Marcio Yuiti Tomiyoshi

A influência do convívio com
parceiro doente sobre parâmetros
fisiopatológicos de células
dendríticas

A influência do convívio com parceiro doente
sobre parâmetros fisiopatológicos de células
dendríticas

MARCIO YUITI TOMIYOSHI

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Imunologia.

São Paulo

2007

A influência do convívio com parceiro doente sobre parâmetros fisiopatológicos de células dendríticas

MARCIO YUITI TOMIYOSHI

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Imunologia.**

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto

São Paulo

2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Tomiyoshi, Marcio Yuiti.

A influência do convívio com parceiro doente sobre parâmetros fisiopatológicos de células dendríticas / Marcio Yuiti Tomiyoshi. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Jose Alexandre Marzagão Barbuto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Neuroimunomodulação.

Versão do título para o inglês: The influence of cohabitation with a sick cage mate on physiopathological parameters of dendritic cells.

Descritores: 1. Estresse 2. Células dendríticas 3. Neuroimunomodulação 4. Comportamento animal 5. Psiconeuroimunologia 6. Baço I. Barbuto, Jose Alexandre Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB187/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcio Yuiti Tomiyoshi.

Título da Dissertação: A influência do convívio com parceiro doente sobre parâmetros fisiopatológicos de células dendríticas.

Orientador(a): Jose Alexandre Marzagão Barbuto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **089** nas fls. **19** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, Coordenador da Linha de Pesquisa "**A influência do "estresse" na diferenciação e ativação de células dendríticas em camundongos C57BI/6**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Márcio Yuiti Tomiyoshi e os pesquisadores Cristina de Oliveira Massoco e João Palermo-Neto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **16.09.2005**.

São Paulo, 20 de setembro de 2005.

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "A influência do estresse na diferenciação e ativação de células dendríticas em camundongos C57Bl/6", protocolo nº720/2005, utilizando 140 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 " Stress influence upon differentiation and activation of C57Bl/6 mouse dendritic cells", protocol number 720/2005, utilizing 140 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, 26 de setembro de 2005

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

Aos meus pais e à minha irmã

AGRADECIMENTOS

Aviso a todos os incautos que irei me dedicar com afinco na escrita deste item por acreditar que qualquer trabalho se faz e é melhor aproveitado se feito em conjunto.

Ao Professor Doutor José Alexandre Marzagão Barbuto (Alex, the Boss) cujos agradecimentos não cabem e nem ousa colocar em palavras. Mesmo assim, agradeço pela enorme contribuição na minha formação acadêmico-pessoal, guiando-me e deixando-me autoguiar quando necessário.

Ao Professor Doutor João Palermo-Neto por, apesar de inúmeros tropeços meus, estar sempre de braços abertos para me apoiar e me dar subsídios para continuar nesta empreitada.

À Doutora Cristina de Oliveira Massoco (Cris!!) embora nem sempre perto, sempre presente, agradeço por, entre outros, ter me apresentado ao modelo experimental e ter me apoiado sempre.

Aos inúmeros camundongos C57BL/6 que deram suas vidas em contribuição à pesquisa.

Aos estimados colegas do laboratório de Imunologia de Tumores que, desde a iniciação científica me ajudaram a tentar compreender o que significa fazer pesquisa:

- a, assim apelidada, “velha guarda”: Alexandra, Luis Ensina, Angela, Giovana e Camila com quem pouco convivi, mas me ajudaram nos passos iniciais;
- ao Renato (Renatson Bói) ou Márcio, nunca sei o nome, pelo companheirismo ao longo deste caminho que tive o prazer de trilhar;
- aos de toda e para qualquer hora: Clara (Crarabóia), Bruno (Brunóideo), Andréia (Amigandréia), Roberto, João Paulo (Ruanitos, el Pablitos), Patricia (Patty), Célia, Marisa, Gabriela (Gabidson Girl), Ana Paula (Donana etc...), Graziela (Grá), Leonardo (Leo); por todos os momentos de discussões fundamentadas e as nem tanto;

- a nova, quase velha, geração, sendo que uns vão mas todos ficam: Adriana (Catita Infante); Simone (Simonelo's), Vivian (Vizinha);
- aos novíssimos integrantes que ainda não possuem apelidos: Valéria, Cristiano, Lourran e Lilian que farão parte da incrível história deste laboratório.

Aos que tive o prazer em ajudar e, principalmente ser ajudado do grupo de Neuroimunomodulação da Faculdade de Veterinária e Zootecnia: Mônica, Glaucie, Alison, Viviane, Milena, Karin, Andreia, Maria Silvia Morgulis, Luciana V., Daniela e aos técnicos de laboratório Priscila, Magali e Ricardo (Jibóia). Especialmente ao Daniel Stankevicius que me ensinou a trabalhar no Ethovision.

Aos amigos deste departamento por todos os momentos de descontração, por me apoiarem, por me confundirem e desconfundirem e, mais importante, por me aguentarem todo esse período:

- àquelas do laboratório carinhosamente denominado de “anexo”, que, aliás não sabemos até hoje quem é anexo de quem: Juliana (Judith), Cintia, Fernanda (Zezones), Claudinha e Mônica;
- aos “maláricos” e “chagásicos”: Rogério (Urtigones), Ana Paula (Professorinha), Sandra (Sandroca's), Sheila, Ricardo, Sergio (Colega);
- as “Veretes”: Adriana (Eudrieininha) e Maíra;
- aos que estão acima da gente, literalmente: Mariane (Marymana) e Rafael (Rafinha);
- e também àqueles que não foram sistematicamente classificados: Edimara (Edicildes), Camila, Cristiane (Zunha), Andreia, Ivo (Dr. Ivus), Silvana e Marilu.

A todos os doutores que se fizeram presentes na minha banca de qualificação: Ises de Almeida Abrahamsohn, Diana Helena de Benedetto Pozzi, Luciana de Deus Vieira de Moraes, Frederico Azevedo da Costa Pinto e Niels Olsen Saraiva Câmara, uns por me ajudarem na composição de um trabalho melhor arquitetado, outros por me abrirem os olhos.

Às doutoras Sônia Jancar Negro, Lourdes Isaac, Vera Lucia G. Calich e Karina R. Bortolucci, que em muito me ajudaram em momentos que eu realmente precisava.

A todos aqueles que me emprestaram reagentes nos momentos de maior dificuldade experimental, meus sinceros agradecimentos em mostrar que, antes de mais nada, somos um departamento.

Às secretárias do departamento de Imunologia: Valéria, Jotelma, Maria Eni, Amanda e, agora, ao Amarildo, por me aturarem e estarem sempre prontos para ajudar.

Aos membros dos biotérios do ICB e do VPT: Silvia, Sueli, Joelma, Fernando, Andreia; Claudia, Idalina, Herculano por não só cuidarem dos preciosos camundongos e realmente se importarem com isso.

A todos os funcionários desta Universidade, ou não, que foram deveras prestativos quando precisei: Milton (Miltovski), Otacílio (Otacilius Fernandus), Roberto, Moisés (Maomé), Márcio e Débora e a todos os FAISCA.

A todo o pessoal da biblioteca do ICB – USP, por me ajudarem na confecção deste trabalho que lêis.

Aos meus amigos de sempre: Caio, Daniel e Galego, embora amizades verdadeiras não precisam de agradecimentos.

À minha Célia simplesmente por me permitir compartilhar de sua vida.

Aos meus assessores e revisores, tanto os formais quanto aos informais, por estarem dispostos a corrigir arduamente minhas falhas de escrita e lógica.

A FAPESP e ao CNPq pelo fomento à pesquisa, mais especificamente à minha pesquisa e à dos laboratórios de que fiz parte.

“Science provides us with some of the most elegant stimulating puzzles that life has to offer. It throws some of the most provocative ideas into our arenas of moral debate. And occasionally, it improves our lives. I love science, and it pains me to think that so many are terrified of the subject or compassion, or the arts, or being awed by nature. Science is not meant to cure us of mystery, but to reinvent and reinvigorate it.”

Robert M. Sapolsky

RESUMO

Tomiyoshi MY. A influência do convívio com parceiro doente sobre parâmetros fisiopatológicos de células dendríticas. [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

As intercomunicações existentes entre o sistema nervoso e o sistema imune parecem ser de grande importância para a manutenção e restabelecimento da homeostasia. Em humanos, a convivência com portadores de doenças, uma condição denominada “*caregiving*”, tem sido relatada como um agente estressor capaz de causar alterações inclusive imunológicas. A transposição desta condição para modelos experimentais é complexa e nunca se pode pretender atingir uma equivalência real entre espécies. Todavia, num modelo descrito recentemente demonstrou-se que camundongos Swiss que conviveram com outros, portadores do tumor ascítico de Ehrlich, apresentam alterações em parâmetros comportamentais e imunes indicando que é possível estudar em roedores, alterações fisiológicas decorrentes do convívio com parceiro doente. Diante disto, avaliamos, no presente trabalho, se algumas destas alterações também poderiam ser observadas em decorrência do convívio de fêmeas da linhagem C57Bl/6 sadias com parceira singênica portadora do melanoma B16F10. Analisamos, nos animais sadios, alguns parâmetros comportamentais e imunes. Dentre os últimos estudamos o fenótipo das células apresentadoras de antígenos presentes no baço, nos linfonodos e daquelas diferenciadas, *in vitro*, a partir de precursores de medula óssea, a indução de hipersensibilidade tardia (DTH) e a resposta linfocitária *in vitro* ao antígeno indutor da DTH. Esta convivência, por 20 dias, foi capaz de: 1) alterar significativamente o comportamento das parceiras sadias aumentando a movimentação geral no campo aberto e diminuindo o tempo em exploração e o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz; 2) aumentar a expressão da molécula co-estimuladora CD80 nas populações MHCII⁺CD11c⁺ presentes no baço; 3) diminuir o percentual de células derivadas de precursores de medula óssea, MHCII⁺CD80⁺ após cultura por sete dias em meio de diferenciação (GM-CSF e IL-4) e ativação com LPS; 4) interferir negativamente na resposta cutânea à ovalbumina, um fenômeno aparentemente associado à proliferação de uma subpopulação linfocitária produtora de IL-10. No entanto, o convívio com portador do melanoma B16F10 não alterou: 1)

o fenótipo dos precursores de medula óssea; 2) o fenótipo de células dos linfonodos; 3) o estabelecimento do melanoma e; 4) a concentração sérica média de corticosterona no 20º de convivência. Podemos concluir, portanto, que o convívio com parceiro portador do melanoma B16F10 foi capaz de alterar o comportamento dos animais e de afetar tanto a diferenciação de células dendríticas *in vitro*, quanto a expressão de moléculas de superfície nas subpopulações apresentadoras de antígenos presentes no baço dos animais. Estes fatores, em conjunto, podem contribuir para a modificação do padrão de resposta imune nos animais e, portanto, este modelo pode servir para a análise das alterações imunológicas observadas em indivíduos envolvidos em “*caregiving*”.

Palavras-chave: Estresse, “*caregiving*”, células dendríticas, neuroimunomodulação, comportamento animal, psiconeuroimunologia.

ABSTRACT

Tomiyoshi MY. The influence of cohabitation with a sick cage mate on physiopathological parameters of dendritic cells. [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

The existing communications between the nervous and the immune systems seem to play an important role for both the maintenance and the reestablishment of homeostasis. In humans, living with a sick person, a condition designated as *caregiving* has been reported as a psychological stressor capable of affecting many aspects of physiology, including the immune response. The transposition of such conditions to animal models is complex and one can never assume to achieve real equivalence between species. However, in a recently described model, healthy Swiss mice, which cohabited with ascitic Ehrlich tumor-bearers, presented both behavioral and immunological alterations, indicating that it is possible to study, in rodents, physiological alterations due to the cohabitation with a sick partner. Therefore, we evaluated, herein, behavioral and immunological alterations in healthy C57Bl/6 female mice caused by cohabiting with syngeneic mice bearing the B16F10 melanoma. Among the immune parameters we analyzed the antigen-presenting cells phenotype (in the spleen, lymph nodes and after *in vitro* differentiation of bone marrow precursors), the induction of a delayed-type hypersensitivity (DTH) and the *in vitro* lymphocyte response to the antigen used to induce the DTH. This cohabitation, for 20 days with a melanoma-bearer: 1) significantly altered the behavior of the healthy partners, increasing the general locomotion at the Open Field and decreasing the exploration time and number of entries at the plus-maze open-arms; 2) enhanced the expression of the CD80 co-stimulatory molecule on MHC⁺CD11c⁺ cells harvested from the spleen; 3) interfered in the dendritic cell differentiation *in vitro*, since the percentage of MHC⁺CD80⁺ cells was smaller after differentiation in the presence of GM-CSF e IL-4 and activation with LPS; 4) negatively interfered in the establishment of a DTH to ovalbumin, a phenomenon that was associated with the proliferation of an IL-10-producing lymphocyte subpopulation. However, cohabitation with a melanoma-bearer did not significantly alter: 1) the phenotype of bone marrow precursors; 2) the phenotype of lymph node adherent cells; 3) the B16F10 melanoma development; 4) the mean corticosterone serum level, at the 20th day of cohabitation.

In summary, the cohabitation with a B16F10-bearer was able to modify behavioral aspects and to affect both DC differentiation and co-stimulatory molecules expression on the splenic antigen presenting cells. These factors, together, could contribute to a change in the immune response pattern in the animals and, therefore, this model could be proposed as a means to analyze the immune alterations observed in caregivers.

Keyword: Stress, caregiving, dendritic cells, neuroimmunomodulation, animal behavior, psychoneuroimmunology.

LISTA DE ABREVIATURAS

5HIAA – Ácido 5-hidroindol 3 acético
ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico
AD – Animal Doente
AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC – Célula apresentadora de antígeno
CAS – Companheiro de Animal Saudável
CD – “*Cluster of Differentiation*”
CEEA – Comissão de ética em experimentação animal
CFA – “*Complete Freund Adjuvant*”
CFSE – Carboxyfluorescein succinimidyl ester
COBEA – Colégio Brasileiro de experimentação animal
CPT – Companheiro de Portador de Tumor
CRH – Hormônio liberador de corticotropina
CTLA – “*Cytotoxic T-lymphocyte antigen*”
DC – Célula Dendrítica
DHEA – Diidroepiandrosterona
DOPAC – Ácido 4,4-diidroxifenilacético
DTH – “*Delayed-Type Hypersensitivity*”
EAE – Encefalomielite Autoimune Experimental
ED – Dia Experimental
ELISA – “*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*”
EUA – Estados Unidos da América
FSC – “*Forward Scatter*”
GCs – Glicocorticóides
GH – Hormônio do Crescimento
GM-CSF – “*Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor*”
HBSS – “*Hanks Balanced Salt Solution*”
HEL – “*Hen Egg Lysozyme*”
HIV – Vírus da Imunodeficiência humana
HPA – Hipotálamo Pituitária Adrenal
HPLC – “*High Performance Liquid Chromatography*”
HVA – Ácido homovalínico

IFN – “*Interferon*”

IL – Interleucina

IP – índice de proliferação

LPS – Lipolissacarídeo

MAPK – “*Mitogen Activated Protein Kinase*”

MFI – “*Mean Fluorescent Intensity*”

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MO – Medula Óssea

NE – Norepinefrina

NF- κ B – “*Nuclear Factor – Kappa B*”

NK – “*Natural Killer*”

NIM – Neuroimunomodulação

NO – Óxido Nítrico

NOD – “*Non-Obese Diabetes*”

OVA – Albumina de ovo

PBS – Solução Tamponada de Fosfato

PNI – Psiconeuroimunologia

POMC – Proopiomielocortina

PRL – Prolactina

REM – “*Rapid-eye movement*”

S.C. – subcutâneo

SD – Desvio padrão

SEM – Erro padrão da média

SI – Sistema Imune

SN – Sistema Nervoso

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SSC – “*Side Scatter*”

TAE – Tumor Ascítico de Ehrlich

Th – Linfócito T “*helper*”

TLR – “*Toll-Like Receptor*”

TNF – “*Tumor Necrosis Factor*”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 ANIMAIS	40
3.2 TUMOR.....	40
3.3 ESTABELECIMENTO DO CONVÍVIO COM PARCEIRO DOENTE	41
3.4 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS	41
3.4.1 <i>Campo Aberto</i>	42
3.4.2 <i>Labirinto em Cruz Elevado</i>	43
3.5 AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CORTICOSTERONA NO SORO	44
3.6 COLETA DAS CÉLULAS ADERENTES DOS CAMUNDONGOS	45
3.6.1 <i>Isolamento da subpopulação CD11c⁺</i>	46
3.7 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS A PARTIR DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA.....	46
3.8 ANÁLISE FENOTÍPICA EM CITÔMETRO DE FLUXO	47
3.9 ESTABELECIMENTO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO	48
3.9.1 <i>Ensaio de proliferação linfocitária</i>	48
3.9.2 <i>Quantificação de IL-10</i>	49
3.10 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL.....	49
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
3.12 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	50
3.12.1 <i>Caracterização dos efeitos do convívio com parceiro doente através de metodologias comportamentais e bioquímicas</i>	50
3.12.2 <i>Análise da influência do convívio com portador de tumor nas células provindas de órgãos linfóides</i>	50
3.12.3 <i>Caracterização dos efeitos do convívio com parceiro portador de tumor sobre as células dendríticas derivadas de medula óssea</i>	51
3.12.4 <i>Análise da influência do convívio com parceiro portador de tumor sobre o estabelecimento de Hipersensibilidade do Tipo Tardio à Ovalbumina</i>	51
3.12.5 <i>Caracterização dos efeitos do convívio com parceiro portador de tumor sobre o estabelecimento do tumor B16F10</i>	51
4 RESULTADOS.....	53

4.1 CARACTERIZAÇÕES COMPORTAMENTAIS DOS EFEITOS DO CONVÍVIO COM UM PARCEIRO DOENTE	53
4.1.1 <i>Campo Aberto</i>	53
4.1.2 <i>Labirinto em Cruz-Elevado</i>	56
4.2 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA NO SORO DOS ANIMAIS	58
4.3 ANÁLISE FENOTÍPICA DE CÉLULAS DOS BAÇOS	58
4.3.1 <i>População aderente total</i>	58
4.3.2 <i>População CD11c⁺</i>	62
4.4 ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS ADERENTES ISOLADAS DE LINFONODOS	63
4.5 ANÁLISE FENOTÍPICA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DIFERENCIADAS IN VITRO	66
4.6 ESTABELECIMENTO DE REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO	68
4.6.1 <i>Condições subótimas de sensibilização</i>	68
4.6.1.1 <i>Ensaio de Proliferação</i>	69
4.6.1.2 <i>Quantificação de IL-10</i>	71
4.6.2 <i>Sensibilização em condições aprimoradas</i>	71
4.7 AVALIAÇÃO DO ESTABELECIMENTO DO MELANOMA B16F10	72
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

“If you believe you have control over inevitable stressor, you may consider it somehow to be your fault that the inevitable occurred.”

(Robert M. Sapolsky, *Why Zebras don't get ulcers*)

A exposição de um indivíduo a uma situação de estresse pode acarretar uma série de respostas coordenadas que incluem alterações nas funções neuroendócrinas e complexas mudanças comportamentais. O principal motivo pelo qual tais respostas foram selecionadas parece ser o de proteger o indivíduo e restabelecer a homeostase. A percepção do agente estressor leva a uma ativação de inúmeras regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) e esta atividade do SNC acaba influenciando a resposta e função de diversos outros sistemas que compõem o organismo, dentre os quais, o Sistema Imune (SI) (BUCKINGHAM et al., 1997).

Apesar do SNC, de fato, interferir no SI, é interessante notar que tanto o Sistema Nervoso quanto o Sistema Imune foram classificados como supersistemas devido à plasticidade de responder a diferentes estímulos e, suas capacidades de adaptação e de auto-regulação (TADA, 1997). Assim, esta característica de variação de resposta de acordo com o estímulo torna ambos sistemas de especial interesse, uma vez que as possibilidades de perguntas e, conseqüentemente de respostas, são bastante amplas. Exatamente esta plasticidade é que torna o estudo individual destes sistemas complexo e o da interação deles, ainda mais.

Nos últimos anos, a investigação destas interações tem sido englobada nos termos “Psiconeuroimunologia” (PNI) ou “Neuroimunomodulação” (NIM). Entretanto, a investigação desta área não é, de fato, tão recente, pois desde 200 a.C., Galeno já havia observado em mulheres melancólicas uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores de mama (STERNBERG, 1997). Os primeiros relatos científicos modernos de que a atividade cerebral é capaz de interferir no curso de

uma resposta imune são de 1891 quando Sawchenko demonstrou, em pombos, que lesões cerebrais modificavam a resistência destes animais a determinadas doenças (SPECTOR, 1996). Em 1904, os experimentos de Loeper e Crouzon também apontam para esta mesma direção, demonstrando, pela primeira vez, que a injeção de adrenalina é capaz de alterar os níveis de leucócitos circulantes (BENSCHOP et al., 1996).

Já na década de 1920 tivemos o primeiro estudo científico que analisou a capacidade de modulação da resposta imune através do condicionamento do indivíduo (ADER, 2003). A partir de então diversos outros trabalhos demonstraram que é possível condicionar o curso de uma resposta imune por meio de um estímulo de condicionamento (ADER e COHEN, 1975; ROGERS et al., 1976), mais uma vez confirmando a inter-relação entre estes sistemas. Como exemplo, podemos utilizar o trabalho de Ader et al. (1979) em que os autores associaram, em ratos, a administração via oral de ciclofosfamida, uma droga imunomoduladora (BERGER, 1993), com uma solução adocicada de sacarina. Após algumas sessões de condicionamento, os autores constataram que a simples apresentação da solução adocicada era capaz de diminuir a resposta imune, medida pela menor produção de anticorpos frente a um estímulo específico, com hemácias de carneiro.

Apesar de terem sido descritos já há algum tempo, os protocolos de condicionamento ainda são alvo de muitos estudos devido a sua metodologia até certo ponto, simples. Madden et al., (2001), por exemplo, demonstraram que uma única exposição a um estímulo condicionador associado à imunização com uma proteína (HEL, “*hen egg lysozyme*”) foi capaz de induzir produção de anticorpos em um posterior desafio com o estímulo condicionador, sem que houvesse re-exposição à proteína. Mostrando a complexidade das interações envolvidas neste tipo de resposta, Mormede et al. (2004) demonstraram que o condicionamento a um estímulo aversivo, apesar de modular a resposta imune, não é capaz de condicionar diretamente a ativação dos genes responsáveis pela produção de citocinas em sítios periféricos ou no hipotálamo, embora, no mesmo estudo, o condicionamento da expressão dos genes que codificam o “*Nuclear factor kappa B*” (NF- κ B) assim como a “*mitogen activated protein kinase*” (MAPK) pudesse ter sido constatado.

É interessante notar que nos trabalhos citados, os autores utilizam estímulos palatáveis – solução de sacarina – como agentes causadores de distúrbio; outra maneira corriqueiramente utilizada para o estudo das inter-relações entre o SNC e o

SI é o uso de estímulos ambientais agressores, tais como aqueles utilizados por Hans Selye, em 1936, em um trabalho que se tornou um marco no estudo da área de neuroimunomodulação. Neste trabalho, Selye descreveu o desenvolvimento de uma síndrome decorrente da exposição a um conjunto muito diversificado de estímulos lesivos/nocivos (frio, injúria tecidual, excesso de exercícios, intoxicação, etc), que era caracterizada por hipertrofia de glândulas adrenais, úlceras gástricas e, curiosamente, atrofia de órgãos linfóides (incluindo o timo, o baço e 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”. Deste trabalho, dois conceitos foram estabelecidos: 1) a resposta aos estímulos ambientais parecia adaptativa, representando uma tentativa do organismo de acomodar-se a esta nova situação e 2) a resposta era sempre a mesma, independente do estímulo (SELYE, 1936). Posteriormente estes diversos estímulos passaram a ser chamados, genericamente, de **estresse**.

Existem muitas maneiras de indução de estresse em modelos experimentais, usando protocolos baseados em estresses físicos ou psicológicos/sociais, como a aplicação de choques escapáveis e/ou inescapáveis (PALERMO-NETO et al., 2003), por desequilíbrio ou por confinamento (SAINT-MEZARD et al., 2003), pelo convívio com um parceiro agressivo (VEGAS et al., 2004) ou doente (MORGULIS et al., 2004; ALVES et al., 2006), entre outros. Além dessa separação de acordo com a natureza os agentes estressores também podem ser classificados, considerando-se a duração do evento estressor, isto é, agudo ou crônico. Estas classificações são úteis porque diferentes condições de estresse acarretam diferentes respostas fisiológicas (DHABHAR et al., 1997; KEENEY et al., 2006), por exemplo, estresses agudos acarretam ativação mais proeminente do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) culminando na liberação de catecolaminas; já em situações de estresse crônico existe uma predominância de ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) que resulta na liberação de hormônios, entre os quais os glicocorticóides (NORMAN e LITWACK, 1997). Ora, se diferentes agentes estressores causam diferentes consequências fisiológicas, o SI também deveria ser afetado de forma diferente em cada situação. De fato já foi constatado que, enquanto estresses crônicos normalmente suprimem a resposta imune, os agudos estão associados à intensificação da mesma (VISWANATHAN et al., 2005).

Vale notar ainda que além do estímulo variar, a percepção do estímulo é

passível de enormes variações de acordo com o indivíduo (AVITSUR et al., 2003). Esta variação acontece entre dois pólos bem descritos pela analogia feita por Korte et al. (2005). Estes autores propõem a classificação das respostas (quer seja em humanos, quer seja em roedores), em dois padrões: o das águias, no qual a resposta frente a uma agressão é luta ou fuga (*fight-flight*), caracterizando-se assim, uma resposta “ativa” à agressão; e o das pombas, em que a resposta mais freqüente é a de se esconder ou paralisar-se (*hide-freeze*). É interessante ressaltar que estas respostas fisiológicas “opostas” podem ocorrer em indivíduos submetidos ao mesmo estímulo, inclusive em animais de experimentação homogêneos, teoricamente mantidos em condições “uniformes”. Isto torna muito claro que a forma pela qual cada indivíduo compreende, assimila e responde a um estímulo é muito variável e, até o momento, dificilmente controlável.

Além das manifestações fisiológicas após a percepção de um agente estressor serem inúmeras, as interpretações do significado do que é o estresse também são diversas. Tomaremos como base para o presente estudo, a proposta por Gatchell e Baum (1983) no qual o estresse é definido como “um processo complexo pelo qual o organismo reage a eventos internos ou externos ou a eventos psicológicos que representem um desafio ou um perigo a este organismo”.

Do Sistema Nervoso ao Sistema Imune

*“The stressor is inevitable;
the warning cannot change the stressor,
just the perception of it!”*

(Robert M. Sapolsky *Why Zebras dont get ulcers*)

A conexão entre o SN e o SI já pode ser notada anatomicamente, uma vez que todos os órgãos linfóides são inervados pelo SN, embora de maneira diferente (MADDEN e FELTEN, 1995). A inervação do baço, por exemplo, é composta principalmente por fibras da via simpática (cerca de 98%), sendo que há uma maior densidade destas fibras na polpa branca do baço, mas, curiosamente, bastante esparsa nos folículos (locais onde se encontram os linfócitos B); já nos linfonodos, as fibras noradrenérgicas e as colinérgicas se equivalem e inervam tanto a zona cortical quanto a paracortical, mas, novamente, parecem ausentes nos centros

germinativos (ELENKOV et al., 2000). Desta forma, o estabelecimento de uma resposta imune ocorre em regiões que podem ser influenciadas por estímulos neuroquímicos desencadeados pela ativação do SNC (DEL REY et al., 2000), uma vez que existem tanto receptores para catecolaminas (KOHM e SANDERS, 2000; WRONA; 2006) quanto para opióides (CARR et al., 1996) nas superfícies celulares de diversas células do SI.

Além da interferência direta de mediadores do SN sobre células e órgãos do SI, estes mesmos compostos podem atuar em sítios do Sistema Endócrino e ativá-los (WRONA, 2006). Em decorrência, há liberação de hormônios que, por sua vez, podem atuar como importantes moduladores da resposta imune.

Assim, a influência do SNC sobre o SI, pode ocorrer por 3 vias principais (esquematizadas na figura 1): 1) a via endócrina, desencadeada pela ativação do SNC mediada principalmente por hormônios provindos do hipotálamo e da pituitária, tendo como via comum final, principalmente, a secreção de corticosteróides; 2) a inervação simpática e, 3) a inervação parassimpática (WRONA, 2006).

Figura 1 Exemplos da influência do Sistema Nervoso Central e sua modulação do Sistema Imune. 1) A acetilcolina produzida pelo nervo vago age em macrófagos reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias; 2) Hormônios derivados do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal modulam a função de linfócitos; 3) A inervação simpática pode regular a função dos tecidos de órgãos linfóides e as células neles contidas. (BLALOCK e SMITH, 2007).

A primeira via, a de produção de glicocorticoides, tem sido descrita com a principal via de modulação da resposta imune após a percepção de um agente estressor (BESEDOVSKY e DEL REY, 1996; ELENKOV et al., 2002). Para ativação desta via os sinais neurosensoriais devem ser processados no núcleo paraventricular do hipotálamo e no centro noradrenérgico do “*locus coeruleus*”, também no hipotálamo (REICHE et al., 2004). Destas regiões partem estímulos que ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e, em determinadas situações, o sistema nervoso simpático (ADER et al., 1993). A estimulação neural do hipotálamo

o leva a liberar o hormônio liberador de corticotropina (CRH) que, por sua vez, estimula a glândula pituitária a aumentar a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) a partir da clivagem da proopiomelanocortina (POMC). Finalmente, o ACTH estimula as adrenais a liberarem glicocorticóides (GCs) (SAPOLSKY, 1993). Aqui vale ressaltar que além dos glicocorticóides, os principais hormônios envolvidos na reação ao estresse, os mesmos hormônios que levam ao aumento da liberação de GCs, também podem atuar diretamente como moduladores da resposta imune, sendo usados, em determinadas situações, como sinais indicativos de situações de estresse (ZHOU et al., 1993).

Os GCs são importantes moduladores da resposta inflamatória e imune (ELENKOV e CHROUSOS, 2002). Entre outros efeitos significativos sobre estas respostas, os GC são capazes de modificar o padrão de resposta dos linfócitos T, pois têm capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , o Interferon (IFN)- γ e a Interleucina (IL)-2 (BOUMPAS et al., 1993) e, provocam um aumento da produção de IL-10 (ELENKOV et al., 1996). Isto leva os T CD4⁺ a assumir um padrão do tipo Th2 (DAY et al., 2001), com aumento da expressão de citocinas características deste padrão, como a IL-4, IL-10 e IL-13, e uma inibição de expressão de IFN- γ e de TNF- α (RAMIERZ et al., 1996).

Outros hormônios, cuja liberação ocorre em resposta a situações de estresse, também podem influenciar a resposta imune. Dentre estes podemos incluir: alguns produtos da zona *reticularis* do córtex adrenal como androsterona, progesterona e a dehidroepiandrosterona (DHEA). É interessante notar que esta última, ao contrário da corticosterona (CHROUSOS e GOLD, 1992), parece aumentar a síntese de IL-2 e IFN- γ , sem afetar a produção de IL-4 (DAYNES et al., 1990), fazendo com que os linfócitos T apresentem uma resposta do tipo Th1.

Ainda mais, hormônios produzidos na glândula pituitária também podem atuar como moduladores da resposta imune. Neste contexto, o hormônio do crescimento (GH) parece ser capaz de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos e aumentar a produção de IL-1 e TNF- α por estas células (KELLEY, 1989); a prolactina (PRL), também é capaz de estimular o sistema imune de maneira antagônica aos efeitos de glucocorticóides, além de aumentar a atividade proliferativa no timo (BERNTON et al., 1991); o CRH também aparece como capaz de modular a resposta, já que, além de atuar diretamente na produção de

corticotesterona e, portanto ser capaz de alterar positiva ou negativamente a quantidade deste hormônio no sistema, também faz com que linfócitos produzam maiores quantidades de IL-1 e IL-2 (SINGH et al., 1990).

Da mesma forma, a ativação do SNA também contribui nesta conversa entre o sistema nervoso e o imune. Para ativação desta via, muitas regiões do cérebro, em particular o córtex cerebral, a amígdala, e partes da formação reticular, são ativadas após a percepção do agente estressor e terão suas ações sobre o SNA através do hipotálamo. Aí ocorre a integração das informações a partir dessas estruturas e estabelece-se em uma resposta “coerente”. Isto pode acontecer de diferentes maneiras, pois o hipotálamo age sobre o SNA através de três vias principais: projetando-se para o núcleo do trato solitário (o principal recipiente dos influxos sensoriais a partir das vísceras que atua sobre o núcleo no nervo vago e sobre outros neurônios parassimpáticos do tronco cerebral); projetando-se para regiões do tronco cerebral no bulbo ventral rostral (que controla a saída pré-ganglionar, importante para a função simpática) e projetando-se diretamente para a saída autonômica da medula espinhal (KANDEL et al., 2000).

Estas vias de influência sobre a atividade adrenérgica são significativas para a modulação da resposta imune, uma vez que, por exemplo, tem sido vastamente descrito que a inoculação de adrenalina ou noradrenalina altera a distribuição das subpopulações celulares presentes no sangue de indivíduos sadios (BENSCHOP et al., 1996) e que situações de estresse psicológico agudo, provocando liberação de catecolaminas, são capazes de aumentar a população de células NK e diminuir a de linfócitos T CD4⁺ bem como de linfócitos B no sangue de seres humanos (MILLS et al., 1995). Além da capacidade de atuarem diretamente, a norepinefrina e a epinefrina também podem atuar indiretamente sobre a função imune, afetando a produção de hormônios como os mineralocorticoides (ex: aldosterona) que também têm ações moduladoras do SI (NORMAN e LITWACK, 1997);

Desta forma, embora, em geral, se estude o SI isoladamente e se detecte sua capacidade de responder diretamente a estímulos antigênicos e, ao mesmo tempo, se auto-regular, é preciso considerar que, fazendo parte de um organismo complexo, nenhum sistema, por mais autônomo, ou “autopoiético”, que possa parecer, escapa da influência, direta ou indireta, do controle nervoso.

Do Sistema Imune ao Sistema Nervoso

*“There is no incurable disease,
only incurable people”*

(Robert M. Sapolsky *Why Zebras dont get ulcers*)

A influência do SN sobre as ações do SI tornou-se tão evidente que James E. Blalock criou, em 1984, uma teoria na qual o SI atuaria como um órgão sensorial; sensível a estímulos outros que não aqueles que somos capazes de ouvir, ver, cheirar, tocar ou palatizar. Segundo esta teoria, o SI foi desenvolvido para que o organismo fosse capaz de detectar moléculas não pertencentes ao próprio com grande sensibilidade e especificidade e, conseqüentemente mobilizar-se e responder ao estímulo (BLALOCK, 1984; BLALOCK e SMITH, 2007).

Para que esta “função” sensorial do SI pudesse ser considerada, é preciso demonstrar transferência de informações deste sistema ao SN. Caracterizações iniciais desta via de comunicação demonstraram que após três dias de um dado desafio antigênico, a subsequente ativação do SI foi acompanhada por mudanças na ativação do hipotálamo (BESEDOVSKY et al., 1977). Este trabalho abriu as portas para muitos outros que vieram a descrever melhor as formas pelas quais o SI é capaz de interagir com o SNC. Assim, foi descrito que inúmeras células que compõem o SI são capazes de produzir diversos hormônios (ex: prolactina, hormônio do crescimento), além de neuropeptídeos (encefalinas e endorfinas), catecolaminas e opióides endógenos (LOLAIT et al., 1984; MONTGOMERY et al., 1987; HARBOUR et al., 1987; BLALOCK, 1989; 1994; CARR e BLALOCK, 1991). Estes dados demonstram que, assim como as células que compõem o sistema imune estão sujeitas a modulações oriundas do SN, estas também são capazes de sinalizar para o SN, e, aparentemente, de maneira direta.

É interessante notar que, já na resposta inata do organismo à injúria – a inflamação – ocorrem interações claras entre o SN e o SI. Recentemente, foi descrito em macrófagos alveolares e em neutrófilos, um aumento na produção, *de novo*, de epinefrina e norepinefrina após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) que, aparentemente, está relacionado com o aumento da injúria tecidual inflamatória (FLIERL et al., 2007). Portanto, ao mesmo tempo em que o SN pode influenciar o processo inflamatório, através da inervação vascular e, provavelmente da liberação

local de neurotransmissores, estes, liberados pelas células recrutadas pelo processo inflamatório, podem sinalizar para o SN, mostrando a possibilidade de modulação bidirecional da inflamação.

Outra forma de inter-relação entre o SI e o SNC ocorre por intermédio de citocinas, dentre as quais, se destacam: IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , e os Interferons (DANTZER, 2006). Além de sua função local, normalmente associada à regulação da resposta imune e inflamatória, algumas citocinas são capazes de interferir diretamente no comportamento de um indivíduo, como é bem descrito no caso dos pirógenos endógenos, IL-1, IL-6 e TNF- α (NETEA et al., 2000). Além da febre e do comportamento doentio potencialmente induzido na presença destas citocinas, outro comportamento também parece ser influenciado por estas citocinas: o sono (OPP, 2006). Não só as citocinas influenciam no sono como algumas fases do sono, como a fase REM (*rapid eye movement*) parecem ser capazes de induzir produção de citocinas, como a IL-7 e a IL-15 (BENEDICT et al., 2007), modulando, provavelmente, a resposta imune. Adicionalmente podemos citar a participação de citocinas na manutenção do ritmo circadiano, sendo que essa modulação pode acontecer tanto indiretamente, por intermédio de outros fatores como a melatonina (PONTES et al., 2007) como diretamente por ativação de genes que atuam no controle do ciclo (CAVADINI et al., 2007). Outra situação na qual citocinas também parecem desempenhar um papel importante é a depressão, uma vez que a concentração sérica de citocinas como IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF- α já foi diretamente correlacionada com a severidade da doença, e que estas citocinas contribuem para o desenvolvimento do quadro, tanto em humanos quanto em camundongos (HAYLEY et al., 2005).

As citocinas podem também agir diretamente em vias neuroendócrinas. Neste âmbito poderíamos citar a ação da IL-1, que pode tanto estimular a secreção de CRH (SAPOLSKY et al., 1987) como atuar diretamente nas células do córtex adrenal aumentando a síntese de cortisol (WINTER et al., 1990). A IL-6 é outra citocina que aparentemente tem função importante na regulação endócrina, uma vez que animais transgênicos para IL-6, que superexpressam esta citocina, apresentam uma quantidade elevada de corticosterona no soro, e têm aumento da liberação de vasopressina e de ACTH pela pituitária, sob ação da mesma citocina (RABER et al., 1997).

As maneiras pelas quais as citocinas parecem ser capazes de atuar em componentes do SN (esquematizadas na Fig. 2) podem ser subdivididas em três. A primeira delas é pela estimulação de nervos aferentes viscerais, tendo como principal representante o nervo vago (MAIER et al., 1998): alguns processos inflamatórios e infecciosos viscerais são capazes de, por intermédio de aferências vagais, estimular o “*locus coeruleus*” e desencadear uma resposta de estresse mediada pela liberação de CRH (McCANN et al., 1998). A segunda maneira é pela produção local de citocinas no SN, por astrócitos e células da microglia (WIESELER-FRANK et al., 2005). A terceira via seria uma via “endócrina”, onde citocinas presentes na circulação sanguínea agiriam sobre o SNC, seja pela passagem passiva através da barreira hemato-encefálica, seja pelo transporte ativo, que ocorre para algumas citocinas (BANKS et al., 1995; ROTHWELL e HOPKINS; 1995).

Portanto, não se pode negar a passagem de informações do SI para o SN, que, como discutimos, pode ocorrer e ocorre de diferentes maneiras. Por outro lado, a classificação do SI como um órgão sensorial, de Blalock, parece extrapolar os dados atualmente disponíveis, parecendo-nos mais apropriado considerar a ambos, sistemas complexos que interagem intensamente, mas não de maneira dependente como os órgãos sensoriais e o SN.

Figura 2 Exemplos da influência do Sistema Imune sobre o Sistema Nervoso. 1) A ação de citocinas (IL-1, por exemplo) no nervo vago ocasionando alterações comportamentais; 2) Neuropeptídeos (β -endorfina, por exemplo) provindo de linfócitos podem atuar em nervos sensoriais periféricos modulando a dor; 3) Algumas citocinas também podem atuar no hipotálamo e glândula pituitária aumentando a produção de CRH e ACTH, respectivamente; 4) Hormônios (estimulador de α -melanócito, por exemplo) podem atravessar a barreira hematoencefálica e atuar no Sistema Nervoso Simpático. (BLALOCK e SMITH, 2007).

Convivência com doentes

Em humanos, é notória a quantidade de eventos que podem acarretar uma vida “estressada”. O termo estresse já foi, há muito, incorporado em nosso vocabulário cotidiano designando desde situações banais até as mais “catastróficas” o que é condizente com a definição do que é estresse, uma vez que esta é, de fato, muito ampla. Dentre as inúmeras situações já descritas como capazes de atuarem como agente estressor, o convívio e o ato de cuidar de doentes são considerados como agentes estressores, que, além do mais, podem se prolongar por muito tempo. Essa convivência afeta, em geral, principalmente familiares ou pessoas próximas ao indivíduo doente. Nos EUA, cerca de 73% dos pacientes que apresentam câncer em estágios avançados preferem permanecer em suas residências e receber cuidados em casa, ao invés de ficar internados em hospitais e ter atenção profissional (FINUCANE, 2002). Esta porcentagem é semelhante ao observado no caso de pacientes portadores de Alzheimer, pois, de acordo com os dados da “Alzheimer’s Association” (EUA), de 70 a 80% dos pacientes vivem em suas casas, onde recebem os cuidados de que precisam (THOMPSON et al., 2004).

Muitos destes “*caregivers*” não realizam tal atividade só por escolha, mas muitas vezes pelo fato do doente ser um parente próximo. Ora, esta atividade exige dedicação exclusiva em alguns casos, que leva os indivíduos a interromper suas atividades sociais e relacionamentos, resultando em perdas de amizade e, eventualmente isolamento social, outro evento que também pode ser considerado como agente estressor (NAVAIE-WALISER, 2002). Desta forma, não é surpreendente que um dos principais reflexos deste convívio seja o estabelecimento de quadros semelhantes ao de depressão (DORE e ROMANS, 2001).

Por outro lado, Wolff, em 2007 reportou que cerca de 70% dos “*caregivers*” de pacientes terminais concordam que o ato de cuidar faz com que eles “se sintam melhor consigo mesmos” e que “permitem a eles apreciar mais o fato de estarem vivos”. Evidenciando que a depressão, embora seja o aspecto clínico mais observado em “*caregivers*”, não é o único fenômeno emocional desencadeado neste processo. Assim, embora as consequências do convívio com doente ainda não estejam claras, parece ser consenso que este evento é capaz de interferir diretamente em aspectos psicológicos daqueles que o fazem.

Além desta interferência, o ato de conviver com um parceiro portador de doença é capaz de alterar, não só parâmetros emocionais, mas também imunes (KIECOLT-GLASER et al., 1995 e 2002). Estudos clínicos demonstraram uma maior susceptibilidade a infecções e alterações hematológicas em indivíduos que convivem/cuidam de portadores de Alzheimer (KIECOLT-GLASER et al., 1995), de HIV/AIDS (FLASKERUD e LEE, 2001) ou com recém-nascidos prematuros (GENNARO et al., 1997). Mais especificamente podemos citar o caso de *caregivers* para portadores do mal de Alzheimer, nos quais já foi observado um aumento do nível de cortisol salivar, uma menor proliferação de linfócitos e menor produção de IL-2 (BAUER et al., 2000) e uma diminuição no número de linfócitos T circulantes, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ (MILLS et al., 1999).

É interessante notar que parece, até certo ponto, simples, imaginar que seres humanos são capazes de demonstrar e manifestar fisicamente afetividade um pelo outro e, portanto de responder a condições emocionais com alterações da função imunológica, como ocorre em situações mais “clássicas” de estresse. No entanto, ao extrapolarmos esta condição para modelos experimentais, torna-se difícil propor situações em que animais apresentem alterações fisiológico-comportamentais causadas por estresses ambientais “sutis”, como a doença de um parceiro. Neste sentido o trabalho de Palermo-Neto et al. (2003) nos ajuda a aceitar o fato de que animais podem e reagem ao ambiente emocional em que se encontram. Neste trabalho os autores descrevem que tanto animais que foram submetidos a choques inescapáveis quanto animais que somente observavam os animais sendo submetidos a tais choques (tinham contato visual, auditivo e olfativo) apresentaram alterações comportamentais, aumento dos níveis de corticosterona e diminuição na resistência ao tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Adicionalmente, animais que foram submetidos a choques escapáveis também apresentavam aumento compatível no nível de corticosterona, porém nenhuma das outras alterações foi observada (sugerindo, então, que os resultados obtidos para o comportamento e susceptibilidade ao TAE são independentes do aumento deste hormônio). Ainda na discussão sobre a capacidade de roedores de perceberem estados emocionais em outros roedores, Langford et al. (2006) descrevem, em camundongos, um comportamento que, talvez pudesse ser descrito como empatia. Nestes experimentos, os autores analisam o comportamento de animais submetidos a tratamentos aversivos (inoculação de ácido acético 0,9%) na presença ou não de um

companheiro de gaiola submetido ou não a este mesmo tratamento. Eles puderam observar que quando os animais eram submetidos a este tratamento, na presença de um companheiro submetido ao mesmo ou a outro tratamento indutor de dor, o comportamento associado à dor era maior do que quando os animais eram submetidos ao mesmo tratamento, porém isolados ou até mesmo na presença de um animal com o qual os mesmos não tinham convivido. Ainda mais, os autores também descrevem como fator crucial para este comportamento a possibilidade de visualização entre os animais. Destes trabalhos (PALERMO-NETO et al, 2003; LANGFORD et al, 2006) depreende-se que, embora seja complicado assumirmos que roedores como camundongos possuam, de fato, algo similar à empatia, é notório que estes animais são capazes de perceber o estado emocional de um companheiro e de reagir a ele. De maneira mais interessante, estes dois trabalhos denotam que este comportamento é mais evidente em animais que conviveram entre si por um determinado período de tempo, isto é, foram companheiros de gaiola.

No trabalho de Morgulis et al. (2004), partindo do princípio que animais sociais estabelecem hierarquias e apresentam comportamento social bem definido, os autores puderam constatar que camundongos Swiss que apenas conviveram com animais de mesma linhagem portadores do TAE apresentaram uma menor resistência a este mesmo tumor quando desafiados após 11 dias de convívio. Ao analisarem o comportamento dos animais submetidos a esta condição, puderam verificar que houve modificações em diversos parâmetros analisados, mas surpreendentemente não constataram alterações significativas na quantidade de corticosterona sérica destes mesmos animais. Esta falta de alteração da corticosterona foi inesperada, pois situações ansiogênicas classicamente induzem um aumento na produção de GCs, como vimos anteriormente. Ao analisar parâmetros fisiológicos dos animais, os autores puderam constatar um menor número de leucócitos no sangue, indicando a possibilidade de que o modelo de convívio com parceiro doente seja capaz de modular alguns parâmetros imunológicos como a distribuição dos subtipos celulares de maneira independente de glicocorticóides. Neste mesmo modelo, o grupo demonstrou também que este convívio com parceiro portador do TAE faz com que ocorra uma redução na atividade oxidativa e fagocítica de neutrófilos, bem como uma redução nos níveis de noradrenalina e um aumento em seu *turnover* no hipotálamo dos animais (ALVES et al., 2006).

É interessante notar que, nestes últimos trabalhos, observou-se a facilitação do crescimento do TAE em camundongos Swiss e uma diminuição da contagem periférica de leucócitos, dois fatores associados, uma vez que a atividade citotóxica de neutrófilos contra o tumor de Ehrlich parece ser relevante para o controle do desenvolvimento desta neoplasia nos animais (BERGAMI-SANTOS et al., 2004). Esta observação ilustra a possibilidade da existência de mecanismos diversos, em ação nos animais submetidos ao convívio, capazes de afetar o controle e o desenvolvimento de tumores. Entretanto, em diversos modelos de estresse, há grande quantidade de informações que mostram a existência de alterações dos mais diversos parâmetros da resposta imune adquirida (PARIANTE et al., 1977; SKLAR e ANISMAN, 1980; DHABHAR e McEWEN, 1997; VILLANO et al., 2001; AVITSUR et al., 2002, PALERMO-NETO et al., 2003; SAINT-MEZARD et al., 2003; MORGULIS et al., 2004; HOGLUND et al., 2006; KINSEY et al., 2007).

Ora, considerando-se que o estabelecimento de praticamente qualquer resposta imune adquirida depende da apresentação antigênica aos linfócitos T, e que esta depende fundamentalmente das DCs, seria possível que a modulação funcional deste tipo celular fosse um mecanismo comum a diversas situações estressoras.

Células Dendríticas (DCs)

Inicialmente caracterizadas pelo aspecto morfológico (STEINMAN e COHN, 1973), estas células são atualmente descritas desempenhando papel fundamental no desencadeamento da resposta imune, pois são as únicas capazes de ativar células T “naive” e induzir a resposta imune primária, promovendo, conseqüentemente o estabelecimento da memória imunológica (BANCHEREAU et al., 2000). Por outro lado, embora as DCs possam desencadear de maneira eficaz a resposta imune, acredita-se que em seus estágios imaturos são tolerogênicas, induzindo a anergia das células T (RUTELLA et al., 2004), as quais, então, poderiam atuar como células reguladoras/supressoras da resposta imune (LECHLER et al., 2001). Um outro atributo importante das DCs é a sua mobilidade. Esta propriedade permite às DCs se movimentarem do sangue para os tecidos periféricos e dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides. A seletividade da migração das DCs, sua

residência em determinado tecido e sua capacidade migratória são eventos fortemente regulados sendo que fatores quimiotáticos liberados pelos tecidos alvos e as moléculas de adesão expressas em sua superfície estão envolvidos nestes processos (BELL et al., 1999).

As DCs iniciam a resposta dos linfócitos T quando migram para os órgãos linfóides secundários, como linfonodos, baço ou tecidos linfóides da mucosa, sofrendo um processo de maturação (STOLL et al., 2002; BOUSSO et al., 2003). Nesse estágio, expressam altos níveis de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86), aumentam a expressão de moléculas do MHC I e MHC II e passam a expressar o marcador CD83, característico da DC ativada (ZHOU et al., 1992; EGNAER e HART et al., 1995).

No órgão linfóide, as DCs maduras apresentam antígenos aos linfócitos T naive antígeno-específicos, dando início, assim, à resposta imune adquirida (BANCHEREAU et al., 2000). A resposta principal dos linfócitos T é dependente de muitos fatores, incluindo a concentração de antígenos nas DCs, a afinidade dos receptores pelo pMHC correspondente, o estado de maturação da DC e o tipo de estímulo para maturação (GUETT et al., 2003). Por outro lado, a apresentação de antígenos por DCs imaturas é considerado um importante caminho pelo qual a tolerância a antígenos próprios do corpo é mantida. Os antígenos apresentados pelas DCs imaturas podem induzir tolerância, impossibilitando a proliferação e causando anergia dos linfócitos T, enquanto, simultaneamente, a apresentação de antígenos por DCs maduras estimula a ação efetiva destes linfócitos (PROBST et al., 2003; STEINMAN et al., 2003). A produção de citocinas como IL-12 (interleucina 12) durante o processo de maturação das DCs promove a indução de respostas do tipo Th1 (HEUFLER et al., 1996). Em contraste, IL-10 (interleucina 10) está identificada como a principal citocina que pode inibir tanto a diferenciação das DCs a partir de monócitos quanto a maturação das DCs, por bloquear a liberação de IL-12 (XIA e KAO, 2003). Dado o papel central das DCs na resposta imune, tais células são alvos de estudo em uma série de situações clínicas que envolvem principalmente linfócitos T, como: transplantes, alergias, doenças auto-imunes, imunodeficiência, resistência a infecções e a tumores, bem como a produção de vacinas (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998). Contudo, diversos fatores podem interferir no comportamento das DCs e comprometer sua utilização em situações clínicas.

Assim como outras células do SI, as DCs também estão sujeitas a modulação de suas respostas pela ação do SN. Existem várias maneiras pelas quais a funcionalidade destas células pode ser modulada pela ação do sistema neuroendócrino. Uma delas é via catecolaminas, que atuam diretamente no processo de migração de células dendríticas (ROUGASCH et al., 1999; MAESTRONI, 2000), além de atuarem na distribuição das DCs, a norepinefrina atua também, via receptores adrenérgicos presentes na membrana celular, na função destas células, fazendo com que estas diminuam a produção de IL-12 e aumentem de IL-10, após estímulo com LPS (MAESTRONI, 2006).

Outra via de modulação é a ação inibitória dos glucocorticóides sobre a maturação das DCs em seres humanos (PIEMONTI et al., 1999) ou em camundongos (MOSER et al., 1995), alterações que poderiam ter consequências muito amplas sobre a resposta imune. Essa ação dos GCs sobre a maturação de DCs parece depender também do momento no qual estas células foram tratadas, isto é, ao longo do processo de diferenciação de precursores em DCs, o uso da dexametasona (análogo sintético das GCs), acarretou diferentes alterações fenotípicas (MATYSZAK et al., 2004). É interessante notar que, embora os GCs sejam capazes de induzir uma maior expressão de receptores do tipo “toll” (TLR) isto, aparentemente, não interfere o processo de maturação das DCs (ROSKOVA et al., 2006).

Embora os mecanismos desta ação dos GCs sobre as DCs ainda não sejam completamente conhecidos, a liberação de GCs pode provocar um aumento nos níveis de IL-10, citocina que é capaz de induzir DCs murinas a manter um fenótipo imaturo ($CD80^{low}CD86^{low}$) (WAKKACH et al., 2003). Alternativamente, a IL-10 pode inibir diretamente a função de apresentação de antígenos das DCs, deste modo prevenindo a resposta imune mediada por células T, fenômeno que pôde ser demonstrado pela inibição da atividade lítica de células $CD8^{+}$ frente a melanócitos humanos quando estas foram cocultivadas com DCs tratadas com IL-10 (STEINBRIK et al., 1999). No entanto, neste mesmo trabalho foi possível observar que esta ação da IL-10 parece não ser eficaz em DCs maduras, da mesma forma que o observado com os GCs (MATYSZAK et al., 2004).

Além disso, células T reguladoras/supressoras, potencialmente induzíveis na presença de IL-10 (CHEN et al., 2003), são capazes de prejudicar a capacidade estimuladora das DCs, uma vez que parecem ser capazes de impedir a expressão

de moléculas co-estimuladoras pelas mesmas (MISRA et al., 2004) ou interferir com a duração de interação entre os linfócitos T e as DCs (TADOKORO et al., 2006). Desta forma a IL-10, uma citocina cuja produção é aumentada em diferentes condições de estresse (ELENKOV et al., 1996), poderia regular a resposta imune de duas maneiras: ou atuando diretamente na célula dendrítica ou agindo em células reguladoras que podem, por sua vez, afetar funcionalmente as DCs.

Embora a via mais comumente associada a este aumento de produção de IL-10 em indivíduos submetidos ao estresse dependa da produção de GCs, sabe-se que as diferentes maneiras de se induzir o estresse ou que diferentes constituições genéticas podem resultar em diferentes mudanças neuroquímicas nos mesmos (ADER et al., 1993; PARÉ et al., 1993; STRATAKIS et al., 1995). Ao mesmo tempo, os mais variados modelos de estresse já foram associados ao favorecimento do estabelecimento de tumores, evidenciando que, apesar de gerar situações endócrinas diferentes, as diversas formas de indução de estresse parecem ser capazes de criar um micro-ambiente favorável ao estabelecimento tumoral (SKLAR et al., 1980; VILLANO et al., 2001; PALERMO-NETO et al., 2003) mesmo que não se detecte o aumento, normalmente característico, de GCs nos animais estressados (MORGULIS et al., 2004).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo inicial a caracterização comportamental dos animais submetidos ao convívio com parceiro portador de um tumor diverso do já descrito na literatura (MORGULIS et al., 2004), o melanoma B16F10. Confirmada a alteração comportamental nestes animais, seria possível reforçar a validade do convívio com parceiro doente como modelo de estudo e, assim, utilizá-lo para avaliar as alterações funcionais de DCs de animais submetidos a agentes estressores aparentemente sutis. Além disto, procurou-se avaliar, ainda que não profundamente, alterações funcionais do sistema imune dos animais, frente a estímulos diferentes.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi verificar se o convívio de camundongos, fêmeas, C57Bl/6, sadias, com animais de mesma linhagem e idade, portadoras do melanoma murino B16F10, altera o comportamento e parâmetros imunofisiológicos dos animais sadios.

Desta forma, pretendeu-se, especificamente:

- avaliar se o modelo era capaz de alterar (no dia 20), o comportamento dos animais sadios (através de análises em Campo Aberto e Labirinto em Cruz-Elevado) e a concentração de corticosterona sérica;
- avaliar os efeitos do convívio, sobre a expressão das moléculas CD80, CD86, MHC classe II e CD11c pelas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas) presentes no baço e nos linfonodos dos animais;
- avaliar a expressão destes mesmos marcadores em células de medula óssea obtidas dos animais que conviveram com parceiro doente e diferenciadas, *in vitro*, em meio contendo GM-CSF e IL-4;
- avaliar os efeitos do convívio sobre o estabelecimento, *in vivo*, de uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio (frente à ovalbumina) analisando também, *in vitro*, a proliferação celular das células não-aderentes provindas de baço e dos linfonodos destes animais;
- avaliar o crescimento do melanoma B16F10 em animais sadios que conviveram com portadoras do tumor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados cerca de 160 camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6, com 4 a 8 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).

Antes do início dos experimentos, os animais foram alojados, por um período de cinco dias, em gaiolas de polipropileno (28 x 17 x 12 cm) em número de dois animais por gaiola para adaptação às condições experimentais. Estas gaiolas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26 °C) e umidade (65 a 70%) foram mantidas por meio de aparelhos de ar condicionado central, com ventilação, exaustão e luminosidade controladas, obedecendo-se a um ciclo claro – escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores NUTRILABOR GUABI®. Ração e água foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todos os experimentos.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (protocolo #720/2005) e com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) conforme aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo #089, fl.19, livro 2).

3.2 Tumor

Células do melanoma murino da linhagem B16F10 foram cultivadas em meio R-10 (RPMI 1640, GibCo BrL com 10% de Soro bovino fetal, GibCo BrL). As células foram mantidas em cultura a 37 °C em incubadoras com atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de água. A cada dois dias as culturas foram avaliadas quanto à necessidade de troca de meio e repique.

3.3 Estabelecimento do convívio com parceiro doente

Como modelo experimental foi utilizado um protocolo adaptado de Morgulis et al. (2004). Para tanto, os animais foram mantidos em pares nas caixas micro-isoladoras. Este pareamento foi realizado cinco dias antes do início dos experimentos (ED_0), observando apenas a equivalência de peso entre os animais de uma mesma caixa. As caixas foram denominadas aleatoriamente como “controle” e “estresse”.

No dia experimental 0 (ED_0), um dos camundongos da caixa “estresse” foi inoculado com $10^6/50 \mu\text{L}$ de células viáveis do melanoma B16F10 na pata traseira direita (via sub-cutânea), este foi chamado de animal doente (AD). Ao animal que convivia com este, nenhum procedimento foi adotado sendo ele designado como *Companheiro de Portador de Tumor* (CPT), objeto de nosso estudo.

Nesta mesma ocasião, um animal da caixa “controle” recebeu, por via sub-cutânea na pata traseira direita, $50 \mu\text{L}$ de R-10 (considerado como o AD). Ao outro nenhum procedimento foi realizado sendo designado como *Companheiro de Animal Sadio* (CAS), objeto controle de nosso estudo.

Esta interação entre os camundongos foi mantida por cerca de 20 dias após a inoculação do tumor ou PBS, sendo que o tumor tornava-se detectável por volta do dia 10 a 12 (ED_{10-12}).

3.4 Análise do comportamento dos animais

Ao final dos 20 dias de interação (ED_{20}), os camundongos foram analisados quanto ao comportamento. É importante ressaltar que todos os experimentos comportamentais foram realizados sempre em um mesmo período estipulado (8h – 9h) para minimizar a possível interferência do ritmo circadiano, e que os aparelhos foram lavados com uma solução a 5% de álcool em água entre cada utilização, este protocolo foi utilizado para evitarmos uma possível interferência dos odores produzidos pelo animal anterior. Vale lembrar também que, antes das medições, os animais permaneceram por um período superior a uma hora no ambiente onde seriam realizados os experimentos comportamentais (embora todo o equipamento se encontre no biotério) para aclimação. De qualquer forma, realizamos os experimentos alternadamente, sendo que sempre iniciávamos as aquisições de dados introduzindo um animal do grupo controle e, posteriormente um do grupo

experimental.

Estes experimentos foram realizados nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob a supervisão da Dr^a. Cristina de Oliveira Massoco e do Prof. Dr. João Palermo Neto sendo que contamos com o auxílio do pós-graduando Daniel Stankevicius, todos do Departamento e Patologia da Faculdade supra citada.

3.4.1 Campo Aberto

Neste experimento os animais foram colocados individualmente, na zona central de uma arena redonda feita de madeira (40 cm de diâmetro e com paredes de 20 cm de altura, sendo o conjunto todo elevado a 60 cm do solo) e a atividade locomotora analisada por cinco minutos com o auxílio de uma câmera de vídeo montada verticalmente à arena e conectada a um computador localizado em uma sala adjacente à experimental. A arena foi virtualmente dividida em quatro zonas: tigmotáctica, externa, média e central, da região mais próxima às paredes para o centro do aparelho (Fig. 3). Esta divisão foi realizada para que pudéssemos avaliar não só a atividade locomotora geral dos animais, mas também para avaliarmos a preferência manifestada por ele, em cada zona.

Este aparato fornece dados referentes principalmente à atividade locomotora geral dos animais, dados que poderiam ser indicativos também de uma maior ativação do Sistema Nervoso em decorrência de diversas situações. Desta forma, sabe-se que animais ansiosos apresentam uma menor atividade exploratória do campo aberto sendo que permanecem preferencialmente na zona tigmotáctica e tendem a evitar a zona interna (KELLEY, 1993).

Os dados analisados foram referentes à distância movida (cm), velocidade média (cm/s), tempo em exploração em cada zona (s) e número de entradas em cada zona, sendo estes dados adquiridos com o auxílio do software Ethovision System (Noldus Information Technology).

Figura 3. Fotografia da arena (aparelho total) do campo aberto. Na foto estão graficamente representadas as quatro diferentes zonas analisadas: Tigmotáctica (Tigmo), Externa, Intermediária (Interm.) e Central.

3.4.2 Labirinto em Cruz Elevado

Os animais foram colocados (um a um) no centro de um labirinto em forma de cruz e ficaram livres para explorá-lo por cinco minutos. Os animais foram introduzidos imediatamente após o campo aberto, pois este procedimento faz com que os animais explorem mais intensamente o labirinto em cruz e, conseqüentemente torna as diferenças de comportamento no aparelho, mais evidentes (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1987).

O labirinto consiste e assim foi virtualmente dividido em quatro braços: dois abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois fechados (parede de 20 cm) mais uma região central, sendo o sistema todo elevado a 60 cm do solo (Fig. 4). Os animais foram introduzidos na intersecção dos quatro braços (zona central) com a cabeça voltada para um braço fechado. O uso deste aparato é recomendado para avaliações de situações ansiolíticas, uma vez que, animais nesta condição permanecem menos tempo nos braços fechados e apresentam um maior número de entradas nos braços abertos (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1987).

Os dados analisados foram: número de entradas em cada zona, tempo de permanência em cada zona e distância movida em cada componente do aparato. Os dados foram adquiridos com o mesmo sistema de informática descrito no item 3.4.1.

Figura 4. Fotografia da arena (aparelho total) do labirinto em cruz-elevado. Na foto estão graficamente representadas as duas principais zonas analisadas: os dois braços abertos (BA) e os braços fechados (BF). A intersecção dos quatro braços foi denominada como zona central.

3.5 Avaliação do Nível de Corticosterona no Soro

Os animais foram sacrificados no ED₂₀ por decapitação. Para tanto, foram habituados a este procedimento nos cinco dias que antecederam ao protocolo de coleta de soro. A habituação ocorreu em relação ao ambiente onde a coleta seria realizada e à própria guilhotina, sendo que a cabeça dos animais era introduzida alternadamente na região de corte da guilhotina e, após cerca de cinco segundos nesta condição, os animais eram retirados e colocados de volta em suas gaiolas. Estes procedimentos foram adotados para que o animal se habituasse com o procedimento de forma tal que, no momento de coleta, os níveis de corticosterona não estivessem exacerbados em decorrência desta situação ansiogênica frente ao novo.

A determinação quantitativa de corticosterona presente no soro dos animais foi realizada através de kits comerciais (Coat-a-Count DPC MedLab). Para tanto, o sangue coletado dos animais foi acondicionado em tubos de 1,5 mL que foram mantidos em temperatura ambiente até a formação de coágulos (cerca de 2 horas). Os tubos foram centrifugados (629 g, 20min) e os soros obtidos e armazenados em

freezer (-80 °C) até a data da dosagem hormonal. A coleta de soro foi realizada sempre em uma mesma hora estipulada (7h00 – 8h00) a fim de não haver influência do ritmo circadiano na produção deste hormônio.

A concentração hormonal foi determinada por radioimunoensaio. Nesta técnica há competição da corticosterona marcada radioativamente (com I¹²⁵) e do hormônio contido em cada amostra pelos sítios de anticorpos fixados na parede dos tubos de ensaio. Experimentalmente, foram adicionados 50 µL de cada amostra e 1mL da corticosterona marcada em cada tubo e, este complexo mantido em temperatura ambiente por 2 horas até o equilíbrio ser atingido. A seguir, o conteúdo foi desprezado, sendo a leitura da radioatividade remanescente desta reação realizada no Contador Automático de Radiação Gama (Packard®). Os resultados finais das contagens foram expressos em ng/mL.

Para obtenção da curva padrão foram utilizados calibradores-padrão (50 µL) com concentrações previamente conhecidas de corticosterona, quais sejam: 0-20-50-100-200-500-1000-2000 ng/mL, no ensaio realizado.

Como controle foi utilizado um soro controle (50 µL) com concentração de 200 ng/mL de corticosterona no início, no meio e no final de ensaio. Os seguintes parâmetros de validação do ensaio foram registrados:

Sensibilidade do método: 91,30%

Coeficiente de variação baixo: 4,16%

Coeficiente de variação alto: 0,17%

Limite de detecção 3,161 ng/mL

Este experimento de quantificação de corticosterona sérica foi realizado no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP - SP.

3.6 Coleta das Células Aderentes dos Camundongos

Utilizamos um protocolo adaptado de Bjorck (2001) no qual os baços e linfonodos dos animais foram removidos cirurgicamente e mantidos em HBSS gelada. Estes foram macerados em telas de aço inoxidáveis estéreis com porosidade de 0,25 mm e lavadas três vezes em HBSS a 4°C, 290g por 10 minutos. Seguiu-se então a lise de eritrócitos através de uma solução de Cloreto de Amônio

(0,16M). Após contagem das células, estas foram mantidas em placas plásticas por um período de 2 horas em estufa (37 °C, 5% CO₂) para aderência. As células aderentes foram imunofenotipadas (item 3.8) ou foi realizado a separação imunomagnética (item 3.6.1).

3.6.1 Isolamento da subpopulação CD11c⁺

A população CD11c⁺ foi isolada por seleção positiva em coluna imunomagnética. Para tanto, após a aderência das células esplênicas, estas foram incubadas por 20 minutos, a 4°C, com esferas magnéticas específicas (Miltenyi Biotec), ajustando-se a concentração celular pela indicada. Após este período, as células foram lavadas para remoção de esferas excedentes, e introduzidas em coluna de afinidade (tipo MS) acoplada ao VarioMACS (Miltenyi Biotec). Para maior pureza as células foram reintroduzidas na coluna. As células positivas (CD11c⁺) foram isoladas e ressuspensas em solução tampão para posterior imunofenotipagem.

3.7 Diferenciação de Células Dendríticas a partir de Células de Medula Óssea

Para a diferenciação de células dendríticas a partir de precursores de medula óssea foi utilizado o método proposto por Inaba et al. (1992) com algumas modificações. Em suma, a medula óssea foi retirada de fêmures e tíbias dos animais pela lavagem do interior dos ossos com meio R-1 (meio R10 diluído 10x em meio RPMI-1640) ou HBSS (Hanks Balanced Salt Solution), por intermédio de agulhas estéreis. Estas células foram lavadas (4 °C, 290 g e 10min) neste mesmo meio e os eritrócitos foram removidos pela lavagem em tampão de lise de hemácias (Cloreto de amônio – 0,16M). As células restantes foram novamente lavadas, contadas e mantidas em meio de diferenciação contendo 8×10^{-3} µg/mL de mGM-CSF (R&D, Peprotech) e 1ng/mL de IL-4 (R&D, Peprotech). Este meio foi renovado no 4º dia de cultura (removendo 75% do meio). Como estímulo de maturação foi adicionado 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS, SigmaAldrich) no quinto dia de cultura.

3.8 Análise Fenotípica em Citômetro de Fluxo

As células foram lavadas e ressuspensas em 100µl/poço de tampão de citometria (PBS contendo 0,5% (p/v) de soroalbumina bovina e 0,02% (p/v) de azida sódica). Após outro ciclo de lavagem (290 g, 10min) as células foram ressuspensas em tampão e adicionadas aos marcadores específicos. Após incubação por 20 minutos a 4 °C e no escuro, as células foram lavadas duas vezes em tampão para citometria (100 µl/poço). As células foram, então ressuspensas em 150 µL de tampão para citometria contendo 2% de paraformaldeído, para fixação das células. A seguir foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo, analisando-se 10.000 eventos por reação. Para a análise dos resultados foi utilizado o “software” CellQuest (BD).

A imunofenotipagem das células geradas *in vitro* (item 3.7) e isoladas do baço (item 3.6) foi realizada analisando a frequência e a intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores CD80, CD86, I-A^b e CD11c (tabela I). A aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo em aparelho FACSCalibur (Becton & Dickinson). Para análise utilizamos o software WinMDI® versão 2.8. O anticorpo anti-CD14 humano foi utilizado como controle isotópico para o anti-IA^b.

Tabela I – Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de citometria de fluxo.

Especificidade	Clone	Origem	Marcação	Fabricante
Anti-CD80	RMMP-1	IgG2a, rato	PE	BD Biosciences
Anti-CD11c	HL3	IgG1k, hamster	APC	BD Biosciences
Anti-CD11c	HL3	IgG1k, hamster	FITC	BD Biosciences
Anti-Iab	I-A ^b	IgG2ak, murino	PE	BD Biosciences
Anti-CD86	RMMP-2	IgG2a, rato	FITC	BD Biosciences
Anti-CD14 humano	M5E2	IgG2ak, murino	FITC	BD Biosciences

3.9 Estabelecimento de Hipersensibilidade do Tipo Tardio

Foi utilizado um protocolo adaptado de Macedo & Barbuto (1988) com algumas modificações. Os animais sadios de ambos os grupos (ao final do protocolo de indução de estresse, ED₂₀) foram inoculados subcutaneamente com 50 µg de OVA (albumina de ovo – SIGMA Aldrich) emulsificada em 0,1 mL de adjuvante completo de Freund (CFA, Gibco – BRL). Decorridos oito dias da data de sensibilização com OVA, os animais foram desafiados também s.c. no coxim plantar com uma solução de OVA agregada a 2%. O crescimento na espessura da pata foi medida em momentos estipulados (1h, 6h e 48h), para verificação do processo inflamatório inicial e do estabelecimento de uma hipersensibilidade do tipo tardio. Para avaliar o crescimento da pata, os dados de cada momento foram subtraídos do valor inicial de cada coxim plantar. Ao final das 48 horas, os animais foram eutanasiados e seus baços e linfonodos foram removidos e processados para avaliações *in vitro*.

3.9.1 Ensaio de proliferação linfocitária

Após aderência de pelo menos 2 horas em estufa (5% de CO₂ a 37 °C), as células não-aderentes provenientes dos órgãos linfóides obtidos dos animais no item 3.9 foram coradas com CFSE (5mM, Molecular Probes) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas (400 g por 8 minutos a 20 °C), sendo quantificadas.

As células aderentes, oriundas do mesmo ensaio de aderência, foram pulsadas com 1 mg de Ovalbumina, por uma hora. Neste, as células foram incubadas por uma hora com 1 mg de OVA e, após este período, foram novamente lavadas para a remoção da OVA excedente.

Co-incubamos, então as células não-aderentes com células aderentes na concentração de 30:1 (não-aderentes:aderentes) por quatro ou sete dias. Após estes períodos as células foram coletadas, lavadas e analisadas em citômetro de fluxo quanto à perda de fluorescência.

Para a análise dos dados de proliferação, foi criado um índice de proliferação (IP), permite mensurar a queda na intensidade de fluorescência das células marcadas, que será tanto maior, quanto maior for o número de divisões, e foi

calculado da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Média geométrica da intensidade de fluorescência de LT cultivados isoladamente}}{\text{Média geométrica da intensidade de fluorescência das co-culturas}}$$

3.9.2 Quantificação de IL-10

O sobrenadante das co-culturas estabelecidas no item 3.9.1 foi coletado e armazenado para posterior quantificação de IL-10. As dosagens de citocinas foram realizadas por ELISA, utilizando os kits OptEIA para citocinas (BD Biosciences). Neste método, placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc International) foram sensibilizadas com 100 μL por poço de anticorpo de captura diluído em tampão PBS, e incubadas por uma noite. Após 3 lavagens com 400 μL /poço de tampão de lavagem para ELISA, as placas foram bloqueadas com 300 μL /poço de tampão de bloqueio por 2 horas a temperatura ambiente. Após 3 lavagens, as amostras foram incubadas por um período de 2 horas em temperatura ambiente. Para a curva padrão da citocina foram incubadas duplicatas de 50 μL /poço das diluições seriadas das citocinas recombinantes, conforme recomendações do fabricante. O período de incubação das amostras e curva padrão foram de 2 horas em temperatura ambiente. Após três lavagens foram adicionados 50 μL /poço do anticorpo de detecção, com incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente, a placa foi lavada três vezes, 50 μL /poço de estreptoavidina foi adicionada e incubada por 20min, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 50 μL /poço de H_2SO_4 (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

3.10 Avaliação do crescimento tumoral

Ao final dos 20 dias de convívio com o parceiro doente tanto animais dos grupos CAS como os do CPT foram “desafiados” com o melanoma B16F10. Para tanto, 10^6 células tumorais viáveis foram inoculadas no coxim plantar direito (s.c.) e a espessura da pata medida com o auxílio de paquímetro (Mitutoyo) pelos 21 dias seguintes. O crescimento da pata foi calculado subtraindo o valor obtido em cada dia

com o respectivo valor inicial.

3.11 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o software GraphPad Prisma. Inicialmente realizamos teste de Bartlett para verificar se os dados eram paramétricos. Após esta constatação, utilizamos o Teste t de Student para determinar diferenças estatísticas entre os CPT e CAS. Os dados estão apresentados como média aritmética $\pm$ desvio padrão (SD) ou erro padrão (SEM), conforme indicado na legenda. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada como capaz de mostrar diferenças significativas.

3.12 Delineamento Experimental

3.12.1 Caracterização dos efeitos do convívio com parceiro doente através de metodologias comportamentais e bioquímicas

Para determinarmos se o convívio com parceiro portador do melanoma B16F10 alterava o comportamento dos animais realizamos dois procedimentos de avaliação comportamental: campo aberto (item 3.4.1) e labirinto em cruz elevado (item 3.4.2). Foram realizados dois experimentos independentes (replicações) partindo de cinco animais de cada grupo. Para análise dos resultados tivemos um número amostral de oito animais para cada grupo, uma vez que não se observou crescimento tumoral adequado no parceiro doente em todas as ocasiões. A quantificação dos níveis de corticosterona (item 3.5) foi realizada com o soro de outros cinco animais de cada grupo. Estes animais foram sacrificados por decapitação e o sangue coletado para dosagem hormonal. Os órgãos linfóides foram coletados para imunofenotipagem de algumas subpopulações celulares presentes no baço e no linfonodo. Os fêmures destes animais foram coletados para posterior diferenciação de precursores em DCs.

3.12.2 Análise da influência do convívio com portador de tumor nas células provindas de órgãos linfóides

Foram realizados três experimentos independentes com cinco animais cada.

Adicionalmente utilizamos o material obtido no experimento 2. No ED₂₀ os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e removemos cirurgicamente os órgãos linfóides (baço ou linfonodos). Após ensaio de aderência (item 3.6) de, pelo menos duas horas separamos as células não-aderentes das aderentes e, nestas a sub-população CD11c⁺ (item 3.6.1). Estas diferentes sub-populações foram imunofenotipadas e analisadas por citometria de fluxo (item 3.8).

3.12.3 Caracterização dos efeitos do convívio com parceiro portador de tumor sobre as células dendríticas derivadas de medula óssea

Os animais utilizados nos experimentos 2 também tiveram seus fêmures e tíbias removidos para obtenção, após lavagem, de células precursoras da medula óssea. Ao total realizamos três experimentos independentes. Estas células foram mantidas em meio de diferenciação contendo GM-CSF e IL-4 por sete dias, sendo ativadas com LPS nos últimos dois dias (item 3.7). Ao final deste período as células foram marcadas e analisadas por citometria de fluxo.

3.12.4 Análise da influência do convívio com parceiro portador de tumor sobre o estabelecimento de Hipersensibilidade do Tipo Tardio à Ovalbumina

Foram realizados três experimentos independentes com cinco animais em cada grupo (totalizando 20 animais por experimento). Nestes experimentos os animais (CAS e CPT) foram mantidos isolados (uma vez que os seus companheiros foram eutanasiados) e inoculados, no ED₂₀, com uma solução contendo Ovalbumina emulsificada em adjuvante completo de Freund. Decorridos oito dias, realizamos um desafio antigênico (OVA agregada) e acompanhamos por 48 horas o crescimento da pata inoculada (item 3.9). Neste mesmo momento, os animais foram eutanasiados por CO₂ e tiveram seus baços e linfonodos removidos para as análises *in vitro* (itens 3.9.1 e 3.9.2).

3.12.5 Caracterização dos efeitos do convívio com parceiro portador de tumor sobre o estabelecimento do tumor B16F10

Foi realizado apenas um experimento para avaliarmos o crescimento do tumor B16F10, sendo utilizados, no total, 20 animais (número amostral final de cinco animais por grupo). No ED₂₀, os animais dos grupos CAS ou CPT foram isolados

(uma vez que o animal que convivia, portador ou não do melanoma foi eutanasiado), sendo inoculados, por via subcutânea na pata traseira esquerda com 10^6 células viáveis do melanoma B16F10. O crescimento do tumor foi acompanhado por outros 21 dias (item 3.10).

Vale ressaltar que em todos os experimentos, caso não fosse constatado o aparecimento do tumor no companheiro doente (AD) até o ED₁₂, o par era descartado da amostragem experimental.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterizações comportamentais dos efeitos do convívio com um parceiro doente

Com o objetivo de avaliar os efeitos do convívio com um parceiro portador de um tumor (B16F10) sobre o comportamento dos animais, realizamos experimentos no Campo Aberto e no Labirinto em Cruz-Elevado, metodologias que permitem inferências sobre situações que envolvem ansiedade. Realizamos dois experimentos independentes sendo que o número amostral total foi de oito animais ($n=8$).

4.1.1 Campo Aberto

Os resultado obtidos no campo aberto indicam que os animais que conviveram com animais portadores do B16F10 (CPT) apresentaram uma maior movimentação quando comparados aos animais controles (CAS), esta movimentação foi caracterizada pelo aumento significativo na distância total movida na arena; no entanto, não pôde ser caracterizada preferência por alguma zona específica do campo aberto (Fig. 5). Também observamos o desenvolvimento de uma maior velocidade média pelos animais, principalmente na exploração da zona tigmotáctica (Fig. 6). Os animais CPT apresentaram, ainda em relação aos do grupo CAS, o mesmo tempo de exploração em cada zona (Fig. 7) e trocaram de zonas com a mesma frequência (Fig. 8).

Vale lembrar que, neste aparelho, os animais, não importando o tratamento, apresentam maior atividade locomotora nas zonas mais próximas à parede. Ao contrário, os dados referentes à velocidade média apresentam-se maiores em locais afastados da parede, isto é, nas zonas centrais foram encontrados maiores valores.

Figura 5. Distância total (cm) movida nas diferentes zonas (arena total, tigmotáctica, externa, média e Interna) do Campo Aberto por animais sadios que conviveram por 20 dias com um parceiro sadio, CAS (□) ou com parceiro portador de tumor, CPT (■). Os dados foram apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) com $n=8$ em dois experimentos independentes. ★ indica $p < 0,05$ (teste t de Student).

Figura 6. Velocidade Média (cm/s) nas diferentes zonas (arena, tigmotáctica, externa, média e interna) do Campo Aberto por animais sadios que conviveram por 20 dias com um parceiro sadio, CAS (□) ou com parceiro portador de tumor, CPT (■). Os dados foram apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) com $n=8$ em dois experimentos independentes. ★ indica $p < 0,05$ (teste t de Student).

Figura 7. Percentual de tempo em exploração nas diferentes zonas (tigmotáctica, externa, média e interna) do Campo Aberto por animais sadios que conviveram por 20 dias com um parceiro sadio, CAS (□) ou com parceiro portador de tumor, CPT (■). Os dados foram apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) com $n=8$ em dois experimentos independentes. ★ indica $p < 0,05$ (teste t de Student).

Figura 8. Número de entradas nas diferentes zonas (tigmotáctica, externa, média e interna) do Campo Aberto por animais sadios que conviveram por 20 dias com um parceiro sadio, CAS (□) ou com parceiro portador de tumor, CPT (■). Os dados foram apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) com $n=8$ em dois experimentos independentes. ★ indica $p < 0,05$ (teste t de Student).

4.1.2 Labirinto em Cruz-Elevado

Logo após os experimentos no Campo Aberto, os animais foram introduzidos no Labirinto em Cruz-Elevado. Embora não tenhamos constatado diferenças na distância movida pelos animais CPT quando comparados aos CAS em nenhuma das zonas deste aparelho (Fig. 9), notamos que os animais do grupo CPT permaneceram mais tempo explorando os Braços Fechados e menos tempo nos Braços Abertos e na Zona Central (Fig. 10); os animais do grupo CPT apresentaram, também uma menor frequência de entradas nos Braços Abertos em relação àquela do grupo CAS (Fig. 11).

Figura 9. Distância Movida (cm) nas diferentes zonas (braços abertos, central e braços fechados) do Labirinto em Cruz-Elevado por animais sadios que conviveram por 20 dias com um parceiro sadio (□) ou com parceiro portador de tumor (■). Os dados foram apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) com $n=8$ em dois experimentos independentes.

Figura 10. Percentual de tempo em exploração nas diferentes zonas (braços abertos, central e braços fechados) do Labirinto em Cruz-Elevado por animais sadios que conviveram por 20 dias com um parceiro sadio (□) ou com parceiro portador de tumor (■). Os dados foram apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) com $n=8$ em dois experimentos independentes. ★ indica $p < 0,05$.

Figura 11. Número de entradas nas diferentes zonas (braços abertos, central e braços fechados) do Labirinto em Cruz-Elevado por animais sadios que conviveram por 20 dias com um parceiro sadio (□) ou com parceiro portador de tumor (■). Os dados foram apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) com $n=8$ em dois experimentos independentes. ★ indica $p < 0,05$ (teste t de Student).

4.2 Análise da concentração de corticosterona no soro dos animais

Para verificar uma possível ativação do eixo HPA, em decorrência do convívio com o parceiro doente, coletamos o soro dos animais dos grupos CAS e CPT e quantificamos a concentração de corticosterona. Este experimento foi realizado em uma única ocasião, com um número amostral de cinco animais/grupo (n=5).

Não constatamos diferenças significantes na concentração de corticosterona presente nos soros dos animais do grupo CPT (CAS: $41,68 \pm 38,36$ X CPT: $31,57 \pm 8,86$, media $\pm$ SD). O alto valor de desvio padrão observado para os animais do grupo controle indica uma maior variação individual do hormônio nesse grupo do que no grupo CPT. Ao analisarmos a variância, pudemos evidenciar que esta variação individual foi significativamente diferente entre os grupos (CAS: 92,04% X CPT: 28,07%, $p=0,019$).

4.3 Análise fenotípica de células dos baços

Para avaliar o efeito do convívio com um parceiro doente sobre o fenótipo das células esplênicas, coletamos os baços dos animais e analisamos a expressão de algumas moléculas de superfície, por citometria de fluxo, após marcação.

4.3.1 População aderente total

Baços dos animais dos grupos CAS ou CPT foram cirurgicamente retirados e, após lise de eritrócitos, procedeu-se à marcação para moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), integrina CD11c e a molécula apresentadora de antígeno I-A^b (MHCII), as quais foram analisadas em Citômetro de Fluxo.

Observamos que tanto as células provenientes dos animais do grupo CAS quanto aquelas do grupo CPT apresentaram uma alta frequência de células I-A⁺ (Fig. 15C e 15D). Vale ressaltar, ainda, que para a molécula I-A^b utilizamos um controle isotópico (no caso o anti-CD14 humano) para eliminar a possibilidade de marcação inespecífica (MFI: não-marcado:2,14; controle isotópico: 2,80).

Em relação à expressão da integrina CD11c, notamos uma alta frequência de células duplo positivas em ambos os grupos (CAS: $58,39\% \pm 2,54$; CPT: $57,85\% \pm 3,49$, $p=0,81$; Fig. 15C e 15D). Tendo em vista que estas células esplênicas tinham sido inicialmente separadas por aderência, a porcentagem de células encontradas

excedeu as expectativas que tínhamos para a população de células dendríticas presentes no baço. É interessante notar, ainda, que a maioria das células I-Ab⁺ expressa também o marcador B220 (Fig. 15E e 15F), o que nos possibilitou caracterizá-las como possíveis linfócitos B. Desta forma, subdividimos virtualmente as células em duas subpopulações, de acordo com o nível de expressão de CD11c; I-Ab⁺CD11c^{low} e I-Ab⁺CD11c^{high} (Fig. 15G e 15H). Mesmo após esta subdivisão, não constatamos diferenças no nº de células que compõe cada subpopulação (Fig. 16).

Figura 15. Dot Plots representativos de três experimentos independentes (n=8 animais/grupo). Como controle utilizamos as células dos animais do grupo CAS ou do grupo CPT sem marcação (A e B) e avaliamos a expressão de IAb x CD11c (C, D, G e H), de IAb x B220 (E e F). Para posterior análise as células foram subdivididas de acordo com o nível de expressão de CD11c em CD11c^{low} e CD11c^{high} (G e H).

Figura 16. Porcentagem de células I-Ab⁺CD11c⁺. Após aderência de, pelo menos 2 horas, as células esplênicas de animais do grupo CAS (barras vazias) ou CPT (barras cheias) foram incubadas com anti-CD11c e anti-Iab. A população CD11c⁺ foi posteriormente dividida em CD11c^{low} e CD11c^{high}. Dados apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) de três experimentos (n=8 animais/grupo).

Quanto às moléculas co-estimuladoras, verificamos que as células esplênicas provenientes dos animais do grupo CPT apresentaram uma maior quantidade de células CD80⁺CD86⁺ (Fig.17A e 17B). Adicionalmente, observou-se que esta diferença deveu-se, principalmente a um aumento na intensidade de fluorescência de CD80 (MFI: CAS=6,45; CPT=20,47 - Fig.17D) sendo que a intensidade do CD86 pouco se alterou (MFI: CAS=15,54; CPT=17,65 - Fig. 17C).

Figura 17. Expressão de moléculas co-estimuladoras pelas células aderentes de baço de animais do grupo CAS (A) ou CPT (B). Sobreposição de histogramas da expressão de CD80 (C) ou CD86 (D) em células de animais do grupo CAS (- -) ou de animais do grupo CPT (-). Como controle, células sem marcação do grupo CAS (■) ou do grupo CPT (□). Figuras representativas de dois experimentos independentes (n=6 animais/grupo).

Este aumento na expressão da molécula co-estimuladora CD80, observado para as células aderentes totais de animais de ambos os grupos, também pôde ser evidenciado após definirmos as subpopulações $CD11c^{low}$ e $CD11c^{high}$ (Fig. 18A); da mesma forma, a expressão de CD86 não apresentou diferenças entre os grupos CAS e CPT após a subdivisão das células de acordo com o nível de expressão da molécula CD11c (Fig. 18B).

Figura 18. Expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 (A) e CD86 (B) nas células aderentes I-Ab⁺ CD11c^{low} ou CD11c^{high} de animais do grupo CAS (barras vazias) ou CPT (barras cheias). Dados apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) de dois experimentos independentes (n=6 animais/grupo). ★ indica $p < 0,05$ (test t de Student).

4.3.2 População CD11c⁺

Para analisar, de outra maneira, se o fenômeno observado ocorria na subpopulação de células dendríticas, os baços de animais de ambos os grupos foram cirurgicamente retirados e, após lise de eritrócitos, a população CD11c⁺ foi isolada por separação em coluna imunomagnética.

Procedeu-se, então à marcação para as moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e as células foram analisadas em Citômetro de Fluxo. De fato, pudemos comprovar que tanto os esplenócitos como a subpopulação CD11c⁺ provenientes dos animais do grupo CPT expressaram moléculas co-estimuladoras em maiores quantidades quando comparadas aos do grupo controle, CAS (Fig. 19C e 19D).

Figura 19. Análise fenotípica de esplenócitos CD11c⁺ provenientes de animais que conviveram com parceiro sadio (C) ou com parceiro portador de tumor (D). Como controle foram utilizadas células não marcadas do grupo CAS (A) e do CPT (B). Dot Plots representativos de dois experimentos independentes (n=6 animais/grupo).

4.4 Análise fenotípica das Células Aderentes Isoladas de Linfonodos

Após analisarmos as células esplênicas, analisamos a distribuição e expressão destes mesmos marcadores nas populações dos linfonodos. Assim como os baços, os linfonodos poplíteos foram removidos cirurgicamente e, após lise dos eritrócitos em tampão de cloreto de amônio e aderência por 2 horas, as células aderentes foram marcadas para CD80, CD86, CD11c e I-A^b.

De maneira interessante, verificamos a presença de uma população I-A^b com marcação intermediária nas células dos linfonodos provenientes dos animais do grupo CPT (Fig. 20C) quando comparadas às células dos animais do grupo CAS (Fig. 20B). No entanto, a intensidade de fluorescência não tenha se alterou de forma significativa entre os dois grupos (MFI: CAS= $319,1 \pm 36,27$; CPT= $365,6 \pm 145,6$ – Fig. 21A). De maneira semelhante, a população IAb⁺CD11c⁺ também não foi alterada após o convívio com parceiro doente (CAS: $4,33\% \pm 1,3$ X CPT: $3,19 \pm 0,81$ – Fig. 20).

Além disso e ao contrário do observado para as células esplênicas, constatamos uma leve diminuição no n° de células CD80⁺CD86⁺ no grupo CPT (Fig. 20E) quando comparado com os dados do grupo CAS (Fig. 20D). Todavia a MFI da molécula CD80 (MFI: CAS= $12,67 \pm 1,35$; CPT= $20,05 \pm 8,8$ – Fig. 19B) e a de CD86 não apresentaram alterações significantes (MFI: CAS= $10,72 \pm 2,11$; CPT= $10,65 \pm 0,65$ – Fig. 21C).

Figura 20. Avaliação fenotípica de células aderentes de linfonodos poplíteos provenientes de animais controle (A e C) ou estressados (B e D). As células foram avaliadas quanto à expressão de CD11c e I-A^b (A e B) ou CD86 e CD80 (C e D). Dot Plots representativos de três experimentos independentes (n=8 animais/grupo /experimento).

Figura 21. Expressão das moléculas do IAb (A), CD80 (B) ou CD86 (C) nas células aderentes dos linfonodos de animais do grupo CAS (barras vazias) ou CPT (barras cheias). Dados apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) de dois experimentos independentes (n=6 animais/grupo).

4.5 Análise fenotípica de células de medula óssea diferenciadas *in vitro*

Uma vez que havia a possibilidade do convívio com um parceiro doente influenciar as células presentes nos órgãos linfóides e também os seus precursores, analisamos fenotipicamente as células diferenciadas a partir de precursores das medulas ósseas, mantidas por sete dias em meio contendo GM-CSF e IL-4 e ativadas por 48 horas com LPS.

Ao compararmos a porcentagem de células IAb⁺ no início da cultura, com o observado após o período de diferenciação, notamos um aumento na porcentagem destas células nos animais dos dois grupos (Fig. 22A). Tendo em vista que a porcentagem de células apresentadoras (IAb⁺) não era diferente, analisamos a expressão das moléculas co-estimuladoras em ambos os períodos. Quanto ao CD86, observamos aumento do n° de células positivas nos animais dos dois grupos. Este aumento seria esperado, uma vez que as condições de cultura deveriam induzir a diferenciação de precursores em células dendríticas. No entanto, apenas nas células provenientes de animais do grupo CPT pudemos constatar diferenças significativas (Fig. 22B). Já para a porcentagem de células expressando CD80 notamos que eventos diferentes aconteceram com as células dos animais dos grupos CAS e CPT. Após sete dias em cultura, grande parte das células dos animais do grupo CAS passaram a expressar este marcador, enquanto as células dos animais do grupo CPT deixaram de expressar esta mesma molécula de superfície (Fig. 22C).

Figura 22. Porcentagem de células IAb⁺ (A), CD86⁺ (B) ou CD80⁺ (C). Células de medula óssea de animais do grupo CAS (barras vazias) ou CPT (barras cheias) foram diferenciadas em meio contendo GM-CSF e IL-4 por sete dias e ativadas nas últimas 48 horas. Dados apresentados como média aritmética $\pm$ erro padrão (SEM) de dois experimentos independentes (n=6 animais/grupos). ★ indica $p < 0,05$ e ★★ $p < 0,01$ (test t de Student).

De maneira interessante, além do nº de células CD80⁺ ter diminuído, as células diferenciadas dos animais do grupo CPT apresentaram uma redução não significativa no nível de expressão desta molécula (MFI: CAS= $162,2 \pm 39,18$ X CPT= $81,1 \pm 40,62$, n=6), enquanto que a MFI de CD86 pouco se alterou (Fig. 23C e 23D). Embora a porcentagem de células CD80⁺CD86⁺ tenha permanecido em níveis semelhantes, foi possível constatar visivelmente o desaparecimento de uma subpopulação CD80^{high}, como ilustrado na figura 23.

Figura 23. Análise fenotípica das células de Medula Óssea tratadas por sete dias com GM-CSF e IL-4 proveniente de animais que conviveram com parceiro sadio (C) ou com parceiro portador de tumor (D). Como controle foram utilizadas células não marcadas de animais do grupo CAS (A) ou do CPT (B). Dot plots representativos de três experimentos independentes (n=6 animais por grupo).

4.6 Estabelecimento de Reação de Hipersensibilidade do Tipo Tardio

4.6.1 Condições subótimas de sensibilização

Para avaliar se o convívio com companheiro portador de tumor interferiria em parâmetros imunes, optamos por avaliar o estabelecimento de uma DTH frente a Ovalbumina. Realizamos no total dois experimentos independentes, sendo que ao final o número amostral foi de oito animais. No entanto, após estas repetições, notamos um erro metodológico foi cometido quando na sensibilização dos animais

com ovalbumina em adjuvante completo de Freund: a emulsificação não foi realizada de maneira satisfatória.

De qualquer maneira, pudemos observar que animais de ambos os grupos apresentaram uma reação inflamatória inicial de intensidade semelhante sendo esta ainda detectada após cerca de seis horas após o desafio antigênico (Fig. 24). Decorridas 48 horas do momento do desafio, a espessura das patas dos animais do grupo CPT voltou a níveis próximos do basal enquanto que aquela dos camundongos do grupo CAS apresentou um aumento, compatível com o esperado numa reação de hipersensibilidade do tipo tardio, embora em valores absolutos baixos (Fig. 24).

Figura 24. Aumento da espessura da pata dos animais do grupo CAS (□) e CPT (■). Os animais foram previamente sensibilizados com uma solução de OVA + CFA e, após oito dias desafiados no coxim plantar com OVA 2% agregada. O aumento da pata foi medido e subtraído do valor inicial. Dados apresentados como média aritmética $\pm$ desvio padrão (SD) (n=8 animais/grupo)★ indica $p < 0,05$

4.6.1.1 Ensaio de Proliferação

Tendo em vista que os animais do grupo CPT não apresentaram uma resposta cutânea à OVA da mesma maneira que os do grupo CAS o fizeram, realizamos ensaios *in vitro* para avaliar a resposta proliferativa das células esplênicas quando estimuladas com OVA. As células linfóides foram inicialmente

definidas através de um “gate” em tamanho e granularidade (Fig 25A) e o índice de proliferação foi calculado a partir de células não aderentes marcadas com CFSE e não estimuladas (Fig 25B). Com quatro dias de co-cultura, o índice de proliferação calculado para os animais de ambos os grupos foi bastante similar (Fig 25C; CAS: 1,97 X CPT: 1,72). No entanto, após sete dias em co-cultura, as células dos animais CAS apresentaram um índice de proliferação maior que aquelas dos animais do grupo CPT (Fig 25D; CAS: 2,00 X CPT: 1,09).

Figura 25. Sobreposição dos histogramas representativos da intensidade de fluorescência, pela subpopulação linfocitária determinada através de um “gate” por tamanho (FSC) e granularidade (SSC) (A), e o índice de proliferação calculado de acordo com a perda de fluorescência (B; histograma cheio representa a proliferação após estímulo pelo mitógeno conA e o histograma vazio a incorporação de CFSE sem estímulo). Células não-aderentes foram incubadas com CFSE e co-cultivadas com células aderentes pulsadas com 1 mg de OVA por quatro dias (C) ou sete dias (D). Células de animais controles (CAS) representados nos histogramas cheios e os estressados (CPT) em vazio. n=8 animais/grupo

4.6.1.2 Quantificação de IL-10

Com o intuito de avaliar a concentração de IL-10 no sobrenadante das co-culturas descritas acima, realizamos a quantificação desta interleucina pelo método de ELISA.

Nos animais do grupo CPT, o sobrenadante das co-culturas mantidas por quatro dias apresentou quantidade detectável de IL-10 ($248,90 \pm 5,99$ pg/mL; Fig. 26) ao passo que as co-culturas do grupo CAS apresentaram níveis abaixo do limiar de detecção para esta mesma citocina. Após sete dias, no entanto, a concentração de IL-10 presente no sobrenadante de ambas co-culturas foi semelhante (CAS: $79,70 \pm 68$ pg/mL X CPT: $75,19 \pm 29,51$ pg/mL; Fig. 26).

Figura 26. Quantificação de IL-10 no sobrenadante de co-culturas de células esplênicas aderentes pulsadas com 1mg de ovalbumina e co-cultivadas com células esplênicas não aderentes por 4 ou 7 dias. As células foram isoladas de animais do grupo CAS (barras vazias) ou CPT (barras cheias). Os dados foram apresentados como média aritmética $\pm$ desvio padrão (SD) de triplicatas (n=8 animais/grupo) N.D. = não detectado.

4.6.2 Sensibilização em condições aprimoradas

O protocolo de sensibilização utilizado foi revisto, sendo a emulsificação feita, agora, de maneira apropriada. No entanto, não foi possível a realização de muitos experimentos devido a problemas ocorridos com o estabelecimento do melanoma B16F10. Nesta nova condição, não pudemos constatar as diferenças observadas para a sensibilização em condições subótimas, sendo que os valores obtidos neste

experimento são mais elevados, estando, assim, de acordo com o descrito na literatura (Fig. 27).

Figura 27. Aumento da espessura da pata de CAS (□) ou CPT (■). Os animais foram previamente sensibilizados com uma emulsão de OVA em CFA e, após oito dias desafiados no coxim plantar com OVA 2% agregada. O aumento da pata foi medido e subtraído do valor inicial. Dados apresentados como média aritmética $\pm$ desvio padrão (SD) (n=3 animais/grupo)★ indica $p < 0,05$

4.7 Avaliação do estabelecimento do melanoma B16F10

Um dos objetivos do presente projeto foi analisar a influência do convívio com parceiro portador do melanoma B16F10 sobre o estabelecimento deste mesmo tumor.

Para tanto, decorridos os 20 dias de convívio, animais de ambos os grupos (CAS e CPT) foram inoculados, via subcutânea, com 10^6 células de B16F10 viáveis. Após acompanhamento por 22 dias após a data da inoculação do melanoma (que ocorreu no ED₂₀), não evidenciamos, em nenhum momento, diferenças significativas entre os dados dos dois grupos (Fig. 28).

Figura 28. Aumento da espessura da pata em animais CPT (▲) ou CAS (■) após inoculação de 10⁶ células viáveis do melanoma B16F10. Dados representados pela média aritmética ± desvio padrão (SD) de um único experimento (n=5 animais/grupo).

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho apontam para a mesma direção que outros do grupo de neuroimunomodulação (MORGULIS et al., 2004; ALVES et al., 2006) e acrescentam novas informações, pois animais que conviveram com portadores do melanoma B16F10 apresentaram: 1) aumento na locomoção geral observada no campo aberto; 2) aumento no tempo em exploração dos braços fechados e diminuição no tempo em exploração e no nº de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz-elevado; 3) alteração na variância do nível de corticosterona, mas não no valor médio de concentração hormonal quando comparado aos animais controle; 4) aumento no nível de expressão de CD80 por células esplênicas, mas não nas células provenientes de linfonodos; 5) diminuição na quantidade de células CD80⁺ e aumento de células CD86⁺ após cultura *in vitro* de precursores de medula óssea em meio para diferenciação de células dendríticas; 6) diminuição de uma resposta cutânea à ovalbumina, fenômeno aparentemente relacionado à expansão de células produtoras de IL-10. No entanto, o convívio com um parceiro doente não alterou o estabelecimento do melanoma B16F10.

Assim, analisando-se estes resultados em seu conjunto depreende-se que a convivência por 20 dias com parceiro portador do melanoma B16F10 produz alterações fisiológicas que foram constatadas tanto no comportamento destes animais, assim como por alterações fenotípicas de células que compõem o Sistema Imune. Todas estas alterações serão interpretadas e discutidas dentro de um contexto de neuroimunomodulação.

Inicialmente era essencial caracterizar o modelo aqui proposto como capaz de alterar significativamente parâmetros comportamentais e validá-lo como um modelo para o estudo das interrelações do SN e do SI. Esta caracterização foi necessária uma vez que o modelo no qual nos baseamos (MORGULIS et al., 2004; ALVES et al., 2006) utilizou-se de camundongas da linhagem Swiss portadoras do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) como animal doente e, no modelo aqui proposto, foi utilizado o melanoma B16F10 como agente indutor da doença e outra linhagem de camundongos (C57Bl/6). Outra alteração feita foi o tempo de convívio, no modelo original os animais eram mantidos em pares por 11 dias, tempo no qual o TAE, na concentração utilizada já estava bastante aparente, causando comportamento doentio em seu portador (MORGULIS et al., 2004), enquanto no protocolo aqui

adotado os animais conviveram por um período superior, de 20 dias, uma vez que o melanoma, na forma e concentração que foi inoculada, é somente visível de maneira significativa após este período. Neste contexto, é interessante o observado por Langford et al. (2006), que animais que convivem por um período de 14 a 21 dias parecem ser mais suscetíveis a alterações em seus parceiros. É fato, porém, que estes autores não utilizaram o convívio com animal doente, mas sim a capacidade de um parceiro demonstrar comportamento associado à dor ao mesmo tempo em que observa outro sendo submetido a outro ou ao mesmo tratamento indutor de dor.

Outro aspecto metodológico que optamos em manter foi o uso de fêmeas para o estudo, tendo em vista que machos são mais territorialistas e agressivos, ao passo que fêmeas são mais tolerantes, principalmente com outras fêmeas (PARMIGIANI et al., 1989) sendo, inclusive mais suscetíveis a estresses baseados em instabilidade social (HALLER et al., 1999). Isto se reflete no fato de que modelos de estresses sociais variam de acordo com o sexo dos animais (BROWN e GRUNBERG, 1995). Outro motivo pelo qual foi mantido o uso de fêmeas foi o fato de que camundongos machos, quando pareados em gaiolas, corriqueiramente estabelecem uma situação de hierarquia de dominância - submissão que é capaz de alterar inúmeros aspectos fisiológicos que poderiam interferir tanto no comportamento quanto em parâmetros imunológicos de cada animal (STEFANSKI, 2000; KINSEY et al., 2007). Por outro lado, a utilização de fêmeas em trabalhos de comportamento pode acarretar conclusões imprecisas, devido a um possível viés causado pelos hormônios sexuais, já que cada animal poderia estar em momento diferente do ciclo estral. Neste caso, alterações fisiológicas poderiam decorrer não só do estímulo controlado, mas também dos níveis de hormônios sexuais de cada animal, uma vez que estes são capazes de influenciar o estabelecimento de situações de estresse (GRAY e LEVINE, 1964; ZIMMERBERG e FARLEY, 1993; MORA et al., 1997). Para minimizarmos os efeitos destes hormônios estrais e suas variações, utilizamos sempre animais de uma mesma prole, habituadas por cinco dias antes do início dos experimentos. Assim, não só se conseguiu a habituação propriamente dita, mas também se tentou sincronizar os ciclos estrais (FOX et al., 1984). No entanto, em nenhum momento dosamos objetivamente a concentração de qualquer hormônio desta natureza. Mesmo assim, considerar que os resultados obtidos de repetições experimentais fossem decorrentes das fases do ciclo estral, seria considerar que, nestes experimentos diferentes, os animais dos grupos

estivessem em momentos igualmente diferentes do ciclo.

Ainda sobre o modelo experimental, um ponto que merece discussão é a extrapolação dos resultados obtidos no modelo de convívio com parceiro doente, quer seja o aqui proposto quer o proposto inicialmente por Morgulis et al. (2004), com a situação descrita para humanos, denominada de *caregiving*. Talvez seja, até certo ponto, simples compreendermos, mesmo em camundongos, que estresses físicos e agressivos como choques elétricos aplicados nas patas (PALERMO-NETO et al., 2003) e até mesmo aqueles induzidos por Hans Selye em 1936, possam acarretar distúrbios em diversos sistemas de um organismo, dentre os quais o Sistema Imune. Por outro lado, a compreensão de que estresses psicológicos, por serem mais sutis, podem alterar significativamente a resposta fisiológica e, dentro disso, alterar o curso de uma resposta imune pode ser de difícil aceitação para alguns. No entanto, diversos estudos, inclusive em camundongos, demonstram que é possível estabelecermos condições de estresses psicológicos em modelos experimentais e que estes afetam o sistema imune. Mais ainda, é possível induzir alterações semelhantes ao estresse em animais que observam outro animal sendo submetido a um dado tratamento. Como exemplo podemos citar o trabalho de Palermo-Neto et al. (2003), no qual um camundongo foi exposto a choques nas patas e um outro, em uma câmara adjacente, apenas observava este procedimento (portanto tendo contato visual, auditivo e olfativo com aquele submetido aos choques). O interessante deste trabalho é que tanto os animais que receberam os choques quanto os animais que presenciavam a aplicação do estímulo aversivo apresentaram aumento nos níveis de ansiedade, medidos pelo campo aberto e labirinto em cruz-elevado, uma diminuição na resposta imune inata e menor resistência ao crescimento do TAE. Além deste trabalho, podemos citar também o de Langford et al. (2006) no qual os autores descrevem um aumento do comportamento associado à dor em animais que visualizam seus respectivos companheiros sendo submetidos ao mesmo ou outro tratamento de dor. Em conjunto, estes resultados sugerem que tanto estresses físicos quanto psicológicos são capazes de alterar parâmetros comportamentais e imunes. Mais ainda, estas observações sugerem que, de fato, existe uma intercomunicação entre diferentes animais capaz de interferir na fisiologia de cada um deles, em modelos que, até certo ponto, se aproximam de uma situação humana de “*caregiving*”.

Diante disso, não é surpreendente o observado por Morgulis et al. (2004), que

o convívio com animais portadores do TAE é capaz de induzir alterações comportamentais indicativas de ansiedade e, associados a estas, leucopenia e redução na resistência ao próprio tumor de Ehrlich. Em um estudo posterior, Alves et al. (2006), com o mesmo modelo, observaram outras alterações imunológicas como: diminuição do *burst* oxidativo e intensidade de fagocitose de neutrófilos e diminuição do *burst* oxidativo de macrófagos. Assim, retomando o observado por Palermo-Neto et al. (2003) de que animais que apenas observam a aplicação de choques nas patas de um outro animal apresentam-se ansiosos e, fazendo um paralelo com o trabalho de Langford et al., (2006) e ainda mais com o de Morgulis et al., (2004), que animais que convivem com um outro portador do TAE também se apresentam ansiosos, cabem as perguntas: até que ponto um camundongo é capaz de reconhecer um evento como agressor em um outro animal? Quais seriam as alterações decorrentes desta percepção na fisiologia deste animal? Seriam estas alterações equivalentes às observadas em “*caregivers*” humanos? Embora não pretendendo responder definitivamente a estas questões, mas procurando ampliar a aplicabilidade do modelo descrito por Morgulis et al. (2004), estudamos alterações de comportamento e do sistema imune induzidas pelo convívio com portador de um outro tumor, o melanoma B16F10, em animais de outra linhagem, os camundongos C57Bl/6.

Desta forma, os experimentos iniciais foram no intuito de caracterizar as alterações comportamentais, se é que estas existiam, após o convívio por 20 dias com um parceiro portador do melanoma B16F10. Para discutirmos melhor os significados dos dados obtidos nos aparelhos de análise comportamental, faz-se necessário compreender qual o racional existente nestes aparelhos e suas possíveis consequências fisiológicas. Em um ambiente novo, existem duas maneiras pelas quais os animais podem se portar, uma delas é a tendência natural de explorar este ambiente, ou, alternativamente, os animais podem ficar imóveis (*freezing*). Este último comportamento é detectado no aparelho chamado de “Campo Aberto”, como uma diminuição do comportamento exploratório e da atividade locomotora geral dos animais. Sendo capaz de aferir tal mudança comportamental, o Campo Aberto é considerado um bom teste para quantificação de alguns efeitos comportamentais de ansiedade (BELZUNG e GRIEBEL, 2001).

Em nosso estudo, porém, as análises no campo aberto indicaram que os animais que conviveram com parceiro doente tiveram maior atividade locomotora

geral. Embora aparentemente não condizente com o descrito como característico de animais ansiosos, esta atividade locomotora aumentada pode ser decorrência de uma maior ativação de fibras noradrenérgicas do “*locus coeruleus*” (JORDAN, 1998), fenômeno também descrito em animais submetidos a estresses psicológicos (LEVINE et al., 1990). Esta hipótese parece plausível, uma vez que no modelo do convívio com parceiro portador do TAE foi observada uma diminuição nos níveis de noradrenalina hipotalâmica (ALVES et al., 2006), compatível com um consumo aumentado deste mediador, que parece, de fato ocorrer em situações de estresse, uma vez que Glavin et al., (1983) demonstraram uma correlação inversa entre a quantidade de noradrenalina hipotalâmica e as respostas ao agente estressor.

Já no Labirinto em Cruz-Elevado, sabe-se que animais ansiosos preferem os braços fechados do aparelho, um comportamento que faz parte do repertório defensivo natural dos roedores (GROSSEN e KELLEY, 1972), provavelmente por ficarem menos expostos a possíveis predadores (BARNETT, 1956; 1958) e que tem sido observado em diversos modelos onde animais são submetidos a tratamentos ansiogênicos (FAGGIN e PALERMO-NETO, 1985; ADER et al., 1993, PALERMO-NETO et al., 2003; MORGULIS et al., 2004). Confirmando esta hipótese observa-se que drogas ansiolíticas aumentam a exploração dos braços abertos deste aparelho (PELLOW et al., 1985). Coerentemente, em nossas neste aparelho, obtivemos dados que apontam para uma maior ansiedade em animais que conviveram com parceiro doente, uma vez que estes apresentam uma menor exploração e menor número de entradas nos braços abertos.

Tendo, dentro do proposto, caracterizado o comportamento dos animais como o de animais “ansiosos”, avaliamos a concentração de corticosterona presente no soro, uma vez que este hormônio é abundante em situações de estresse (ELENKOV et al., 2002) em decorrência da ativação do eixo HPA. Esta dosagem hormonal foi realizada apenas em uma ocasião com cinco animais de cada grupo e não observamos, no ED₂₀, diferenças entre os valores médios de corticosterona presente no soro dos animais que conviveram com parceiro doente, em relação àqueles que não conviveram. Estes resultados não são surpreendentes, já que o modelo de convívio com portadores do TAE foi inicialmente caracterizado como um indutor de ansiedade comportamental independente de corticosterona (MORGULIS et al., 2004). Além disso, poderíamos especular que o fato dos animais conviverem por cerca de 10 dias com um companheiro portador de um tumor visível poderia ter

ocasionado uma adaptação do eixo HPA (REUL e DE KLEUT, 1985; MILLER et al., 1992) sem que ocorresse o mesmo comportamentalmente. Neste caso, em momentos anteriores ao ED₂₀ talvez tivéssemos podido observar alterações na concentração de corticosterona, já que a adaptação requer uma manutenção de níveis hormonais elevados. Entretanto, é interessante notar que no modelo do convívio com parceiro portador do TAE, o convívio era mantido apenas por 11 dias, sendo este o dia de coleta do soro, e, mesmo com este período de tempo menor, não foram observadas diferenças. Esta diferença no tempo de convívio, como discutido previamente, é justificável pela biologia de cada tumor utilizado, uma vez que com cerca de 11 dias o TAE já está, visivelmente comprometendo a saúde do indivíduo, ao passo que após este período o B16F10 ainda não está suficientemente desenvolvido.

Apesar de não apresentarem diferenças significativas no valor médio de concentração de corticosterona, as dosagens mostraram uma diferença significativa em sua variância, isto é, a concentração deste hormônio em cada animal analisado do grupo CPT, quando comparado a outro animal de mesmo grupo, apresentou-se mais uniforme do que os valores do grupo CAS. Estes resultados indicam que, enquanto animais controles tiveram uma produção variável deste hormônio, os animais que conviveram com portadores do melanoma B16F10 tiveram concentrações mais uniformemente distribuídas. Uma possível explicação, ainda especulativa, para essa menor variação entre os indivíduos que compõe o grupo CPT, poderia ser a questão do confronto social com o parceiro (KEENEY e HOGG, 1999; KEENEY et al., 2006). Animais do grupo CAS conviveram durante todo o período de 20 dias com outro animal saudável e, portanto, tiveram de competir com este animal. Por outro lado, animais do grupo CPT poderiam ter se habituado a conviver com um animal doente cuja capacidade locomotora poderia estar prejudicada. Isto é, o desenvolvimento do melanoma B16F10 prejudicaria a movimentação e alteraria o comportamento do animal de tal forma, que apresentaria menos desafios para o seu parceiro. Esta teoria esbarra no fato de que ambos animais tinham acesso *ad libitum* tanto à comida quanto à bebida, ou seja, os companheiros de gaiola não tinham, a princípio o que disputarem.

Outra possibilidade, ainda especulativa para os valores de corticosterona é que os animais do grupo CPT apresentavam, no ED₂₀ um valor máximo de concentração de corticosterona sendo este nível mantido e, por isso apresentaram

menor variância entre as amostras, já para os animais do grupo CAS a variação deste hormônio pode ser reflexo de variações no momento do ritmo circadiano que cada animal se encontrava na hora da coleta. Isto porque o material foi extraído no período de maior concentração sérica de corticosterona, no entanto, para o grupo controle, alguns animais já haviam, de fato, apresentado este pico de produção enquanto que outro ainda não, os animais experimentais, porém apresentavam uma produção já mais elevada e, por isso, tendo menos variações de acordo com este ciclo diário. Novamente, existe um problema nesta hipótese, caso os animais do grupo CPT apresentem um valor constante e máximo, para que os animais do grupo CAS apresentem um valor médio igual ao dos animais CPT, mas com variação diferente, teríamos de pressupor que alguns dos animais controles possuem, no ED₂₀, um valor superior ao máximo presente no soro dos animais CPT.

Devemos levar em conta também que, além dos glucocorticóides, outros hormônios oriundos da ativação do eixo HPA ou não (ex: DHEA, GH, CRH, PRL) também poderiam estar envolvidos em alterações imunes (KELLEY, 1989; DAYNES et al., 1990; SINGH et al., 1990; BERNTON et al., 1991; CHROUSOS e GOLD, 1992), e atuar na habituação do eixo HPA, o que poderia acarretar a manutenção dos níveis de corticosterona observados.

Passamos então para a avaliação fenotípica das células apresentadoras de antígenos presentes no baço e nos linfonodos dos animais, uma vez que, o desencadeamento de uma resposta imune adquirida está intimamente correlacionado não só com a presença destas células, mas também com o estado de ativação em que se encontram (STEINMAN e BANCHEREAU, 2007).

Neste contexto, analisamos, nas células provenientes dos órgãos linfóides dos animais de ambos os grupos, a expressão da integrina CD11c e da molécula de MHC de classe II (IAb), uma vez que a expressão destes dois marcadores na membrana celular, as classifica, em camundongos, como células dendríticas (INABA et al., 1997). Esta última molécula, a IAb, é de particular interesse, uma vez que a sua expressão, em C57Bl/6 já foi descrito um aumento na expressão de moléculas do complexo do MHC por células de microglia após eventos estressantes (FRANK et al. 2006), por um mecanismo aparentemente independente de glicocorticóides (LI et al., 2007). No entanto, as células esplênicas dos animais do grupo CPT não apresentaram diferenças significantes na expressão de CD11c e de IAb quando comparadas ao nível de expressão das células dos animais do grupo CAS.

Analizamos também a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, tendo em vista a importância destas na apresentação antigênica (MONDINO e JENKINS, 1994). Após análise dos resultados, notamos que eventos distintos ocorrem no linfonodo e no baço. Nos linfonodos dos animais que conviveram com parceiro doente constatamos uma manutenção no número de células positivas e no nível de expressão de CD80 e de CD86, em relação aos animais controle; ao passo que, no baço destes mesmos animais foi possível observar um aumento na expressão de CD80, quer seja pelas células aderentes totais como pelas células CD11c⁺ subdivididas de acordo com o nível de expressão (CD11c^{low} ou CD11c^{high}). Constatamos também que este aumento no nível de expressão de CD80 também foi detectado em células do baço CD11c⁺ purificadas por esferas imunomagnéticas, evidenciando que este fenômeno se dá, não somente na população global de células esplênicas, como também na subpopulação CD11c⁺.

Vale ressaltar que estas análises demonstraram variação na expressão da molécula co-estimuladora CD80, enquanto que a expressão da CD86 pouco se alterou. Vale lembrar que as moléculas da família B7, dentre as quais a B7.1 (CD80) e a B7.2 (CD86), são importantes reguladoras da apresentação de antígenos, que apresentam características de expressão diferentes. Por exemplo, a molécula CD80 tem sua expressão aumentada em APCs em resposta a estímulos de maturação enquanto que a CD86 é expressa constitutivamente em níveis baixos e, após estimulação da células, há um aumento rápido e transitório de sua expressão (GREENWALD et al., 2005). A função destas moléculas, enquanto acessórias à apresentação antigênica, está, corriqueiramente associada à ativação de linfócitos T, por intermédio da ligação com o CD28, apesar disto, muito se tem dito a respeito da inibição de linfócitos T, mediada principalmente pela interação entre estas moléculas com a molécula "*cytotoxic T-lymphocyte antigen*" (CTLA)-4. (KEIR e SHARPE, 2005). No entanto, o papel de cada uma destas moléculas na interação com os diversos ligantes e as conseqüências desta interação ainda é controverso. Por exemplo, o tratamento de camundongos não-obesos diabéticos (NOD) com anti-CD86 preveniu o estabelecimento da doença enquanto que o uso de anti-CD80 potencializou os efeitos da doença. Por outro lado, foi possível observar o oposto no tratamento da encefalomielite aguda experimental (EAE), isto é, o uso de anti-CD80 diminuiu a progressão da doença ao passo que o anti-CD86 a exacerbou (SUBUDHI et al., 2005). Apesar desta controvérsia acerca dos resultados da interação com

estas moléculas co-estimuladoras, é evidente que a expressão diferencial destas moléculas pode modificar o processo de apresentação antigênica e a resposta de linfócitos T, fenômeno que, a julgar por nossas observações, poderia ocorrer nos animais submetidos ao convívio com parceiro doente.

Outro resultado interessante foi a expressão diferenciada destes marcadores nos diferentes órgãos linfóides analisados – linfonodos e baço. Interessante, mas não surpreendente, uma vez que este fenômeno já foi observado por Xu et al. (2000) em um modelo de EAE, em ratos, sendo que, associado à maior frequência de células CD80⁺ e CD86⁺ no baço houve um aumento na produção de óxido nítrico (NO) neste ambiente. Esta possibilidade de que existe um aumento de moléculas co-estimuladoras, associado a uma maior produção de NO é bastante intrigante, uma vez que, o NO é capaz de promover apoptose de linfócitos T (WILLIAMS et al., 1998) e também inibir sua proliferação (LIEW, 1995) indicando que, de fato, esta expressão diferencial acarreta em resoluções diferentes na ativação ou inibição e até mesmo na sobrevivência de linfócitos após o contato com as APCs.

Esta regulação na expressão das moléculas co-estimuladoras de acordo com o local analisado deve ser compatível com efeitos diversos do SNC sobre os diferentes órgãos, uma vez que a inervação nestes órgãos linfóides é, de fato, diferente (MADDEN e FELTEN, 1995; MIGNINI et al., 2003). Enquanto o baço é innervado praticamente por fibras da via simpática, os linfonodos possuem distribuição semelhante de inervação simpática e parassimpática (ELENKOV et al., 2000).

Em conjunto, os dados obtidos quanto à expressão dos marcadores analisados (IAb, CD11c, CD80 e CD86) levam a um panorama indicativo de que as células dos animais do grupo CPT parecem possuir uma maior capacidade de iniciar uma resposta imune, mesmo sem que nenhum estímulo “externo” tenha sido fornecido (indicado pelo aumento da expressão da molécula co-estimuladora CD80). Assim, ainda que muito especulativamente, poderíamos sugerir que algumas das correlações existentes entre situações de estresse e o desenvolvimento de doenças auto-imunes (WARD et al., 2002) poderiam ser reflexo de uma maior ativação de células apresentadoras de antígenos que, apresentando antígenos próprios poderiam quebrar estados prévios de tolerância.

Poderíamos também interpretar que a diferença na expressão de moléculas co-estimuladoras apresentada pelas células dos animais do grupo CPT poderia ser

decorrente da expressão diferencial destas moléculas já nos precursores de medula óssea, bem como alteração no processo de diferenciação destes precursores em DCs, uma vez que tanto glicocorticóides (PIEMONTI et al., 1999; MATYSZACK et al., 2000; MAESTRONI et al., 2002) quanto catecolaminas (TABAROWSKY et al., 1996) parecem influenciar *in vitro* a diferenciação de DCs a partir de precursores de medula óssea. Para verificar esta hipótese, coletamos a medula óssea de animais de ambos os grupos e cultivamos em meio de diferenciação contendo GM-CSF.

Os resultados obtidos nestes experimentos indicaram que os precursores de MO dos animais que conviveram com parceiro doente não apresentaram diferenças significantes quando comparadas aos dos animais controle, no entanto, após a cultura em meio suplementado com IL-4 e GM-CSF, houve um aumento na quantidade de células expressando a molécula CD86 de ambos os grupos, sugerindo a diferenciação dos precursores presentes na MO. Por outro lado, para a molécula CD80 houve um aumento na quantidade de células positivas no grupo controle (mais um indicativo desta diferenciação), mas uma diminuição significativa nas células do grupo CPT, que pode ser interpretada como uma deficiência de diferenciação dos precursores em células dendríticas. Mais ainda, notamos que, enquanto em culturas de células de animais CAS, é visível o aparecimento na cultura, de uma população $CD86^+CD80^{high}$ após o estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, em culturas de células de animais CPT esta população não foi detectada. Esta diminuição na expressão de moléculas co-estimuladoras observada na diferenciação em DCs é um fenômeno normalmente associado à presença e ação de glicocorticóides (PIEMONTI et al., 1999; MATYSZACK et al., 2000; MAESTRONI, 2002), que, no entanto, no dia da coleta da medula óssea (ED₂₀) não foi observada em nossos animais. Isto suscita a possibilidade de que o modelo do convívio com parceiro doente seja capaz de influenciar a diferenciação de células dendríticas de uma maneira independente da liberação de glicocorticóides.

Uma das possibilidades para explicar o observado seria a ativação do SNA que culmina no aumento de NE, também na medula óssea, que possui inervação autônoma e, portanto estando sujeita a sua regulação (TABAROWSKY et al., 1996). Embora o processo de diferenciação tenha sido realizado *in vitro* já foi demonstrado que uma rápida exposição dos precursores à NE, já é um estímulo suficientemente capaz de alterar a diferenciação de DCs, fazendo com que as células resultantes produzam menores concentrações de IL-12 e maiores de IL-10 em resposta à

estímulos como o LPS e KLH (“*keyhole limpet hemocyanin*”) ou a ligação pelo CD40 (MAESTRONI, 2002) ou seja, adquiram um perfil de menor ativação, condizente com o esperado para uma menor expressão de moléculas co-estimuladoras.

Outra forma de explicarmos esta alteração no processo de diferenciação seria a diferente sensibilidade dos precursores às citocinas adicionadas para diferenciação celular. Apesar de ainda não haver consenso quanto às citocinas e nem à quantidade de cada uma para a diferenciação em células dendríticas, parece ser necessária a utilização tanto do GM-CSF quanto da IL-4. Assim sendo, poderíamos especular que a diferenciação apresentada por animais submetidos ao convívio com parceiro doente pode ter sido reflexo de uma menor expressão de receptores para IL-4, fato que já foi observado em células após tratamento com corticosteróides (SO et al., 2002). Podemos também sugerir que a diferença fenotípica encontrada nas células derivadas de precursores de medula óssea dos animais do grupo CPT, ao final dos sete dias em cultura pudesse ser decorrente de diferenças na ativação destas células pelo estímulo, o LPS. Diante disto, o TLR4 (do inglês *toll-like receptor 4*), um reconhecido receptor para estímulos como o LPS (TAKEUCHI et al., 1997), poderia ter a sua expressão alterada nas células diferenciadas *in vitro*. Neste sentido Zhang e Daynes (2007) demonstram que a diferenciação de macrófagos a partir de precursores de medula óssea, na presença de GCs, leva à maior expressão de TLR4 associada a uma superexpressão de citocinas pró-inflamatórias. Além do mais, estresses psicológicos já foram demonstrados também como capazes de induzirem à maior expressão de TLR4 por macrófagos esplênicos (BAILEY et al., 2007). Apesar destes trabalhos apontarem para uma situação na qual o estresse, via modulação por GCs, é capaz de aumentar a expressão de receptores do tipo toll e, conseqüentemente exacerbar uma resposta, o observado no presente trabalho não corrobora essas observações, pois notamos que as DCs que se diferenciaram dos precursores oriundos de animais que conviveram com portador de tumor apresentaram uma menor expressão da molécula coestimuladora CD80, fato que poderia ser considerado como indicador de uma menor atividade linfoestimuladora por estas células. De qualquer forma, é preciso notar que estas alterações foram descritas como acontecendo na presença de níveis elevados de GC, o que não observamos em nosso modelo.

Após estes experimentos de fenotipagem de células presentes nos baços, nos linfonodos e daquelas diferenciadas *in vitro*, realizamos ensaios *in vivo* para

avaliarmos se as diferenças encontradas poderiam se refletir no curso de uma resposta imune. Para tanto, optamos por um ensaio de hipersensibilidade tardia (DTH) frente a um estímulo antigênico, a ovalbumina, e por um ensaio de crescimento do tumor B16F10.

Nos experimentos de DTH, os resultados apontaram para um caráter imunossupressor do convívio com parceiro portador do melanoma B16F10, pois, após 48 horas do desafio antigênico, as patas dos animais que conviveram com parceiro doente não apresentaram nenhum aumento de volume ao passo que as patas dos animais controle demonstravam um aumento significativo, sugerindo a possibilidade de existência de uma resposta imune, com migração celular, nos animais do grupo CAS, que estava ausente nos CPT, mesmo considerando que a intensidade da reação observada foi inferior ao usualmente descrito na literatura (JACYSYN et al., 2001). Embora esta baixa intensidade possa indicar que a resposta observada não se caracteriza perfeitamente como uma reação de DTH típica, sua reprodutibilidade, por sua vez, indica que se trata de fenômeno real e não de um artefato de um único experimento. É interessante notar que, apesar desta falha no estabelecimento de DTH após eventos psicológicos já ter sido observada, tanto em camundongos (BASSO et al., 1994) quanto em humanos (SMITH et al., 2004), existem outros autores que demonstram que, após estresses agudos existe um aumento na geração de uma resposta migratória de leucócitos, acarretando uma melhora na DTH e que este fenômeno é dependente da adrenal, uma vez que a sua remoção elimina esta melhora na resposta (DHABHAR e McEWEN, 1999).

Uma explicação que se poderia aventar para esta diferença após 48 horas, seria a de uma extensão da resposta inflamatória inicial nos animais do grupo CPT. Esta diferença seria compatível com alguns dados da literatura, que dizem que estresses crônicos podem também ter efeitos imunossupressores em eventos inflamatórios iniciais (DHABHAR & McEWEN, 1997; PARIANTE et al., 1997; ZORRILA et al., 2001). Além disso, o modelo de convívio com parceiro portador de TAE foi capaz de diminuir a atividade de células envolvidas no processo inflamatório, como os neutrófilos (ALVES et al., 2006) e, portanto poderíamos esperar que a reação inflamatória pudesse estar debilitada. Porém, esta explicação não se sustenta, uma vez que a espessura da pata destes animais após uma e seis horas era de mesma magnitude que a dos animais controle, também em experimentos independentes. Assim, a visão em conjunto destes dados sugere que, mesmo tendo

um processo inflamatório visualmente semelhante, os animais CPT não foram capazes de estabelecer uma resposta à OVA equivalente à dos animais CAS.

Para avaliar se a alteração observada quanto à espessura das patas era decorrente de modificações no processo de apresentação antigênica realizamos ensaios de proliferação *in vitro* com as células dos mesmos animais utilizados para o ensaio de DTH. Observamos que tanto os linfócitos dos animais controle como os dos que conviveram com parceiro doente foram capazes de proliferar, com intensidade semelhante, após quatro dias de co-cultura com células aderentes de baço, pulsadas com OVA. No entanto, a proliferação das células dos CPT foi acompanhada por uma elevada concentração de IL-10 no sobrenadante das culturas, enquanto nas culturas de células dos animais CAS, não foi detectada esta citocina. Além disso, pudemos observar que após três dias desta primeira análise (ou seja, uma co-cultura de sete dias) as células dos animais do grupo CPT cessaram a proliferação, ao passo que as dos controles continuaram.

Nestes experimentos, sempre foram co-cultivadas as células de um mesmo grupo, isto é, células apresentadoras de animais do grupo CPT com linfócitos de animais do grupo CPT, sendo o mesmo válido para as co-culturas dos animais do grupo CAS. Desta forma, embora tenhamos mostrado diferenças na proliferação celular e na produção de IL-10, não podemos inferir, por estes experimentos, se estas alterações foram decorrentes de diferenças nas células apresentadoras ou nos linfócitos dos animais que conviveram com portador de tumor, uma vez que ambos os tipos celulares podem ser modulados após um evento estressor (BAUER et al., 2000; AVITSUR et al., 2002; KINSEY et al., 2007).

Todavia, nestes ensaios de DTH realizados, um erro metodológico fundamental ocorreu - a emulsão do adjuvante completo de Freund não foi realizada de maneira eficiente. Este erro certamente comprometeu a indução de resposta frente ao estímulo antigênico. Ao notarmos este erro, refizemos o experimento de modo apropriado e, desta feita, observamos resposta mais intensa à OVA, mas não pudemos constatar diferenças do aumento de pata em nenhum dos momentos analisados. No entanto, estes resultados são de apenas uma repetição com número amostral baixo e, portanto têm de ser analisados com cautela. Mesmo assim, podemos especular que as diferenças observadas nos primeiros experimentos de DTH tenham aparecido exatamente pela falta de emulsificação. Isto é, no segundo momento, em que a emulsificação ocorreu, o estímulo foi maior que as alterações

proporcionadas por um agente sutil como o convívio com parceiro doente e, desta forma camuflando qualquer interferência que este tinha no estabelecimento da DTH.

Finalmente, embora tenhamos constatado que o convívio com parceiro doente pareça alterar o estabelecimento de uma resposta imune, isto não modificou o crescimento do melanoma B16F10 nos animais. É interessante notar que no modelo original, de convívio com parceiro portador do TAE, os animais estressados apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento deste mesmo tumor (MORGULIS et al., 2004). Esta diferença entre o TAE e o melanoma poderia ser decorrente da relação dos dois tumores com o sistema imune. Por exemplo, o TAE é uma linhagem suscetível aos neutrófilos (BERGAMI-SANTOS et al., 2004), cuja função está alterada nos animais que convivem com portadores do TAE (ALVES et al, 2006), enquanto estas células não parecem estar envolvidas na resistência ao melanoma B16F10 (SA-ROCHA et al., 2006).

Em suma, demonstramos que o modelo inicialmente descrito por Morgulis et al. em 2004 e investigado por Alves et al. (2006), no qual os autores utilizam camundongos Swiss, portadores do tumor ascítico de Ehrlich para induzirem em companheiros de mesma linhagem e sadios, alterações comportamentais e fisiológicas e que os autores, muito cautelosamente, comparam com situações de *caregiving* em humanos, pôde ser adaptado para camundongos da linhagem C57Bl/6 com o melanoma B16F10. São inegáveis, no entanto, as perguntas que este trabalho levanta, quer estas sejam acerca do modelo propriamente dito, isto é: como ocorre exatamente a interação entre os animais na gaiola? O animal de fato possui algo semelhante à empatia e prefere a companhia de seu companheiro? Qual o estímulo sensorial que leva às alterações fisiológicas? Quer seja a respeito das alterações imunológicas aqui descritas. Mas afinal, qual trabalho científico não tem, como objetivo principal, mesmo que subliminar, essa capacidade de abrir novas questões?

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que o convívio com parceiro portador do melanoma B16F10:

- alterou significativamente o comportamento dos animais 1) aumentando a atividade locomotória geral, medida no campo aberto e o tempo em exploração dos braços fechados do labirinto em cruz e 2) diminuindo o tempo em exploração e número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz-elevado;
- aumentou significativamente a expressão da molécula co-estimuladora CD80, mas não a expressão da molécula CD86 pelas células apresentadoras de antígeno (MHCII⁺) presentes no baço destes animais, mas não nas presentes nos linfonodos dos mesmos;
- diminuiu a quantidade de células CD80⁺ por células diferenciadas *in vitro* a partir de precursores de medula óssea mantidas por sete dias em meio contendo GM-CSF e IL-4 e ativadas com LPS por 48 horas;
- diminuiu a resposta cutânea à ovalbumina, fenômeno que esteve associado à maior proliferação de uma subpopulação linfocitária aparentemente produtora de IL-10;
- não interferiu no estabelecimento do melanoma B16F10.

REFERÊNCIAS

- Ader R, Cohen N. Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom Med.* 1975; 37: 333–40.
- Ader R, Cohen N, Grotta LJ. Adrenal involvement in conditioned immunosuppression. *Int. J. Immunopharmacol.* 1979; 1: 141–5.
- Ader R, Cohen N. Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Ann Rev Psychol.* 1993; 44: 53–85.
- Ader R. Conditioned immunomodulation: research needs and directions. *Brain Behav Immun.* 2003; 17: 51–7.
- Alves GJ, Vismari L, Florio LC, Palermo-Neto J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. *Neurosci Res.* 2006; 56(2): 172–9.
- Avitsur R, Stark JL, Dhabhar FS, Sheridan JF. Social stress alters splenocyte phenotype and function. *J Neuroimmunol.* 2002; 133: 66–71.
- Avitsur R, Stark JL, Dhabhar FS, Kramer KA, Sheridan JF. Social experience alters the response to social stress in mice. *Brain Behav Immun.* 2003; 17: 426–37.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998 v. 392: 245–252.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 767–811.
- Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain-barrier. *Neuroimmunomodulation.* 1995; 2: 241–8.
- Barnett SA. Behaviour of wild rats in the laboratory. *Med Biol Illust.* 1956; 6: 104–11.
- Barnett SA. Exploratory behaviour. *Brit J Psychol.* 1958; 49: 289–310.
- Basso AM, Depiante-Depaoli M, Cancela L, Molina VA. Chronic restraint attenuates the immunosuppressive response induced by novel aversive stimuli. *Physiol Behav.* 1994; 55(6): 1151–5.
- Bauer ME, Vedhara K, Perks P, Wilcock GK, Lightman S L, Shanks N. Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *J Neuroimmunol.* 2000; 103: 84–92.
- Bayley MT, Engler H, Powell ND, Padgett DA, Sheridan JF. Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor-dependent pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293(3): 1180–90.
- De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical Journal: sample references. C2003 – [updated 2005 June15; cited 2006 May 16]

- Bell D, Young JW, Banchereau J. Dendritic cells. *Adv Immunol.* 1999; 72: 255-324.
- Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res.* 2001; 125: 141-9.
- Benedict C, Dimitrov S, Marshall L, Born J. Sleep enhances serum interleukin-7 concentrations in humans. *Brain Behav Immun.* 2007; 21(8): 1058–62.
- Benschop RJ, Rodrigues-Feuerhaun M, Scheldlowski M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav Immun.* 1996; 10(2): 77–91.
- Bergami-Santos PC, Mariano M, Barbuto JAM. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sci.* 2004; 75: 245–255.
- Berger, NA. Alkylating agents. In: *Anticancer Drugs* (revisado por CHABNER, BA). In: de Vita Jr, VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles and practice of oncology.* 4ed. JB Lippincott Co.;1993. V.1, p.400 – 9.
- Bernton EW, Bryant HU, Holaday JW. Prolactin and Immune function. In: Ader R., Felten DL., Cohen N. *Psychoneuroimmunology.* 2nd Ed. San Diego: San Diego Academic Press; 1991. p. 403–28.
- Besedovsky HO, Sorkin E, Felix D, Haas H. Hypothalamic changes during the immune response. *Eur J Immunol.* 1977; 7: 323–5.
- Besedovsky HO, de Rey A, Sorkin E, Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science,* 1986; 233: 652–654.
- Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypothesis. *Endocr Rev.* 1996; 17: 64–102.
- Bjorck P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood,* 2001 Dec 15;98 (13): 3520-6.
- Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol.* 1984; 132: 1067–70.
- Blalock JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev.* 1989; 69: 1–32.
- Blalock JE. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for a communication between the immune and neuroendocrine systems. *Ann NY Acad Sci.,* 1994; 741: 292–8.
- Blalock JE, Smith EM. Conceptual development of the immune system as a sixth sense. *Brain Behav Immun.* 2007; 21: 23–33.

Boumpas DT, Chrousos RL, Wilder RI, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoids therapy for immune mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med.* 1993 Dec 15; 119 (12):1198-1208.

Bousso P, Robey E. Dynamic of CD8⁺ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol.* 2003; 4: 579-585.

Brown KJ, Grunberg NE. Effects of housing on males and females rats: crowding stresses males but calms females. *Physiol Behav.* 1995; 58: 1085–9.

Buckingham JC, Gillies GE, Cowell AM. Stress, stress hormones and the immune system. Chichester, England; New York: John Wiley & Sons, Ltd. 1997

Carr DJ, Blalock JE. A molecular basis for intersystem communication between the immune and neuroendocrine systems. *Int Rev Immunol.* 1991; 4: 213–28.

Carr DJ, Rogers TJ, Weber RJ. The relevance of opioids and opioid receptors on immunocompetence and immune homeostasis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996; 213: 248 – 57.

Cavadini G, Petrzilka S, Kohler P, Jud C, Tobler I, Birchler T, Fontana A. TNF- α suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box mediated transcription. *Proc Nat Acad Sci.* 2007; 104 (31): 12843–8.

Chen Z, O'Shaughnessy MJ, Gramaglia I, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, Narula S, Roncarolo MG, Blazar BR. IL-10 and TGF- β induce alloreactive CD4⁺CD25⁻ T cells to acquire regulatory cell function. *Blood,* 2003; 101: 5076-5083.

Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA,* 1992; 267: 1444–52.

Dantzer R. Cytokines, sickness behaviour and depression. *Neurol Clin.* 2006; 24: 441–60.

Daynes RA, Dudley DJ, Araneo BA. Regulation of murine lymphokine production in vivo. II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. *Eur J Immunol.* 1990; 20: 793–802.

Dhabhar, FS, McEwen, BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun.* 1997; 11: 286–306.

Dhabhar FS, McEwen BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(3): 1059-64.

Del Rey A, Kabiersch A, Petzoldt S, Randolph A, Besedovsky HO. Sympathetic innervation affects superantigen-induced decrease in CD4V beta 8 cells in spleen. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 917: 575–81.

Dore G, Romans SE. Impact of bipolar affective disorder on family and partners. *J Affect Disord.* 2001; 67: 147-58.

Egnaer W, Hart DN. The phenotype of freshly isolated and cultured human bone marrow allostimulatory cells: possible heterogeneity in bone marrow dendritic cell populations. *Immunology.* 1995; 85:611-620.

Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians.* 1996 Sep; 108 (5): 374-381.

Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve – an integrative interface between Two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000; 52: 595-638.

Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 966: 290-303.

Faggin BM, Palermo-Neto J. Differential alterations in brain sensitivity to amphetamine and pentylene-tetrazol in socially deprived mice. *Gen Pharmacol.* 1985; 19, 299–302.

Finucane T.E. Care of patients nearing death: another view. *J Am Ger. Soc.* 2002, 50: 551–3.

Flaskerud JH, Lee P. Vulnerability to health problems in female informal caregivers of persons with HIV/AIDS and age-related dementias. *J Adv Nurs.* 2001; 33(1): 60-8.

Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Langs MS, Neubig RR, Ward PA. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature.* 2007; 449(7163): 721-5.

Fox JG, Cohen BJ, Loew FM. Laboratory animal medicine. Orlando (FL) Academic Press Inc.; 1984. p 41–3.

Frank MG, Baratta MV, Sprunger DB, Watkins LR, Maier SF. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain Behav Immun.* 2007; 21: 47–59.

Gatchell RJ, Baum A. An introduction to health psychology reading. Maryland: Addison-Wesley Publishing; 1983.

Gennaro S, Fehder W, Nuamah IF, Campbell DE, Douglas SD. Caregiving to very low birthweight infants: a model of stress and immune response. *Brain Behav Immunol.* 1997; 11(3): 201-15.

Glavin G, Tanaka M, Tsuda A, Kohno Y, Hoaki Y, Nagasaki N. Regional rat brain noradrenaline turnover in response to restraint stress. *Pharmacol Biochem Behav.*

1983; 19: 287-90.

Gray JA, Levine S. Effects of induced estrus on emotional behavior of in selected strains of rats. *Nature*, 1964; 201: 1198–1200.

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Ann Rev Immunol*. 2005; 23: 515-48.

Grossen NE, Kelley MJ. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol*. 1972; 81(2): 307-10.

Guett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J. T Cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol*. 2003; 4:355-360.

Haller J, Fuchs E, Halasz J, Makara GB. Defeat is a major stressor in males while social stability is stressful mainly in females: towards the development of a social stress model in female rats. *Brain Res Bull*. 1999; 50(1): 33–9.

Harbour DV, Smith EM, Blalock JE. Splenic lymphocyte production of an endorphin during endotoxic shock. *Brain Behav Immun*. 1987; 1: 123–33.

Hayley S, Poulter MO, Merali Z, Anisman H. The pathogenesis of clinical depression: stressor and cytokine induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*. 2005; 135(3): 659-78.

Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman R, Romani N, Schuler G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol*. 1996; 26: 259.

Hoglund CO, Axen J, Kemi C, Jernelov S, Grunewald J, Muller-Suur C, Smith Y, Gronneberg R, Eklund A, Stierna P, Lekander M. Changes in immune regulation in response to examination stress in atopic and healthy individuals. *Clin Exp Allergy*. 2006. 36 (8): 982–992.

Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, and Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1992; 176: 1693-702.

Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells form the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med*. 1997; 186(5): 665-72.

Jacysyn JF, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Modulation of delayed-type hypersensitivity during the time course of immune response to a protein antigen. *Immunology*, 2001; 102: 373–9.

Jordan LM. Initiation of locomotion in mammals. *Ann NY Acad Sci*. 1998; 16: 83-93.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of neuroscience. New York, McGraw-Hill, 2000; 1414p.

Keeney AJ, Hogg S. Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. *Behav Pharmacol.* 1999; 10: 753–64.

Keeney AJ, Jessop DS, Harbuz MS, Marsden CA, Hogg S, Blackburn-Munro, RE. Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *J Neuroendocrinol.* 2006; 15: 330–8.

Kelley, K.W. Growth hormone, lymphocytes and macrophages. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38: 705–13.

Kelley, AE. Locomotion activity and exploration. In: van Haaren F., editor. 1993. *Methods in behavioral pharmacology*. New York: Elsevier, 1993. p. 499–518.

Keir ME, Sharpe AH. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005; 204: 128–43.

Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Malarkey WB, Mercado AM, Glaser R.. Slowing of wound healing by psychooogical stress. *Lancet.* 1995; 346: 1194–96.

Kiecolt-Glaser JK, McGuire L, Robles TF, Glaser R. Emotions, morbidity and mortality: New perspectives from psychoneuroimmunology. *Ann Rev Psychol.* 2002; 53: 83– 07.

Kinsey SG, Bailey MT, Sheridan JF, Padgett DA, Avitsur R. Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function C57Bl/6 and CD-1 mice. *Brain Behav Immun.* 2007; 21(4): 458-66.

Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. *Immunol Today.* 2000; 21: 539–42.

Korte SM, Koolhas JM, Wingfield JC, McEwen BS. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29(1): 3-38.

Langford DJ, Crager SE, Shehzad Z, Smith SB, Sotocinal SG, Levenstadt JS, Chanda ML, Levitin DJ, Mogil JS. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science.* 2006; 312(5782): 1967-70.

Lechler R, Chai JG, Marelli-Berg F, Lombardi G. The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance. *Immunology,* 2001; 103: 262-269.

Levine ES, Litto WJ, Jacobs BL. Activity of cat locus coeruleus noradrenergic neurons during the defense reaction. *Brain Res.* 1990; 531: 189–95.

Li M, Wang Y, Guo R, Bai Y, Yu Z. Glucocorticoids impair microglia ability to induce

- T cell proliferation and Th1 polarization. *Immunol Lett.* 2007; 109: 129–37.
- Liew FY. Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Curr Op Immunol.* 1995; 7: 396–9.
- Lister RG. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987; 92: 180–5.
- Lolait SJ, Lim AT, Toh BH, Funder JW. Immunoreactive beta-endorphin in a subpopulation of mouse spleen macrophages. *J Clin Invest.* 1984; 73: 277–80.
- Lyons AB. Divided we stand: Tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol.* 1999; 77: 509–515.
- Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods.* 2000; 243: 147–154.
- Macedo MS, Barbuto JAM. Murine delayed type hypersensitivity is suppressed by *Ascaris* sum extract. *Braz J Med Biol Res.* 1988; 21: 523–5.
- Madden KS, Felten DL. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol Rev.* 1995; 75: 77–106.
- Madden KS, Boehm GW, Lee SC, Grotta LJ, Cohen N, Ader R. One-trial conditioning of the antibody response to hen egg lysozyme in rats. *J Neuroimmunol.* 2001; 113: 236–9.
- Maestroni GJM. Dendritic cell migration controlled by α_{1b} -adrenergic receptors. *J. Immunol.* 2000; 165: 6743–47.
- Maestroni GJM. Short exposure of maturing, bone marrow-derived Dendritic cells to norepinephrine: impact on kinetics of cytokine production and Th development. *J Neuroimmunol.* 2002; 129: 106–114.
- Maestroni GJ. Sympathetic nervous system influence on the innate immune response. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1069: 195–207.
- Maier SF, Goehler LE, Fleshner M, Watkins LR. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Ann NY Acad Sci.* 1998; 840: 289–300.
- Mastorakos G., Weber JS., Magiakou MA., Gunn H, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and stimulation of systemic vasopressin secretion by recombinant IL-6 in humans: potential implications for the syndrome of inappropriate vasopressin secretion. *J Clin Endocrinol.* 1994; 79: 934–9.
- Matyszak MK, Citterio S, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 2000; 30: 1233–1242.
- McCann SM., Sternberg EM., Lipton JM., Chrousos GP., Gold PW., Smith CC.

Neuroimmunomodulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1998: 840

Mignini F, Streccioni V, Amenta F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2003; 23: 1–25.

Miller AH, Spencer RL, Pulera M, Kang S, McEwen BS, Stein M. Adrenal steroid receptor activation in rat brain and pituitary following dexamethasone: implications for the dexamethasone suppression test. *Biol Psychiatry.* 1992; 32:850–869.

Mills PJ, Berry CC, Dimsdale JE, Ziegler MG, Nelesen RA, Kennedy BP. Lymphocyte subset redistribution in response do acute experimental stress: effects of gender, ethnicity, hypertension, and the sympathetic nervous system. *Brain Behav Immun.* 1995; 9: 61–9.

Mills PJ, Yu H, Ziegler MG, Patterson T, Grant I. Vulnerable caregivers of patients with Alzheimer's disease have a deficit in circulation CD62L-T lymphocytes. *Psychosom Med.* 1999; 61: 168-174.

Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 2004; 172: 4676-4680.

Mondino A, Jenkins MK. Surface proteins involved in T cell costimulation. *J Leuk Biol.* 1994; 55(6): 805-15.

Montgomery D, Zukoski C, Shah G, Buckley A, Pacholszyk T, Russel D. Con-A stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. *Biochem Biophys Res Comm.* 1987; 145: 692–98.

Mora S, Dubassaut N, Diaz-Veliz G. Effects of estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology.* 1997; 21(7): 609–20.

Morgulis MS, Stankevicius D, Sa-Rocha LC, Palermo-Neto J. Cohabitation with a sick cage mate: consequences on behaviour and on ehrlich tumour growth. *Neuroimmunomodulation*, 2004; 11(1): 49-57.

Mormede C, Palin K, Kelley KW, Castanon N, Dantzer R. Conditioned taste aversion with lipopolysaccharide and peptidoglycan does not activate cytokine gene expression in the spleen and hypothalamus of mice. *Brain Behav Immun.* 2004; 18: 186–200.

Moser M, de Smedt T, Sornasse T, Tielemans F, Chentouffi AA, Muraille E, van Mechelen M, Urbain J, Leo. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol.* 1995 Oct; 25(10): 2818-2814.

Murray SE, Rosenzweig HL, Johnson M, Huising MO, Sawicki K, Stenzel-Poore, MP. Overproduction of corticotropin releasing hormone blocks germinal center formation: role of corticosterone and impaired follicular dendritic cell networks. *J Neuroimmunol.* 2004; 156: 31–41.

Navaie-Waliser M, Spriggs A, Feldman PH. Informal caregiving: differential experiences by gender. *Med Care*, 2002; 40: 1249–59.

Norman AW., Litwack G. *Hormones*. 2nd Ed. San Diego: Academic Press. 1997

Netea MG, Kullberg BJ, Van der Meer JWM. Circulating cytokines as mediators of fever. *Clin Infect Dis*. 2000; 31: 178–184.

Opp MR. Sleep and psychoneuroimmunology. *Neurol Clin*. 2006; 24(3): 493-506.

Palermo-Neto J, Massoco CO, de Souza WR. Effects of physical and psychological stressor on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav Immun*. 2003; 17: 43-54.

Paré WP, Glavin GB. Animal models of stress in pharmacology. *Methods Behav Pharmacol*. 1993; 413–441.

Parmigiani S, Brain PF, Palanza P. Ethoexperimental analysis of different forms of intraspecific aggression in the house mouse. In.: Blahchard R. *Ethoexperimental approaches to the study of behavior*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1989. p. 418 – 31.

Pariante CM, Carpinello B, Orru MG, Sitzia R, Piras A, Farci AM, Del Giacco GS, Piludu G, Miller AH. Chronic caregiving stress alters peripheral blood immune parameters: The role of age and severity of stress. *Psychother Psychosom*. 1977; 66: 199–207.

Pellow S, Chopin SE, File SE, Briley M. Validation of open:closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985; 14: 149–167.

Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, Socci C, di Carlo. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol*. 1999 Jun 1; 162(11): 6473-6481.

Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res*. 2007; 43(4): 365-71.

Probst HC, Lagnel J, Kollias G, Van Den Broek M. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cell as potent inducers of CD8⁺ T cell tolerance. *Immunity*. 2003; 18:713-720.

Raber J, O'Shea RD, Bloom FE, Campbell IL. Modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function by transgenic expression of interleukin-6 in the CNS of mice. *J Neurosci*. 1997; 17(24): 9473–80.

Ramierz F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a Th2 cytokine response by CD4⁺ T cells in vitro. *J Immunol*. 1996; 156: 2406-2412.

Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *The Lancet Oncol.* 2004; 5(10): 617–625.

Reul, JM, de Kloet, ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 1985; 117 (6): 2505–2511.

Rogausch H, Del Rey A, Oertel J, Besedovsky H. Norepinephrine stimulates lymphoid cell mobilization from the perfused rat spleen via β -adrenergic receptor. *Am J Physiol.* 1999; 276: 724.

Rogers MP, Reich P, Strom TB, Carpenter CB. Behaviorally conditioned immunosuppression: replication of a study. *Psychosom Med.* 1976; 38: 447–51.

Roskova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol.* 2006.

Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 1995; 18: 130–6.

Rothwell NJ, Loddick S, Lawrence C. Cytokines and neurodegeneration. In: *Immune Responses in the Nervous System.* Oxford (UK): Bios Scientific Publishers; 1995.

Rutella S, Lemoli RM. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett.* 2004; 94:11-26.

Sa-Rocha VM, Sa-Rocha LC, Palermo-Neto J. Variations in behavior, innate immunity, and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. *Physiol Behav.* 2006; 88: 108–115.

Saint-Mezard P, Chavagnac C, Bosset S, Ionescu M, Peyron E, Kaiserlian D, Nicolas JF, Bérard F. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *J Immunol.* 2003 Oct 15; 171(8): 4073-80.

Sapolsky RM, Rivier C, Yamamoto G, Plotsk P, Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin releasing factor. *Science,* 1987; 238: 522–4.

Sapolsky RM. Neuroendocrinology of the stress-response. In: Becker JB, Breedlove SM, Crews M. *Behavioural endocrinology.* Cambridge, Mass: The Mit Press; 1993.

Sapolsky RM. *Why Zebras don't get Ulcers: an update guide to stress, stress related diseases, and coping.* 2nd Ed. New York: WH Freeman; 1998.

Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature,* 1936; 32

Singh VK., Warren RP., White ED, Leu JPC. Corticotropin releasing-factor induced stimulation of immune functions. *Ann NY Acad Sci.* 1990; 594: 416–9.

- Sklar LS, Anisman H. Social stress influence tumor growth. *Psychosom Med.* 1980; 42(3): 347–365.
- Smith A, Vollmer-Conna U, Benett B, Wakefield D, Hickie I, Lloyd A. The relationship between distress and the development of a primary response to a novel antigen. *Brain Behav Immun.* 2004; 18(1): 65-75.
- So EY, Kim SH, Cho BS, Park HH, Lee CE. Corticosteroid inhibits IL-4 signaling through down-regulation of IL-4 receptor and STAT6 activity. *FEBS Lett.* 2002; 518: 53–9.
- Spector NH. Neuroimmunomodulation: a brief review. Can conditioning of natural killer cell activity reverse cancer and/or aging? *Regul Toxicol Pharmacol.* 1996; 24: 32–8.
- Stefanski V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. *Psychoneuroendocrinology.* 2000; 25(4): 389–406.
- Steinbrik K, Jonuleit H, Müller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8⁺ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*, 1999 March 1; 93(5): 1634-1642.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973; 137(5): 1142-62.
- Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007; 449(7161): 419-26.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussensweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 685-711.
- Sternberg EM. Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest.*, 1997; 100: 2641–47.
- Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interaction in lymph nodes. *Science.* 2002; 296: 1873-1876.
- Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and Pathophysiology of the Stress System. *Ann NY Acad Sci.* 1995; 771: 364-371.
- Subudhi SK, Alegre ML, Fu YX. The balance of immune response: costimulation versus coinhibition. *J Mol Med.* 2005; 83: 193–202.
- Tabarowsky Z, Gibson-Berry K, Felten SY. Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow. *Acta Histochem.* 1996; 98: 453–457.
- Tada T. The immune system as a supersystem. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 1–13.

Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2006; 203(3): 505-511.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda S, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1997; 11(4): 443-51.

Thompson RL, Lewis SL, Murphy MR, Hale JM, Blackwell PH, Acton GJ, Clough DH, Patrick GJ, Bonner PN. Are the sex differences in emotional and biological responses in spousal caregivers of patients with Alzheimer's disease? *Biol Res Nurs*. 2004; 5: 319-30.

Vegas O, Beitia G, Sánchez-Martin JR, Arregi A, Azpiroz A. Behavioral and neurochemical responses in mice bearing tumors submitted to social stress. *Behav. Brain Res*. 2004; 155:125–134.

Villano BL, Barbuto JA, Malucelli BE. Effects of social isolation on Ehrlich tumor growth and tumor leukocyte infiltration in mice: evidence of participation of the submaxillary salivary gland. *Neuroimmunomodulation*, 2001; 9(6): 313–318.

Viswanathan K, Daugherty C, Dhabhar FS. Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. *Int Immunol*. 2005, 17(8): 1059–69.

Xia CQ, KAO KJ. Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal protein kinase. *Scand J immunol*. 2003; 166:4312.

Xu L, Yang J, Huang Y, van der Meide PH, Levi M, Wahren B, Link H, Xiao B. Limitation of nitric oxide production: cells from lymph node and spleen exhibit distinct difference in nitric oxide production. *Immunol Lett*. 2000; 71(3): 177-84.

Wakkach A, Fuornier N, Brun V, Breittmeyer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 2003; 18: 605-617.

Ward MM, Marx AS, Barry NN. Psychological distress and changes in the activity of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2002; 41(2): 184-8.

Wieseler-Frank, J, Maier SF, Watkins LR. Central pronflammatory cytokines and pain enhancement. *Neurosignals*, 2005; 14: 166–74.

Williams MS, Noguchi S, Henkart PA, Osawa Y. Nitric oxide synthase plays a signaling role in TCR-triggered apoptotic death. *J Immunol*. 1998; 161: 6526–31.

Winter JS., Gow KW, Perry YS., Greenberg AH. A stimulatory effect of interleukin-1 on adrenocortical cortisol secretion mediated by prostaglandins. *Endocrinology*, 1990; 127: 1904–9.

- Wolff R. *in* End-of-life caregiving often like a full-time job. *Cancer J Clin.* 2007; 57: 128–9.
- Wrona D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol.* 2006; 172: 38–58.
- Zhang TY, Daynes RA. Glucocorticoid conditioning of myeloid progenitors enhances TLR4 signaling via negative regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *J Immunol.* 2007; 178(4): 2517-26.
- Zhou LJ, Schwarting R, Smiyh HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol.* 1992; 149:135-742.
- Zimmerberg B, Farley MJ. Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. *Physiol Behav.* 1993: 1119–24.
- Zorrila EP, Luborsky L, McKay JR, Rosenthal R, Houldin A, Tax A, McCorkle R, Seligman DA, Schimdt K. The Relationship of Depression and Stressors to Immunological Assays: A Meta-Analytic Review. *Brain Behav Immun.*, 2001; 15: 199–226.