells generated from naïve CD4⁺ T cells exposed to norepinephrine. **Journal of Neuroimmunology**, v. 166, p. 232-240, 2001.

SWIERGIEL, A. H.; SMAGIN, G. N.; DUNN, A. J. Influenza virus infection of mice induces anorexia: comparison with endotoxin and interleukin-1 and the effects of indomethacin. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 57, p. 389-396, 1997.

SWIERGIEL, A. H.; SMAGIN, G. N.; JOHNSON, L. J.; DUNN, A. J. The role of cytokines in the behavioral responses to endotoxin and influenza virus infection in mice: effects of acute and chronic administration of the interleukin-1-receptor antagonist (IL-1ra). **Brain Research**, v. 776, p. 96-104, 1997.

SZURO-SUDOL, A.; NATHAN, C. F. Suppression of macrophage oxidative metabolism by products of malignant and nonmalignant cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 156, p. 945-961, 1982.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **The American Journal of Physiology**, v. 246, p. C1-9, 1984.

THOMPSON, R. L.; LEWIS, S. L.; MURPHY, M. R.; HALE, J. M.; BLACKWELL, P. H.; ACTON, G. J.; CLOUGH, D. H.; PATRICK, G. J.; BONNER, P. N. Are there sex differences in emotional and biological responses in spousal caregivers of patients with Alzheimer's disease? **Biological Research for Nursing**, v. 5, p. 319-330, 2004.

TIKU, K.; TIKU, M. L.; SKOSEY, J. L. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 3677-3685, 1986.

UGAZ, E. M.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal diazepam treatment on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Immunopharmacology**, v. 41, p. 209-217, 1999.

VAN EEDEN, S.; KLUT, M. E.; WALKER, B. A. M.; HOGG, J. C. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. **Journal of Immunological Methods**, v. 232, p. 23-43, 1999.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A.; HIRSCH, J. G. SPECTOR, W. G.; LANGEVOORT, H. L. CROFTON, R.; BLUSSÉ, V. O. A. A characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. In: VAN, FURTH, R.; MARTINUS, N. **Mononuclear Phagocytes Functional Aspects**. Boston: The Hague, 1980

VAN OVERVELD, F. J.; DEMKOW, U. A.; GORECKA, D.; ZIELINSKI, J.; DE BACKER, W. A. Inhibitory capacity of different steroids on neutrophil migration across a bilayer of endothelial and bronchial epithelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 477, p. 261-267, 2003.

VEDHARA, K.; FOX, J. D.; WANG, E. C. Y. The measurement of stress-related immune dysfunction in psychoneuroimmunology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 699-715, 1999.

VEDHARA, K.; SHANKS, N.; ANDERSON, S.; LIGHTMAN, S. The role of stressors and psychosocial variables in the stress process: a study of chronic caregiver stress. **Psychosomatic Medicine**, v. 62, p. 374-385, 2000.

VELLUCCI, S. V. The effects of ether stress of bethasone treatment on the concentration of noradrenaline and dopamine in various regions of the rat brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 60, p. 601-615, 1977.

VERHAEGHE, S.; DEFLOOR, T.; VAN ZUUREN, F.; DUIJNSTEE, M.; GRYPDONCK, M. The needs and experiences of family members of adult patients in an intensive care unit: a review of the literature. **Journal of Clinical Nursing**, v. 14, p. 501-509, 2005.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J. K.; TARTAGLIA, N.; SILBERT, L.; MARTIN, D.; MAIER, S. F. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. **Neuroscience Letters**, v. 183, p. 27-31, 1995.

WEISS, S. J.; YOUNG, J.; LOBUGLIO, A. F.; SLIVKA, A.; NIMEH, N. F. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 68, p. 714-721, 1981.

WEIZMAN, R.; GAVISH, M. Molecular cellular and behavioral aspects of peripheral-type benzodiazepine receptors. **Clinical Neuropharmacology**, v. 16, p. 401-417, 1993.

WERB, Z.; BANDA, M. J.; JONES, P. A. Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases isolated from macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 1340-1357, 1980.

WERB, Z.; CHIN, J. R. Apoprotein E is synthesized and secreted by resident and thioglycolate-elicited macrophages but not by pyran copolymer or bacillus Calmett Guérin-activated macrophages. **Journal Experimental Medical**, V.243, P.1240-1253, 1981.

WERB, Z.; HEMBRY, R. M.; MURPHY, G.; AGGELER, J. Commitment to expression of the metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. **The Journal of Cell Biology**, v. 102, p. 697-702, 1986.

WILKINSON, L. O., JACOBS, B.L. Lack of responses of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of freely moving cats to stressful stimuli. **Exp. Neurol**, v. 101, p. 445-457, 1988.

WHITELAW, D. M. The intravascular lifespan of monocytes. **Blood**, v. 28, p. 455-464, 1966.

WILNER, P. Animal models as research tools in depression. **International Journal Geriatric Psychiatry**, v.6, p. 469-476, 1991.

ZAVALLA, F.; TAUPIN, V.; DESCAMPS-LATCHA, B. In vivo treatment with benzodiazepine onhibits murin phagocyte metabolism and prodiction of interleukin-1, tumor necrosis factor and interleukin-6. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, p. 442-449, 1990.

ZHOU, D.; KUSNECOV, A. W.; SHURIN, M. R.; DEPAOLI, M.; RABIN, B. S. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**, v. 133, p. 2523-2530, 1993.

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