

VANESSA DE MOURA SÁ ROCHA

Aspectos neuroimunes de camundongos mantidos em uma relação social estável

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

Departamento:
Patologia

Área de Concentração
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. João Palermo-Neto

São Paulo

2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1644
FMVZ

Sá-Rocha, Vanessa de Moura

Aspectos neuroimunes de camundongos mantidos em uma relação social estável / Vanessa de Moura Sá-Rocha. – São Paulo: V. S. Sá-Rocha, 2006.

145 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo-Neto.

1. Neuroimunomodulação. 2. Dominância. 3. Estresse. 4. Tumor.
5. Corticosterona. I. Título.




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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo das relações neuroimunológicas ao longo do desenvolvimento tumoral", Protocolo nº 41/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 27/02/2002.

(We certify that the Research "Study of neuroimmunological relationships during a tumor development" protocol number 41/2002, under the responsibility of Prof.Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 02/27/2002 meeting.)

São Paulo, 27 de fevereiro de 2002


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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SÁ-ROCHA, Vanessa de Moura

Título: Aspectos neuroimunes de camundongos mantidos em uma relação social estável

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Para Lú e Pedro Henrique

Poema enjoadinho

De: Vinicius de Moraes

*Filhos... Filhos?
Melhor não tê-los!
Mas se não os temos
Como sabê-los?
Se não os temos
Que de consulta
Quanto silêncio
Como os queremos!
Banho de mar
Diz que é um porrete...
Cônjuge voa
Transpõe o espaço
Engole água
Fica salgada
Se iodifica
Depois, que boa
Que morenaço
Que a esposa fica!
Resultado: filho.
E então começa
A aporrinhação:
Cocô está branco
Cocô está preto
Bebe amoníaco
Comeu botão.
Filhos? Filhos
Melhor não tê-los
Noites de insônia
Cãs prematuras
Prantos convulsos
Meu Deus, salvai-o!
Filhos são o demo
Melhor não tê-los...
Mas se não os temos
Como sabê-los?
Como saber
Que macieza
Nos seus cabelos
Que cheiro morno
Na sua carne
Que gosto doce
Na sua boca!
Chupam gilete
Bebem xampu
Ateiam fogo
No quarteirão
Porém, que coisa
Que coisa louca
Que coisa linda
Que os filhos são!*

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho a várias pessoas que amo:

*Aos meus queridos Lú e Pedro Henrique pela imensa
felicidade que representam em minha vida*

*Aos meus pais por todo o esforço que foi empenhado
durante toda esta jornada*

*Aos meus irmãos pela enorme amizade, confiança e apoio
irrestrito nos caminhos que decidi escolher*

*À Dorothea e Luiz José Sá Rocha, que me receberam
na família como uma filha*

*À Ana, Zé, Murilo, Léo, Sandra, Alexandre e Marcão,
pelos maravilhosos momentos em família*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao meu querido orientador João Palermo Neto
Exemplo de dinamismo, seriedade, competência e liderança
Muito obrigada por me receber em seu laboratório
Agradeço de coração por todos estes anos de incentivo
dedicação e investimento na minha formação
acadêmica, científica e pessoal*

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Ao programa de pós graduação em patologia experimental e comparada

Aos professores do Departamento de Patologia: Idércio, Matú, Luciano, Helenice, Meirusse, Nívea, Guerra, Martha, Arthur, Alda, Silvana e Malú, pelo convívio e ensinamentos durante estes anos

Ao Prof. Jorge pela inestimável ajuda na dosagem dos neurotransmissores

Ao Prof. Cláudio Alvarenga e a técnica Priscila do Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal pela dosagem de corticosterona

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia: Ricardo, Magali e Jibóia, por toda ajuda na execução deste trabalho

Aos funcionários do biotério do departamento de patologia: Cláudia, Idalina, Rosires, Herculano, Nelsinho e Sr. Luizinho que se dedicam arduamente aos cuidados dos animais de experimentação

Aos funcionários: Marguite, Romeika, Cláudia, Silvia, Shirley, Buga, Cláudio e Cristina

A todas as funcionárias da Biblioteca por toda ajuda durante estes anos de convívio e por fazer desta biblioteca um excelente local de estudo e aprendizado

As funcionárias da secretaria da pós-graduação desta faculdade por todo carinho e ajuda

Aos amigos e colegas de pós-graduação: Cris Massoco, Silvia Morgulis, Eva, , Fred, Basso, Natô, Carol, Sandra, Adriana, Mônica, Daniel, Viviane, Lú Vismari, Marcos, Ricardão, Elaine, Portela, Andréia, Heidge, Domênica, Ísis, Glauciê, Maria Isabel, Renato, Ana Leda, Teresa, Beth, Dario por tudo que me ensinaram.

**Este trabalho recebeu apoio financeiro das seguintes agências de
fomento à pesquisa:**

CNPq processo número: 301708/2004-5 e 140636/2002-1

Fapesp – Temático - processo número: 04/12128-0

RESUMO

SÁ-ROCHA, V. M. **Aspectos neuroimunes de camundongos mantidos em uma relação social estável.** [Neuroimmune aspects of mice in social stable relationships]. 2006. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O objetivo do presente trabalho foi investigar as repercussões de uma relação social estável sobre diferentes parâmetros de comportamento, neuroquímica e atividade imune de camundongos dominantes e submissos. Machos adultos (com aproximadamente 90 dias de idade) mantidos em duplas desde o desmame, foram determinados como dominantes ou submissos, após três avaliações consecutivas do comportamento, onde foram observadas a presença ou ausência de ataques ou fugas e posturas de submissão. Em alguns experimentos, grupos de cinco animais mantidos em uma mesma caixa foram utilizados para comparação com resultados obtidos de animais que conviveram em duplas. Foram utilizadas apenas as duplas de camundongos onde a hierarquia social foi claramente observada. Os resultados mostraram que os animais submissos apresentaram em relação aos dominantes: 1) diminuição no tempo gasto na zona central do campo aberto; 2) diminuição no número de entradas nos braços abertos e diminuição no tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado; 3) aumento no tempo gasto na exploração dos braços fechados do labirinto em cruz elevado; 4) diminuição no número de entradas e no tempo gasto na exploração do terço final dos braços fechados do labirinto em cruz elevado; 5) aumento na taxa de renovação de dopamina no hipotálamo; 6) diminuição da taxa de renovação de dopamina no corpo estriado; 7) maior número de metástases induzidas pelo melanoma murino experimental B16F10; 8) aumento do percentual de células T CD8⁺ no timo após 14 dias de inoculação do mesmo melanoma; 9) diminuição no burst oxidativo basal de neutrófilos e monócitos sanguíneos, mas não naquele induzido por bactérias; 10) menor atividade de células NK presentes no baço e no

sangue. Em relação aos animais mantidos em número de cinco, os animais submissos apresentaram: menor percentual de células NK no sangue. Já os animais dominantes, apresentaram em relação aos animais mantidos em grupos: 1) aumento da taxa de renovação de noradrenalina no hipotálamo; 2) aumento na taxa de renovação de dopamina no corpo estriado; 3) menor percentual de células NK no sangue. O *status* social, no entanto, não provocou diferenças: 1) nos níveis absolutos de dopamina, noradrenalina e serotonina; 2) nos metabólitos de serotonina; 3) nos níveis séricos basais de corticosterona; 4) no peso e número de células do baço e timo; 5) no percentual de células T CD4⁺ e CD8⁺ no baço e 6) no percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos sanguíneos. Em conjunto, os presentes resultados mostraram que animais dominantes e submissos mantidos por 90 dias em uma hierarquia social estável, apresentaram diferenças comportamentais e neuroquímicas, e responderam de forma diferente a um mesmo estímulo imune, no caso, o desenvolvimento de metástases induzida nos pulmões pela administração do melanoma experimental murino B16F10. Estes resultados sugerem que diferentes mecanismos, que não a ativação do eixo HPA, estejam envolvidos com o aumento de susceptibilidade ao desenvolvimento do tumor observado nos indivíduos submissos.

Palavras chave: Neuroimunomodulação. Dominância. Estresse. Tumor. Corticosterona.

ABSTRACT

SÁ-ROCHA, V. M. **Neuroimunes aspects of mice kept in a stable social relation.** [Neuroimmune aspects of mice in a stable social relationships]. 2006. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The objective of the present work was to investigate the repercussions of a stable social relationship on different parameters of the behavior, neurochemical and immune activity of dominant and submissive mice. Adult males (with approximately 90 days of age) kept in pairs since wean it, had been determined as dominant or submissives, after three consecutive evaluations of the behavior, where presences or absences of attacks or escapes and positions of submission had been observed. In some experiments, groups of five animals kept in one same box had been used to compare the results gotten between these and the animals coexisting in pairs. The pairs had been used only where the social hierarchy clearly was observed. The results had shown that the submissive animals in relation to the dominant ones had presented: 1) reduction in the time spent in the central zone of the open field; 2) reduction in the number of entrances in the open arms and reduction in the time spent in the exploration of the open arms of the plus maze; 3) increase in the time spent in the exploration of the closed arms of the plus maze; 4) reduction in the number of entrances and time spent in the exploration of the final third of the closed arms of the plus maze; 5) increase in the turnover of dopamine in the hypothalamus; 6) reduction in the turnover of dopamine in the corpus striatum; 7) increased number of metastasis in the lungs induced by murino melanoma experimental B16F10; 8) increase of the percentage of cells T CD8⁺ in the thymus after 14 days of inoculation of the same melanoma; 9) reduction in the basal oxidative burst of neutrophil and monocytes sanguine, but not in the induced by bacteria; 10) decreased NK cells activity measured in the blood and spleen. In relation to the animals kept in number of

five, the submissive animals had presented: 1) reduction in the percentage of NK cells in the blood. While the dominant animals had presented in relation to the animals kept in groups: 1) increase in the turnover of norepinephrine in hypothalamus; 2) increase in the turnover of dopamine in the whole body; 3) reduction in the percentage of NK cells in the blood. The social status, however, did not provoke differences: 1) in the absolute levels of dopamine, norepinephrine and serotonin; 2) in the metabolites of serotonin; 3) in the serum levels of corticosterone; 4) in the weight and number of cells of the spleen and thymus; 5) in the percentage of cells T CD4⁺ and CD8⁺ in the spleen and 6) in the percentage of lymphocytes, neutrophil and monocytes in the blood. Together, the results obtained had shown that dominants and submissive animals kept 90 days living in a stable social hierarchy had presented behavior and neurochemical differences, and had answered of different form to one same immune stimulation, in this case, the induced development of metastasis in the lungs for experimental melanoma murino B16F10, where the submissive had been more susceptible than the dominant ones. This results suggest that other mechanisms, different of HPA activation, may be involved with the decreased resistance of submissive mice to B16F10 tumor dissemination.

Key words: Neuroimmunomodulation. Dominance. Stress. Tumor. Corticosterone.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	NEUROIMUNOMODULAÇÃO - INTERAÇÕES ENTRE OS SISTEMAS NEUROENDÓCRINO E IMUNE	19
2.1.1	O Sistema imune modulando o SNC	21
2.1.2	O SNC modulando o Sistema imune	27
2.1.3	O estresse e seus efeitos bidirecionais sobre o SI	35
2.1.4	A hierarquia social, o estresse e as diferentes estratégias individuais para lidar com uma situação estressante	45
3	OBJETIVOS	52
3.1	OBJETIVO GERAL.....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4	MATERIAL E METODOS	54
4.1	ANIMAIS	54
4.2	DROGAS E REAGENTES	55
4.2.1	Drogas	55
4.2.2	Reagentes	55
4.3	FORMAÇÃO DOS GRUPOS E ESTABELECIMENTO DAS RELAÇÕES DE DOMINÂNCIA/SUBMISSÃO	58

4.4	ESTUDOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	59
4.4.1	Campo aberto e medida da atividade geral	60
4.4.2	Medida da ansiedade por meio do Labirinto em cruz elevado	62
4.5	DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA.....	64
4.6	NEUROQUÍMICA.....	65
4.6.1	Coleta e processamento dos tecidos cerebrais para neuroquímica	65
4.6.2	Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos	66
4.7	ESTUDO DE RESISTÊNCIA AO CRESCIMENTO DO MELANOMA B16F10.....	68
4.8	CITOMETRIA DE FLUXO	69
4.8.1	Estudo da atividade de neutrófilos e monócitos sanguíneos	70
4.8.2	Estudo da atividade de células NK	73
4.8.3	Imunofenotipagem	75
4.8.3.1	Determinação do percentual de células NK no sangue por anticorpo monoclonal	75
4.8.3.2	Determinação do percentual de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no baço e timo por anticorpo monoclonal.....	76
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	78

5.1	EXPERIMENTO 1: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL EM DUPLAS DE CAMUNDONGOS SOBRE A ATIVIDADE GERAL E OS NÍVEIS DE ANSIEDADE DOS ANIMAIS DOMINANTES E SUBMISSOS	78
5.2	EXPERIMENTO 2: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA	83
5.3	EXPERIMENTO 3: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE OS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES E DE SEUS METABÓLITOS	84
5.4	EXPERIMENTO 4: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE O NÚMERO DE METÁSTASES PULMONAR INDUZIDA PELO MELANOMA EXPERIMENTAL B16F10	94
5.5	EXPERIMENTO 5: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE O PESO E A CELULARIDADE DO BAÇO E TIMO DE ANIMAIS INOCULADOS OU NÃO COM O MELANOMA B16F10	96
5.6	EXPERIMENTO 6: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE O PERCENTUAL DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS	99
5.7	EXPERIMENTO 7: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS TCD4 ⁺ E TCD8 ⁺ NO BAÇO E TIMO	102
5.8	EXPERIMENTO 8: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS SANGÜÍNEOS.....	104
5.9	EXPERIMENTO 9: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE A ATIVIDADE DE CÉLULAS NK DE ANIMAIS DOMINANTES E SUBMISSOS	105
6	DISCUSSÃO	106
7	CONCLUSÕES	123
	REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

Pares de camundongos colocados em um ambiente neutro prontamente iniciam um combate, caracterizado por um ritual estereotipado que tem como propósito o estabelecimento do território a ser ocupado pelo macho vencedor (MOYER, 1976). Esta situação de confronto social, tem sido amplamente utilizada como modelo de estresse social em ratos e camundongos, e seus efeitos podem ser relevantes para o entendimento de doenças relacionadas ao estresse em seres humanos (MARTINEZ et al., 1998). Vários modelos de estresse social têm sido desenvolvidos e apresentam como foco principal de estudo uma análise das conseqüências biológicas dos efeitos do estresse induzido pela subordinação (BLANCHARD, et al.1995, GINSBURG; ALLEE, 1942; FUCHS, 1996). O modelo mais utilizado para este tipo de estudo é o chamado intruso - residente, no qual um animal (rato ou camundongo) é colocado individualmente (ou na presença de uma fêmea castrada) durante alguns dias dentro de uma gaiola de moradia. Em seguida, um outro macho, objeto do estudo (geralmente mais novo ou menor do que o macho residente) é colocado por uma única ou várias vezes dentro desta gaiola, analisando-se a partir deste momento as conseqüências da disputa pela dominância daquele ambiente.

Os estudos que abordam os efeitos do estresse induzido nestas condições de confronto social analisam, na maioria das vezes, os efeitos de um estresse agudo (confrontação única) ou crônico (confrontações repetidas) sobre os animais. Nestes modelos os animais apresentam, nos breves encontros que têm, uma instabilidade das relações sociais, que leva a confrontos intensos e constantes vinculados ao estabelecimento da dominância entre eles. Por outro lado, após um certo número de confrontos entre uma determinada dupla estabelece-se, uma relação de dominância-submissão entre eles. Quando isto ocorre, a probabilidade de

novas lutas é substancialmente reduzida porque o animal submisso aprende a responder antecipadamente à agressão do oponente assumindo posturas e sinais comportamentais específicos (postura defensiva).

Alterações na função imune têm sido constantemente associadas aos efeitos do estresse, tanto em humanos como em modelos animais. Assim, já foi relatado um aumento na capacidade de proliferação de linfócitos e na produção de anticorpos em camundongos submissos mantidos em condições de confronto social (FAUMAN, 1987; LYTE; NELSON, 1990). Por outro lado, também já foi visto uma diminuição na atividade de células NK, na produção de citocinas e na proliferação de linfócitos em ratos e camundongos submissos submetidos ao confronto social (HARDY et al., 1990; IRWIN et al., 1990). Entretanto, pouco se sabe sobre o comportamento e a função imune de camundongos dominantes e submissos que vivenciam uma relação na qual a hierarquia social se encontra estável. Será que nesta condição, os camundongos submissos apresentam alterações semelhantes às aquelas observadas em uma situação de estresse agudo ou crônico por confronto social? O presente trabalho foi elaborado para avaliar as alterações comportamentais, neuroquímicas, bioquímicas e imunes de animais dominantes e submissos mantidos em uma relação social estável.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO - INTERAÇÕES ENTRE OS SISTEMAS NEUROENDÓCRINO E IMUNE

Neuroimunomodulação ou Psiconeuroimunologia é a denominação do campo de pesquisa interdisciplinar que estuda as complexas relações existentes entre os Sistemas Nervoso, Endócrino e Imune.

Aproximadamente 200 A.C., o filósofo grego Galeno já relatava que mulheres melancólicas eram mais susceptíveis ao câncer que mulheres de “sangue quente”. No entanto, embora muitos acreditassem na existência de importantes comunicações entre o Sistema Nervoso (SN) e o Sistema Imune (SI), não se conhecia até a pouco tempo, nenhuma base biológica para a existência dessas interações. Na verdade, desde o trabalho pioneiro de Hans Selye sabe-se que o Sistema Nervoso Central (SNC), pela mediação que exerce sobre funções neuroendócrinas durante o estresse, é capaz de influenciar respostas orquestradas pelo SI. Selye demonstrou que o estresse causava aumento no tamanho da adrenal, hipotrofia do timo e linfonodos e que ratos adrenalectomizados e hipofisectomizados não apresentavam tais alterações, revelando este fato a existência de um eixo funcional entre a hipófise e a adrenal, de grande importância para a comunicação entre o SN e o SI (SELYE, 1956).

Entretanto, segundo Dunn (1999), apenas em 1975 surgiu o primeiro trabalho mostrando evidências seguras de que o SN poderia afetar o SI. Ader e Cohen conduziram um estudo especificamente delineado para determinar se um estímulo condicionado – a ingestão de uma solução adocicada com sacarina - pareado com ciclofosfamida, uma droga

imunossupressora, seria capaz de promover o condicionamento da resposta imune. Os autores observaram que os animais re-expostos somente à sacarina apresentaram uma redução da resposta imune frente ao desafio com o antígeno, quando comparados tanto aos animais condicionados que não foram re-expostos à sacarina, como aos animais não condicionados que beberam solução com sacarina ou ao grupo controle tratado com placebo. Este fenômeno foi, posteriormente, repetido em outros laboratórios; no entanto, os mecanismos íntimos envolvidos com o mesmo não são ainda compreendidos e a interpretação destes achados ainda é controversa. Porém, os resultados trazem de maneira inequívoca, evidências de que alterações no SN podem influenciar a resposta imune e vice-versa.

Outro estudo considerado um marco na demonstração das interações entre o SNC e o SI, foi o de Bartrop¹ et al. (1977 apud URSIN, 1994, p. 204-211). Neste trabalho, os autores reportaram a ocorrência de uma redução na função de linfócitos após uma situação de luto, mostrando que uma situação de estresse psicológico é capaz de produzir alterações da função imune

A razão lógica que tem justificado a existência de uma comunicação entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune é que estes sistemas compartilham de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos comuns (BLALOCK, 1984; CARR, 1992; LIGNON et al., 1991; OVADIA; ABRAMSKY, 1987). Além disso, produtos originalmente tidos como específicos de cada um destes sistemas coexistem em tecidos linfóides, endócrino e nervoso. Assim, por exemplo, há células linfóides produzindo ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) e TSH (hormônio estimulador da tireóide) (BLALOK, 1984) e citocinas sendo produzidas no SNC (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). Estas observações

¹Bartrop, R. W., E. Luckhurst, et al.. Depressed lymphocyte function after bereavement. **Lancet**, v.1, n.8016, Apr 16, p.834-6, 1977.

indicam a existência de comunicações bidirecionais entre os sistemas neuroendócrino e imune, ou seja, tanto mecanismos neuroendócrinos podem modular a atividade do SI, quanto este pode influenciar a atividade do sistema neuroendócrino (MADDEN; FELTEN, 1995).

2.1.1 O Sistema imune modulando o SNC

Besedovsky foi o primeiro cientista a mostrar que um aumento na produção de anticorpos era acompanhado de um aumento de até três vezes na concentração plasmática de corticosterona, frente a um desafio com hemácias de carneiro em ratos. Dois anos depois, este mesmo autor demonstrou um aumento na atividade elétrica das células do núcleo ventromedial do hipotálamo durante o pico da resposta de anticorpos formados em resposta a uma imunização primária (BESEDOVSKY et al., 1975,1977a,1977b), sendo estes achados posteriormente replicados por Saphier et al. (1987). Estes trabalhos demonstraram que o SN pode perceber e responder a sinais emitidos pela atividade do SI durante uma resposta a um estímulo imunogênico.

Assim, seria possível então que produtos secretados por células imunes ativadas pudessem influenciar a função neuroendócrina. Neste sentido, Besedovsky (1981) observou que o sobrenadante de células imunes ativadas *in vitro* com concanavalina A era capaz de induzir um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona em ratos, através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Este autor foi o primeiro a mostrar evidências de que a ativação do sistema imune e a conseqüente liberação de seus mediadores solúveis provocam alterações na resposta endócrina pelas ações destes mediadores no SNC.

Mostrou-se, também, que a ativação do eixo HPA relatada para o tratamento com hemácias de carneiro e outros antígenos, ocorria 5-8 dias após o tratamento, momento que

coincidia com o pico de produção de anticorpos. Observações similares foram feitas por outros pesquisadores utilizando como antígeno a proteína básica de mielina (MACPHEE et al., 1989). Outros pesquisadores trouxeram evidências experimentais de que a resposta neuroendócrina induzida por produtos secretados por células imunes era iniciada após a ativação do sistema imune (BESEDOVSKY, 1996). Estas respostas indicam que o cérebro recebe informações do sistema imune e responde aos sinais destas substâncias derivadas das células imunes. Posteriormente foi demonstrado que a IL-1, substância produzida, por exemplo, por macrófagos e monócitos ativados, é capaz de promover um aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona pela ativação do eixo HPA, com conseqüente liberação de ACTH em ratos e camundongos (BESEDOVSKY et al., 1986). Em seguida, outros autores apresentaram evidências de que a IL-6, o TNF- α , o IFN- γ e a IL-12 também são capazes de estimular o eixo HPA (HOLSBOER et al., 1988; NAITOH et al., 1988; SACCO et al., 1997; SHARP et al., 1989). Entretanto, estudos comparativos mostraram que a IL-1 é mais potente do que o TNF- α e a IL-6 na capacidade de aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona (BESEDOVSKY et al., 1991).

Posteriormente descobriu-se que a administração intraperitoneal de IL-1 era capaz de diminuir as concentrações de noradrenalina (NOR) no hipotálamo de ratos (KABIERSCH et al., 1988). Outros autores mostraram que o metabólito da noradrenalina MHPG e a razão MHPG/NOR, no hipotálamo, estavam aumentados após a administração de IL-1 e estas alterações foram correlacionadas com o aumento da concentração plasmática de ACTH e de corticosterona, mostrando que a ativação do eixo HPA pela IL-1 envolve modificações no metabolismo de NOR no hipotálamo (DUNN, 1988,1992). Além disso, Uehara (1987) mostrou que camundongos tratados com anticorpos anti fator liberador de corticotropina (CRF) não apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona e de ACTH após administração de IL-1. O conjunto destes resultados sugerem fortemente que a ação da IL-1 se

faça por meio da ativação de neurônios produtores do hormônio liberador de corticotrofina localizados no hipotálamo (BERKENBOSCH, 1987).

As citocinas são moléculas protéicas relativamente grandes e que apresentam natureza hidrofílica e por isso não atravessam livremente a barreira hemato-encefálica. Desta forma, como estas moléculas poderiam alcançar estruturas centrais e promover alterações da atividade deste sistema? Neste contexto, há evidências de que esta comunicação se dá por via neural, representada fundamentalmente pelo nervo vago, cujas terminações inervam todos os órgãos da cavidade peritoneal (KONSMAN; PARNET et al., 2002). Assim, já foi relatado que a liberação de IL-1 por macrófagos estimulados por LPS é capaz de estimular fibras aferentes vagais que transmitiriam informações para o SNC (GOEHLER et al., 1999; MAIER et al., 1998). Neste sentido, foi verificado que a seção do nervo vago foi capaz de evitar diversos componentes do comportamento doentio, além de impedir a ativação induzida pela administração de IL-1 ou LPS de áreas do tronco cerebral, hipotálamo e estruturas límbicas (KONSMAN; PARNET et al., 2002). Demonstrou-se ainda, uma segunda forma de comunicação que se faz por via humoral; esta comunicação é mais lenta, uma vez que as citocinas produzidas a partir da injeção de LPS ou IL-1 caem na corrente sanguínea e sua mensagem atinge o cérebro por meio das células endoteliais, que produzem prostaglandinas (em especial PGE2) após o estímulo do LPS ou IL-1. A PGE2 exerceria seus efeitos por meio de receptores (EP4) expressos em neurônios da área pré-optica medial e núcleo paraventricular do hipotálamo (KONSMAN; PARNET et al., 2002). Além disso, as citocinas presentes na corrente sanguínea podem ainda passar para o interior do cérebro em locais onde a barreira hemato-encefálica é mais fraca, como o plexo coróide e os órgãos circumventriculares, estimulando macrófagos localizados nesta região a produzirem mais IL-1, que exerceria seu efeito por meio de receptores expressos em neurônios presentes em

diversas áreas do cérebro, como o núcleo do trato solitário, hipocampo e amígdala (KONSMAN; PARNET et al., 2002).

A ativação do eixo HPA e a conseqüente liberação de ACTH e de glicocorticóides fazem parte das respostas neurovegetativas ligadas a situações de estresse e ansiedade (GRAEFF, 1989). Desta forma, a ativação do eixo HPA pela IL-1, produzida durante um processo inflamatório ou infeccioso, passa então, a ser considerada uma situação capaz de gerar estresse ou ansiedade de forma semelhante àquela desencadeada por estímulos ambientais ou físicos (DUNN, 1995).

De fato, a administração periférica e central de baixas doses de IL-1 em camundongos induz um padrão de respostas comportamentais que inclui uma diminuição da atividade locomotora (OTTERNESS, 1988), anorexia (MCCARTHY, 1986), diminuição da atividade exploratória (DUNN, 1991), bem como da atividade sexual e aumento no tempo de sono (SPADARO, 1990a,1990b). Segundo Hart (1988) estas alterações, que ocorrem tipicamente durante uma infecção, não devem ser compreendidas como um estado de depressão inespecífica e/ou generalizado do SNC, mas sim como uma estratégia comportamental altamente especializada, frente a uma situação em que o animal encontra-se em um potencial risco de vida. Assim, cada uma destas respostas fazem parte da reação homeostática natural do organismo para combater a infecção, sendo este conjunto de alterações comportamentais denominado de “comportamento doentio” (KENT, 1992).

Os mecanismos através dos quais a IL-1 modula o comportamento não estão totalmente compreendidos; entretanto, existem fortes evidências mostrando o envolvimento do CRF na modulação da atividade locomotora, alimentação e atividade exploratória (DUNN, 1991). Há, também, outros trabalhos demonstrando a participação das prostaglandinas nas alterações comportamentais ocasionadas pela injeção de IL-1 (HELLERSTEIN et al., 1989). Assim, a administração periférica ou central de IL-1 mimetiza alterações comportamentais e

neuroquímicas observadas após a administração de LPS ou do vírus de *Newcastle* (DUNN, 1995); entretanto, é muito provável que nestas situações outros componentes estejam envolvidos.

A ativação deste eixo é entendida como um mecanismo de regulação no qual os hormônios liberados exercem um papel modulador de diversas funções orgânicas, dentre as quais aquela de controlar o processo inflamatório e/ou infeccioso em curso, inibindo a produção da mesma IL-1, via ação imunossupressora dos glicocorticóides (DUNN, 1995).

Neste sentido, vários trabalhos têm mostrado que esta comunicação bidirecional entre os dois sistemas pode exercer uma função protetora ao organismo, enquanto que o desequilíbrio da mesma pode levar a uma predisposição, ou piora de doenças.

Desta forma, um experimento realizado por MACPHEE et al (1989), demonstrou que os glicocorticóides da adrenal exercem uma função crucial no restabelecimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo de esclerose múltipla. A EAE pode ser induzida pela imunização de animais com proteína básica de mielina obtida de porquinhos da índia (MPB) e homogeneizada em adjuvante completo de Freud, sendo que a linhagem susceptível de ratos desenvolve uma paralisia 10 a 14 dias após a imunização. Os autores observaram neste trabalho que o início da paralisia nos animais coincide com o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona. Os ratos se recuperam espontaneamente da paralisia em poucos dias; entretanto, animais adrenalectomizados não se recuperaram da paralisia, a menos que fosse instituída uma terapia com glicocorticóides.

Em ratas Lewis, uma menor resposta do eixo HPA foi associada ao aumento de susceptibilidade dos animais à artrite. Esta linhagem de ratos apresenta uma artrite que se assemelha à artrite reumatóide humana, em resposta à administração de extrato de parede celular de *estreptococcus*, enquanto que ratos da linhagem Fischer não desenvolvem a doença. A resposta à artrite em ratas Lewis pode ser prevenida pela administração de dexametasona, e

pode ser induzida em ratos Fischer pelo uso de um antagonista de receptores de glicocorticóides, o RU 486. Assim, a deficiência de resposta nas ratas Lewis, foi associada a uma ativação incompleta do eixo HPA pela parede celular de *estreptococcus*, pela IL-1 e pelo CRF, quando comparadas com o que ocorre em ratos Fischer, fato que pode estar associado a uma regulação inapropriada do gene do CRF (STERNBERG et al., 1989).

Estes exemplos mostram não apenas a existência de circuitos neuroendócrinos participando da imunoregulação, como o importante significado fisiológico do *feedback* negativo exercido pelos glicocorticóides na resposta imune. Estas evidências não contradizem o fato de que o sistema imune esteja também, sob controle de mecanismos muito eficientes de autoregulação.

Como pôde ser visto, as informações que partem do sistema imune em direção ao sistema nervoso representam importantes mecanismos adaptativos frente a estímulos presentes no meio, como vírus, bactérias, protozoários ou antígenos. Segundo Blalock (1984) o sistema imune pode agir como um sistema sensorial, identificando este tipo de estímulo e transformando-o em informação que possa ser “compreendida” pelo SNC, que então seria capaz de elaborar as respostas adaptativas necessárias (BLALOCK, 1984).

Alguns trabalhos desenvolvidos em nossos laboratórios fortalecem esta idéia. Neste sentido, foi demonstrado que ratos re-expostos a um estímulo visual previamente associado com uma resposta alérgica pulmonar apresentaram aumento nos níveis de ansiedade avaliado por meio do labirinto em cruz elevado (PALERMO-NETO et al., 2000). Em outro estudo, camundongos imunizados com ovalbumina (OVA) desenvolveram uma aversão ao antígeno presente na dieta. Deste modo, frente a opção de ingerir água ou uma solução adocicada de clara de ovo, animais não imunizados preferem beber a solução doce, enquanto animais imunizados com OVA passam a rejeitar a solução doce que contém o antígeno, ingerindo preferencialmente água (BASSO et al., 2001; CARA et al., 1994). Além disso, os animais

imunizados com OVA e desafiados com o antígeno por via oral apresentaram níveis de ansiedade mais elevados e maior expressão de Fos em áreas do SNC relacionadas com a emotividade, tais como o núcleo central da amígdala e núcleo paraventricular do hipotálamo (BASSO et al., 2003). Segundo Basso, a resposta imune causada por um antígeno presente na dieta atuaria como uma aferência do SNC, transformando um sinal não cognitivo em um sinal capaz de gerar uma resposta comportamental elaborada e relevante para a adaptação do animal ao meio. Em outro trabalho desenvolvido em nossos laboratórios, Costa-Pinto et al. (2005) observaram que camundongos imunizados com OVA evitaram a exploração de um ambiente previamente associado à exposição ao antígeno por via aérea, por meio de nebulização. Neste trabalho, a reação alérgica nas vias aéreas levou a uma resposta comportamental em que os animais passaram a evitar o lado escuro da caixa (o qual foi associado a exposição do antígeno), para ficar no compartimento claro, considerado desconfortável para os animais. Além disso, o desafio nasal com o antígeno também levou a ativação do núcleo paraventricular do hipotálamo e do núcleo central da amígdala de animais imunizados com OVA (COSTA-PINTO et al., 2005).

2.1.2. O SNC modulando o Sistema imune

Abordamos até o momento, diversos estudos que mostram como o SI é capaz de alterar e modular as atividades do SNC; passaremos agora a explorar o outro sentido das relações apresentando trabalhos relevantes que mostram como o SNC pode modular as atividades do SI.

Como já comentado anteriormente, o primeiro trabalho mostrando evidências seguras de que o SNC poderia afetar o SI, foi desenvolvido por Ader e Cohen em 1975. Usando um

modelo de condicionamento aversivo ao sabor, os autores delinearam um estudo para determinar se as respostas imunes poderiam ser modificadas por um condicionamento Pavloviano clássico. De fato, estes autores mostraram que a resposta imune poderia ser condicionada, porém este estudo foi recebido pela sociedade científica com certo ceticismo naquela ocasião. Em 1982, estes mesmos autores mostraram a habilidade do condicionamento imune em prolongar o início e retardar a progressão de uma doença autoimune, o lúpus sistêmico eritematoso, em camundongos que desenvolvem espontaneamente a doença. Neste trabalho, os autores observaram que os animais re-expostos ao estímulo condicionado, previamente pareado com ciclofosfamida, apresentaram redução da proteinúria e aumento da sobrevivência por várias semanas, tanto em relação aos camundongos não condicionados que foram tratados com a mesma quantidade de ciclofosfamida como em relação ao controle não tratado. Assim, pelo condicionamento da resposta imune, foi possível retardar o desenvolvimento espontâneo do lúpus sistêmico eritematoso, usando doses cumulativas de droga imunossupressora, que *per se*, era ineficaz em alterar a progressão da doença autoimune (ADER; COHEN, 1982).

Neste sentido, outros autores mostraram que a re-exposição a um estímulo condicionado, previamente pareado a uma droga imunossupressora, pôde prevenir o aparecimento da artrite induzida experimentalmente por adjuvante de Freud, em ratos (KLOSTERHALFEN, 1983) e prolongar a sobrevivência de camundongos submetidos a transplantes (GORCZYNSKI, 1982).

Uma outra estratégia para o estudo das relações entre o SNC e o SI utiliza-se de lesões em áreas cerebrais específicas e analisa as repercussões ocasionadas por estas lesões em parâmetros relacionados a atividade do sistema imune, usando-se para isso dos procedimentos de estereotaxia (FELTEN, 1991). Embora este procedimento tenha suas limitações, e nos mostre principalmente o que o restante do SNC pode fazer na ausência da área lesionada, este

modelo demonstrou a presença de circuitos cerebrais específicos que podem modular a resposta imune na periferia. Assim, alguns estudos mostraram que uma lesão no hipotálamo anterior resultou em: involução do timo e diminuição transitória da proliferação de células do baço, quando estimuladas com concanavalina A (CROSS et al., 1984), diminuição na atividade de células NK (CROSS et al., 1984) e alteração no crescimento de tumores (SOBUE et al., 1983). Por outro lado, ratos que tiveram o *locus coeruleus* lesionado apresentaram menor produção de anticorpos contra albumina sérica bovina e uma redução no tamanho do timo e da população de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico (NIKOLIC et al., 1993). Vale lembrar que o *locus coeruleus* é uma área onde se encontra a maior concentração de corpos celulares de neurônios noradrenérgicos, responsáveis pela elaboração das respostas neurovegetativas relacionadas ao estresse (FRANKLIN; PAXINOS, 1986). Neste sentido, o fato de lesões no *locus coeruleus* implicarem em alterações da atividade imune sugere que uma ativação na atividade do sistema nervoso simpático poderia levar a alterações do funcionamento da resposta imune. De fato, estudos anatômicos revelaram a existência de uma estreita relação entre fibras nervosas simpáticas e células do sistema imune, trazendo evidências de que as células imunes são alvos da atividade destes nervos (MADDEN et al., 2001).

Como dito anteriormente, vários estudos já confirmaram a presença de receptores para neurotransmissores em células do sistema imune (BAYGUINOV et al., 2001). Desta forma, a interação de neurotransmissores com estes receptores exerce influência crítica nas reações imunes no organismo. Sabe-se que o Sistema Nervoso Simpático (SNS) inerva todos os órgãos linfóides e que as catecolaminas, produto final do SNS, são capazes de modular vários parâmetros imunes (MADDEN et al., 1997). Assim, um estímulo ambiental de natureza imunológica poderia modular processos imunes por meio da ativação do SNS, com conseqüente liberação de catecolaminas que interagem com seus receptores adrenérgicos

localizados nas células imunes (CUNNICK et al., 1990; ELENKOV et al., 1995; EXTON et al., 1996; SHERIDAN et al., 1998). Neste sentido, experimentos mostraram que o SNS regula todos os aspectos da função imune incluindo a migração de leucócitos, proliferação celular, produção de citocinas e de anticorpos (MADDEN, 2001).

No que se refere à migração de leucócitos, estudos conduzidos com seres humanos demonstraram que após a administração de adrenalina e noradrenalina ocorre uma rápida mobilização de linfócitos (cerca de 30 minutos), seguida de aumento dos granulócitos e relativa leucopenia, resposta esta obtida num período máximo de 2 a 4 horas (BENSCHOP et al., 1996). As catecolaminas afetam preferencialmente a circulação de células NK e granulócitos, enquanto o número de linfócitos B e T permanecem relativamente inalterados (BENSCHOP et al., 1996). Da mesma forma, um estímulo estressor agudo, ou o exercício físico induz um aumento transitório no número de linfócitos, especialmente no número de células NK. Já o tratamento com terbutalina, agonista seletivo de receptores β_2 adrenérgicos, administrado durante sete dias induziu a uma redução no número de células T citotóxicas e NK, sem alterar significativamente o número de células T *helper* (MAISEL et al., 1990). Assim, um aumento agudo na atividade simpática ou a administração aguda de agonistas adrenérgicos parecem ter efeitos opostos no número de células NK que aqueles observados após ativação prolongada da atividade simpática. Estes dados vão de encontro com outros verificados em seres humanos, onde foi observado uma correlação negativa entre os níveis plasmáticos de noradrenalina e o percentual de células NK (KNUDSEN et al., 1996).

Atualmente sabe-se que a ativação simpática geralmente, mas nem sempre, inibe as funções de células T e a atividade de células NK, especialmente no baço (MADDEN, 2001). Evidências sugerem que a noradrenalina ou agonistas de receptores β adrenérgicos inibem a proliferação de linfócitos T induzida *in vitro* por mitógenos (CHAMBERS et al., 1993; HADDEN et al., 1970). Este fenômeno é geralmente acompanhado por um aumento de AMPc

nos linfócitos (CARLSON et al., 1989) o que, por sua vez, inibe a secreção de IL-2 pelas células T (BARTIK et al., 1993). Estes achados sugerem que a inibição da proliferação de células T se dá, pelo menos em parte, pela inibição na produção de IL-2, citocina importante na estimulação da proliferação de linfócitos T. Um estudo em que depletaram os níveis de noradrenalina com o uso de 6-OHDA mostrou redução na produção de IL-2 e na proliferação de linfócitos T no baço após um estímulo com a concanavalina A (MADDEN et al., 1994).

Os efeitos da noradrenalina e adrenalina nas células NK parecem ter natureza dual. Por um lado, a noradrenalina pode modular de forma transitória e rápida o aumento do número de células NK devido a uma mobilização destas células em seus depósitos no organismo, como já dito anteriormente. Por outro lado, a noradrenalina e a adrenalina parecem inibir a atividade destas células, como indicado por estudos *in vitro* e *in vivo*. Neste sentido, a administração *in vitro* de noradrenalina e isoproterenol (agonista de receptores β adrenérgico) inibiu a atividade de células NK, sendo este efeito bloqueado pelo propranolol (antagonista de receptores adrenérgicos) e mimetizados pela terbutalina, indicando o envolvimento de receptores β_2 adrenérgico neste processo (HELLSTRAND; HERMODSSON, 1989; WHALEN; BANKHURST, 1990).

Neste sentido, foram realizados diversos estudos nos laboratórios do pesquisador Ben-Eliyahu; eles mostram a forte relação que existe entre, atividade simpática e a susceptibilidade ao crescimento tumoral em ratos, utilizando diversos modelos experimentais que promovem a ativação do sistema simpático. Em um destes estudos, os autores verificaram que a administração de metaproterenol, um agonista de receptores β_2 adrenérgico, em ratos Fischer suprimiu a atividade de células NK de maneira dose-dependente e aumentou a susceptibilidade destes animais a metástases pulmonares induzidas por células da linhagem MADB106, sendo este efeito bloqueado pelo nadolol, um antagonista periférico de receptores β adrenérgicos (SHAKHAR; BEN- ELIYAHU, 1998). Para verificar se este efeito era

mediado por uma alteração na atividade de células NK, os autores compararam o efeito do tratamento com metaproterenol em ratos depletados quimicamente de células NK com seu efeito em animais não depletados de NK e verificaram que o tratamento com metaproterenol elevou em três vezes o aumento do número de células tumorais retidas no pulmão de ratos normais e não apresentou diferença nos animais que tiveram suas células NK depletada (SHAKHAR; BEN- ELIYAHU, 1998).

Da mesma forma, a estimulação de fibras nervosas do baço em ratos Wistar também resultou em supressão da atividade destas células, sendo este efeito completamente bloqueado pela administração de nadolol (KATAFUCHI et al., 1993). Além disso, a administração de CRF, que promove a ativação do SNS é acompanhada pela diminuição da atividade de células NK. Porém este efeito não é mediado pela ativação adrenocortical, com conseqüente aumento de corticosterona plasmática, uma vez que o pré-tratamento com propranolol preveniu a inibição da atividade de NK induzida pelo CRF (IRWIN et al., 1992; STRAUSBAUGH; IRWIN, 1992).

Estudos realizados *in vitro* mostraram que a estimulação de receptores β 2 adrenérgicos de células NK diminuía sua capacidade de aderência às células endoteliais presentes na cultura (BENSCHOP et al., 1994; BENSCHOP et al., 1997). Tal fato poderia explicar os achados encontrados em estudos *in vivo*, que mostraram ser a administração de noradrenalina e adrenalina, ou de agonistas de receptores β adrenérgicos capaz de induzir a um aumento no número de células NK na circulação (SHAKHAR; BEN-ELIYAHU, 1998; SCHEDLOWSKI et al., 1996; VAN TITS et al., 1990).

Além de mudanças na atividade destas células, várias evidências têm mostrado que a ativação de receptores adrenérgicos em células imunes pela adrenalina e noradrenalina pode mudar o padrão de uma resposta imune, inibindo seletivamente uma resposta do tipo Th1 e favorecendo outra do tipo Th2 (BORGER et al., 1998; ELENKOV et al., 1996; SANDERS et

al., 1997). As células Th1, são linfócitos T helper que secretam preferencialmente citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-2 e TNF- β , que promovem a imunidade celular, enquanto as células Th2 secretam citocinas como a IL-4, IL-10, IL-13 que promovem uma resposta humoral (ABBAS et al., 1996; FEARON; MOSMANN; SAD, 1996). As respostas Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias, assim, IL-2 e INF- γ inibem Th2, enquanto a IL-4 e IL-10 inibem a resposta Th1 (ABBAS et al., 1996). A IL-12, citocina produzida por monócitos/macrófagos ativados e por células apresentadoras de antígenos, é a principal citocina indutora da resposta imune celular (TRINCHIERI, 1995). Estudos feitos com agonista não seletivo e agonista seletivo de receptores β 2 adrenérgicos mostraram uma inibição na produção de IL-12 por monócitos e células dendríticas tanto *in vivo* como *in vitro* (HASKO et al., 1998; PANINA-BORDIGNON et al., 1997). Uma vez que a IL-12 é uma citocina potente na promoção do aumento do IFN- γ inibindo a síntese de IL-4 por células T, a produção de IL-12 pode representar mais um mecanismo pelo qual a noradrenalina e adrenalina afetam o balanço Th1/Th2. Uma explicação para esta seletividade de ação das catecolaminas foi apresentada por Sanders et al. (1997) que mostraram a presença de receptores β 2 adrenérgicos em células Th1, mas não em células Th2. Assim, o uso de agonistas de receptores β 2 adrenérgicos, tanto em humanos como em camundongos, inibiu a produção de IFN- γ por células Th1, mas não afetou a produção de IL-4 por células Th2 (BORGER et al., 1998; SANDERS et al., 1997).

Também tem sido demonstrada a existência de receptores dopaminérgicos em várias células do sistema imune, incluindo àquelas encontradas no baço (SANTAMBROGIO et al., 1993). Won et al. (1995) mostraram que este neurotransmissor está envolvido na regulação da imunocompetência, da mesma forma que a adrenalina e a noradrenalina, uma vez que camundongos tratados com antagonistas dopaminérgicos apresentaram uma redução na atividade de células NK localizadas no baço (WON et al., 1995).

No que diz respeito à atividade de macrófagos, alguns trabalhos mostram que o tratamento *in vitro* com agonistas β adrenérgicos suprime a produção de H_2O_2 e outras espécies reativas de oxigênio (HENRICKS et al., 1988a,b; SCHOPF, 1983); outros achados da literatura indicaram que esta supressão induzida por agonistas β adrenérgicos não foi bloqueada por antagonistas β adrenérgicos (HENRICKS et al., 1988). Assim, Fukushima (1993) usando macrófagos peritoneais humanos, mostrou que o tratamento *in vitro* destas células com noradrenalina e adrenalina foi capaz de diminuir a geração de ânions superóxido (O^-) e peróxido de hidrogênio, enquanto Conlon et al. (1988) estudando macrófagos alveolares de bovinos mostraram que agonistas e também antagonistas de receptores β adrenérgicos foram capazes de inibir a capacidade destas células em produzir espécies reativas de oxigênio. Em trabalho mais recente, Sanders e colaboradores propõem que as diferentes respostas observadas em macrófagos, após o tratamento com catecolaminas, está associada aos receptores envolvidos com a resposta. Assim, observou-se que o tratamento com agonistas de receptores α adrenérgicos aumentou a produção de TNF induzida por LPS e a capacidade de fagocitar, enquanto que o tratamento com agonistas de receptores β adrenérgicos diminuiu a produção de O^- e de H_2O_2 , além de diminuir a produção de TNF induzida por LPS e a capacidade de fagocitar destas células (SANDERS; KASPROWICZ et al., 2001).

2.1.3. O estresse e seus efeitos bidirecionais sobre o SI

Para começar uma abordagem sobre o tema proposto neste item faz-se necessário uma definição da palavra estresse, uma vez que a mesma apresenta diversos significados. Por

várias vezes essa palavra é colocada para se referir a uma condição que provocou a resposta (estímulo estressor ou simplesmente estressor), ou para se referir às mudanças na homeostasia do organismo induzidas por uma condição externa (reposta de estresse propriamente dito). É relativamente comum ver o uso da palavra estresse sendo empregado tanto para se referir ao estímulo estressor como à resposta induzida pelo estímulo estressor. Assim, para o propósito desta revisão de literatura um estressor é qualquer estímulo (psicológico, ambiental, comportamental ou imunológico) capaz de provocar uma resposta fisiológica, que pode ser mensurada pelo aumento dos níveis de glicocorticóides - cortisol no homem e corticosterona em ratos e camundongos - (CREEL, 2001). As conseqüências desta resposta são geralmente adaptativas a curto prazo (DHABHAR; MCEWEN, 1996,1997b), porém, podem ser prejudiciais quando o estímulo estressor se mantém por um período crônico (DHABHAR; MCEWEN, 1997b; MCEWEN, 1998).

Os dois componentes principais de uma resposta fisiológica de estresse são: o eixo HPA, por meio da liberação de CRF e o sistema nervoso autonômico simpático via *locus coeruleus*. Funcionalmente, o CRF e o *locus coeruleus* parecem participar de um sistema de reverberação, onde a ativação de um sistema tende a ativar o outro (CHROUSOS; GOLD, 1992). Isto inclui projeções de neurônios secretores de CRF do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) para o *locus coeruleus* (e também para outras regiões cerebrais como o córtex e regiões subcorticais), da mesma forma que projeções de fibras catecolaminérgicas do *locus coeruleus*, chegam ao PVN. Desta forma, influências corticais via sistema límbico e possivelmente *locus coeruleus* aumentam a liberação de CRF decorrente de um estímulo estressor emocional ou ambiental, como por exemplo, a presença de um predador, enquanto que estímulos estressores como dor, hemorragia entre outros que ativam o *locus coeruleus* causam a estimulação noradrenérgica de neurônios aí localizados que projetam seus axônios para os neurônios secretores de CRF no PVN (MCCANN et al., 2000). Vale lembrar que o

sistema límbico é composto pelo córtex cingulado, córtex pré-frontal e associativo, tálamo, hipotálamo, fórnix e amígdala, que são estruturas envolvidas com as funções cognitivas, comportamentais, emocionais e neuroendócrinas (HASS, 1997).

A ativação do *locus coeruleus* derivada da liberação de noradrenalina resulta em alterações comportamentais como aumento de vigília e *arousal*. Perifericamente, esta ativação aumenta a atividade noradrenérgica simpática com aumento na liberação de NOR dos terminais nervosos simpáticos e de adrenalina da adrenal (MCEWEN, 1998). Este aumento de catecolaminas na circulação facilita a obtenção de energia necessária para o bom funcionamento de órgãos vitais e prepara o organismo para uma resposta do tipo “luta ou fuga”, com aumento dos batimentos cardíacos, da pressão arterial, da glicose e de outras alterações (MCEWEN, 1998).

Por outro lado, a ativação do eixo HPA por um estímulo estressor resulta na liberação de CRF, que estimula a hipófise anterior a secretar o ACTH no sangue. Este, uma vez na corrente sanguínea, estimula o córtex da adrenal a liberar glicocorticóides. A maioria dos trabalhos que abordam como objeto de estudo as repercussões do estresse e da ativação do eixo HPA sobre a função imune relatam efeitos imunossupressores, prejudiciais a saúde, e seu envolvimento na etiologia de uma série de doenças (ADER et al., 1991; BORYSENKO; BORYSENKO, 1982; COHEN; HERBERT, 1996; IRWIN et al., 1990; KHANSARI et al., 1990; KIECOLT-GLASER et al., 1996; MCEWEN et al., 1997b; MORGULIS et al., 2004; PALERMO-NETO et al., 2001, 2003; PORTELA et al., 2001). De fato, os glicocorticóides são largamente conhecidos por suas ações imunossupressoras (MUNCK et al., 1984) e usados clinicamente como agentes anti-inflamatórios (SCHLEIMER et al., 1989).

Entretanto, ao contrário desta idéia bem estabelecida tem surgido uma nova visão para o fenômeno que aborda os efeitos benéficos do estresse e de seus mediadores em preparar o sistema imune para lidar com desafios (como por exemplo, feridas e infecções) que possam

surgir pela ação de um estímulo estressor como, por exemplo, um predador (DHABHAR; MCEWEN, 1997b).

Dhabhar e McEwen (2001), fizeram uma extensa e cuidadosa revisão da vasta literatura sobre o tema. Influenciados por uma perspectiva evolutiva, os autores colocaram que a imunossupressão causada por estímulos estressores parece não ter um caráter adaptativo; de fato, o estresse é uma reação intrínseca que faz parte da vida de todos os organismos e lidar bem com esta situação é o que permite a sobrevivência. Neste sentido, as mudanças ambientais e as pressões de seleção natural atuariam como grandes estímulos estressores, podendo ser psicológicos (medo ou ansiedade), físicos (mordidas ou infecções) ou fisiológicos (fome ou privação de água). Uma das primeiras funções do cérebro é perceber este estímulo estressor, avaliar o perigo do mesmo e capacitar o organismo a lidar com as conseqüências dele decorrentes (DHABHAR; MCEWEN, 2001). Esta função é acompanhada pela liberação de neurotransmissores e hormônios envolvidos na resposta de estresse. Assim, estes autores sugeriram que - da mesma forma que, sob algumas condições, esta resposta prepara o sistema nervoso, cardiovascular, muscular e neuroendócrino para uma resposta de luta ou fuga - também poderia preparar o sistema imune para os desafios impostos pela situação (DHABHAR; MCEWEN, 1996; 1997a,b; DHABHAR et al., 1995b,1996. DHABHAR et al., 1994).

Revisando a literatura Dhabhar e McEwen (2001) observaram três paradoxos evidentes nas relações entre o estresse, a função imune e a saúde. Para os autores parece paradoxal um organismo ter uma redução em sua capacidade de responder a desafios imunes justamente quando esta resposta imune pode ser crítica para sua sobrevivência como, por exemplo, sob condições em que o indivíduo pode ser machucado ou infectado pela ação de agentes estressores, como o ataque de predadores. Em segundo lugar, várias evidências têm mostrado que o estresse reduz a atividade imune e pode, por isso, aumentar a susceptibilidade

ao câncer (BEN-ELIYAHU et al., 1991; COHEN et al., 1991; GLASER et al., 1994; KIECOLT- GLASER et al., 1996). Mas, por outro lado ele também pode exacerbar doenças inflamatórias como psoríase, asma, artrite e lúpus sistêmico eritematoso (AL'ABADIE; KENT; GAWKRODGER, 1994; AMKRAUT, SOLOMON; KRAEMER, 1971; MEI-TAL et al., 1970; PAWLAK et al., 1999; THOMASON et al., 1992) Finalmente, e em terceiro lugar, sabe-se ser o estresse é capaz de exacerbar doenças autoimunes e inflamatórias, mas os hormônios do estresse (glicocorticóides) são utilizados clinicamente para o tratamento destas doenças (SCHLEIMER et al., 1989).

Frente a estes dados aparentemente contraditórios, Dhabhar e McEwen (2001) propõem um novo paradigma para explicar as observações paradoxais encontradas para as interações do estresse, seus mediadores e a função imune, baseados fundamentalmente nos efeitos dos glicocorticóides como mediadores da resposta de estresse. Os autores acreditam que quatro parâmetros chaves podem influenciar a direção (aumento ou redução) dos efeitos de um estressor ou dos glicocorticóides sobre o sistema imune: (1) os efeitos dos hormônios glicocorticóides sobre a distribuição dos leucócitos no corpo; (2) os diferentes efeitos de um estímulo estressor agudo versus um estímulo crônico sobre a função imune; (3) os diferentes efeitos de doses fisiológicas versus farmacológicas de glicocorticóides e os diferentes efeitos de glicocorticóides endógenos (corticosterona ou cortisol) versus glicocorticóides sintéticos (dexametasona); e (4) o tempo de exposição ao estressor ou aos glicocorticóides relativo ao estágio (inicial ou final) da resposta imune (DHABHAR; MCEWEN, 2001).

De interesse particular para esta revisão, serão abordados principalmente os dois primeiros parâmetros descritos pelos autores. Assim, já foi dito neste texto sobre os efeitos do estresse na distribuição de leucócitos; porém, vale destacar que este mesmo fenômeno também foi observado em peixes (PICKFORD et al., 1971), camundongos (JENSEN, 1969), ratos (DHABHAR et al., 1994,1995b; STEFANSKI et al., 1996), coelhos (TOFT et al., 1993),

cavalos (SNOW et al., 1983) e primatas não humanos (MORROW-TESCH et al., 1993), sugerindo que esta resposta tenha sido conservada através da evolução e que a redistribuição de leucócitos tenha um papel adaptativo importante.

Assim como as catecolaminas, os glicocorticóides também mudam a distribuição de leucócitos no organismo (DHABHAR et al., 1996). Animais adrenalectomizados apresentaram menor magnitude nos efeitos do estresse sobre a distribuição de leucócitos do que animais não adrenalectomizados (DHABHAR et al., 1996). Além disso, o tratamento agudo com corticosterona em animais adrenalectomizados induziu uma diminuição no número de linfócitos e monócitos sanguíneos similar àquela observada em animais não adrenalectomizados após um estímulo estressor agudo (DHABHAR et al., 1996).

Diversos trabalhos investigaram o destino destas células imunes após um estímulo estressor agudo ou tratamentos agudos com glicocorticóides e catecolaminas. Toft et al. (1993) utilizando imagem gama para seguir o caminho de leucócitos marcados com radioativos e transferidos para um coelho, verificaram que um estímulo estressor agudo foi capaz de redistribuir os leucócitos do sangue para os tecidos linfáticos (TOFT et al., 1993). Fleshner et al. (1992), mostraram que um estresse agudo resultou em aumento no percentual de células $CD4^+$ e diminuição no percentual de $CD8^+$ em linfonodos mesentéricos (FLESHNER et al., 1992). Além disso, dados de alguns artigos têm mostrado que os corticosteróides induzem um acúmulo de linfócitos nas mucosas (WALZER, et al., 1984) e na pele (DHABHAR; MCEWEN, 1996).

Desta forma, o estresse agudo induziria uma resposta bifásica onde ocorre um aumento inicial (nos primeiros minutos) do número de leucócitos sanguíneos, seguido por uma diminuição do número destas células (entre a primeira e a segunda hora) com posterior restabelecimento do número de leucócitos no sangue após a retirada do estímulo (DHABHAR; MCEWEN, 1997a).

Com base nestas observações McEwen et al. (1997) propõem uma função adaptativa para a redistribuição de leucócitos induzida pelo estresse agudo. Segundo eles, o estímulo agudo provoca uma ativação do sistema nervoso simpático que induz um recrutamento dos leucócitos de órgãos como o baço, timo, pulmão e outros para a corrente sanguínea e vasos linfáticos, aumentando o número de células na circulação, sendo este efeito mais evidente com os granulócitos e células NK. Já a ativação do eixo HPA seria responsável pela diminuição do número de leucócitos na corrente sanguínea e migração destas células para regiões que são as principais barreiras do corpo contra a entrada de agentes infecciosos como a pele, mucosas do trato gastro-intestinal e urinário-genital, linfonodos e pulmão, preparando o organismo para desafios imunes que possam surgir frente uma situação de perigo que põe em risco sua sobrevivência (DHABHAR; MCEWEN, 1994,1995b, MCEVEN et al.,1997).

Seguindo esta linha de raciocínio, é possível acreditar que uma resposta aguda a um estressor pode levar, em algumas situações, a um aumento na atividade imune e que este fenômeno possa ter importante caráter adaptativo, preparando o indivíduo para responder de forma mais eficiente aos desafios imunes que surjam nesta situação (como infecções).

Neste sentido, Wood et al. (1993) mostraram que ratos submetidos a choques nas patas apresentaram aumento na imunidade humoral e na imunidade mediada por células frente a sensibilização com hemocianina. Especificamente, os autores submeteram diferentes grupos de animais a uma sessão única de choque nos dias -1, 0, 1 e 3 relativos à data de sensibilização (0). Eles observaram que comparados com os animais controles não estressados, os animais submetidos ao choque no dia 0 ou no dia 1 mostraram aumento nos níveis séricos de anticorpos anti hemocianina IgG, na proliferação de esplenócitos e na imunidade mediada por células localizadas na pele em resposta ao antígeno hemocianina (WOOD et al., 1993). Em outro experimento, Carr et al (1992) observaram que o estresse agudo induzido pelo frio aumentava a produção de IgG e IgM por esplenócitos e que este

aumento era mediado por receptores α -adrenérgicos (CARR;WOOLLWY;BLALOCK, 1992).

Dhabhar e McEwen (1996) examinaram os efeitos da exposição a um estressor agudo sobre a resposta de hipersensibilidade tipo tardia (DTH), uma medida *in vivo*, da imunidade de células T que envolve uma sensibilização primária com um antígeno seguida de uma re-exposição ao mesmo antígeno dias ou semanas depois. Neste estudo a resposta de DTH foi avaliada pela medida da espessura do edema formado na base da orelha de ratos após o desafio com o antígeno. Os autores mostraram que a exposição por um período de 2 a 5 horas a um estresse induzido por contenção, imediatamente antes do desafio com 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB) desencadeou nos animais estressados um aumento na intensidade e duração da resposta imune em relação aos não estressados. A análise histológica mostrou aumento de infiltrado celular na pele dos animais previamente submetidos ao estímulo estressor em comparação aos animais controle, sugerindo que a redistribuição de leucócitos induzida pelo estresse poderia ser um dos fatores por trás deste aumento induzido na imunidade da pele (DHABHAR; MCEWEN, 1996).

Outros autores também mostraram que uma resposta a um estressor agudo pode aumentar a atividade de células imunes, como a fagocitose realizada por macrófagos do baço (LYTE; NELSON; BAISSA, 1990; LYTE; NELSON; THOMPSON, 1990) bem como a fagocitose realizada por células polimorfonucleares do sangue (SHURIN et al., 1994) e a atividade de células NK (JAIN; STEVENSON, 1991; MILLAR et al., 1993).

Da mesma forma, estudos *in vitro* utilizando concentrações de corticosterona próximas às encontradas fisiologicamente mostraram um aumento induzido por ela na proliferação de esplenócitos (WIEGERS et al., 1994,1995) e na secreção de óxido nítrico e de IL-1 β (BROUG-HOLUB; KRAAL, 1996) e do TNF- α (RENZ et al., 1992) por macrófagos.

Desta forma, o aumento da atividade imune induzido por um estresse agudo, poderia ser benéfico nos casos de infecção e câncer aumentando a resistência do organismo, mas também poderia atuar de forma prejudicial no caso de doenças auto-imunes e inflamatórias, predispondo o indivíduo a estas desordens.

Por outro lado, numerosos estudos têm mostrado que o estresse crônico pode ser imunossupressor e prejudicar a saúde (IRWIN, 1994; KHANSARI et al., 1990; KORT, 1994; MORGULIS et al., 2004; PALERMO-NETO et al., 2001,2003; PORTELA et al., 2001). Assim, de forma contrária aos efeitos descritos para um estresse agudo, a resposta de DTH na pele induzida pelo DNFB foi suprimida em animais cronicamente estressados (BASSO et al., 1993; DHABHAR; MCEWEN, 1996).

Neste sentido, um trabalho bastante interessante desenvolvido em nossos laboratórios por Morgulis et al. (2004), mostrou evidências experimentais de que um estresse crônico de natureza psicológica, induzido pelo ato de conviver com um companheiro doente na caixa durante onze dias, era capaz de diminuir a resistência dos animais companheiros ao desenvolvimento do tumor de Ehrlich (MORGULIS et al., 2004).

Com base em seus próprios dados e nos dados descritos na literatura, McEwen et al. (1997) propõem que a resposta ao estresse e suas repercussões na função imune devem ser observadas num contexto de *Stress Spectrum*. Assim, uma das regiões deste espectro de estresse é caracterizada pelo eustresse (*Eustress*), ou seja, condições de um estresse agudo, de curta duração ou fisiologicamente adaptável, que resulta em condições fisiológicas de imunocompetência. Segundo os autores, uma característica importante do eustresse é a rápida resposta fisiológica de estresse montada na presença de um estressor, seguida de um rápido “desligamento” da resposta uma vez retirado o estímulo. Na outra ponta do espectro do estresse está caracterizado o diestresse (*distress*), ou seja, condições de estresse crônico, repetido, ou que provoquem exaustão fisiológica, que tem como resultante, condições de

imunossupressão. A característica importante do diestresse é que a resposta fisiológica ou pode persistir por um longo tempo após a retirada do estímulo estressor ou ser repetidamente ativada e resultar em um aumento total integrado na exposição do organismo aos hormônios do estresse. Além disso, o modelo do *Stress Spectrum* também propõe que entre a região do eustresse e do diestresse existe uma área de resiliência (*Resilience*), que é definida como a habilidade dos sistemas fisiológicos em capacitar a sobrevivência por longo período de tempo sob condições de adversidade. A representação do modelo de *Stress Spectrum* proposto pela primeira vez por McEwen et al. (1997) encontra-se logo abaixo, na figura 1.



Figura 1- Modelo hipotético proposto por McEwen et al. (1997) representando o *Stress Spectrum* e suas possíveis repercussões na função imune (modificado de DHABHAR; MCEWEN, 1997; MCEVEN)

Assim, Dhabhar e McEwen (2001) desenvolveram um novo conceito para o estresse, a alostasia "*The concepts of allostasis*" (DHABHAR; MCEWEN, 1997) . Segundo os autores, esta terminologia permite aceitar as ambigüidades existentes no tradicional conceito de estresse. Neste novo conceito, alostasia é definida como um processo adaptativo realizado para manter ativamente a estabilidade interna por meio de sucessivas mudanças (STERLING, 1988).

A alostasia é importante tanto nos eventos imprevisíveis, como por exemplo conflitos pela hierarquia social de um grupo, competição por recursos, tempestade e desastres naturais, como também em eventos previsíveis, como mudanças sazonais que desencadeiam a migração e hibernação. A idéia central é que existe um custo adicional para o organismo se recuperar caso os mediadores da alostasia (hormônios adrenais, neurotransmissores, citocinas, entre outros) sejam liberados freqüentemente ou sejam administrados de forma ineficiente, sendo este custo designado de "carga alostática" (MCEWEN, 2000;2003).

Este novo conceito expande os limites tradicionais do conceito de estresse e permite a abordagem de situações onde um certo nível de estresse tem um valor adaptativo para o animal. Até mesmo alguns estímulos estressores naturais crônicos podem ter um grande potencial adaptativo individual e também para a espécie. Neste sentido, podemos citar como exemplos, a manutenção temporal das relações de dominância e submissão, a relação entre presa e predador e até mesmo as condições de convívio entre um animal sadio com um animal doente. Nas relações de dominância e submissão em camundongos, os animais adotam diferentes estratégias comportamentais e imunológicas para lidar com os mesmos eventos estressores. Assim, em uma situação onde a hierarquia social do grupo esteja estabelecida não existiria uma situação estressante e sim, segundo McEwen, (1996) uma situação "eustressante" com diminuição da carga alostática de cada indivíduo.

2.1.4. A hierarquia social, o estresse e as diferentes estratégias individuais para lidar com uma situação estressante.

Dos ratos aos homens, salvo raras exceções, os machos das espécies são mais agressivos do que as fêmeas e freqüentemente o alvo desta hostilidade é o macho da mesma espécie. Vários trabalhos realizados na década de 60, mostraram que pares de machos colocados em um ambiente neutro prontamente iniciam um combate, caracterizado por um ritual estereotipado que tem como propósito o estabelecimento do território pelo macho vencedor (MOYER, 1976). Esta marcação de território permite que o macho vencedor tenha prioridade aos recursos disponíveis no ambiente e ao acasalamento (PARMIGIANI et al., 1998). Após um certo número de ataques entre uma determinada dupla de animais, uma relação de dominância-submissão é estabelecida entre eles. Quando isto ocorre, a probabilidade de novas lutas é substancialmente reduzida porque o animal submisso aprende a responder antecipadamente à agressão do oponente por meio de sinais comportamentais específicos (postura defensiva) ou fugindo do oponente (MOYER, 1976).

A classificação do *ranking* social (dominante e submisso) é geralmente baseada na medida da habilidade competitiva dos animais. De um modo geral, os camundongos dominantes são aqueles que apresentam alta taxa de ataques emitidos em relação ao número de ataques recebidos dentro do seu grupo (BARNARD; LUO, 2002).

Por mais de 30 anos já se sabe que as interações agressivas podem provocar um grande aumento nos níveis de corticosterona. Os primeiros trabalhos a relatarem este fenômeno foram feitos com ratos selvagens e primatas, e mostraram que os animais dominantes e submissos apresentavam aumento nos níveis de corticosterona, mas a resposta era maior nos animais submissos (BRONSON; ELEFTHERIOUS, 1964; LOUCH;

HIGGINBOTHAM, 1967; MANOGUE, 1975). Estes estudos são a origem da visão convencional de que a subordinação é uma situação estressante (CREEL, 2001).

Uma vez que o estabelecimento de uma nova hierarquia social em um grupo desencadeia alterações na liberação de corticosterona, e este hormônio tem importante papel na resposta imune, surgiu um grande interesse da comunidade científica em estudar as repercussões de um estresse induzido por uma situação social (e conseqüentemente mais natural do que modelos como choque na pata, contenção, entre outros) sobre a resposta imune destes animais. Isto levou ao desenvolvimento de modelos de estresse mais relevantes para o contexto do desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse em seres humanos (MARTINEZ et al., 1998).

Diversos modelos de estresse social têm sido desenvolvidos (BLANCHARD, 1995; FUCHS et al., 1996; KUDRYAVTSEVA, 1991) e apresentam como foco principal de estudo o efeito da subordinação induzida pela luta (MARTINEZ et al., 1998). O modelo mais utilizado é o chamado modelo intruso - residente (GINSBURG; ALLEE, 1942), no qual um animal (rato ou camundongo) é colocado individualmente (ou na presença de uma fêmea castrada) durante alguns dias dentro de uma caixa. Em seguida, um outro macho (geralmente mais novo ou menor do que o macho residente) é colocado dentro da caixa e começa a disputa pela dominância daquele ambiente.

Neste sentido, utilizando este modelo, Stefanski e Ben-Eliyahu (1996) mostraram que animais submissos apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento de metástases tumorais do que animais dominantes (STEFANSKI; BEN-ELIYAHU, 1996). Posteriormente outro trabalho mostrou que o estresse crônico induzido pelo confronto social no modelo intruso-residente levava a uma granulocitose e que este achado estava relacionado com o aumento nos níveis plasmáticos de noradrenalina observado nestes animais (STEFANSKI, 2000).

Bartolomucci et al. (2001) mostraram que alterações no comportamento, nos níveis de corticosterona e na função imune em camundongos, eram dependentes do contexto em que estes animais estavam inseridos. Assim, os autores mostraram que camundongos dominantes e submissos que viviam em duplas estabelecidas logo após o desmame, não apresentaram diferenças nos níveis de corticosterona, no comportamento avaliado no campo aberto, na proliferação de esplenócitos e na produção de interleucinas, sugerindo que viver com o camundongo irmão não é condição estressante nem para o dominante, nem para o submisso. Já animais que foram submetidos a uma condição de estresse psicológico crônico (21 dias) apresentaram diferentes respostas comportamentais e imunológicas que foram dependentes do contexto em que estes animais se encontravam. Para realizar este experimento, 19 ratos com quatro meses de idade foram colocados individualmente em suas caixas por uma semana e serviram como residentes. No dia 0 do experimento, ratos mais jovens e menores (com três meses de idade) foram introduzidos na caixa dos ratos residentes. Após a interação os animais foram divididos por uma placa de poliestireno colocada de forma transversal na caixa, permitindo o contato visual e olfatório, mas não o contato físico. Esta divisão era diariamente retirada (durante 21 dias) por um período de 10 minutos e eram recolocadas logo no início dos combates, com o registro do animal dominante e do animal submisso de cada caixa. Uma relação dominante/submisso foi estabelecida a partir do segundo dia de interação entre os animais e quatro grupos experimentais foram distinguidos, sendo: um grupo residente dominante, residente submisso, intruso dominante e intruso submisso. De forma interessante, observaram que as alterações no campo aberto dependiam do *status*, sendo que os animais residentes que se tornaram dominantes e os intrusos que se tornaram dominantes apresentaram as maiores atividades locomotoras e exploratórias, porém a corticosterona estava aumentada em todos os grupos em relação aos animais controle. Além disso, a resposta imune também foi dependente do contexto. Assim, os animais residentes que se tornaram

submissos apresentaram uma diminuição na proliferação de esplenócitos e na produção de IL-4 e IL-10 por estas células, enquanto os camundongos dos outros três grupos não mostraram alterações nos parâmetros imunes avaliados. Este estudo apresenta resultados interessantes, pois mostrou que um estresse de natureza psicológica (a ameaça do ataque) foi capaz de provocar diferentes alterações tanto nos animais dominantes como nos submissos, dependendo da situação anterior na qual o camundongo se encontrava (residente ou intruso) (BARTOLOMUCI et al., 2001).

Por outro lado, na tentativa de simular um ambiente mais natural, Blanchard et al. (1995) colocaram 100 ratos machos em um ambiente enriquecido com túneis e registraram seu comportamento, mudanças de massa corporal e níveis de corticosterona. Inicialmente, o número de lutas ultrapassava 40 por hora tanto para os dominantes como para os submissos. Treze dias depois, os subordinados apresentavam em média 17 feridas e perda de 20% de sua massa corporal inicial. (BLANCHARD et al., 1995). Agressões neste grau de severidade geralmente não são encontradas em espécies selvagens, onde os combates raramente derivam em feridas graves e a proporção de agressão é menor (CREEL et al., 1992,1997).

Desta forma, talvez os estudos que relacionam os níveis de corticosterona e função imune de dominantes e submissos nestas situações intensas possam ser relacionados na natureza a eventos sociais como a formação de novos grupos, onde as relações geralmente são estabelecidas por meio de lutas (CREEL, 2001). Estes estudos revelam muito sobre a relação entre o comportamento agressivo e a resposta de estresse. Entretanto, não necessariamente revelam as conseqüências de viver como um submisso em um grupo que apresenta uma relação de hierarquia social estável.

De qualquer modo fica evidente que, dependendo do ambiente, alguns indivíduos são mais vulneráveis do que outros aos efeitos do estresse. Assim, retornamos ao conceito de alostasia, definido no tópico acima, em que certas condições ambientais afetam

diferentemente a carga alostática nos diferentes indivíduos (DHABHAR; MCEVEN, 2001; KORTE et al., 2005).

Para desenvolver melhor este assunto, abordaremos algumas diferenças nas estratégias comportamentais adotadas por indivíduos dominantes e submissos (chamados respectivamente de *Hawk* – agressivos- e *Dove* - não agressivos por KORTE) para lidar com os eventos estressantes. Em uma situação de competição os animais dominantes mostram comportamento agressivo e só cessam este comportamento quando o oponente se submete, o que envolve grande gasto de energia, mas garante ao dominante acesso preferencial dos recursos alimentares disponíveis no local. Por outro lado, a estratégia dos submissos é de poupar energia; assim, na percepção de um oponente mais forte os submissos recuam ou manifestam uma postura de congelamento e submissão. Já quando dois submissos se encontram, ambos irão dividir os recursos disponíveis no ambiente, sem lutas e sem custo de energia. Desta forma, sob a perspectiva de economia de recursos, as duas estratégias podem ser bem sucedidas (KORTE et al., 2005).

Outro exemplo das diferentes estratégias comportamentais adotadas por dominantes e submissos foi vista no teste de natação forçada. Os camundongos dominantes colocados na piscina mantinham continuamente o comportamento de escape e natação mesmo quando não havia nenhuma rampa ou plataforma que possibilitasse sua saída, enquanto os submissos mostravam um comportamento passivo de flutuar na água, que pode ser interpretado como uma atitude extremamente adaptativa uma vez que economiza energia (KORTE et al., 1996). Além disso, os camundongos dominantes desenvolvem facilmente rotinas que são relativamente independentes dos estímulos ambientais (comportamento rígido), enquanto camundongos submissos apresentam maior percepção das mudanças em seu ambiente e conseqüentemente mostram maior flexibilidade em seu comportamento (BENUS et al., 1990, 1991).

Para se adaptar às mudanças promovidas pelo ambiente, camundongos dominantes e submissos diferem não só na sua resposta comportamental, mas também nas suas respostas fisiológicas, neuroendócrinas e imunes (KORTE et al., 2005). Assim, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal está, de forma geral, mais ativo nos animais dominantes do que nos submissos. Este fato é revelado pela liberação mais efetiva de testosterona nos animais dominantes. Já o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal encontra-se bem mais responsivo nos animais submissos. Quando desafiados em situações estressantes agudas, os submissos liberam mais corticosterona do que os dominantes. Esta hipótese é corroborada pelo aumento da expressão de mRNA para CRF no hipotálamo de animais submissos fato que não ocorre nos dominantes (VEENEMA, 2003). Na hipófise a liberação de ACTH também é mais elevada nestes animais (submissos) quando comparado com o percentual dos níveis basais dos dominantes (VEENEMA, 2003). Já a atividade simpática, mensurada pela liberação de noradrenalina, é mais elevada, de forma geral, em camundongos dominantes quando comparados aos submissos. O inverso é verdadeiro para o sistema parassimpático (KORTE et al., 2005).

Estas diferenças mostram que dominância e submissão além de categorias comportamentais observáveis em animais de diferentes espécies, são diferenças intrínsecas presentes nos animais, em seus aspectos neurobiológicos e neuroendócrinos mais íntimos. Assim sendo, porque esperar que animais tão diferentes em termos neurobiológicos sejam iguais em suas respostas imunes? A maioria dos trabalhos descritos na literatura tem como foco principal avaliar as repercussões de estímulos estressores intensos na função imune de animais submissos. Porém muito pouco se sabe sobre o comportamento, a bioquímica e função imune de camundongos que apresentam uma relação de hierarquia social estável, onde não há mais a presença do estímulo estressor (lutas pela disputa da dominância). Nesta situação, será que os animais submissos apresentam sintomas comparáveis àqueles

observados em situações de estresse social crônico? Neste trabalho procurou-se avaliar quais as repercussões neuroimunes em camundongos mantidos em uma relação social estável. Especificamente, avaliou-se o comportamento, a neuroquímica, os níveis de corticosterona, a resistência ao crescimento do melanoma experimental B16F10, o peso e a celularidade do baço e timo, o perfil de células sanguíneas, e a atividade de neutrófilos, monócitos e células NK.

3 OBJETIVOS

A hipótese deste trabalho é a seguinte: Camundongos submissos mantidos em uma **hierarquia social estável** apresentam diferenças comportamentais, neuroquímicas, bioquímicas e imunes em relação aos animais dominantes. Para avaliar se nossa hipótese é verdadeira ou falsa, elaboramos os objetivos específicos descritos a seguir.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações comportamentais, neuroquímicas, bioquímicas e imunes de animais dominantes e submissos mantidos em duplas em uma relação social estável.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade geral e os níveis de ansiedade de camundongos dominantes e submissos mantidos em duplas em uma hierarquia social estável.
- Avaliar os níveis séricos de corticosterona em camundongos dominantes e submissos mantidos em duplas em uma hierarquia social estável, assim como em camundongos agrupados em cinco.

- Avaliar os níveis de dopamina, noradrenalina e serotonina e de seus metabólitos em camundongos dominantes e submissos mantidos em duplas em uma hierarquia social estável, assim como em camundongos agrupados em cinco.
- Avaliar o número de metástases pulmonares induzidas pelo melanoma murino B16F10 em camundongos dominantes e submissos mantidos em duplas em uma hierarquia social estável.
- Avaliar o peso e o número de células do baço e timo de camundongos dominantes e submissos mantidos em duplas em uma hierarquia social estável após a inoculação de células tumorais B16F10.
- Avaliar o perfil de células sanguíneas em camundongos dominantes e submissos mantidos em duplas em uma hierarquia social estável, assim como em camundongos agrupados em cinco.
- Avaliar o perfil de linfócitos do baço e do timo (T CD4⁺ e TCD8⁺) de camundongos dominantes e submissos mantidos em duplas em uma hierarquia social estável após a inoculação de células tumorais B16F10.
- Avaliar a atividade de neutrófilos e monócitos sanguíneos de camundongos dominantes e submissos mantidos em duplas em uma hierarquia social estável.
- Avaliar a atividade de células NK presentes no sangue e no baço de camundongos dominantes e submissos mantidos em duplas em uma hierarquia social estável.

4 MATERIAL E METODOS

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

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos adultos C57BL/6 machos, com idade entre 2 e 4 meses, mantidos em número de dois animais por caixa plástica (16 x 28 x 13 cm). Maravalha esterilizada e livre de resíduos foi utilizada como cama. Os camundongos foram mantidos em salas artificialmente iluminadas, em um ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (luzes acessas às 7:00 a.m.), com temperatura ($22 \pm 4,0$ °C) e umidade (45,0-65,0%) controladas por aparelho central de exaustão, refrigeração e troca de ar, com livre acesso à ração e água. Os experimentos foram feitos em uma sala diferente daquela onde os animais foram mantidos, mas com as mesmas condições, sendo os animais transferidos em suas próprias caixas, onde permaneceram por 1 semana antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos, manuseados e usados de acordo com as normas, preceitos e protocolos relativos ao uso de Animais de Laboratório em Pesquisa do comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo de ética nº 41, aprovado no mês de fevereiro de 2002).

4.2 DROGAS E REAGENTES

Segue abaixo de forma detalhada as drogas e reagentes utilizadas neste trabalho.

4.2.1 Drogas

- Cloridrato de Ketamina (Dopalen injetável[®] - Agribrands) – anestésico dissociativo utilizado nos procedimentos anestésicos.
- Xilazina (Rompun[®], Bayer) – tranquilizante e relaxante muscular de ação no sistema nervoso central, utilizado nos procedimentos anestésicos.
- Heparina Sódica (Liquemine[®] 25.000UI/5ml, Roche) – anticoagulante utilizado durante a coleta de sangue.
- Penicilina/Estreptomicina[®] (GIBCO) – antibióticos utilizados no meio de cultura onde se faz a manutenção das células B16F10.

4.2.3 Reagentes

- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ - Synth) – utilizado na técnica de HPLC.
- Ácido clorídrico (HCl- Synth) - utilizado na técnica de HPLC.
- Ácido orto-fosfórico (H_3PO_4 - Synth) - utilizado na técnica de HPLC.
- Ácido heptano sulfônico ($C_7H_{15}NaO_3S$ - Merck) - utilizado na técnica de HPLC.

- Ácido hidroxindolacético (5-HIAA - $C_{10}H_9NO_3$ - Sigma) - utilizado como padrão para dosagem de 5-HIAA na técnica de HPLC.
- Ácido homovanílico -HVA ($C_9H_{10}O_4$ - Sigma) – utilizado como padrão para dosagem de HVA na técnica de HPLC.
- Ácido perclórico ($ClHO_4$ - Fluka) – utilizado na técnica de HPLC.
- Anticorpos conjugados a FITC (isotiocianato fluorescente) anti-CD³, anti-CD⁴; e PE (ficoeritrina) anti-CD⁴, anti CD⁸, anti-NK1 (Pharmingen-BD) – utilizado para marcação dos linfócitos.
- Azul de Tripán[®] 0,4% (GIBCO) – corante utilizado para a contagem de células e determinação da viabilidade celular.
- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – Bactéria marcada com iodeto de propídeo utilizada para avaliar a atividade de neutrófilos e monócitos sanguíneos.
- Cloreto de Sódio (NaCl - Synth) – utilizada para promover a lise das hemácias nas diluições de 0,2% e 1,6%.
- Diacetato 2'7' Diclorfluoresceína[®] (DCFH-DA, Sigma) – corante fluorescente que se conjuga a enzimas citoplasmáticas, utilizado na avaliação do *burst oxidativo* de neutrófilos e monócitos sanguíneos.
- Diacetato de Carboxifluoresceína succinidil éster CFDA-SE (CFSE, Molecular Probes). – corante fluorescente que se conjuga a enzimas citoplasmáticas, utilizado na avaliação da citotoxicidade de células NK.
- 3,4 Diidroxibenzilamida - DHBA ($C_7H_9NO_2$ - Sigma) –utilizado na técnica de HPLC.
- DOPAC - ácido 3,4 diidroxifenilacético ($C_8H_8O_4$ - Sigma) – utilizado como padrão para dosagem de DOPAC pela técnica de HPLC.
- Dopamina - 3- hidroxitiramina ($C_8H_{11}NO_2.HCl$ - Sigma) utilizado como padrão para dosagem de dopamina pela técnica de HPLC.

- EDTA[®] (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O Sigma) – utilizado na concentração de 3mM, para interromper a reação de fagocitose após o período de incubação das amostras e também quando do uso da técnica de HPLC.
- *Escherichia coli* (*E coli*[®] Molecular Probes) – bactéria marcada com o fluorocromo alexa-flúor utilizada para avaliação do burst oxidativo e da fagocitose de neutrófilos e monócitos sanguíneos
- Ficoll-Paque[®] Plus (Amersham-biosciences) – gradiente de concentração utilizado para a separação de linfócitos.
- Fosfato dissódico (Na₂HPO₄ - Synth) – usado na técnica de HPLC.
- Formaldeído 10% (HCHO - Quimex) – fixador de tecidos.
- Fungizona[®] (GIBCO) – antifúngico à base de anfotericina B utilizado no preparo do meio de cultura.
- Giemsa (Sigma) – corante celular.
- HEPES[®] (GIBCO) – tampão utilizado no preparo do meio de cultura.
- Iodeto de propídeo[®] (Sigma, St Louis) - utilizado para avaliação de viabilidade das células B16F10 no ensaio de citotoxicidade de NK.
- Kit de corticosterona para ratos Coat-a-Count[®] (DPC) – utilizado para a dosagem de corticosterona no soro dos animais.
- Metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅ - Synth) - utilizado na técnica de HPLC.
- Metanol (CH₃OH - Merck) – utilizado na técnica de HPLC.
- Metoxifeniletlenoglicol - MHPG (Sigma) - utilizado para fazer o padrão de MHPG para a técnica de HPLC.
- Noradrenalina - Norepinephrine bitartrate (C₈H₁₁NO₃. C₄H₆O₆. H₂O - Serva) – utilizado como padrão para dosagem de noradrenalina pela técnica de HPLC.

- PBS (*Phosphate-buffered saline*) – solução tamponada com fosfato utilizada em todos os procedimentos celulares.
- RPMI 1640[®] (GIBCO) – meio de cultura celular utilizado para a manutenção das células tumorais.
- Serotonina -5 HT (5 hidroxitriptamina – Sigma) - utilizado como padrão para dosagem de serotonina pela técnica de HPLC.
- Soro Fetal Bovino[®] (GIBCO) – Utilizado para enriquecer o meio de cultura para manutenção das células B16F10.
- Tripsina 0,2% (ATP Instituto Adolf Lutz) – utilizada para retirar as células tumorais aderidas à garrafa de cultura.

4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS E ESTABELECIMENTO DAS RELAÇÕES DE DOMINÂNCIA/SUBMISSÃO

Antes do início de cada experimento, os camundongos foram pesados e pareados de acordo com seus pesos imediatamente após o desmame (21 dias após o nascimento). Noventa dias após o nascimento, foi feita a observação e a determinação dos camundongos dominantes e submissos da caixa. Para isso, os animais foram removidos de suas caixas moradia e isolados por um período de 7 minutos em caixas similares. Após este período de isolamento, os animais foram recolocados em suas caixas moradia, sendo observados durante 15 minutos para avaliação da presença ou ausência de luta e/ou resposta antecipada à agressão, sendo denominados como dominantes ou submissos. Este procedimento de isolamento teve como único objetivo estimular os animais a iniciarem um combate, facilitando a observação e determinação do macho dominante da caixa. sendo estas observações realizadas por um

período de três dias consecutivos, uma vez ao dia (entre 15:00 e 17:00h). Em cada dia de observação, os comportamentos de dominância/submissão foram inferidos como descrito por (MOYER, 1976), ou seja, pela presença de elementos comportamentais ofensivos como atacar, morder, perseguir e atacar lateralmente. Normalmente, nos primeiros encontros, o atacante sobe sobre seu oponente, e repetidamente o ataca com os membros anteriores estendidos podendo eventualmente, morder a orelha, membros ou a cauda do outro animal. Tipicamente, os combates são curtos, sendo as lutas repetidas em uma seqüência de ações estereotipadas por pelo menos duas vezes durante o período de observação, e então o camundongo submisso tenta fugir. Apenas as duplas de animais que apresentaram relações típicas e evidentes de dominância/submissão e não apresentavam feridas severas decorrentes de mordidas, foram utilizados neste estudo. Em alguns experimentos, grupos de cinco animais mantidos em uma mesma caixa, onde a hierarquia social do grupo não foi determinada, foram utilizados para determinarmos se os parâmetros avaliados em uma situação de animais convivendo em dupla apresentavam diferenças em relação àquelas observadas em animais convivendo em grupos maiores.

4.4 ESTUDOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Foram avaliados o comportamento de exploração no campo aberto e no labirinto em cruz elevado tanto nos camundongos dominantes, como nos submissos. Os experimentos foram feitos uma semana após a determinação da hierarquia social, como descrito no item 4.2.. Para minimizar as possíveis influências circadianas sobre o comportamento observado no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, os camundongos dominantes e submissos foram alternados e sempre observados no mesmo horário do dia (13:00-17:00h). Os aparelhos

utilizados foram limpos com uma solução álcool-água a 5%, antes da colocação dos animais nos mesmos, visando minimizar possíveis efeitos decorrentes do odor da urina ou das fezes dos animais previamente observados.

Os dados do campo aberto e do labirinto em cruz elevado foram coletados e posteriormente analisados por meio de um sistema de observação indireto computadorizado, chamado EthoVision® (NOLDUS Information Technology), que permite o rastreamento, registro e análise de movimentos. O sistema é composto pelo programa EthoVision Pro-Color 1.9 (última data de revisão 2 de junho de 1997), e pelos itens de *hardware*: câmera filmadora (Sony CCD-Iris color) instalada no teto da sala e conectada a um monitor de vídeo (Sony) e um computador (Pentium 133, 16MB de memória RAM, 1,2GB de disco rígido) com placa de captura de vídeo (TARGA+ Truevision, 2D, NTSC), monitor, teclado e *mouse*, além de cabos e conectores.

4.4.1 Campo aberto e medida da atividade geral

O campo aberto é o método mais freqüentemente utilizado para a observação da atividade geral em animais de laboratório e tem sido usado para a quantificação comportamental dos efeitos de um estresse e da ansiedade (KELLEY, 1993; PALERMONETO; MASSOCO; FAVARE, 2001).

O campo aberto utilizado (Figura 2) consiste de uma arena circular de madeira (40 cm de diâmetro, 20 cm de altura) pintada de cinza e virtualmente dividida virtualmente pelo *software* em três zonas: central, intermediária e periférica (KELLEY, 1993). O aparelho está elevado a uma altura de 60 cm do chão. Todos os testes foram conduzidos com o uso de uma iluminação indireta provida por uma lâmpada fluorescente de 60-watts, colocada 2 m acima

da zona central do campo aberto. Para as observações, cada camundongo foi colocado individualmente na zona central do equipamento, sendo observados por 10 minutos para a medida dos seguintes parâmetros: (1) atividade locomotora (medida em cm), (2) tempo gasto na atividade locomotora (medido em segundos) em cada uma das três zonas do campo aberto com o auxílio de uma câmera de vídeo montada verticalmente acima da arena. Outras variáveis medidas foram: (3) velocidade média (cm/s), (4) sinuosidade na arena (graus/cm), (5) número de movimentos iniciados (n), (6) tempo total em movimento (s) e (7) percentual do tempo gasto em movimento (%).

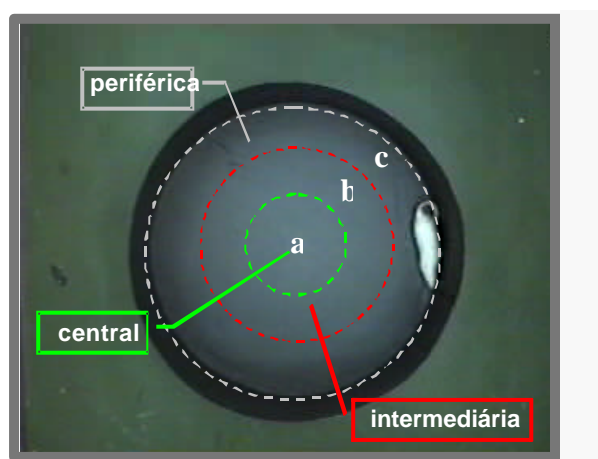


Figura 2 – Representação de um campo aberto dividido virtualmente pelo software EthoVision[®] para a registro e análise do comportamento. Zona Central (a), zona intermediária (b) e zona periférica (c)

O computador e o monitor ficam localizados em uma sala ao lado daquela aonde ficam os animais em teste, como mostra a figura 3. Desta forma, a presença do observador não interferiu com o comportamento dos animais, uma vez que o mesmo ficou fora da sala onde se encontravam os animais em teste.

4.4.2 Medida da ansiedade por meio do Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado é um equipamento freqüentemente usado para a avaliação dos níveis de ansiedade em camundongos. Este aparelho foi validado tanto para drogas ansiolíticas, como os benzodiazepínicos, como para outras ansiogênicas como o petilenotetrazol, cafeína e a anfetamina (PELLOW, 1985).

O teste comportamental no labirinto em cruz elevado foi feito 24 horas após a realização do teste no campo aberto. Resultados anteriores de estudos feitos por este e outros laboratórios tem mostrado que submeter os animais ao campo aberto ou ao *hole board* antes do teste no labirinto em cruz elevado aumenta significativamente a atividade destes animais neste equipamento, i.e., o número total de entradas nos braços abertos e fechados facilitando a análise dos dados neste labirinto (PELLOW, 1985). Para as observações no labirinto em cruz elevado, cada animal foi colocado individualmente na zona central do equipamento (5 cm²), sendo observado por um período de 5 minutos. O labirinto em cruz elevado utilizado neste trabalho foi construído de acordo com aquele validado para camundongos Swiss (PELLOW, 1985); e consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0.25 cm) e dois braços fechados de mesmo tamanho porém com paredes de 20 cm de altura. O aparelho feito de madeira pintada de cinza, configurado de tal forma que os braços similares foram colocados de lados opostos um ao outro (Figura 3). O aparelho está elevado a uma altura de 60 cm do chão sendo iluminado de forma indireta por meio de uma lâmpada fluorescente de 60-watts, colocada 2 m acima da zona central. As observações foram feitas de forma indireta, com sistema EthoVision[®], como descrito anteriormente. As variáveis medidas foram: (1) número de entradas em cada tipo de braço (n), (2) número de entradas e tempo gasto (s) no terço final dos braços abertos e, (3) tempo gasto (s) na exploração dos braços abertos e fechados. As medidas que refletem níveis de ansiedade neste teste são: o percentual de entradas nos braços abertos x braços fechados e

o percentual de tempo gasto nos braços abertos x braços fechados (PELLOW, 1985). Os dados foram analisados usando o mesmo *software* descrito para a análise do campo aberto.

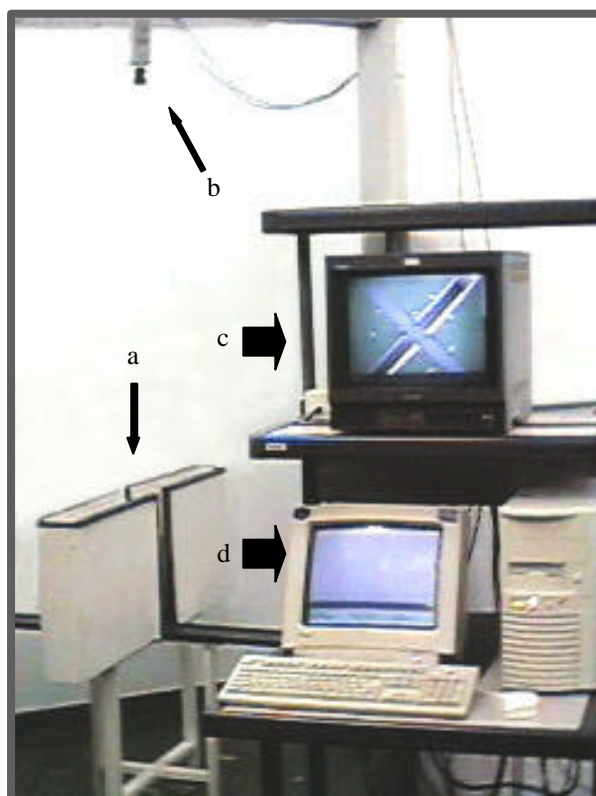


Figura 3 – Fotografia dos equipamentos utilizados para o rastreamento e estudo do comportamento animal. (a) labirinto em cruz elevado, (b) câmera de vídeo utilizada para a aquisição da imagem em tempo real, (c) monitor de vídeo para a visualização da imagem em tempo real e padronização das diferentes zonas utilizadas na arena de teste, (d) computador utilizado para aquisição, armazenamento e análise dos dados comportamentais obtidos

4.5 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado em microtubos de capacidade de 1,5ml, e deixados à temperatura ambiente por um período de uma hora para a retração do coágulo. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, tendo sido o soro coletado e armazenado em freezer -80 até a dosagem das amostras.

Os níveis séricos de corticosterona foram dosados por meio de radioimunoensaio de fase sólida; para tanto utilizou-se um contador de radiação gama (Packard®). Foi empregado, também, um conjunto (Universal Kit – Coat-a-Count – DPC®) de reagentes comerciais, especialmente desenvolvidos para a avaliação quantitativa dos níveis séricos de corticosterona sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, valendo-se do hormônio marcado com I^{125} (elemento radioativo traçador). O conjunto consiste de tubos de polipropileno revestidos internamente com anticorpo contra corticosterona; frasco de hormônio marcado (I^{125} – corticosterona) na forma líquida; frascos contendo padrões de corticosterona nas seguintes concentrações: 0, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 ng de hormônio por ml de soro. Quanto maior a concentração de corticosterona na amostra testada, menor a radiação detectada pelo contador de radiação gama. Isto ocorre porque a corticosterona marcada com I^{125} liga-se em menor concentração aos anticorpos que estão nos tubos do Kit. O coeficiente de variação intra-ensaio da corticosterona foi de 5,1% e o limite mínimo de detecção de 7,4ng/ml.

Os camundongos foram transferidos para a sala de experimentação uma semana antes da coleta, tendo sido diariamente manipulados. Estes procedimentos foram feitos para minimizar os possíveis efeitos de estresses indesejáveis e para reduzir a variabilidade das amostras. Para reduzir os efeitos do ritmo circadiano sobre os níveis hormonais, todas as amostras foram coletadas entre 8:00 e 10:00 horas da manhã.

4.6 NEUROQUÍMICA

4.6.1 Coleta e processamento dos tecidos cerebrais para neuroquímica

Os mesmos animais eutanasiados para a coleta de soro para dosagem de corticosterona foram utilizados para a avaliação neuroquímica. Desta forma, após a decapitação os cérebros foram rapidamente retirados e lavados com solução salina gelada (4°C). Imediatamente após, foram dissecados sobre uma placa de petri rodeada por pedras de gelo seco, formando assim um micro-ambiente o mais frio possível. O corpo estriado e o hipotálamo foram retirados, pesados e congelados a -80°C num tempo máximo de 3 minutos, onde permaneceram por um período de 30 dias até o processamento analítico.

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados com a utilização de uma caneta sonicadora, durante 2 ou 3 minutos, o que foi feito sobre uma cuba de gelo seco; usou-se uma solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA, que foi empregado como padrão interno para as dosagens de monoaminas. O DHBA (3,4 diidroxibenzilamina) foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas. Os homogeneizados foram mantidos durante a noite à 4°C, com a finalidade de se obter uma boa precipitação das proteínas e ácidos nucleicos, com conseqüente melhora na purificação das amostras. Após esta etapa, o material foi centrifugado a 11.000g por 30 minutos a 4°C.

Dopamina (DA), e seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); Noradrenalina (NOR) e seu metabólito 3 - metoxifeniletlenoglicol (MHPG), Serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e seu metabólito 5-ácido hidroxindolacético (5-HIAA), foram dosadas por Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência (HPLC), com detector eletroquímico. Foram calculadas também as relações NOR/MHPG, DOPAC/DA, HVA/DA, (DOPAC+HVA)/DA e 5-HIAA/5-HT como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de NOR, DA e 5-HT, respectivamente. A taxa de recuperação foi maior que 95% para todas as amostras estudadas.

4.6.2 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos

As dosagens neuroquímicas foram realizadas a partir de método previamente descrito (FELICIO et al., 1996). O sistema de HPLC – ED (SHIMATZU Modelo 6A) é composto por uma bomba, um amortecedor de impulsos, uma válvula injetora de 20 µl, um detector eletroquímico, um forno de coluna para manutenção da temperatura, um registrador e um integrador (Modelo Chromatopac), todos marca SHIMATZU. A coluna utilizada foi a C-18 (SUPELCO) medindo 220X4,6 mm com filtro de linha.

A técnica utilizada foi a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico. Esta técnica fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção. No preparo da fase móvel utilizada na quantificação das monoaminas e seus metabólitos, emprega-se um sistema isocrático constituído de fosfato dissódico (7,16 g/l), ácido cítrico (4,20 g/l), EDTA (40,0 mg/l), ácido heptanossulfônico (556 mg/l) e metanol (80 ml/l). O pH desta solução foi acertado para 3,0 com auxílio de ácido ortofosfórico.

A fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo e deaerado por 30 minutos com um fluxo de hélio antes de ser instalada no HPLC. Após sua instalação no cromatografo, ela permanece por uma noite (*overnight*) circulando em um sistema fechado com um fluxo constante de 1,2 ml/min, sendo este procedimento necessário para estabilização do aparelho. O detector eletrolítico foi mantido com potencial de +0,83 V no eletrodo de trabalho. A temperatura para a amostragem no HPLC foi mantida em 25°C.

As substâncias foram reconhecidas através do tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando-as com os padrões. O limite de detecção foi de 0,02 ng para DA, DOPAC, NOR, 5HT e 5HIAA e de 0,2 ng para HVA. Os padrões de concentrações de 1mM de NOR, MHPG, DHBA, DA, DOPAC, HVA, 5HIAA e 5HT foram diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, distribuídos em microtubos de 1,5 ml e em seguida estocados em freezer (-80°C) por um período de até dois meses. No momento da análise os padrões foram descongelados e diluídos 5.000, 10.000 e 20.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M.

As substâncias foram reconhecidas segundo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando-as com os padrões de concentrações conhecidas. O tempo total de cada amostra foi de 28 min. O limite de detecção foi de 1,0 ng/ mL e o limite de quantificação foi de 10,0 ng/mL para os diferentes neurotransmissores quantificados.

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

A cada amostra proveniente dos animais foram adicionadas concentrações conhecidas de padrão interno (DHBA 14 ng/mL), e os valores obtidos foram utilizados para os devidos ajustes nas concentrações dos neurotransmissores.

4.7 ESTUDO DE RESISTÊNCIA AO CRESCIMENTO DO MELANOMA B16F10

Duplas de camundongos dominantes e submissos foram analisadas quanto à resistência ao crescimento de metástases tumorais induzidas pela linhagem de células B16F10. Trata-se de uma linhagem de células obtidas de metástase pulmonar do melanoma (B16F10), singênico ao camundongo C57BL/6. Estas células, são de cultura permanente, mantidas congeladas no laboratório em botijão de nitrogênio (em *vials* próprios para congelamento contendo as células, meio de cultura mais 5% de DMSO) Estas células foram mantidas como descrito por Brownl et al. (2002). Brevemente, elas foram descongeladas em temperatura ambiente, colocadas em tubos falcon de 15ml com meio de cultura RPMI mais 10% de soro fetal bovino, centrifugadas a 300x g por 8 minutos e ressuspensas em 15 ml de meio de cultura, agora suplementado com 5% de soro fetal bovino. Em seguida, as células foram colocadas em garrafas de cultura de 75 cm², mantidas em estufas com 5% de CO₂ à uma temperatura de 37°C até atingirem a fase de crescimento logarítmico, quando então foram retiradas das garrafas de cultura, com o uso de 0,25% de tripsina (3 a 5ml durante 3 minutos em temperatura ambiente). Após este breve período, as células foram centrifugadas a 300 x g por 8 minutos para retirar a tripsina do meio e novamente ressuspensas em meio de cultura RPMI. Posteriormente, foram contadas em câmara de Neubauer, sendo a viabilidade celular avaliada pelo método de exclusão do corante azul de trypan. Todas as amostras de células utilizadas apresentavam no mínimo 95% de viabilidade. Após a contagem, o número de células foi ajustado para 2x10⁶ células/ml de PBS, para a inoculação de 100µl na veia da cauda dos animais. Estes procedimentos foram realizados dentro de um fluxo laminar e com o uso de soluções estéreis.

Quatorze dias após a inoculação, os animais foram eutanasiados por meio de uma associação anestésica de xilazina e ketamina, para a coleta dos pulmões. Imediatamente

depois, estes órgãos foram colocados em uma solução de formaldeído a 10%, sendo utilizados para determinar o número de metástases presentes na superfície do órgão (Figura 4) com o auxílio de uma lupa. O experimento foi conduzido uma semana depois das observações das relações de dominância/submissão tendo sido a estabilidade da hierarquia entre as duplas checada 7 dias após a injeção das células tumorais.



Figura 4 – Fotografia representativa das metástases encontradas nos pulmões de camundongos C57BL/6, 14 dias após a inoculação pela veia da cauda de 2×10^5 células tumorais da linhagem B16F10

4.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Um citometro de fluxo (FACSCALIBUR[®], Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) conectado a um computador Macintosh G4 foi utilizado para imunofenotipagem e avaliação de atividade celular. Os dados dos eventos foram coletados e analisados pelo software Cell Quest Pro[®] (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

As populações foram identificadas de acordo com suas propriedades de tamanho (*Forward Scatter* - FSC) e complexidade interna (*Side Scatter* - SSC), sendo mecanicamente separadas e avaliadas em microscopia ótica, depois de corados com Giemsa.

As fluorescências foram adquiridas em escala logarítmica para a avaliação de moléculas de superfície e atividade celular. A fluorescência da CFSE, do DCFH e do FITC foi detectada pelo leitor FL-1 (530 ± 30 nm) e a fluorescência do iodeto de propídeo, PE e alexa flúor, foi detectada pelo leitor FL-2 (585 ± 42 nm).

As amostras foram analisadas através do programa Cell Quest Pro[®], com a utilização de “gates” que permitem a individualização da população de interesse (linfócitos, neutrófilos, monócitos ou células tumorais) para o estudo, excluindo-se assim, outros tipos celulares das amostras. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo contendo apenas células, como controle de refringência basal da célula a ser analisada.

4.8.1 Estudo da atividade de neutrófilos e monócitos sanguíneos

O sangue da veia cava foi retirado, com a utilização de seringas heparinizadas, dos animais dominantes e submissos de cada dupla; a coleta foi feita após a anestesia dos animais (por meio do uso de uma solução de xilazina + ketamina). Uma amostra de cada sangue coletado foi utilizada para a medida do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos e monócitos; o sangue restante foi utilizado para o ensaio de citotoxicidade de células NK.

A atividade dos neutrófilos e monócitos sanguíneos foi avaliada pela medida de sua capacidade de produção de radicais de oxigênio (*burst* oxidativo) e pela capacidade de fagocitose de bactérias, utilizando-se a metodologia proposta por Hasui et al. (1989). Para tanto, o *burst* oxidativo basal de neutrófilos e monócitos foi avaliado usando-se 100 μ l de sangue total mais 200 μ l de dicloro-fluoresceína (DCFH-DA) (0.3mM) em PBS. A substância

usada para induzir a produção de radicais de oxigênio em neutrófilos e monócitos foi a bactéria *Staphylococcus aureus* ($2,4 \times 10^9$ bactérias/ml). Assim, 100 μ l de sangue total foi misturado com 200 μ l de DCFH-DA (0.3 mM) em PBS (para medir o *burst* basal) ou com 100 μ l de bactéria *S. aureus* marcada com iodeto de propídeo (para o *burst* induzido) em cada tubo de polipropileno. Para a avaliação da fagocitose 100 μ l do sangue foi misturado com 100 μ l de bactéria SAPI ou 30 μ l de bactéria *Escherichia coli* marcada com alexa fluor (Molecular Probes®). As amostras foram incubadas a uma temperatura de 37 °C por 20 minutos, sob agitação. As reações foram paralisadas adicionando-se a cada tubo 2 ml de uma solução de EDTA gelado (3 mM) para finalizar o processo de fagocitose. Após centrifugação (250 g por 10 minutos), as hemácias de todas as amostras foram lisadas com uma solução de 0,2% de NaCl (2,0 ml por amostra) por 20 segundos. Imediatamente depois, uma solução de 1,6% de NaCl (2,0 ml por amostra) foi adicionada a cada amostra para restabelecer a isotonicidade. As amostras foram, então, centrifugadas novamente (250 g por 10 minutos), sendo finalmente as células ressuspensas em 1,0 ml de PBS para a análise no citometro de fluxo. Desta forma, o experimento apresentava a seguinte bateria de tubos:

- Tubo A: 100 μ l de sangue total + 1,0 ml de PBS
- Tubo B: 100 μ l de sangue total + 200 μ l de DCFH-DA + 800 μ l de PBS
- Tubo C: 100 μ l de sangue total + 200 μ l DCFH-DA + 100 μ l de SAPI + 700 μ l de PBS.
- Tubo D: 100 μ l de sangue total + 100 μ l de SAPI + 900 μ l de PBS.
- Tubo E: 100 μ l de sangue total + 30 μ l de *E. coli* + 970 μ l de PBS.

Cada amostra passou pelo citômetro uma única vez, sendo adquiridos 10.000 eventos dentro de um *gate* previamente determinado em cada amostra. Foram registradas as medidas diretas da média de fluorescência dos canais verde para o *burst* oxidativo e vermelho para a fagocitose. O percentual de fagocitose (percentual de neutrófilos ou monócitos que ingeriram bactéria) foi expressa para os neutrófilos como: número de neutrófilos com fluorescência vermelha dividido pelo número total de neutrófilos (x 100) e para os monócitos como: número de monócitos com fluorescência vermelha dividido pelo número total de monócitos (x 100). Também foi avaliada a intensidade de fagocitose destas células, que representa, qualitativamente, quantas bactérias foram fagocitadas pelas células em estudo. Estes valores foram registrados através da intensidade média de fluorescência emitida por estas células. A figura 5 ilustra um citograma e um histograma de análise de fagocitose dos neutrófilos sanguíneos, respectivamente.

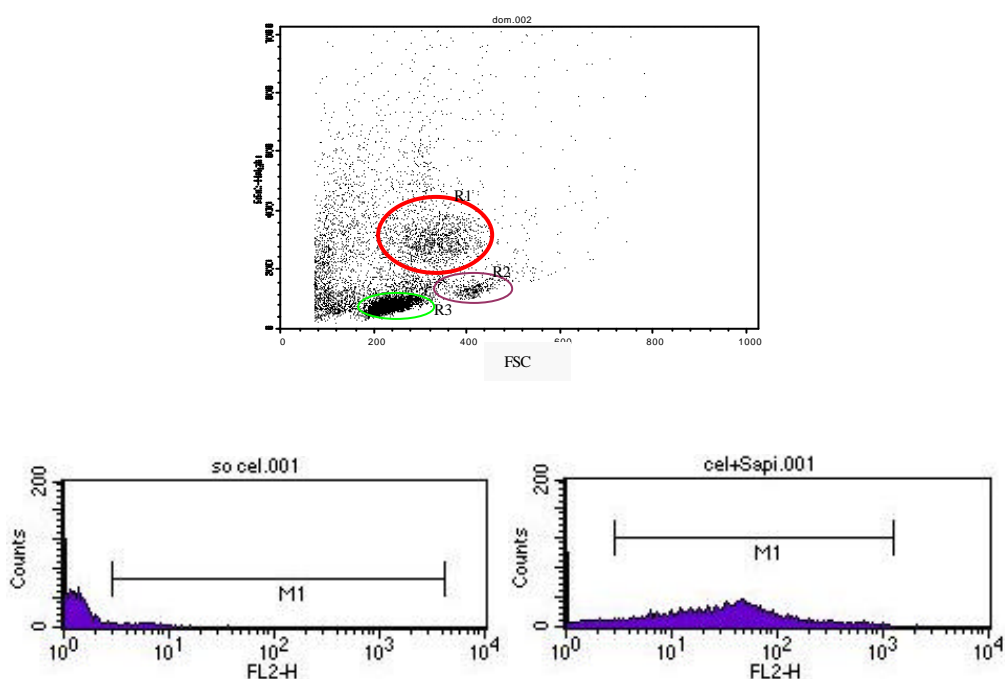


Figura 5 - Representação de citograma (A) e histogramas (B e C) obtidos no estudo de atividade de neutrófilos avaliada por citometria de fluxo. Em A – representação dos leucócitos sanguíneos de camundongos (R1 = neutrófilos; R2 = monócitos; R3 = linfócitos). Em B – representação da intensidade de fluorescência emitida por neutrófilos sanguíneos. Em C representação da intensidade de fluorescência emitida por neutrófilos sanguíneos que fagocitaram bactérias *S. aureus* marcada com iodeto de propídeo

4.8.2 Estudo da atividade de células NK

O sangue da veia cava dos animais dominantes e submissos de cada dupla, foi retirado com a utilização de seringas heparinizadas; a coleta foi feita após a anestesia dos animais (com uma solução de xilazina + ketamina). Uma amostra de cada sangue coletado foi utilizada para o ensaio de citotoxicidade de células NK. O baço de animais dominantes e submissos também foi coletado para o ensaio de citotoxicidade de células NK, sendo estas retiradas no mesmo horário da coleta do sangue, i.e., entre 8:00 e 10:00, uma semana depois da última avaliação das relações de dominância/submissão.

Para a avaliação da citotoxicidade de células NK, foi utilizada a metodologia proposta por Marcusson-Ståhl e Cederbrant (2003). Para tanto, 400 µl de sangue foi diluído em 400 µl de PBS que foi lentamente dispensado em 400 µl de Ficoll PaqueTM Plus. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos à 300 g e 20 °C . As células mononucleares da interface foram coletadas e lavadas duas vezes em 10 ml de meio de cultura RPMI 1640, sendo centrifugadas à 300 g por 10 minutos, contadas e diluídas em meio de cultura RPMI 1640 para o uso no ensaio de citotoxicidade. Para a avaliação da citotoxicidade de células NK no baço, o órgão foi removido e gentilmente macerado em 2,0 ml de RPMI 1640 gelado. A suspensão de células obtidas foi primeiramente centrifugada à 300 x g por 8 minutos e posteriormente ressuspendidas em uma solução de 0,2% de NaCl (2 ml por amostra) por 20 segundos, para a lise das hemácias. Imediatamente depois, uma solução de 1,6% de NaCl (2,0 ml por amostra) foi adicionada a cada amostra para restabelecer a isotonicidade, sendo as células contadas e diluídas em meio de cultura para o uso no ensaio de citotoxicidade.

O ensaio de citotoxicidade foi feito em duplicata para cada animal dominante e submisso. As células tumorais B16F10 foram usadas como células alvo para a determinação *in vitro* da citotoxicidade das células NK. Para tanto, estas células foram marcadas com uma

solução de 7,5 μMol de CFSE por 10 minutos a 37 °C e 5% de CO_2 . Após este período de incubação estas células foram centrifugadas para a retirada do CFSE do meio. A razão de células efectoras (linfócitos do sangue ou baço) x alvo (células tumorais B16F10) utilizada foi de 50:1 para o sangue e 100:1 para o baço, respectivamente. Assim, em cada teste, 100 μl de células do sangue (25×10^5 células/ml) ou 100 μl de células do baço (5×10^6 células/ml) foram incubadas com células alvo (5×10^4 células/ml). As células alvo e efectoras foram, então, misturadas em um volume final de 200 μl em uma placa de 96 poços, incubadas à 37 °C e 5% de CO_2 por um período de 18 a 20h. Uma coluna da placa foi incubada apenas com células alvo (5×10^4 células/ml), sendo usadas como controle para a determinação de morte celular espontânea. No final desta incubação, as amostras foram colocadas em um banho de gelo e 50 μl de uma solução de iodeto de propídeo (50 $\mu\text{g/ml}$) foi adicionado em cada amostra para a marcação do DNA das células mortas. As amostras foram incubadas por 5 minutos, sendo posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Para a análise dos dados, as células alvo marcadas com CFSE foram colocadas em um “gate FL1/FL3” no *dot plot* incluindo todas as células alvo vivas e mortas, onde foram adquiridos 1000 eventos dentro deste *gate*. Um histograma em FL3 foi utilizado para determinar o percentual de células alvo mortas, representado na figura 6, sendo expresso pela seguinte fórmula:

$$\frac{[\text{células alvo mortas na amostra (\%)} - \text{células alvo espontaneamente mortas (\%)}] \times 100}{100 - \text{células alvo espontaneamente mortas (\%)}}$$

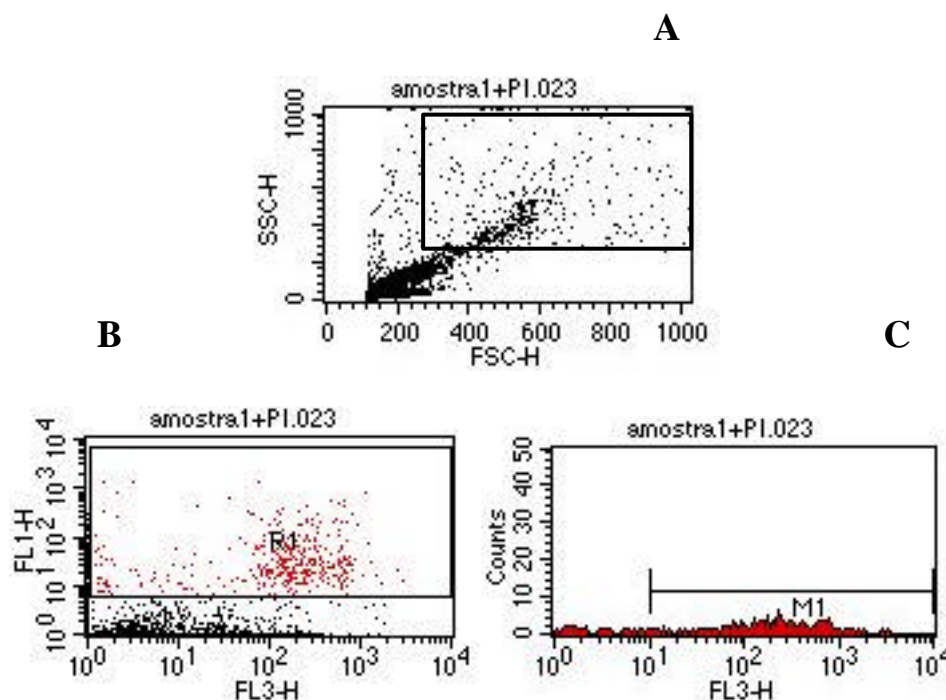


Figura 6 - Citograma (A) e histograma (B e C) representativos da atividade citotóxica de células NK. C – representa o percentual de células alvo mortas na amostra (=M1)

4.8.3 Imunofenotipagem

4.8.3.1 Determinação do percentual de células nk no sangue por anticorpo monoclonal

Para a marcação e determinação do percentual de células NK nos animais, 100 µl de sangue foi incubado com 1µl de anticorpo anti-NK1 marcado com PE. As amostras e o controle negativo (isotipo) foram incubados conforme especificação do fabricante, ao abrigo da luz, durante 1 hora em temperatura ambiente. Após este período as hemácias foram lisadas com uma solução de 0,2% de NaCl (2 ml por amostra) por 20 segundos. Imediatamente depois, uma solução de 1,6% de NaCl (2,0 ml por amostra) foi adicionada a cada amostra para restabelecer a isotonicidade do meio, sendo as amostras imediatamente centrifugadas à 300 g

durante 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi dispensado e este procedimento foi repetido por mais uma vez. Ao final desta etapa, o sedimento de células foi ressuspensão em 1,0 ml de PBS para avaliação no citometro de fluxo, onde 20.000 eventos foram adquiridos para análise das amostras.

4.8.3.2 Determinação do percentual de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no baço e timo por anticorpo monoclonal

O baço e o timo foram coletados, com o auxílio de material cirúrgico e pesado em balança semi-analítica (marca Marthe), sendo o peso relativo do órgão calculado pela fórmula: (peso do órgão x 100)/ peso do animal. Para a avaliação das moléculas de superfície celular CD4⁺ e CD8⁺, o timo e o baço foram coletados e macerados em uma solução de meio RPMI 1640 gelado. As células foram coradas com Azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer, sendo ajustadas a uma concentração de 10⁶ células por tubo em um volume de 100µl. Foram utilizados os anticorpos anti-CD³ para a detecção de linfócitos T, anti-CD⁴ para a detecção de linfócitos TCD4⁺ e anti-CD⁸ para detectar linfócitos TCD8⁺. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz, durante 1 hora em temperatura ambiente, com os diferentes anticorpos. Ao final, o sedimento de células foi ressuspensão em 1,0 ml de PBS para avaliação no citometro de fluxo, onde 20.000 eventos foram adquiridos para análise das amostras.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados diferentes tratamentos estatísticos de acordo com a natureza dos dados obtidos em cada situação experimental. Inicialmente, foi aplicado o teste de Bartlett afim de verificar a necessidade de usar testes paramétricos ou não paramétricos. Todos os dados obtidos foram paramétricos e analisados pelo teste “t” de Student ou ANOVA simples seguida do teste de Bonferroni ou Dunnett. As análises estatísticas foram feitas usando-se a versão 7.0 do software SPSS® SYSTAT. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada como capaz de mostrar diferenças significantes em todas as comparações feitas. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão (DP) ou como média e erro padrão da média (EPM).

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Os camundongos conviveram em duplas por um período prolongado (desde o desmame até os 90 dias de idade). Nesta situação, três cenários foram observados: no primeiro, os animais conviviam harmoniosamente na caixa, sem brigas e sem o estabelecimento de hierarquia social, no segundo os animais agrediam-se constantemente, causando ferimentos intensos em um ou nos dois animais; e no terceiro, após alguns combates entre os animais estabelecia-se uma relação estável de hierarquia social, onde um camundongo tornava-se o dominante e o outro animal o submisso, o que refletia diretamente na diminuição do número e da intensidade dos ataques. Este contexto foi sempre observado nos experimentos descritos neste estudo. Vale lembrar que apenas as duplas de animais que apresentaram relações típicas de dominância/submissão e não apresentavam mordidas e feridas severas foram utilizados neste estudo.

5.1 EXPERIMENTO 1: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL EM DUPLAS DE CAMUNDONGOS SOBRE A ATIVIDADE GERAL E OS NÍVEIS DE ANSIEDADE DOS ANIMAIS DOMINANTES E SUBMISSOS

Sabe-se que animais sob efeito de fármacos ansiogênicos, bem como aqueles submetidos a estímulos estressantes agudos apresentam modificações comportamentais características indicativas de ansiedade que podem ser avaliadas por meio de diferentes equipamentos. Assim, o propósito deste experimento foi o de avaliar os efeitos do

estabelecimento de uma relação social estável em duplas na atividade geral e nos níveis de ansiedade de camundongos dominantes e submissos. Para tanto, foi feito o registro do comportamento de animais provenientes de dez duplas no campo aberto e no labirinto em cruz elevado uma semana após a determinação da hierarquia social (dominantes ou submissos) em cada dupla, conforme descrito no item 4.4.

Como pode ser visto na tabela 1, a única diferença observada no campo aberto entre os animais dominantes e submissos foi no percentual do tempo gasto pelos animais na exploração da zona central do aparelho. De fato, os dados de distância total movida, tempo total e percentual do tempo total em movimento, percentual do tempo gasto nas zonas periférica e intermediária, velocidade média, sinuosidade e número de movimentos iniciados no campo aberto não foram diferentes entre os animais dominantes e submissos.

Tabela 1 - Comportamento de camundongos dominantes e submissos no campo aberto

Parâmetros	Dominantes	Submissos
Distância total movida (cm)	4287,2 ± 297,1	4070,2 ± 165,9
Tempo em movimento (s)	220,6 ± 17,1	210,4 ± 12,2
Percentual do tempo em movimento	36,7 ± 2,8	35,0 ± 2,0
Percentual do tempo gasto na zona periférica	67,9 ± 3,1	72,2 ± 2,8
Percentual do tempo gasto na zona intermediária	21,0 ± 2,2	18,9 ± 1,3
Percentual do tempo gasto na zona central	15,5 ± 1,2	10,4 ± 0,9*
Velocidade média (cm/s)	1,19 ± 0,08	1,13 ± 0,05
Sinuosidade na arena (graus/cm)	29,6 ± 1,1	30,8 ± 1,8
Número de movimentos iniciados	105,3 ± 4,6	102,9 ± 4,4

Os dados são apresentados como média ± DP. *p<0,05 comparado aos camundongos dominantes (teste “t” de Student)

Embora não tenha sido observada diferença na distância total movida entre camundongos dominantes e submissos nos dez minutos de registro do comportamento no campo aberto, uma análise da distância percorrida pelos animais a cada minuto revela diferenças no perfil de movimentação de animais dominantes e submissos, mostrando que os camundongos submissos locomovem-se menos do que os dominantes nos dois primeiros minutos de análise, como pode ser visto na figura 7.

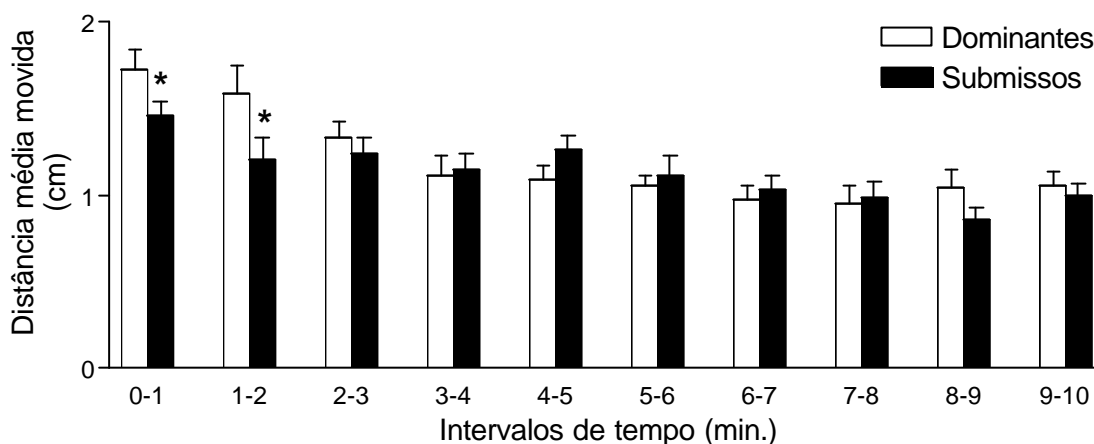


Figura 7 - Distância média movida pelos camundongos dominantes e submissos no campo aberto avaliada a cada minuto. Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p < 0,05$ comparado aos camundongos dominantes (teste “t” de Student)

Como pode ser visto na figura 8 (A-B), os camundongos submissos apresentaram menor número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado ($p < 0,01$) e gastaram menos tempo na exploração destes braços ($p < 0,01$) em relação aos animais dominantes. Por outro lado, o percentual do tempo gasto nos braços abertos foi maior nos animais submissos ($p < 0,01$) em relação àquele observado nos camundongos dominantes. Embora o número de entradas nos braços fechados tenha sido maior nos camundongos submissos, não houve diferença estatística entre os grupos. (Figura 8 – C e D).

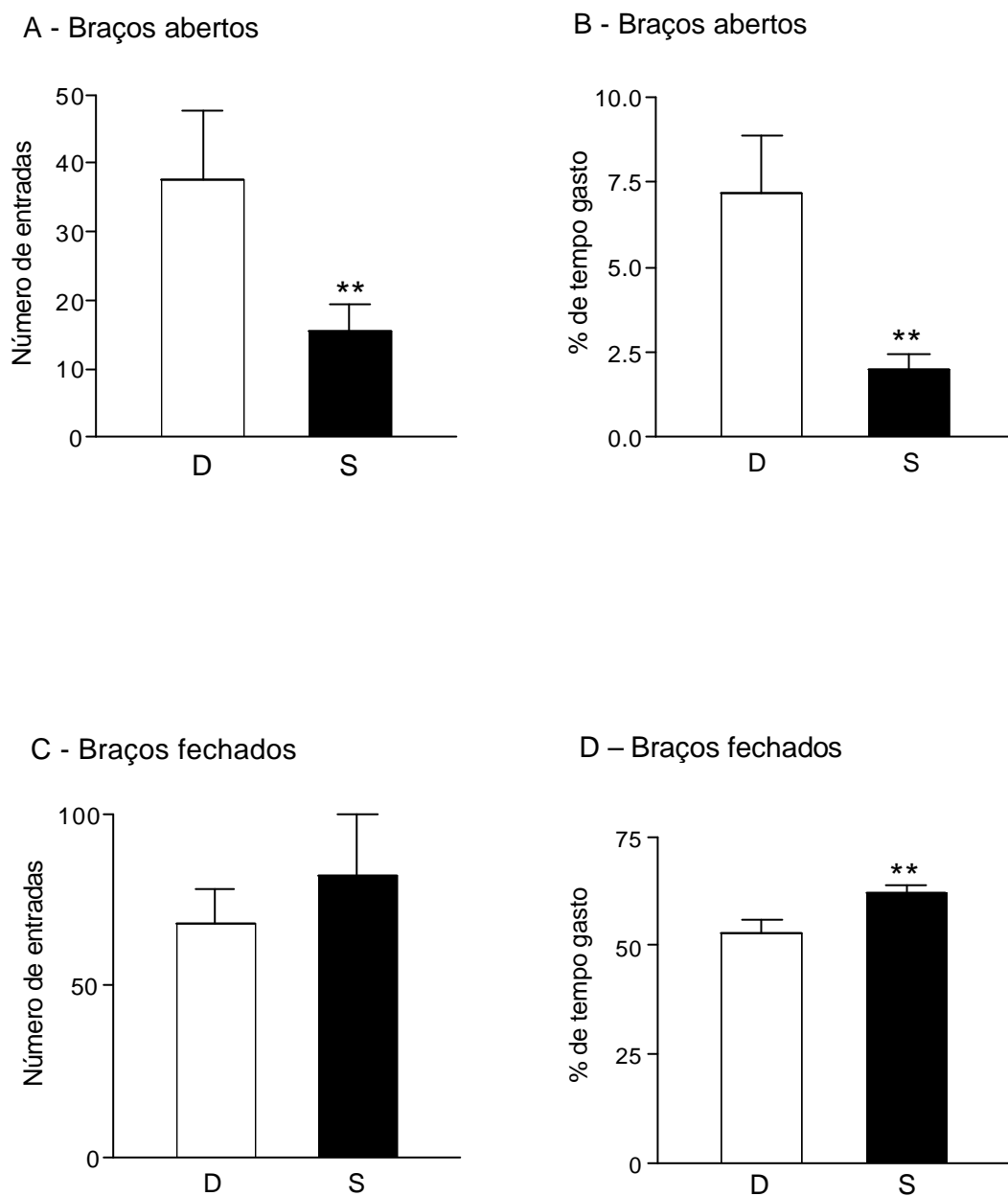


Figura 8 – Efeitos de uma relação social estável em duplas de camundongos sobre os níveis de ansiedade dos animais dominantes e submissos. Avaliação do número de entradas e percentual do tempo gasto nos braços abertos (A e B) e fechados (C e D). Os dados são apresentados como média \pm EPM. Dominantes (colunas vazias), submissos (colunas cheias). $p < 0,01$ em comparação aos animais dominantes

A figura 9 (A – D) mostra o comportamento dos animais dominantes e submissos no terço final dos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Como pode ser visto, os camundongos submissos apresentaram menor número de entradas ($p<0,05$) e passaram menos tempo ($p<0,05$) explorando a porção final dos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação aos camundongos dominantes (Figura 9 – A e B). No mesmo sentido, os dados dos animais submissos relacionados à porção final dos braços fechados foram maiores ($p<0,05$) do que aqueles apresentados pelos camundongos dominantes. (Figura 9 - C e D).

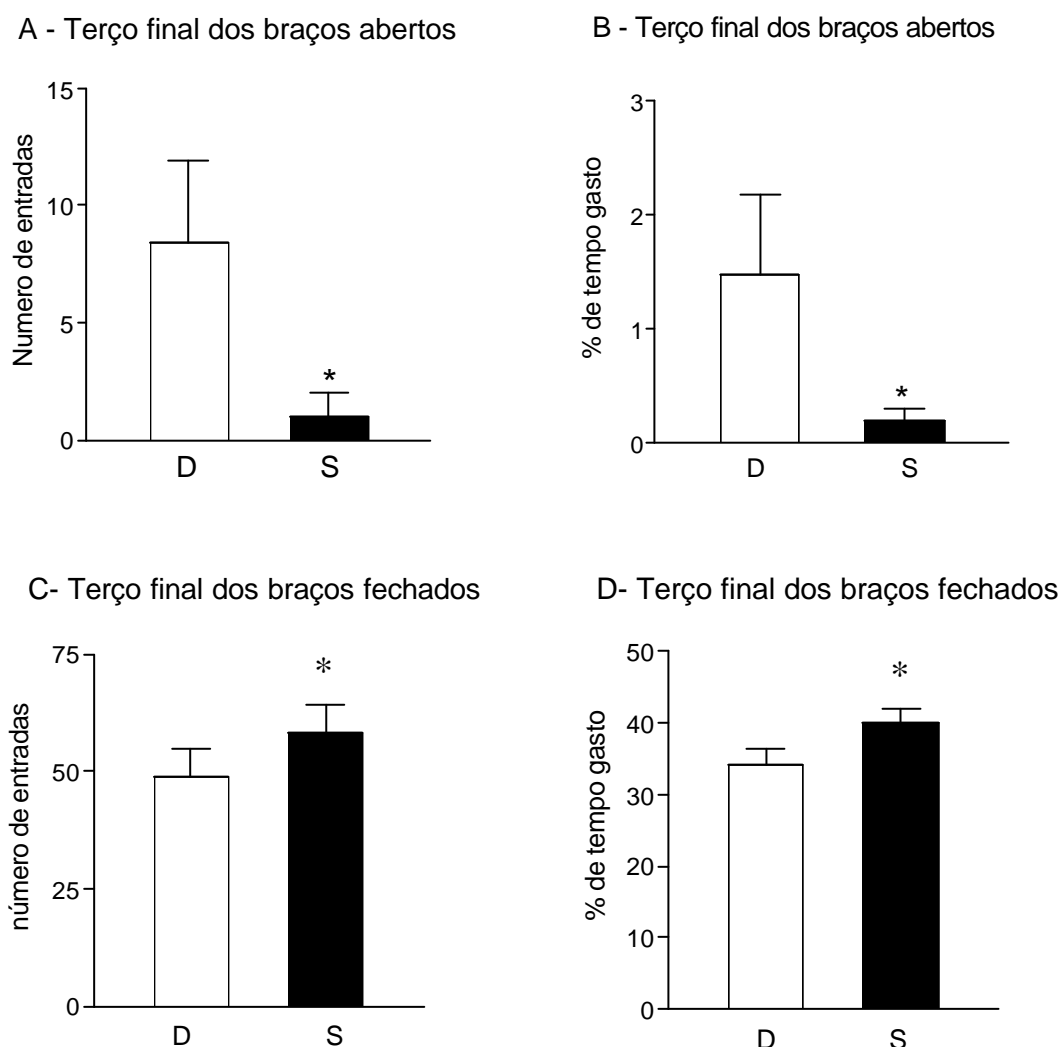


Figura 9- Avaliação do número de entradas e percentual do tempo gasto no terço final dos braços abertos (A e B) e fechados (C e D) de camundongos dominantes e submissos que apresentam relações estáveis de hierarquia social. Os dados são apresentados como média \pm EPM. Dominantes (colunas vazias), submissos (colunas cheias).* $p<0,05$ em comparação aos animais dominantes

5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA

Dez camundongos dominantes e dez camundongos submissos foram utilizados para este experimento. Além disso, mais dez animais mantidos em grupos estáveis de cinco animais por caixa foram utilizados como agrupados para avaliação dos níveis de corticosterona sérica. Os animais foram aclimatados durante uma semana na sala de experimentação, sendo as amostras de sangue coletadas no período da manhã (8:00-10:00 hs) para eliminar os efeitos das alterações circadianas deste hormônio, conforme descrito no item 4.5.

A determinação dos níveis séricos de corticosterona mostrou que não há diferença nos níveis basais deste hormônio entre os animais dominantes e submissos quando comparados a animais mantidos em grupos de cinco por caixa, onde não foi determinada a hierarquia social dos animais (dominantes e submissos), como mostra a figura 10.

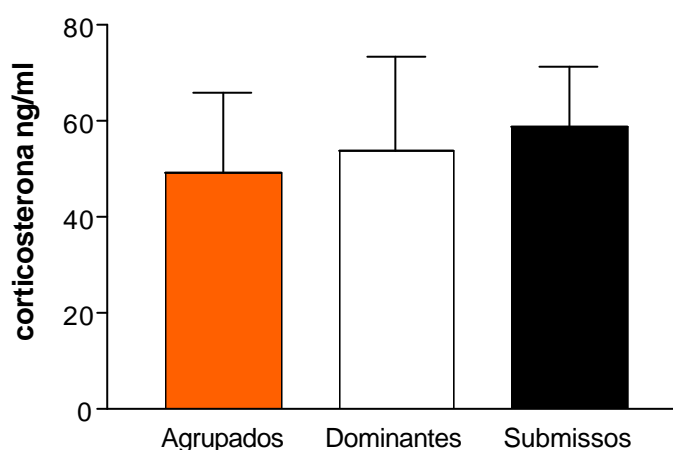


Figura 10 - Efeitos de uma relação social estável sobre os níveis de séricos de corticosterona de animais agrupados em número de cinco por caixa (agrupados) e em duplas de camundongos dominantes e submissos. Os dados são apresentados como média \pm DP. ANOVA

5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE OS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES E DE SEUS METABÓLITOS

Camundongos dominantes e submissos que apresentavam relação social estável e animais mantidos em grupos de cinco por caixa, foram utilizados para a avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos em duas importantes regiões do Sistema Nervoso Central: o hipotálamo e o corpo estriado. Os animais foram aclimatados durante uma semana na sala de experimentação, sendo as amostras de tecido cerebral coletadas no período da manhã (8:00-10:00 hs), conforme descrito no item 4.6.

A tabela 2 mostra as concentrações hipotalâmicas (ng de neurotransmissor/ gr de tecido) de noradrenalina, do seu metabólito MHPG e da taxa de renovação (*turnover*) deste neurotransmissor (MHPG/NOR) em animais mantidos em grupos e em dominantes e submissos mantidos em duplas. A análise estatística dos dados revelou que os animais dominantes, mantidos em uma relação de hierarquia social estável, apresentaram maior taxa de renovação de noradrenalina ($p < 0,05$) em relação aos animais agrupados, e uma tendência ($p < 0,01$) de aumento em relação aos animais submissos, sem apresentar alteradas as concentrações absolutas de noradrenalina ($p = 0,50$) e de MHPG ($p = 0,31$). Entretanto, não se observaram diferenças entre os animais agrupados e os animais submissos. A Figura 11 ilustra este resultado.

Tabela 2 – Efeitos de uma relação social estável sobre as concentrações (ng/gr de tecido) hipotalâmicas de noradrenalina, MHPG e sobre a taxa de renovação de noradrenalina (MHPG/NOR) em camundongos dominantes, submissos e agrupados. Os dados são apresentados como média \pm DP

Grupos	Noradrenalina	MHPG	MHPG/ Noradrenalina
Agrupados	684,80 \pm 111,07	30,90 \pm 14,80	0,034 \pm 0,007
Dominantes	606,70 \pm 107,80	25,44 \pm 4,20	0,042 \pm 0,006*
Submissos	667,49 \pm 160,70	24,91 \pm 6,00	0,037 \pm 0,004

* $p < 0,05$ em relação ao grupo agrupados. ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni

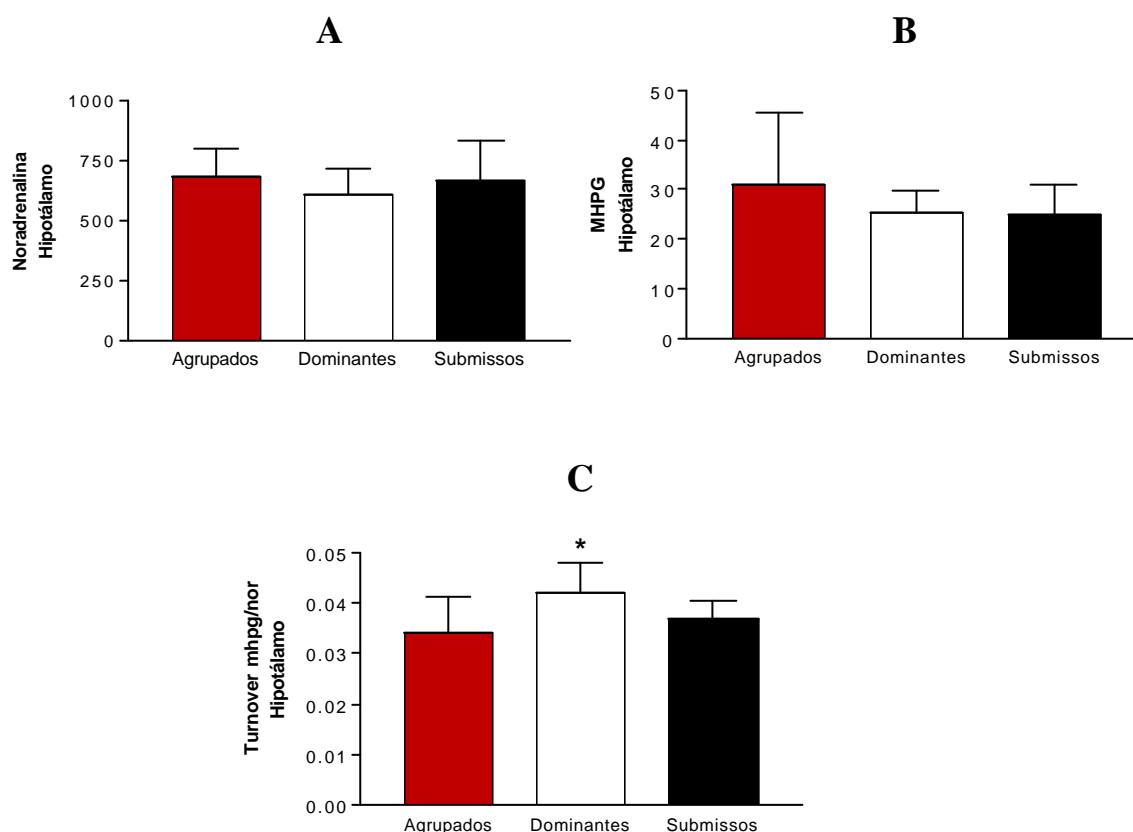


Figura 11 - Efeitos de uma relação social estável sobre as concentrações (ng/gr de tecido) hipotalâmicas de noradrenalina (A), MHPG (B) e sobre o *turnover* de noradrenalina (C) em camundongos dominantes, submissos e agrupados. * $p < 0,05$ em relação ao agrupados. ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni

A tabela 3 apresenta os dados referentes às concentrações hipotalâmicas (ng de neurotransmissor/ gr de tecido) de dopamina, de seus metabólitos DOPAC e HVA e de sua taxa de renovação (DOPAC/dopamina, HVA/dopamina e DOPAC+HVA/DA) em animais mantidos em grupos e em animais dominantes e submissos. A análise estatística dos dados revelou que os animais submissos mantidos em uma relação estável de hierarquia social apresentaram maior taxa de renovação de dopamina no hipotálamo ($p < 0,05$) em relação aos animais dominantes, sem no entanto apresentar alterações das concentrações absolutas de dopamina ($p = 0,19$) e de seu metabólito HVA ($p = 0,47$). Por outro lado, os animais dominantes apresentaram uma tendência de redução do metabólito DOPAC ($p = 0,085$) no hipotálamo. A Figura 12 ilustra este resultado.

Tabela 3 – Efeitos de uma relação social estável sobre as concentrações (ng/gr de tecido) hipotalâmicas de dopamina, de seus metabólitos DOPAC e HVA e de sua taxa de renovação (DOPAC/DA, HVA/DA e DOPAC+HVA/DA) em camundongos dominantes, submissos e agrupados. Os dados são apresentados como média \pm DP

Grupos	Dopamina	DOPAC	HVA	DOPAC/DA	HVA/DA	DOPAC+HVA/DA
Agrupados	236,08 \pm 59,00	55,16 \pm 11,50	94,22 \pm 33,39	0,280 \pm 0,05	0,42 \pm 0,08	0,71 \pm 0,11
Dominantes	224,51 \pm 42,65	44,15 \pm 13,20	93,64 \pm 24,81	0,224 \pm 0,07	0,43 \pm 0,070	0,66 \pm 0,11
Submissos	192,74 \pm 42,90	53,60 \pm 7,18	79,83 \pm 27,83	0,320 \pm 0,10*	0,47 \pm 0,100	0,75 \pm 0,20

* $p < 0,05$ em relação aos animais dominantes. ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni

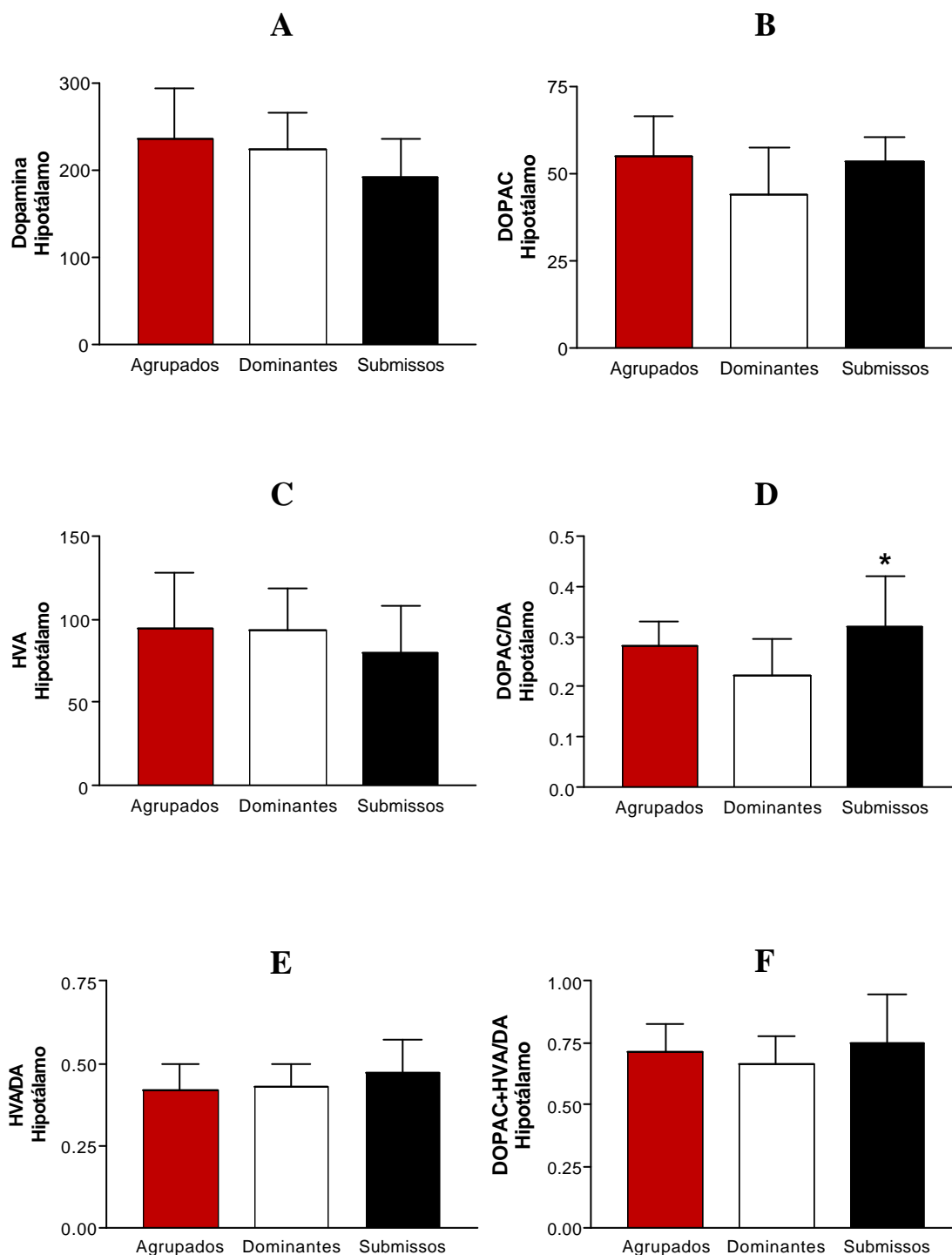


Figura 12 - Efeitos de uma relação social estável sobre as concentrações (ng/gr de tecido) hipotalâmicas de dopamina (A), de seus metabólitos DOPAC (B) e HVA (C) e de seu *turnover* DOPAC/dopamina (D), HVA/dopamina (E) e (DOPAC+HVA)/DA (F) em camundongos dominantes, submissos e agrupados. * $p < 0,05$ em relação aos dominantes. ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni

A tabela 4 apresenta os dados referentes às concentrações hipotalâmicas (ng de neurotransmissor/ gr de tecido) de serotonina, de seu metabólito 5-HIAA e de sua taxa de renovação (5-HIAA/5-HT) em animais mantidos em grupos e em animais dominantes e submissos. A análise estatística dos dados revelou que não há diferença nas concentrações deste neurotransmissor no hipotálamo ($p=0,38$), bem como de seu metabólito ($p=0,22$) assim como de sua taxa de renovação ($p=0,11$). A figura 13 ilustra este resultado.

Tabela 4 – Efeitos de uma relação social estável sobre as concentrações (ng/gr de tecido) hipotalâmicas de serotonina, de seu metabólito 5-HIAA e de sua taxa de renovação (5-HIAA/5-HT) em camundongos dominantes, submissos e agrupados. Os dados são apresentados como média \pm DP

Grupos	Serotonina (5-HT)	5-HIAA	5-HIAA/5-HT
Agrupados	2103,90 \pm 305,00	592,20 \pm 89,00	0,280 \pm 0,013
Dominantes	1828,50 \pm 505,00	479,40 \pm 117,00	0,260 \pm 0,026
Submissos	2031,50 \pm 363,30	499,34 \pm 167,00	0,250 \pm 0,034

ANOVA

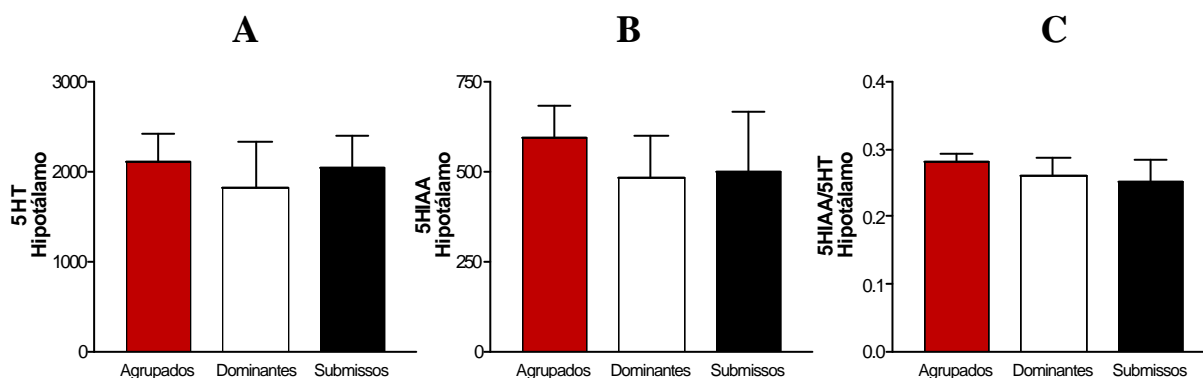


Figura 13 - Efeitos de uma relação social estável sobre as concentrações (ng/gr de tecido) hipotalâmicas de serotonina (A), de seu metabólito 5-HIAA (B) e de seu *turnover* 5-HIAA/5-HT (C) em camundongos dominantes, submissos e agrupados. ANOVA

Apresentamos agora os dados referentes às concentrações destes neurotransmissores dosados na região do corpo estriado dos mesmos camundongos.

As concentrações absolutas do neurotransmissor noradrenalina avaliadas no corpo estriado não apresentaram diferença estatística ($p=0,8$) entre os animais agrupados ($78,7 \pm 17,5$), dominantes ($87,5 \pm 27,7$) e submissos ($87,7 \pm 34,3$). Não foi possível avaliar as concentrações do seu metabólito MHPG nesta estrutura cerebral, uma vez que a mesma estava abaixo do limite de detecção do aparelho. Consequentemente, também foi possível avaliar a taxa de renovação deste neurotransmissor nesta estrutura.

A tabela 5 apresenta os dados referentes às concentrações (ng de neurotransmissor/ gr de tecido) de dopamina, de seus metabólitos DOPAC e HVA e de sua taxa de renovação (DOPAC/dopamina, HVA/dopamina e DOPAC+HVA/DA) no corpo estriado de animais mantidos em grupos e em animais dominantes e submissos. A análise estatística dos dados revelou que os animais submissos mantidos em uma relação estável de hierarquia social apresentaram menor concentração dos metabólitos DOPAC ($p<0,05$) e HVA ($p<0,01$) em relação aos animais agrupados e menor concentração do metabólito HVA ($p<0,001$) e da taxa de renovação HVA/DA e DOPAC+HVA/DA ($p<0,001$) em relação aos animais dominantes, sem no entanto apresentar alterações nas concentrações absolutas de dopamina ($p=0,34$). Além disso, este grupo apresentou uma tendência a uma diminuição da taxa de renovação de DOPAC/DA ($p=0,08$). Já os animais dominantes, apresentaram maiores concentrações do metabólito HVA ($p<0,05$) e também maior taxa de renovação de HVA/DA e DOPAC+HVA/DA em relação aos animais agrupados ($p<0,01$). A figura 14 ilustra estes resultados.

Tabela 5 – Efeitos de uma relação social estável sobre as concentrações (ng/gr de tecido) de dopamina, de seus metabólitos DOPAC e HVA e de sua taxa de renovação (DOPAC/DA, HVA/DA e DOPAC+HVA/DA) no corpo estriado de camundongos dominantes, submissos e agrupados. Os dados são apresentados como média \pm DP

Grupos	Dopamina	DOPAC	HVA	DOPAC/D A	HVA/DA	DOPAC+HVA /DA
Agrupados	4784,7 \pm 723,8	542,3 \pm 85,5	677,2 \pm 125,0	0,113 \pm 0,02	0,141 \pm 0,01	0,259 \pm 0,01
Dominantes	4802,0 \pm 1159,0	517,3 \pm 94,5	820,8 \pm 101,3*	0,114 \pm 0,01	0,189 \pm 0,03**	0,314 \pm 0,03**
Submissos	4139,3 \pm 917,8	439,7 \pm 59,8*	481,8 \pm 62,6***	0,104 \pm 0,01	0,120 \pm 0,02***	0,227 \pm 0,03***

*p<0,05 e **p<0,01 em relação aos agrupados; ***p<0,001 em relação ao grupo dominante. ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni

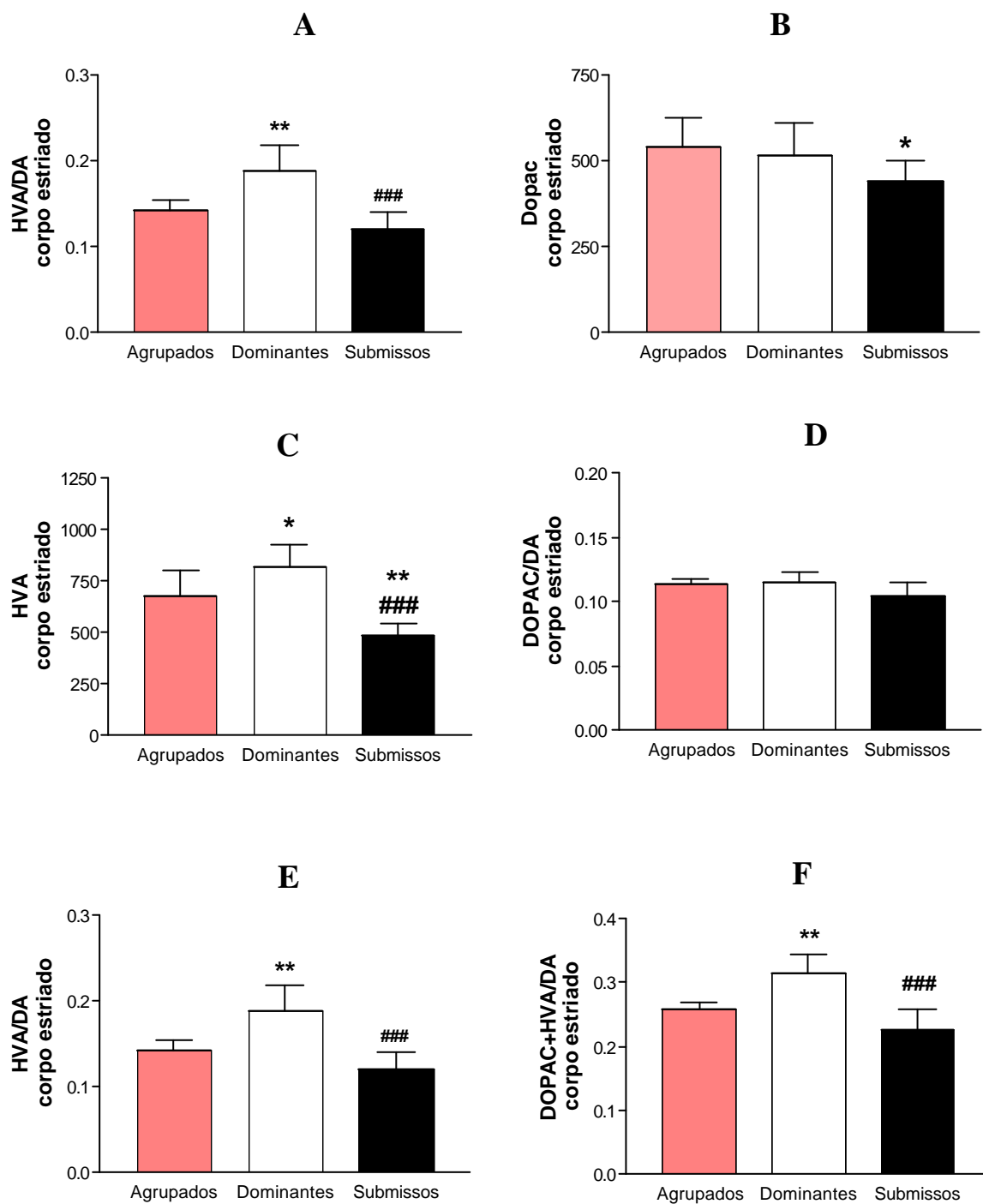


Figura 14 - Efeitos de uma relação social estável sobre as concentrações (ng/gr de tecido) de dopamina (A), de seus metabólitos DOPAC (B) e HVA (C) e de seu *turnover* DOPAC/DA (D), HVA/DA (E) e DOPAC+HVA/DA (F) no corpo estriado de camundongos dominantes, submissos e agrupados. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao agrupados; ### $p < 0,001$ em relação ao grupo dominante. ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni

A tabela 6 apresenta os dados referentes às concentrações (ng de neurotransmissor/gr de tecido) de serotonina, de seu metabólito 5-HIAA e de sua taxa de renovação (5-HIAA/5-HT) no corpo estriado de animais mantidos em grupos, em animais dominantes e submissos. A análise estatística dos dados revelou que não há diferença nas concentrações deste neurotransmissor no corpo estriado ($p=0,22$), bem como de seu metabólito ($p=0,75$). Entretanto, observou-se uma tendência a uma menor taxa de renovação deste neurotransmissor nos animais dominantes ($p=0,08$). A figura 15 ilustra este resultado.

Tabela 6 – Efeitos de uma relação social estável sobre as concentrações (ng/gr de tecido) de serotonina, de seu metabólito 5-HIAA e de sua taxa de renovação (5-HIAA/5-HT) no corpo estriado de camundongos dominantes, submissos e agrupados. Os dados são apresentados como média \pm DP

Grupos	n	Serotonina (5-HT)	5-HIAA	5-HIAA/5-HT
Agrupados	7	754,70 \pm 262,4	408,60 \pm 111,0	0,555 \pm 0,06
Dominantes	9	910,80 \pm 146,3	431,70 \pm 105,0	0,511 \pm 0,04
Submissos	9	976,45 \pm 269,3	389,50 \pm 116,7	0,475 \pm 0,08

ANOVA

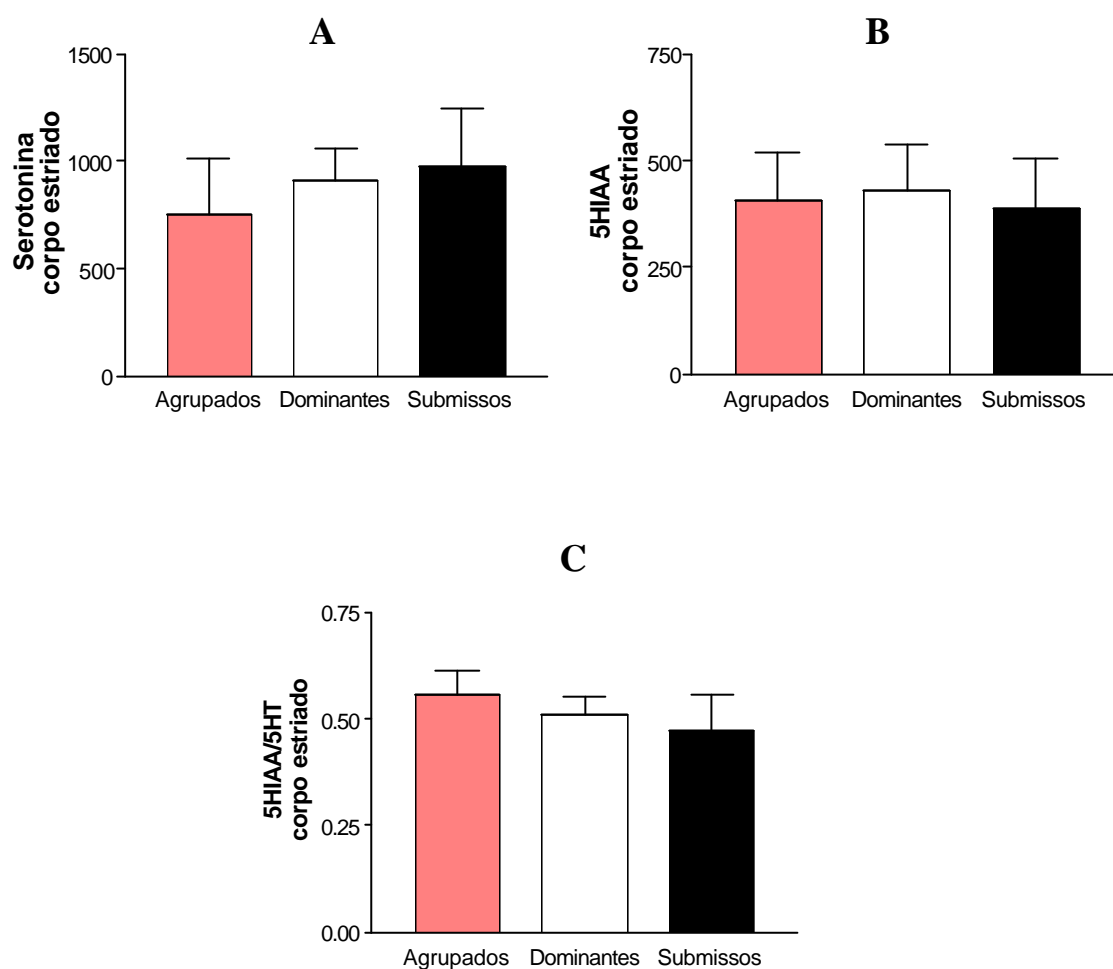


Figura 15 – Efeitos de uma relação social estável sobre as concentrações (ng/mg de tecido) de serotonina (A), seu metabólito 5-HIAA (B) e sua taxa de renovação 5-HIAA/5-HT (C) no corpo estriado de camundongos dominantes, submissos e agrupados. ANOVA de uma via

5.4 EXPERIMENTO 4: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE O NÚMERO DE METÁSTASES PULMONAR INDUZIDA PELO MELANOMA EXPERIMENTAL B16F10

Uma vez verificado que os animais mantidos em um ambiente social estável apresentavam diferenças comportamentais e neuroquímicas, procuramos avaliar se estes animais apresentariam diferentes respostas ao desenvolvimento de um tumor. Para tanto, foi utilizado um modelo experimental de metástase pulmonar, induzida pela inoculação intravenosa de células tumorais da linhagem B16F10, conforme descrito no item 4.7.

A figura 16 mostra a média do número de metástases induzidas pelo melanoma experimental B16F10 no pulmão de camundongos dominantes e submissos. Como pode ser visto, os camundongos submissos apresentam maior número de nódulos na superfície do pulmão ($p < 0,05$) do que os animais dominantes.

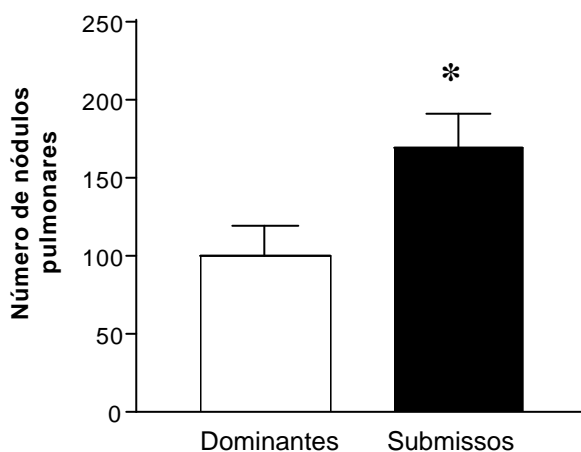


Figura 16 – Número de metástases no pulmonar em camundongos dominantes e submissos verificadas 14 dias após a inoculação pela veia da cauda de 2×10^5 células tumorais B16F10. Os dados representam a média \pm DP. * $p < 0,05$ em relação aos animais dominantes (teste “t” de Student)

Embora os animais submissos tenham apresentado menor resistência ao crescimento tumoral, uma análise cuidadosa dos dados mostra que em 15,5% das duplas avaliadas não houve diferença quanto ao número de nódulos contados na superfície pulmonar de camundongos dominantes e submissos. Por outro lado, 23,0% dos animais dominantes apresentaram maior quantidade de nódulos pulmonares do que os animais submissos. Entretanto, 61,5% dos animais submissos desenvolveram maior número de nódulos tumorais em relação aos seus companheiros de caixa dominantes, fato este que corroborou para o achado já relatado de um maior número médio de nódulos pulmonares encontrados nos animais submissos, como pode ser visto na figura 17.

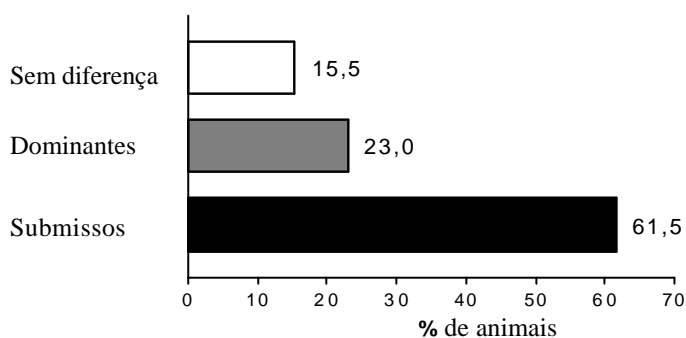


Figura 17 - Percentual de animais com maior número de tumores que o companheiro da caixa

5.5 EXPERIMENTO 5: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE O PESO E A CELULARIDADE DO BAÇO E TIMO DE ANIMAIS INOCULADOS OU NÃO COM O MELANOMA B16F10

Neste experimento, grupos de animais dominantes e submissos receberam a inoculação de células tumorais B16F10 pela veia da cauda, enquanto outros grupos receberam pela mesma via a inoculação de PBS estéril. O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da relação de dominância/submissão no peso relativo dos órgãos linfóides (baço e timo) e no número de células destes órgãos frente ao desafio do tumor experimental B16F10, conforme descrito nos itens 4.7 e 4.8.3.2.

A figura 18 apresenta a média do peso relativo do baço dos animais dominantes e submissos após a administração de PBS e com a inoculação do tumor. Podemos observar que os animais que receberam o tumor apresentaram maior peso relativo deste órgão em relação aos animais que não receberam ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença estatística entre o peso do baço de animais dominantes e submissos sem tumor e entre os animais dominantes e submissos inoculados com o tumor.

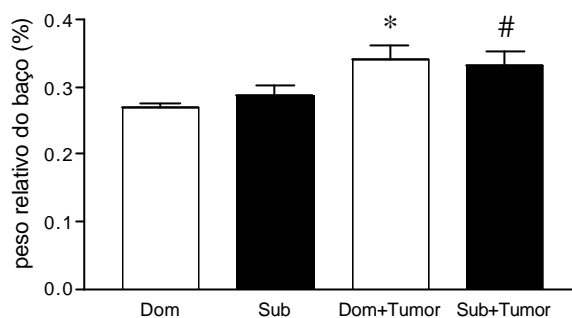


Figura 18- Peso relativo do baço de animais dominantes e submissos com e sem tumor experimental B16F10, vivendo em uma hierarquia social estável. Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p < 0,05$ em relação aos animais dominantes sem tumor. # $p < 0,05$ em relação aos animais submissos sem tumor. ANOVA seguida de Bonferroni

A figura 19 mostra o número de células/ml presentes no baço de animais dominantes e submissos após administração de PBS ou do tumor. Podemos observar que os animais dominantes que receberam o tumor apresentaram maior número de células ($p < 0,05$) que aqueles dominantes que não receberam o tumor experimental. Não houve diferença estatística entre o número de células do baço de animais dominantes e submissos sem tumor e entre os animais dominantes e submissos inoculados com o tumor.

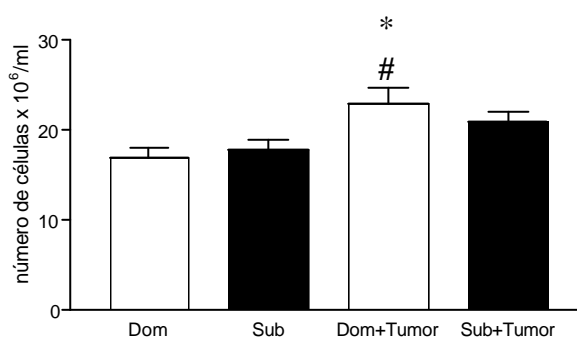


Figura 19- Número de células/ml no baço de animais dominantes e submissos com e sem tumor experimental B16F10, vivendo em uma hierarquia social estável. Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p < 0,05$ em relação aos animais dominantes sem tumor. # $p < 0,05$ em relação aos animais submissos sem tumor. ANOVA seguida de Bonferroni

A figura 20 apresenta a média do peso relativo do timo de animais dominantes e submissos após a administração de PBS ou do tumor. A análise dos resultados mostrou que não houve diferença estatística entre o peso dos timos dos animais.

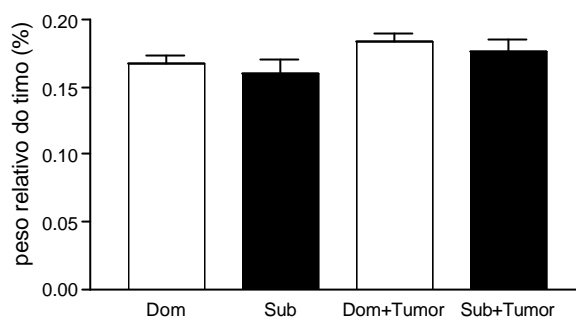


Figura 20- Peso relativo do timo de animais dominantes e submissos com e sem tumor experimental B16F10, vivendo em uma hierarquia social estável. Os dados são apresentados como média \pm DP. ANOVA seguida de Bonferroni

A figura 21 mostra o dado referente ao número de células presentes no timo. A análise dos resultados mostra que não houve diferença estatística entre o número de células presentes nos timos dos animais ($p=0,15$). Entretanto, vale dizer que embora esta diferença não seja estatisticamente diferente, os animais dominantes apresentam uma média de número de células maior do que aquelas observadas nos animais submissos, tanto na situação basal fisiológica, como depois do estímulo imunológico com o tumor experimental.

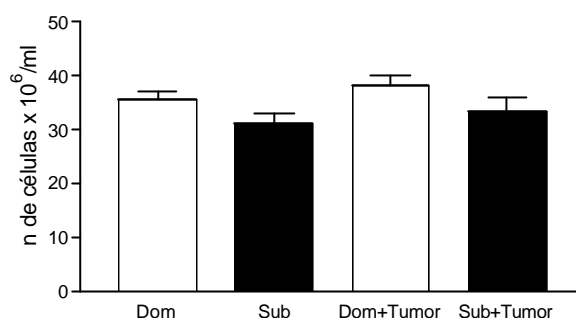


Figura 21 – Número de células no timo de animais dominantes e submissos com e sem tumor experimental B16F10, vivendo em uma hierarquia social estável. Os dados são apresentados como média \pm DP. ANOVA

5.6 EXPERIMENTO 6: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE O PERCENTUAL DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS

Neste experimento, 8 camundongos dominantes e 8 submissos vivendo em uma relação social estável e camundongos mantidos em grupos de 5 animais por caixa (total de 10 animais) foram avaliados quanto ao percentual de células sangüíneas. A figura 22 mostra que não houve diferença entre os grupos quanto ao percentual de linfócitos ($p=0,84$), de neutrófilos ($p=0,89$) e também de monócitos ($p=0,61$) presentes no sangue destes animais.

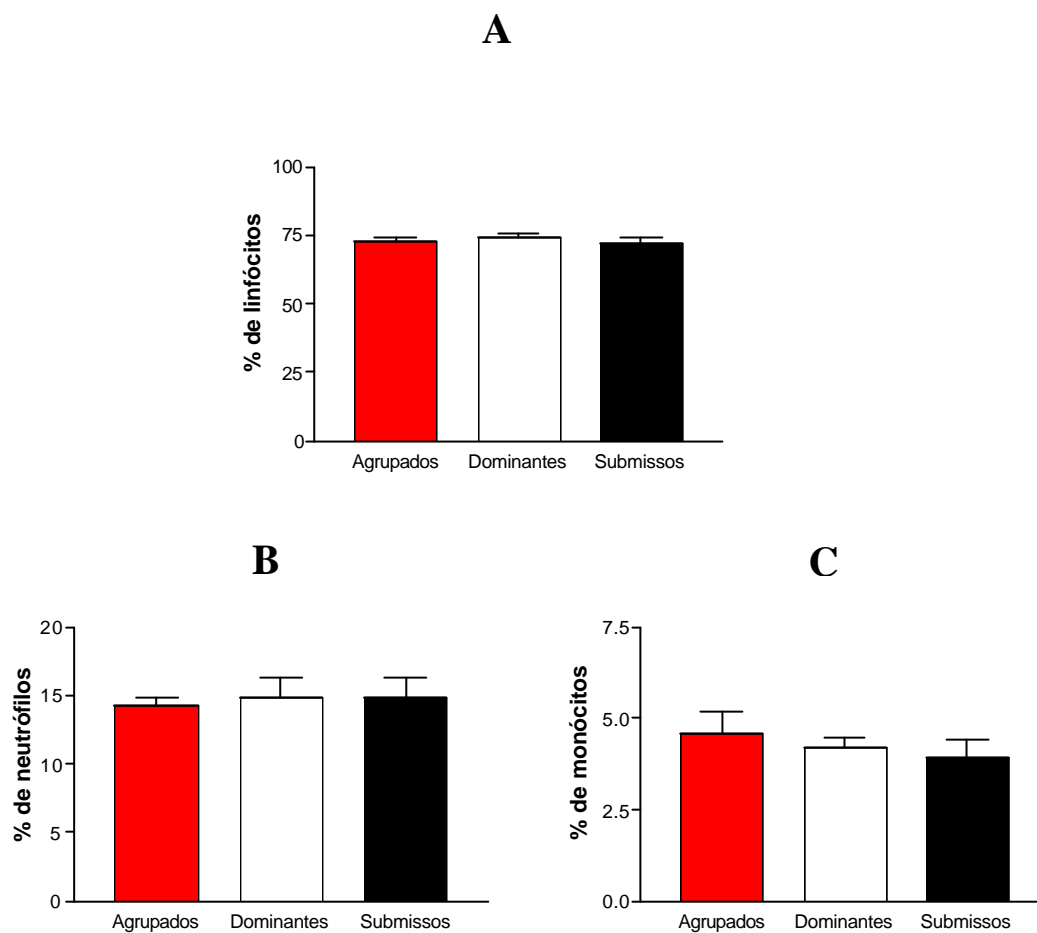


Figura 22 – Percentual de linfócitos (A), neutrófilos (B) e monócitos (C) presentes no sangue de camundongos dominantes e submissos vivendo em uma hierarquia social estável e de animais vivendo em grupos de 5 animais por caixa. Os dados são apresentados como média \pm DP. ANOVA

Embora os animais não tenham demonstrado diferença significativa no valor percentual de linfócitos presentes no sangue, a marcação destas amostras, com anticorpo específico para células NK, mostrou a existência de uma diferença bastante significativa no percentual destas células entre os animais dominantes e submissos em relação aos mantidos em grupos ($p < 0,01$). A figura 23 ilustra este resultado.

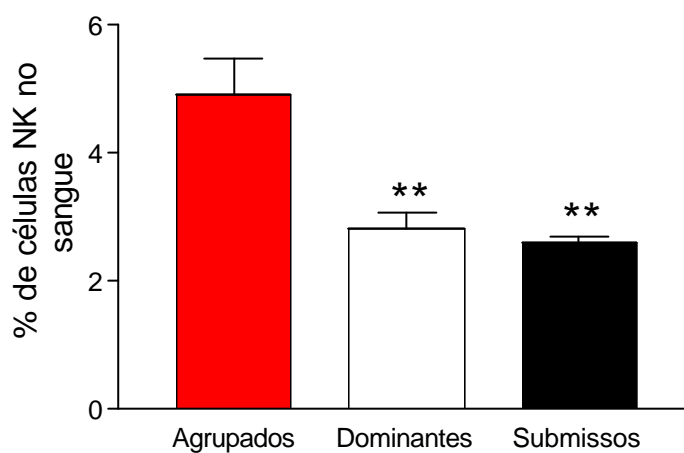


Figura 23 – Percentual de células NK presentes no sangue de camundongos dominantes e submissos vivendo em uma hierarquia social estável e de camundongos vivendo em grupos de 4 animais por caixa. Os dados são apresentados como média \pm DP. ** $p < 0,01$ em relação aos agrupados. ANOVA seguida do teste de Bonferroni

5.7 EXPERIMENTO 7: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS TCD4⁺ E TCD8⁺ NO BAÇO E TIMO

Neste experimento, um grupo de animais dominantes e outro de submissos receberam a inoculação de células tumorais B16F10 pela veia da cauda, enquanto outros grupos receberam pela mesma via a inoculação de PBS estéril. Foi avaliado o percentual de células T CD4⁺ e T CD8⁺ presentes no baço e timo de animais que viviam em uma relação social estável conforme descrito no item 4.8.3.2.

Como pode ser visto na figura 24, não houve diferença quanto ao percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no baço dos animais dominantes e submissos injetados com PBS e também nos animais dominantes e submissos inoculados com o tumor ($p=0,78$). Além disso, o tumor experimental, por si, não foi capaz de provocar mudanças na proporção destas células no baço.

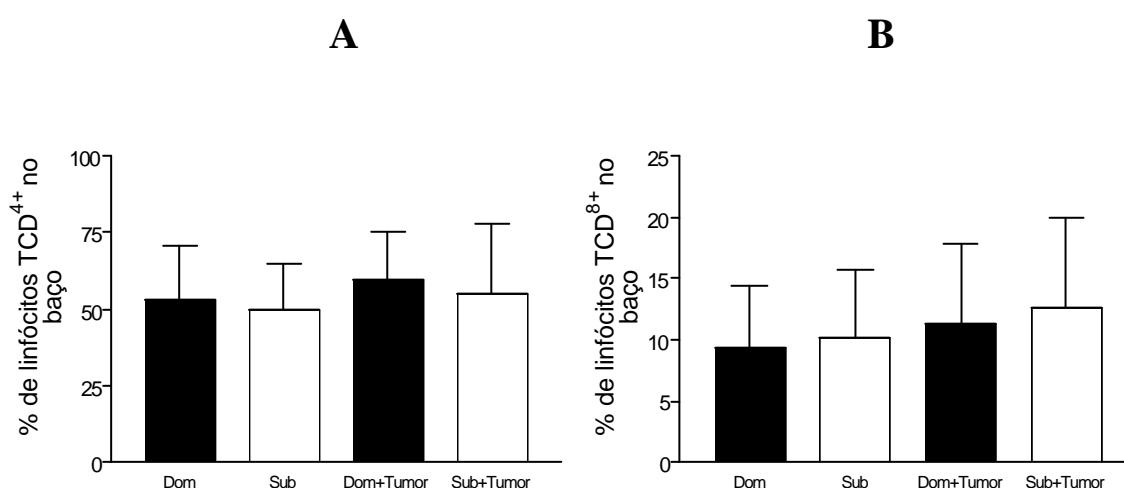


Figura 24 - Percentual de células TCD4⁺ (A) e TCD8⁺ (B) presentes no baço de camundongos dominantes e submissos vivendo em uma hierarquia social estável, inoculados ou não com o tumor experimental B16F10. Os dados são apresentados como média \pm DP. ANOVA

Quanto da análise das populações deste mesmo subtipo de linfócitos no timo, encontrou-se uma resposta diferente daquela vista no baço. Observou-se uma diferença significativa no percentual de células $TCD8^+$ nos animais submissos inoculados com o tumor em relação aos outros grupos experimentais estudados ($p < 0,05$) como pode ser visto na figura 25 (C). Entretanto não se observou diferença no percentual de células T $CD4^+$ e $TCD4^+TCD8^+$ no timo entre os diferentes grupos estudados (A,B).

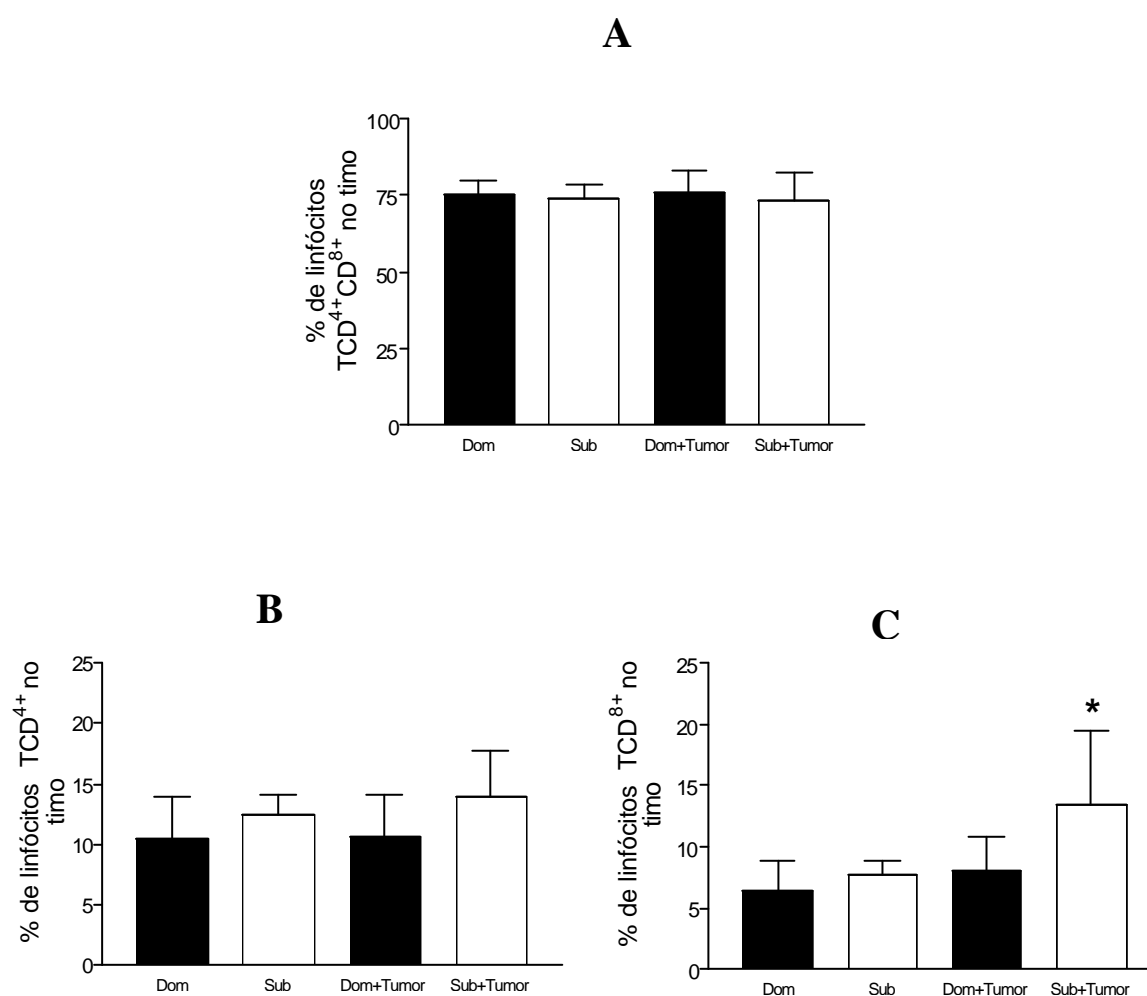


Figura 25 - Percentual de células duplo positivo $TCD4^+TCD8^+$ (A), $TCD4^+$ (B) e $TCD8^+$ (C) presentes no timo de camundongos dominantes e submissos vivendo em uma hierarquia social estável, inoculados ou não com o tumor experimental B16F10. Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p < 0,05$ em relação aos animais dominantes, submissos e dominantes inoculados com tumor. ANOVA seguida do teste de Bonferroni

5.8 EXPERIMENTO 8: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS SANGÜÍNEOS

Neste experimento, 8 camundongos dominantes e 8 submissos vivendo em uma relação social estável e camundongos mantidos em grupos de 5 animais por caixa (total de 10 animais) foram avaliados quanto a atividade de neutrófilos e monócitos sangüíneos, conforme descrito no item 4.8.1.

A tabela 7 mostra os dados obtidos quanto da avaliação do *burst* oxidativo em animais dominantes e submissos vivendo em uma hierarquia social estável. Observou-se uma diminuição significativa no *burst* oxidativo basal de neutrófilos e monócitos sangüíneos de animais submissos ($p < 0,05$) em relação àqueles observados em animais dominantes. Entretanto, não houve diferença quanto ao *burst* oxidativo destas células induzido pelas bactérias *S. aureus* ou *E. coli*, bem como na fagocitose e na intensidade de fagocitose realizada por estas células.

Tabela 7. *Burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos e monócitos provenientes do sangue de camundongos dominantes e submissos

	Neutrófilos		Monócitos	
	Dominantes	Submissos	Dominantes	Submissos
Burst basal	141.0 ± 36.0	109.0 ± 23.0*	74.4 ± 19.8	57.1 ± 7.6*
Burst induzido pela <i>S. aureus</i>	163.0 ± 52.0	165.4 ± 56.6	96.0 ± 20.0	95.8 ± 19.0
(%) Fagocitose da <i>S. aureus</i>	97.0 ± 2.0	94.0 ± 12.0	70.0 ± 28.1	71.9 ± 15.8
(%) Fagocitose da <i>E. coli</i>	92.9 ± 2.8	89.2 ± 5.7	69.8 ± 11.4	70.0 ± 10.2
Intensidade de fagocitose <i>S. aureus</i>	116.0 ± 56.0	126.0 ± 62.1	10.9 ± 2.1	12.4 ± 6.1
Intensidade de fagocitose <i>E. coli</i>	123.0 ± 57	143.4 ± 47.8	12.8 ± 2.1	12.2 ± 2.0

Os dados são apresentados como média ± DP. * $p < 0,05$ em relação aos camundongos dominantes (teste “t” de Student)

5.9 EXPERIMENTO 9: EFEITOS DE UMA RELAÇÃO SOCIAL ESTÁVEL SOBRE A ATIVIDADE DE CÉLULAS NK DE ANIMAIS DOMINANTES E SUBMISSOS

Neste experimento, 8 camundongos dominantes e 8 submissos vivendo em uma relação social estável e camundongos mantidos em grupos de 5 animais por caixa (total de 10 animais) foram avaliados quanto a atividade de células NK, conforme descrito no item 4.8.2.

A figura 26 mostra os resultados relativos à atividade de células NK contra as células tumorais B16F10 em animais dominantes e submissos. Pode-se observar que os animais submissos apresentam menor atividade de células NK presentes tanto no sangue como no baço ($p < 0,05$) do que aquelas apresentadas por animais dominantes.

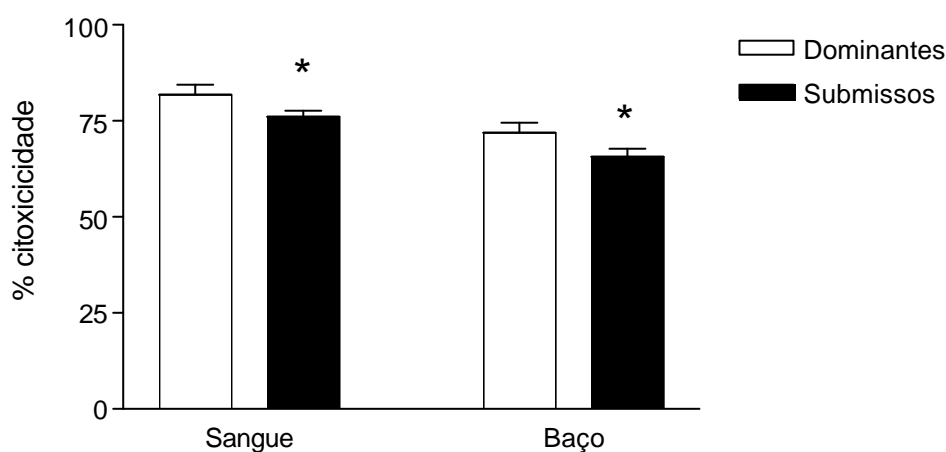


Figura 26 – Atividade de células NK contra as células B16F10 avaliada *in vitro*, em camundongos dominantes e submissos. Os dados representam a média e o DP de células retiradas do baço e do sangue. * $p < 0,05$ em comparação com os animais dominantes (teste “t” de Student)

6 DISCUSSÃO

Os presentes resultados demonstram a presença de diferenças comportamentais, bioquímicas e imunes entre duplas de animais dominantes e submissos mantidos em uma hierarquia social estável e também entre estes animais e outros mantidos em grupos de cinco, onde as relações sociais não foram determinadas. Especificamente, observamos nos animais submissos em relação aos dominantes: 1) diminuição no tempo gasto na exploração da zona central do campo aberto; 2) diminuição no número de entradas nos braços abertos e diminuição no tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado; 3) aumento no tempo gasto na exploração dos braços fechados do labirinto em cruz elevado; 4) diminuição no número de entradas e no tempo gasto na exploração do terço final dos braços fechados do labirinto em cruz elevado; 5) aumento na taxa de renovação de dopamina no hipotálamo e diminuição da taxa de renovação desse neurotransmissor no corpo estriado; 6) maior número de metástases pulmonares induzidas pelo melanoma murino experimental B16F10; 7) aumento do percentual de células T CD8⁺ no timo após 14 dias de inoculação melanoma; 8) diminuição no *burst* oxidativo basal de neutrófilos e monócitos sanguíneos, mas não naquele induzido por bactérias; 9) menor atividade de células NK presentes no baço e no sangue. Em relação aos animais mantidos em número de cinco, os animais submissos apresentaram: um menor percentual de células NK no sangue. Já os animais dominantes, apresentaram em relação aos animais mantidos em grupos: 1) aumento da taxa de renovação de noradrenalina no hipotálamo; 2) aumento na taxa de renovação de dopamina no corpo estriado e 3) menor percentual de células NK no sangue. O *status* social, no entanto, não provocou diferenças: 1) nos níveis absolutos de dopamina, noradrenalina e serotonina; 2) nos metabólitos de serotonina; 3) nos níveis séricos basais de corticosterona; 4) no peso e número

de células do baço e timo; 5) no percentual de células T CD4⁺ e CD8⁺ no baço e 6) no percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos sanguíneos. Analisemos estes resultados à luz dos conhecimentos de neuroimunomodulação.

Quando camundongos são introduzidos na arena do campo aberto, eles são inclinados a explorar principalmente a zona periférica do equipamento, isto é, eles apresentam um comportamento chamado de tigmotaxia positiva (SIMON et al., 1994). Fármacos estressores ou ansiogênicos aumentam o tempo gasto pelos roedores na exploração desta área do campo aberto, ao mesmo tempo em que diminuem a permanência dos mesmos na zona central do aparelho (KELLEY, 1993). Por outro lado, a ocorrência de um aumento no número de entradas ou no tempo gasto pelos camundongos na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado são bem aceitos como indicativos de diminuição dos níveis de ansiedade ou estresse nestes animais (FILE, 1984,1991). Assim, uma redução na locomoção total e/ou no percentual de tempo gasto pelos camundongos na exploração da zona central do campo aberto e na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado podem ser tomados como bons indicadores de níveis de estresse ou ansiedade (FILE, 1984). No contexto desta discussão, inferem-se níveis de ansiedade nos animais a partir da resposta a uma situação em que o comportamento dos mesmos é influenciado por duas forças motivacionais opostas - uma curiosidade natural para explorar uma área nova versus uma aversão a áreas abertas (PELLOW, 1985). O presente estudo mostrou uma diminuição significativa no percentual de tempo gasto pelos camundongos submissos na zona central do campo aberto, em relação aos animais dominantes. Além disso, os camundongos submissos apresentaram menores índices de atividade dentro dos braços abertos do labirinto em cruz elevado e também um aumento no percentual de tempo gasto por eles na exploração dos braços fechados do equipamento, em relação aos dominantes. Mais que isto, uma avaliação setorizada do labirinto em cruz devado mostrou que os camundongos submissos apresentaram uma menor exploração do terço final

dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, a região mais ansiogênica do equipamento. Assim, parece razoável sugerir que os resultados obtidos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado neste experimento, indicam a existência de maiores níveis de ansiedade ou de estresse nos camundongos submissos em relação aos camundongos dominantes.

Um resultado interessante obtido em nosso experimento relativo à análise da atividade exploratória no campo aberto, é aquele que mostra que os animais dominantes e submissos, embora não apresentando diferenças significantes na distância total movida durante dez minutos de observação no campo aberto, apresentaram diferenças no modo como exploraram o aparelho. Assim, nossos dados mostram que os camundongos dominantes percorreram uma distância média no campo aberto maior do que aquela relativa aos submissos nos dois primeiros minutos do teste; este fato sugere que os dominantes apresentam uma exploração mais rápida e superficial do aparelho, enquanto que os submissos o exploraram de forma mais cautelosa no início do teste. Entretanto, a partir do quarto minuto e até o oitavo, os camundongos submissos mudaram seu padrão de comportamento passando a explorar mais o ambiente.

Animais que apresentam uma exploração rápida e superficial podem levar vantagens em áreas onde exista farta disponibilidade de comida ou onde a distribuição da mesma é estável. Isto porque, estes animais buscam pela comida de modo rotineiro, concentrando seus esforços em itens comuns e conhecidos (MARCHETTI; DRENT, 2000). Por outro lado, quando a comida se torna escassa, os animais submissos, que apresentam uma exploração mais cautelosa, levam vantagem porque gastam mais tempo explorando o ambiente de forma minuciosa. Isto foi demonstrado em experimentos com aves, onde observou-se que animais menos agressivos apresentavam um padrão de exploração do ambiente mais demorado, expandindo seus recursos alimentares, enquanto que animais mais agressivos - que faziam uma exploração rápida - alimentavam-se preferencialmente em tigelas que eram

disponibilizadas com comida (VERBEEK et al., 1994, 1999). Foi verificado que os animais menos agressivos prestavam mais atenção às mudanças ocorridas no seu ambiente e, provavelmente, adquiriam informações mais detalhadas sobre ele (VERBEEK et al., 1999). Pela exploração minuciosa, eles aprendiam não apenas onde poderiam encontrar água, comida e abrigo, mas também seus oponentes conspecíficos e seus predadores. Por outro lado, os animais mais agressivos, em situações de escassez de alimento, tiravam proveito da situação observando os animais menos agressivos; copiando seu comportamento, ou até mesmo roubando sua comida (VERBEEK et al., 1999). Estas estratégias, que foram verificadas em outras espécies animais como ratos (KOOLHAAS et al., 1999), suínos (HESSING et al., 1994) e até mesmo humanos (FRIEDMAN; ROSENMAN, 1974), mostram que animais dominantes e submissos apresentam diferentes estratégias para se adaptar às mudanças impostas pelo meio em que se encontram. Neste sentido, nossos dados observados em animais dominantes e submissos em uma condição laboratorial, corroboram com aqueles relatados para animais selvagens, uma vez que mostram diferenças no estado emocional e na forma como estes animais exploram um novo ambiente.

Alterações nos níveis e/ou no *turnover* de neurotransmissores no SNC poderiam justificar os presentes achados comportamentais.

Neste sentido, investigamos os níveis de noradrenalina, dopamina e serotonina (e de seus principais metabólitos) em duas estruturas cerebrais de interesse: o hipotálamo e o corpo estriado. Sabe-se que o corpo estriado é uma estrutura anatômica de fácil identificação cirúrgica em roedores, rica em neurônios dopaminérgicos, mas que também possui níveis consideráveis de noradrenalina e serotonina (UNGERSTEDT, 1971). Já o hipotálamo é uma estrutura rica em noradrenalina, fundamental nas relações motivacionais além de estar ligada ao controle da liberação de hormônios como por exemplo, dos glicocorticóides (MCCANN et al., 2000). Assim verificou-se um significativo aumento na taxa de renovação da

noradrenalina hipotalâmica dos animais dominantes em relação aos agrupados e uma tendência ($p < 0,01$) de aumento desta renovação em relação àquela medida nos animais submissos. Este fato demonstra uma atividade noradrenérgica aumentada nesta região o que pode indicar uma maior ativação simpática. De fato, as raízes anatômicas do SNA simpático encontram-se no núcleo paraventricular do hipotálamo (MCCANN et al., 2000).

O aumento da atividade noradrenérgica central foi associado a dados comportamentais que refletem um aumento de atividade locomotora (COSTA; FRUSSA-FILHO; FELICIO, 2001). Além disso, demonstrou-se que o aumento da atividade do *locus coeruleus* por meio de estimulação elétrica desencadeava um comportamento de medo e ansiedade em macacos (REDMOND; HUANG, 1976). Sabe-se, neste sentido, que situações indutoras de estresse ativam sistemas noradrenérgicos centrais e produzem aumento no *turnover* de noradrenalina no SNC medido por meio da análise dos níveis deste neurotransmissor e de seu principal metabólito o MHPG (CHARNEY et al., 1985). Em particular, áreas da região límbica como o hipotálamo, a amígdala e o hipocampo apresentam aumentos rápidos e de significativa magnitude no *turnover* de noradrenalina em resposta a estressores (IIMORI et al., 1982). Neste sentido, foi observado que animais de laboratório submetidos a um estímulo estressor crônico apresentaram aumento da atividade de células do *locus coeruleus* (PAVCOVICH et al., 1990) e que este aumento estava relacionado a existência de uma maior atividade locomotora em animais de laboratório (LE MOAL, 1991). Entretanto, nossos dados mostram que embora os animais dominantes tenham apresentado aumento da atividade noradrenérgica, este aumento não refletiu uma maior atividade geral avaliada tanto no campo aberto como no labirinto em cruz elevado. Não podem, pois, serem tomadas como índices indicativos de ansiedade ou medo. Mais que isso, os dados comportamentais deste trabalho sugerem a ocorrência de maiores níveis de ansiedade justamente nos animais submissos, que não apresentaram aumento de atividade noradrenérgica. Assim, quer nos parecer que esta

tendência de aumento na atividade noradrenérgica encontrado nos animais dominantes em relação aos submissos, esteja ligada mais a mudanças no padrão de exploração dos aparelhos que à ansiedade propriamente dita.

Outro resultado neuroquímico intrigante encontrado em nossos experimentos mostra que dominantes e submissos diferem entre si quanto aos conteúdos estriatais de dopamina e de seus metabólitos. Assim, enquanto dominantes apresentam um *turnover* de dopamina estriatal aumentado os submissos apresentam modificação em sentido inverso. Destaque-se que ambos os grupos (dominantes e submissos) apresentaram resultados diferentes daqueles de animais mantidos agrupados em número de 5 pelo mesmo período de tempo que apresentaram valores intermediários do *turnover* de dopamina em relação valores de dominantes e submissos. A importância das vias dopaminérgicas nigro-estriatais no controle da movimentação é de há muito tempo conhecida (MASON, 1984). Resultados obtidos em nossos laboratórios (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1980; SANDOVAL; PALERMO-NETO, 1995) já demonstravam o papel fundamental deste sistema de neurotransmissão sobre a atividade geral e o comportamento exploratório de roedores colocados na arena de campo aberto. De forma geral, um aumento dos níveis de dopamina estriatal tanto em condições fisiológicas como após diferentes abordagens farmacológicas (uso de agonistas dopaminérgicos) correlacionam-se positivamente com um aumento de atividade geral no campo aberto e até mesmo com um comportamento conhecido como estereotipado, ou seja, repetitivo e sem finalidade aparente. (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1983; FRUSSA-FILHO; PALERMO-NETO, 1990). O inverso disso, ou seja, o bloqueio de vias dopaminérgicas estriatais com o uso de bloqueadores específicos como os neurolépticos promovem diminuição da atividade motora dos roedores (BERDARDI et al., 1981; FRUSSA-FILHO; PALERMO-NETO, 1990). Estudos etológicos, demonstraram que animais dominantes apresentaram um comportamento exploratório e uma atividade geral, qualificada

como inespecífica e até certo ponto ritualizada. Assim, talvez seja possível sugerir, que este padrão comportamental possa ser comparado aos achados neurofarmacológicos de nosso grupo de pesquisa, encontrados, por exemplo, quando do uso de agonistas dopaminérgicos como a apomorfina. Estes padrões comportamentais, podem ser reproduzidos em roedores de laboratório, com o uso de baixas doses de apomorfina, sendo denominados de exploração estereotipada (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1983). Já, os animais submissos de diferentes espécies, apresentam comportamento exploratório mais detalhado, pormenorizado e atento. Esta perspectiva é mais compatível com um quadro de diminuição da atividade dopaminérgica nigro-estriatal com redução da atividade motora e aumento da atenção dirigida tanto para auto limpeza como para pequenas alterações ambientais (LE MOAL, 1991). Assim sendo, uma possível conseqüência do aumento da taxa de renovação de dopamina estriatal nos animais dominantes, seria justamente aquele de promover o comportamento “padrão” típico destes animais dominantes, qual seja, uma atividade motora em geral maior porém mais superficial e quase estereotipada, inclusive com manifestação de comportamento agressivo por defesa de território. Já para os submissos, o *turnover* diminuído de dopamina estriatal seria compatível com uma atividade motora menor, porém mais atenta e específica (LE MOAL, 1991).

Não foram encontradas diferenças significantes nos níveis de serotonina e de seus metabólitos tanto no hipotálamo como no corpo estriado. Entretanto, o sistema serotoninérgico parece estar envolvido com comportamento de agressão. Estudos feitos em humanos sugerem uma correlação negativa entre os níveis de serotonina no líquido cefaloraquidiano com comportamentos de agressividade como por exemplo impulso homicida e agressão maternal (LINNOILA et al., 1983). Porém, as alterações nos níveis de serotonina descritas nestes trabalhos foram observadas em situações patológicas, e que portanto diferem da nossa análise. Além disso, para correlacionarmos dados de agressividade com níveis de

serotonina em nosso trabalho, a melhor região para realizar a dosagem deste neurotransmissor seria o córtex pré frontal (JACOBS; AZMITIA, 1992).

De alguma forma, estes resultados neuroquímicos evidenciam que as relações de dominância e submissão são capazes de ativar sistemas de neurotransmissão específicos em estruturas cerebrais específicas. Tal fato mostra de forma preliminar, porém consistente, uma estratégia neurocomportamental organizada, compatível com o exercício de diferentes papéis sociais e que se expressam em comportamentos distintos de dominância ou de submissão. Assim, poderíamos dizer, ou pelo menos especular, que animais com comportamentos tão distintos e com mudanças neuroquímicas específicas teriam substratos neurocomportamentais diferentes o suficiente para oferecer respostas distintas aos mesmos estímulos ambientais. De fato, trabalhos encontrados na literatura evidenciam que dominantes e submissos respondem de forma diferenciada a estímulos ambientais comuns (KORTE et al., 2005).

Em muitos casos as relações de dominância e submissão podem ser compreendidas como situações estressantes tanto para os animais dominantes como para os animais submissos. Este fato encontra respaldo e apoio experimental em situações em que o exercício agudo desta relação expõe as duas categorias de animais (dominantes e submissos) a situações típicas de estresse (HALLER; KIEM; MAKARA, 1996; STEFANSKI; ENGLER, 1998a). Neste contexto, observou-se que tanto animais dominantes como submissos, de diferentes espécies, apresentaram aumentos significantes nos níveis plasmáticos de corticosterona (BARTOLOMUCCI, 2001; KOOLHASS et al., 1999). Por outro lado, observou-se que camundongos e ratos dominantes selvagens, mantidos em cativeiro, apresentaram níveis basais de glicocorticóides menores quando comparados com os submissos da mesma colônia (BRONSON; ELEFThERIOU, 1964; LOUCH; HIGGINBOTHAM, 1967). Finalmente, uma relação inversa ocorreu em primatas da espécie *Saimiri sciureus* também mantidos em cativeiro (MANOGUE, 1975). Depreende-se pois, que a literatura relacionada à análise das

correlações entre corticosterona e *status* social (dominantes e submissos) é contraditória. Possivelmente, diferenças temporais e de intensidade nas relações hierárquicas ou na forma como foram analisadas respondam pelas contradições observadas.

Neste contexto, um outro estudo mostrou ausência de diferença nos níveis plasmáticos basais de corticosterona em animais dominantes e submissos, porém relataram ser os níveis basais de ACTH dos animais dominantes maiores que aqueles observados em animais submissos, sugerindo este estudo que o córtex da adrenal destes animais seria menos sensível aos estímulos do ACTH em relação àquele dos animais submissos (VEENEMA et al., 2003). Assim, quer nos parecer que, dependendo da espécie e do tempo de interação existente entre dominantes e submissos, os padrões de liberação de glicocorticóides possam se modificar, levando os animais a perfis hormonais basais e respostas fisiológicas distintas segundo sua hierarquia, quando estes animais são expostos a novos desafios.

Nossos resultados mostraram ausência de diferenças estatísticas entre os níveis plasmáticos de corticosterona de animais dominantes e submissos mantidos em uma relação de hierarquia social estável. Além dos fatos relatados acima, uma possível explicação para este achado, seria o re-estabelecimento da homeostasia nos animais dominantes e submissos após a geração da estabilidade social entre eles, fato este que seria uma consequência do longo período de convivência. Nesta condição, os animais não apresentariam mais respostas fisiológicas indicativas de estresse apesar de continuarem apresentando padrões comportamentais característicos de animais dominantes e submissos. Quer nos parecer, assim, que a situação de estabilidade social criada pela longa convivência não seria mais interpretada pelo dominante ou pelo submisso como uma situação estressante. É importante ressaltar, neste sentido, que os animais, dominantes e submissos do presente trabalho não apresentaram níveis de corticosterona sérica diferentes daqueles medidos em animais que estavam agrupados (5 animais por caixa) pelo mesmo período de tempo. Este fato vai de encontro à afirmativa de

que a estabilização temporal da relação social em camundongos transforma as relações de dominância e submissão em um estímulo não estressante (VEKOVISHCHEVA et al., 2000). Saliente-se ainda, que a reatividade do eixo HPA pode ter permanecido diferente entre eles, conforme sugerido por Veenema et al. (2003). Em outras palavras, é possível que estes animais possam responder de forma diferenciada frente a um novo estímulo estressor.

Diante desta nova situação, onde animais dominantes e submissos apresentam diferenças comportamentais e neuroquímicas, porém sem alterações nos níveis basais de corticosterona, como seria a resposta dos mesmos a um mesmo estímulo imunológico?

Cohn (2003) mostrou em seu trabalho de mestrado, realizado em nossos laboratórios, que animais dominantes e submissos apresentavam comportamentos distintos frente à administração de uma mesma dose de LPS. Segundo o autor, quando os animais submissos recebiam LPS, eles apresentaram parâmetros de comportamento doentio com menor intensidade do que aqueles registrados nos animais dominantes que receberam a mesma dose do LPS. Esta diferença na resposta comportamental de animais dominantes e submissos frente ao mesmo estímulo imunológico, o LPS, mostra que as relações sociais ou a posição do animal nas relações de dominância e submissão são capazes de produzir respostas imunes também distintas. Tal fato pode ser melhor compreendido se lembramos que as alterações comportamentais decorrentes da administração intraperitoneal de LPS dependem da ativação de células imunes, em especial de macrófagos e monócitos, e da produção de interleucinas, em especial a IL-1, IL-6 e TNF- α , que são capazes de induzir tanto alterações neurais específicas como o comportamento doentio (DANTZER, 2001).

Em nosso trabalho optamos por desafiar os animais dominantes e submissos mantidos em uma relação social estável, com o melanoma murino experimental B16F10. O melanoma murino experimental B16F10 tem sido muito utilizado como desafio neoplásico em camundongos visando diferentes abordagens experimentais e até mesmo terapêuticas

(MARX, 2003). Em nosso trabalho, analisamos a capacidade metastática do tumor sobre o tecido pulmonar de animais dominantes e submissos. A partir desta análise, inferiu-se sobre a capacidade do sistema imune dos animais em reagir à células tumorais, evitando sua implantação e a formação de metástases pulmonares. Nossos resultados mostraram um aumento significativo do número de nódulos pulmonares em animais submissos quando comparado com aquele medido nos dominantes. Este resultado evidenciou uma resistência maior dos animais dominantes em relação às células tumorais, evitando assim, a formação de nódulos pulmonares. Já os animais submissos, apresentaram cerca de 50% a mais de nódulos tumorais em relação aos dominantes. Este incremento de nódulos pode ser compreendido como um decréscimo na resistência destes animais à invasão do tumor. A este respeito, já foi demonstrado que o controle do número de células tumorais e de micrometastases na circulação está sujeita a influência direta de diferentes aspectos da imunidade celular, como a atividade citotóxica de linfócitos T, da atividade das células NK, das células dendríticas e, também, da atividade de macrófagos estimulados (SMYTH; GODFREY; TRAPANI, 2001).

Particularmente neste trabalho, o número e a atividade das células NK parecem ser itens importantes para a compreensão do fenômeno observado, como veremos mais à frente. Uma vez que a relação social era estável e não encontramos diferenças nos níveis de corticosterona entre os animais, um novo mecanismo deve emergir para explicar estas diferenças, ou pelo menos para ajudar a entender as diferentes respostas agora descritas nestes animais. É de se esperar, neste sentido, que os fenômenos neurais e os imunes sejam interdependentes ou pelo menos acoplados para adequar as respostas orgânicas aos diferentes desafios (ADER; COHEN, 1991).

Explorando um pouco mais os resultados de sensibilidade e resistência ao melanoma B16F10 apresentado pelos animais dominantes e submissos mantidos em uma relação social estável, verificamos que 61,5% dos submissos tiveram maior número de nódulos pulmonares

quando comparados com seus companheiros de gaiola, ou seja, dominantes. Por outro lado, apenas 23% dos animais dominantes tiveram mais nódulos pulmonares que seus companheiros de caixa submissos. Em 15,5% das caixas não houve diferença significativa entre o número de nódulos nestes animais. Neste sentido, um trabalho em ratos utilizando o modelo intruso-residente, mostrou que animais submissos foram mais susceptíveis à implantação de células tumorais MADB106 nos pulmões, em relação aos animais dominantes (BEN-ELIYAHU, 1991).

Dados observados neste trabalho e relativos ao peso e à celularidade esplênica dos animais mantidos em relações sociais estáveis trazem informações adicionais. Observamos a ocorrência de um maior peso relativo do baço em animais dominantes e submissos que receberam o tumor. Já a celularidade, foi maior apenas nos animais dominantes que receberam o tumor em relação ao seu controle (dominantes que não receberam tumor). Estes dados, apesar de metodologicamente simples, sugerem a existência de uma resposta imune esplênica maior nos animais dominantes frente ao desafio com o tumor B16F10, fato este não observado no timo.

Sabe-se que o baço e o timo apresentam inervação direta do SNS, e que este libera em suas eferências a noradrenalina (MADDEN et al., 1997). Inúmeros trabalhos científicos têm registrado a presença de receptores noradrenérgicos em linfócitos e ou em outras células imunes coletadas dentro do ambiente esplênico (CUNNICK et al., 1990; ELENKOV et al., 1995). Além disso, está razoavelmente bem demonstrado que o LPS, enquanto um estímulo imune, é capaz de modular respostas celulares específicas via ativação do SNS liberando noradrenalina em ambientes específicos como o baço e o timo (ELENKOV et al., 1995; SHERIDAN et al., 1998). Outros estudos demonstram que o SNS é capaz de regular vários aspectos da função imune como o aumento do número de leucócitos na circulação, especialmente os granulócitos e células NK, a diminuição na proliferação celular e também a

produção de citocinas, apresentando assim, um efeito dual nas células deste sistema (MADDEN, 2001). Como não mensuramos os níveis plasmáticos de noradrenalina circulante, podemos apenas especular que o pequeno aumento, porém consistente, de atividade noradrenérgica central observado nos camundongos dominantes poderia ter levado, ou ocorrido simultaneamente, a um aumento de ativação dos núcleos do SNS, gerando uma melhor resposta das células imunes específicas (como por exemplo das células NK). De fato, da mesma forma que um aumento de catecolaminas na circulação facilita a obtenção de energia necessária para o bom funcionamento de órgãos vitais poderia, também, preparar o sistema imune para possíveis desafios que lhe sejam impostos (MCEWEN, 1998). Outra hipótese explicativa, e que não exclui a anterior, seria uma reatividade diferencial do eixo HPA de dominantes e submissos após o desafio com as células tumorais, conforme comentado acima.

Neste sentido, avaliando a resposta esplênica e tímica frente ao melanoma B16F10, verificamos a presença de uma percentagem maior das células $CD8^+$ nos animais submissos que receberam este tumor quando comparados com seus respectivos controles. Não houve diferenças significantes, no entanto, quanto ao percentual das células $CD4^+$. De igual forma, não encontramos alterações significantes nas porcentagens de linfócitos, neutrófilos ou monócitos circulantes quando avaliamos os leucócitos destes animais. Estes fatos reforçam a tese de que os animais não estavam mais sob a influência de condições estressantes e parecem afastar um envolvimento do eixo HPA. Mostrou-se, neste sentido, que animais submissos submetidos a um estresse induzido por confronto social agudo apresentaram não apenas um aumento nos níveis de corticosterona, mas também de noradrenalina, juntamente com uma granulocitose, e diminuição de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ no sangue (STEFANSKI, 2000).

A atividade de neutrófilos e monócitos sanguíneos também foi quantificada neste trabalho. Após um estímulo biológico como, por exemplo a fagocitose de bactérias, estas

células produzem espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e o radical hidroxila, num processo intracelular rico em consumo de oxigênio e, por isso, conhecido como *burst* oxidativo (ELSBACH; WEISS, 1983). Estas substâncias apresentam papel importante na destruição e eliminação de patógenos por sua alta capacidade microbicida. Assim, a avaliação da sua produção é considerada um bom parâmetro para medir a atividade destas células (ELSBACH; WEISS, 1983). Em nosso trabalho, evidenciamos a presença de um menor *burst* oxidativo basal nos animais submissos tanto em neutrófilos como em monócitos. Este fato pode ser interpretado como decorrente de uma menor atividade basal destas células nos animais submissos, fato que pode ter repercutido em uma menor capacidade destas células em responder ao estímulo tumoral. Entretanto, como não foram encontradas diferenças no *burst* oxidativo induzido pelas bactérias, esta hipótese pode não ser verdadeira. Porém, vale lembrar que os mecanismos celulares desencadeados por bactérias e células tumorais no organismo não são os mesmos (MOSS; BLASER, 2005).

Quanto à porcentagem de células NK mostrou-se uma redução significativa da mesma nos animais dominantes e submissos quando comparados com os animais agrupados. Neste sentido, a atividade das células NK tem sido considerada como um dos principais mecanismos de defesa orgânica contra a invasão por células do tumor B16F10 (WU; PRUETT, 1999; WILTROUT et al., 1985). A depleção de células NK aumentou tanto o número de células tumorais, como de colônias do melanoma B16 em testes de metástases pulmonares induzidas experimentalmente (NIESWANDT et al., 1999). A depleção específica das células NK foi capaz de aumentar em 100 vezes a retenção pulmonar de células tumorais da linhagem MADB106 implantadas algumas semanas depois da depleção (BEN-ELIYAHU; PAGE, 1992; SHAKHAR; BEN-ELIYAHU, 1998). Conforme comentado acima, nossos resultados mostram que, os animais dominantes e submissos, apresentaram um número menor de células NK no sangue; porém, e de relevância, apenas os animais submissos apresentaram uma

redução da atividade das células NK o que poderia, de alguma forma justificar o maior crescimento tumoral observado nos mesmos.

Outros experimentos de nosso grupo (MORGULIS et al., 2004; PALERMO-NETO et al., 2003) e de outros grupos científicos também (VISINTAINER et al., 1982) mostraram decréscimos na resistência ao crescimento de um tumor em situações que envolviam níveis muito elevados de ansiedade e/ou estresse, fato que concorda com dados deste trabalho. De fato, na vigência de níveis elevados de glicocorticóides, explicam-se alterações na esfera imune pela diminuição na produção de citocinas como a IL-1, IL-5, IL-6, TNF entre outras (GUYRE et al., 1988), além de diminuição na migração e quimiotaxia de leucócitos (SUGIMOTO et al., 2003; VAN OVERVELD et al., 2003). Como os níveis de corticosterona não variaram entre os camundongos dominantes e submissos, ou se infere a existência de uma reatividade diferencial do eixo HPA a desafios, ou se pressupõe que outra explicação deve haver para justificar os achados imunes acima relatados e obtidos neste experimento. Pelo que já foi exposto, a segunda alternativa parece mais viável.

Neste contexto, a interpretação de nossos dados torna-se mais interessante se focarmos nossa atenção para uma abordagem evolutiva. Assim, quer nos parecer que as diferenças comportamentais e neuroquímicas observadas possam ser uma decorrência de diferentes estratégias utilizadas pelos animais dominantes e submissos destinadas à manutenção da sobrevivência e perpetuação da espécie. Estas estratégias por sua vez, partem do pressuposto de que quando de desafios imunológicos, os animais dominantes por se envolverem mais em lutas, seriam mais sujeitos a infecções decorrentes de feridas provocadas pelos combates, enquanto que os submissos, menos agressivos, seriam mais sujeitos a adquirir infestações por parasitas por terem, conforme já discutido, uma alimentação mais variada. Como consequência, o sistema imune destes animais poderia também ter sido direcionado à responder melhor aos estímulos mais comuns presentes na vida de cada indivíduo. Dentro

desta perspectiva, animais dominantes teriam evoluído para um perfil de resposta imune celular do tipo Th1 (respostas a infecções e tumores) enquanto submissos evoluíram para um perfil de resposta humoral do tipo Th2 (respostas à parasitas) (KORTE et al., 2005). De modo interessante, mostrou-se que a resposta humoral (do tipo Th2) é maior em animais submissos do que nos dominantes (BOLHUIS et al., 2003; HESSING et al., 1995), tendo-se especulado que os animais submissos, devido à sua maior capacidade de exploração em busca de novos recursos alimentares, poderiam estar mais sujeitos a infecções por parasitas presentes na comida. Assim, a maior resistência ao desenvolvimento do melanoma nos animais dominantes, encontrada neste trabalho, encontra apoio nesta teoria defendida por Korte e colaboradores (KORTE et al., 2005).

De igual forma, pode-se especular que a ocorrência do aumento agudo dos níveis de catecolaminas em animais agressivos tenha resultado em maior número de leucócitos na corrente sanguínea, uma vez que se sabe que as catecolaminas recrutam os leucócitos de órgãos onde estas células estão presentes, especialmente as células NK e os granulócitos (DHABHAR et al., 1995a). De fato, o aumento no tráfego destas células para regiões onde as mesmas são necessárias para proteger o indivíduo de infecções, pode ser uma resposta adaptativa importante para os animais dominantes, que conforme dito acima, parecem ter um perfil de resposta imune do tipo Th1 (KORTE et al., 2005).

Alternativamente, nossos dados também poderiam ser interpretados à luz da visão de estresse proposta por Dhabhar et al. (1997a,b). Segundo eles, uma resposta a um estímulo estressor qualquer, à qual o organismo não consegue se adaptar é considerada como um diestresse; o organismo teria portanto, ultrapassado a fase de resistência e entrado em uma fase em que apareceriam repercussões negativas. Já na fase adaptativa de eustresse, um animal da mesma espécie teria vantagens competitivas importantes para sua saúde e também para sua espécie no sentido de resistir mais e melhor a diferentes estímulos estressores.

Nossos experimentos apontam para uma resposta neuroimunológica diferenciada em animais da mesma espécie, que convivem em uma relação estável, mais que ocupam e mantêm hierarquias sociais diferentes. Assim, à luz desta nova teoria do estresse, o estímulo imunológico utilizado por nós, o melanoma murino B16F10, estaria atuando em animais da mesma espécie porém com perfis neuro- endócrino e imune diferentes. Poderíamos especular que os animais dominantes estariam, quem sabe, numa fase de eustresse e por isso, resistiriam melhor ao desafio neoplásico. Já os submissos, embora tenham apresentado o mesmo nível basal de corticosterona que os animais dominantes e os agrupados, apresentariam um eixo HPA mais responsivo ou um SNS mais ativado, e por isso mesmo seriam mais reativos aos estímulos imunes, o que os levaria a uma fase de diestresse, com conseqüente piora na resposta ao tumor.

A compreensão deste novo conceito, no entanto, necessita da elaboração de novos mecanismos fisiopatológicos que permitam explicar a existência de respostas orgânicas distintas frente ao mesmo estímulo estressor, seja ele ambiental ou imunológico, dentro de animais da mesma espécie. A situação experimental ora analisada é dinâmica e, portanto, não pode ser compreendida de uma maneira estática como indicado pela simples análise dos níveis séricos de corticosterona ou pela análise dos níveis hipotalâmicos de noradrenalina, uma vez que estas não seriam suficientes para explicar tantas opções de respostas. O nosso modelo experimental: o estabelecimento de uma relação social estável entre um camundongo dominante e um submisso, agrega valor a estes estudos e aponta para a possibilidade de investigar novos mecanismos envolvidos nas respostas imunes, independentes de variações plasmáticas de corticosterona. Por fim, o conceito de estresse não é mais o mesmo, evoluiu. Assim, novos experimentos deverão ser realizados para aprofundar a análise deste conceito na presente situação experimental e de todas as variantes que agregar.

7 CONCLUSÕES

Conclui-se a partir dos dados obtidos, que animais submissos mantidos em duplas em uma hierarquia social estável apresentam:

- Menor tempo de exploração na zona central do campo aberto e menor tempo de exploração e número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação aos animais dominantes.
- Níveis basais de corticosterona iguais aos dos animais dominantes e aos de animais mantidos agrupados.
- Aumento do *turnover* de dopamina no hipotálamo e diminuição do *turnover* de dopamina no corpo estriado. Tendência a um menor *turnover* de noradrenalina no hipotálamo e ausência de alterações nos níveis e no *turnover* de serotonina nestas estruturas cerebrais em relação aos animais dominantes.
- Maior número de nódulos tumorais induzidos pelo melanoma experimental B16F10 em relação aos animais dominantes.
- Ausência de alteração nos valores basais de leucócitos sangüíneos em relação aos animais dominantes e agrupados, porém menor número de células NK presentes no sangue em relação aos animais agrupados.
- Aumento no percentual de células T CD8⁺ no timo após 14 dias de inoculação do tumor em relação aos animais dominantes.
- Diminuição do *burst* oxidativo basal, mas não naquele induzido por bactérias, em neutrófilos e monócitos sangüíneos em relação aos animais dominantes.

- Menor atividade de células NK em relação aos animais dominantes.

Já os animais dominantes mantidos em uma hierarquia social estável apresentaram em relação àqueles que estavam agrupados:

- Menor percentual de células NK no sangue.
- Aumento no *turnover* de noradrenalina no hipotálamo e do *turnover* de dopamina no corpo estriado.

Tomados em seu conjunto, nossos dados confirmam a hipótese deste trabalho, ao mostrar que camundongos submissos mantidos em uma hierarquia social estável são diferentes dos dominantes quanto aos seus aspectos comportamentais, neuroquímicos e imunes. Além disso, mostram que os animais submissos são menos resistentes ao desenvolvimento de metástases pulmonares induzidas pelo melanoma experimental B16F10. Estes resultados sugerem que diferentes mecanismos, que não a ativação do eixo HPA, parecem estar envolvidos neste aumento de susceptibilidade ao desenvolvimento do tumor nos indivíduos submissos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, n. 6603, p. 787-93, 1996.

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression. **Psychosomatic Medicine**, v. 37, n. 4, p. 333-40, 1975.

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. **Science**, v. 215, n. 4539, p. 1534-6, 1982.

ADER, R.; COHEN, N. Conditioning of the immune response. **Netherland Journal of Medicine**, v. 39, n. 3-4, p. 263-73, 1991.

AL'ABADIE, M. S.; KENT, G. G.; GAWKRODGER, D. J. The relationship between stress and the onset and exacerbation of psoriasis and other skin conditions. **British Journal of Dermatol**, v. 130, n. 2, p. 199-203, 1994.

AMKRAUT, A. A.; SOLOMON, G. F.; KRAEMER, H. C. Stress, early experience and adjuvant-induced arthritis in the rat. **Psychosomatic Medicine**, v. 33, n. 3, p. 203-14, 1971.

BARNARD, C. J.; LUO, N. Acquisition of dominance status affects maze learning in mice. **Behavioural Processes**, v. 60, n. 1, p. 53-59, 2002.

BARTIK, M. M.; BROOKS, W. H.; ROSZMAN, T. L. Modulation of T cell proliferation by stimulation of the beta-adrenergic receptor: lack of correlation between inhibition of T cell proliferation and cAMP accumulation. **Cell Immunology**, v. 148, n. 2, p. 408-21, 1993.

BARTOLOMUCCI, A.; PALANZA, P.; GASPANI, L.; LIMIROLI, E.; PANERAI, A. E.; CERESINI, G.; POLI, M. D.; PARMIGIANI, S. Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependent. **Physiology and Behaviour**, v. 73, n. 3, p. 401-10, 2001.

BASSO, A. M.; DEPIANTE-DEPAOLI, M.; CANCELA, L.; MOLINA, V. Seven-day variable-stress regime alters cortical beta-adrenoceptor binding and immunologic responses: reversal by imipramine. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 45, n. 3, p. 665-72, 1993.

BASSO, A. S.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Immune-induced flavor aversion in mice: modification by neonatal capsaicin treatment. **Neuroimmunomodulation**, v. 9, n. 2, p. 88-94, 2001.

BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003.

BAYGUINOV, O.; HAGEN, B.; SANDERS, K. M. Muscarinic stimulation increases basal Ca(2+) and inhibits spontaneous Ca(2+) transients in murine colonic myocytes. **American Journal of Physiology and Cell Physiology**, v. 280, n. 3, p. C689-700, 2001.

BEN-ELIYAHU, S.; YIRMIYA, R.; LIEBESKIND, J. C.; TAYLOR, A. N.; GALE, R. P. Stress increases metastatic spread of a mammary tumor in rats: evidence for mediation by the immune system. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 5, n. 2, p. 193-205, 1991.

BEN-ELIYAHU, S. P., G. G. In vivo assessment of natural killer cell activity in rats. **Progress in Neuroendocrineimmunology**, v. 5, n., p. 199-214, 1992.

BENSCHOP, R. J.; NIEUWENHUIS, E. E.; TROMP, E. A.; GODAERT, G. L.; BALLIEUX, R. E.; VAN DOORNEN, L. J. Effects of beta-adrenergic blockade on immunologic and cardiovascular changes induced by mental stress. **Circulation**, v. 89, n. 2, p. 762-769, 1994.

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

BENSCHOP, R. J.; SCHEDLOWSKI, M.; WIENECKE, H.; JACOBS, R.; SCHMIDT, R. E. Adrenergic control of natural killer cell circulation and adhesion. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 11, n. 4, p. 321-332, 1997.

BENUS, R. F.; BOHUS, B.; KOOLHAAS, J. M.; VAN OORTMERSSEN, G. A. Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. **Experientia**, v. 47, n. 10, p. 1008-1019, 1991.

BENUS, R. F. D. D. S; KOOLHAAS, J. M. Routine formation and flexibility in social and non-social behaviour of aggressive and non-aggressive mice. **Behaviour**, v. 112, n., p. 176-193, 1990.

BERNARDI, M. M.; DE SOUZA, H.; PALERMO-NETO, J. Effects of single and long-term haloperidol administration on open-field behavior of rats. **Psychopharmacology**, v. 73, p. 171-175, 1981.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Dopamina e função motora. **Ciência e Cultura**, v. 32, p. 856-863, 1980.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effects of apomorphine administration on locomotor activity of control and experimental rats withdrawn from long-term haloperidol treatment. **Gen Pharmacology**, v. 14, p. 545-547, 1983.

BERKENBOSCH, F.; VAN OERS, J.; DEL REY, A.; TILDERS, F.; BESEDOVSKY, H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. **Science**, v. 238, n. 4826, p. 524-526, 1987.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C. A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, n. 4764, p. 652-654, 1986.

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

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response. **European Journal of Immunology**, v. 7, n. 5, p. 323-325, 1977b.

_____. Changes in blood hormone levels during the immune response. **Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine**, v.150, n.2, Nov, p.466-70. 1975.

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

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; KLUSMAN, I.; FURUKAWA, H.; MONGE ARDITI, G.; KABBIERSCH, A. Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 4-6, p. 613-618, 1991.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SORKIN, E. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. **Journal of Immunology**, v. 126, n. 1, p. 385-387, 1981.

BLALOCK, J. E. The immune system as a sensory organ. **Journal of Immunology**, v. 132, n. 3, p. 1067-1070, 1984.

BLANCHARD, D. C.; SPENCER, R. L.; WEISS, S. M.; BLANCHARD, R. J.; MCEWEN, B.; SAKAI, R. R. Visible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 2, p. 117-134, 1995.

BOLHUIS, J. E.; PARMENTIER, H. K.; SCHOUTEN, W. G.; SCHRAMA, J. W.; WIEGANT, V. M. Effects of housing and individual coping characteristics on immune responses of pigs. **Physiology & Behaviour**, v. 79, n. 2, p. 289-296, 2003.

BORGER, P.; HOEKSTRA, Y.; ESSELINK, M. T.; POSTMA, D. S.; ZAAGSMA, J.; VELLENGA, E.; KAUFFMAN, H. F. Beta-adrenoceptor-mediated inhibition of IFN-gamma, IL-3, and GM-CSF mRNA accumulation in activated human T lymphocytes is solely mediated by the beta2-adrenoceptor subtype. **American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology**, v. 19, n. 3, p. 400-407, 1998.

BORYSENKO, M.; BORYSENKO, J. Stress, behavior, and immunity: animal models and mediating mechanisms. **General Hospital Psychiatry**, v. 4, n. 1, p. 59-67, 1982.

BROWNL, L. M.; WELCH, D. R.; RANNELS, S. R. B16F10 melanoma cell colonization of mouse lung is enhanced by partial pneumonectomy. **Clinical Experimental Metastasis**, v. 19, p. 369-376, 2002.

BRONSON, F. H.; ELEFThERIOU, B. E. Chronic Physiological Effects of Fighting in Mice. **General Comparative Endocrinology**, v. 15, n., p. 9-14, 1964.

BROUG-HOLUB, E.; KRAAL, G. Dose- and time-dependent activation of rat alveolar macrophages by glucocorticoids. **Clinical Experimental Immunology**, v. 104, n. 2, p. 332-336, 1996.

CARA, D. C.; CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 6, p. 1331-1341, 1994.

CARLSON, K. E.; BRASS, L. F.; MANNING, D. R. Thrombin and phorbol esters cause the selective phosphorylation of a G protein other than Gi in human platelets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 22, p. 13298-13305, 1989.

CARR, D. J. Neuroendocrine peptide receptors on cells of the immune system. **Chemistry Immunology**, v. 52, n., p. 84-105, 1992.

CARR, D. J.; WOOLLEY, T. W.; BLALOCK, J. E. Phentolamine but not propranolol blocks the immunopotentiating effect of cold stress on antigen-specific IgM production in mice orally immunized with sheep red blood cells. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 6, n. 1, p. 50-63, 1992.

CHAMBERS, D. A.; COHEN, R. L.; PERLMAN, R. L. Neuroimmune modulation: signal transduction and catecholamines. **Neurochemistry International**, v. 22, n. 2, p. 95-110, 1993.

CHARNEY, D. S.; HENINGER, G. R.; JATLOW, P. I. Increased anxiogenic effects of caffeine in panic disorders. **Archives of Genetic Psychiatry**, v. 42, n. 3, p. 233-243, 1985.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **Journal of American Medical Association**, v. 267, n. 9, p. 1244-1252, 1992.

COHEN, N. Bidirectional communication between the central nervous system (CNS) and the immune system. **Developmental and Compative Immunology**, v. 15, n. 3, p. 209-210, 1991.

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

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

CONLON, P. D.; OGUNBIYI, P. O.; BLACK, W. D.; EYRE, P. Beta-adrenergic receptor function and oxygen radical production in bovine pulmonary alveolar macrophages. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 1538-1541, 1988.

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

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 19, n. 1, p. 52-60, 2005.

CREEL, S. Cause of wild dog deaths. **Nature**, v. 360, n. 6405, p. 633, 1992.

CREEL, S. Cooperative hunting and group size: assumptions and currencies. **Animal Behaviour**, v. 54, n. 5, p. 1319-1324, 1997.

CREEL, S. Social dominance and stress hormones. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 9, p. 491-497, 2001.

CROSS, R. J.; BROOKS, W. H.; ROSZMAN, T. L.; MARKESBERY, W. R. Neuromodulation of lymphocyte reactivity in aged rats. **Neurobiology of Aging**, v. 5, n. 2, p. 89-92, 1984.

CUNNICK, J. E.; LYSLE, D. T.; KUCINSKI, B. J.; RABIN, B. S. Evidence that shock-induced immune suppression is mediated by adrenal hormones and peripheral beta-adrenergic receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 36, n. 3, p. 645-651, 1990.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Annals of New York Academy of Science**, v. 933, n., p. 222-234, 2001.

DHABHAR, F. S.; McEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 7, p. 2608-2615, 1996.

DHABHAR, F. S.; McEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 11, n. 4, p. 286-306, 1997a.

DHABHAR, F. S.; McEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. **Neuroendocrinology**, v. 65, n. 5, p. 360-368, 1997b.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; McEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Differential activation of adrenal steroid receptors in neural and immune tissues of Sprague Dawley, Fischer 344, and Lewis rats. **Journal of Neuroimmunology**, v. 56, n. 1, p. 77-90, 1995a.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; McEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 10, p. 5511-5527, 1995b.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; McEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 4, p. 1638-1644, 1996.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; STEIN, M.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 8, n. 1, p. 66-79, 1994.

DHABHAR, F. S. M., B. S. Bidirectional effects of stress and glucocorticoid hormones on immune function: possible explanation for paradoxical observations. R. F. In: ADER, D. L.; COHEN, N. **Psychoneuroimmunology**. 3. ed. San Diego, California: Academic Press, 2001. v.1, p. 301-338.

DUNN, A. J. Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress. **Life Science**, v. 42, n. 19, p. 1847-1853, 1988.

DUNN, A. J. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 261, n. 3, p. 964-969, 1992.

DUNN, A. J.; ANTOON, M.; CHAPMAN, Y. Reduction of exploratory behavior by intraperitoneal injection of interleukin-1 involves brain corticotropin-releasing factor. **Brain Res Bull**, v. 26, n. 4, p. 539-542, 1991.

DUNN, A. J.; WANG, J. Cytokine effects on CNS biogenic amines. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, n. 6, p. 319-328, 1995.

DUNN, A. J.; WANG, J.; ANDO, T. Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. **Advanced Experimental Medical Biology**, v. 461, n., p. 117-127, 1999.

ELENKOV, I. J.; HASKO, G.; KOVACS, K. J.; VIZI, E. S. Modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by selective alpha- and beta-adrenergic drugs in mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 61, n. 2, p. 123-131, 1995.

ELENKOV, I. J.; PAPANICOLAOU, D. A.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. **Proceedings of Association of American Physicians**, v. 108, n. 5, p. 374-381, 1996.

ELSBACH, P.; WEISS, J. A reevaluation of the roles of the O₂- dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes. **Review Infection Disease**, v. 5, p. 843-853, 1983.

EXTON, J. H. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 36, n., p. 481-509, 1996.

FAUMAN, M. A. The relation of dominant and submissive behavior to the humoral immune response in BALB/c mice. **Biological Psychiatry**, v. 22, n. 6, p. 776-779, 1987.

FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 50-53, 1996.

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

FELTEN, D. L. Neurotransmitter signaling of cells of the immune system: important progress, major gaps. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 5, n. 1, p. 2-8, 1991.

FILE, S. E.; ANDREWS, N. Low but not high doses of buspirone reduce the anxiogenic effects of diazepam withdrawal. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 105, n. 4, p. 578-582, 1991.

FILE, S. E.; LISTER, R. G. Do the reductions in social interaction produced by picrotoxin and pentylentetrazole indicate anxiogenic actions? **Neuropharmacology**, v. 23, n. 7A, p. 793-796, 1984.

FLESHNER, M.; WATKINS, L. R.; LOCKWOOD, L. L.; BELLGRAU, D.; LAUDENSLAGER, M. L.; MAIER, S. F. Specific changes in lymphocyte subpopulations: a potential mechanism for stress-induced immunomodulation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 41, n. 2, p. 131-142, 1992.

FRANKLIN, K.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. San Diego, CA: Academic Press, 1996. p. 208.

FRIEDMAN, M. L.; DIES, R. R. Reactions of internal and external test-anxious students to counseling and behavior therapies. **Journal of Consult Clinical Psychology**, v. 42, n. 6, p. 921, 1974.

FRUSSA-FILHO, R.; PALERMO-NETO, J. Effects of single and long-term administration of sulpiride on open-field and stereotyped behavior of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 23, n. 5, p. 463-472, 1990.

FUCHS, E.; KRAMER, M.; HERMES, B.; NETTER, P.; HIEMKE, C. Psychosocial stress in tree shrews: clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 54, n. 1, p. 219-228, 1996.

FUKUSHIMA, T.; SEKIZAWA, K.; JIN, Y.; YAMAYA, M.; SASAKI, H.; TAKISHIMA, T. Effects of beta-adrenergic receptor activation on alveolar macrophage cytoplasmic motility. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 1 Pt 1, p. L67-L72, 1993.

GINSBURG, B. A.; ALLE, W. C. Some effects of conditioning on social dominance and subordination in inbred strains of mice. **Physiological Zoology**, v. 15, n., p. 485-506, 1942.

GLASER, S. L. Reproductive factors in Hodgkin's disease in women: a review. **American Journal of Epidemiology**, v. 139, n. 3, p. 237-246, 1994.

GOEHLER, L. E.; GAYKEMA, R. P.; NGUYEN, K. T.; LEE, J. E.; TILDERS, F. J.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 2799-806, 1999.

GORCZYNSKI, R. M.; MACRAE, S.; KENNEDY, M. Conditioned immune response associated with allogeneic skin grafts in mice. **Journal of Immunology**, v. 129, n. 2, p. 704-709, 1982.

GRAEFF, E. O.; HUNZIKER, M. H.; GRAEFF, F. G. Effects of ipsapirone and BAY R 1531 on learned helplessness. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n. 9, p. 1141-1144, 1989.

GUYRE, P. M.; GIRARD, M. T.; MORGANELLI, P. M.; MANGANIELLO, P. D. Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 30, n. 1-6, p. 89-93, 1988.

HADDEN, D. R.; LOWE, D. C.; MONTGOMERY, D. A.; SHANKS, R. G.; WEAVER, J. A. Propranolol and radioactive iodine in the treatment of thyrotoxicosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 198P, 1970.

HARDY, C. A.; QUAY, J.; LIVNAT, S.; ADER, R. Altered T-lymphocyte response following aggressive encounters in mice. **Physiology & Behaviour**, v. 47, n. 6, p. 1245-1251, 1990.

HALLER, J.; KIEM, D. T.; MAKARA, G. B. The physiology of social conflict in rats: what is particularly stressful? **Behavior Neuroscience**, v. 110, p. 353-359, 1996.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Reviews**, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

HASKO, G.; SZABO, C. Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. **Biochemistry Pharmacology**, v. 56, n. 9, p. 1079-1087, 1998.

HASS, U.; LUND, S. P.; SIMONSEN, L. Long-lasting neurobehavioral effects of prenatal exposure to xylene in rats. **Neurotoxicology**, v. 18, n. 2, p. 547-551, 1997.

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

HELLERSTEIN, M. K.; MEYDANI, S. N.; MEYDANI, M.; WU, K.; DINARELLO, C. A. Interleukin-1-induced anorexia in the rat. Influence of prostaglandins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 84, n. 1, p. 228-235, 1989.

HELLSTRAND, K.; HERMODSSON, S. An immunopharmacological analysis of adrenaline-induced suppression of human natural killer cell cytotoxicity. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 89, n. 4, p. 334-341, 1989.

HENRICKS, P. A.; ENGELS, F.; VAN DER VLIET, H.; NIJKAMP, F. P. Oxygen metabolism and eicosanoid formation of alveolar macrophages of Haemophilus influenzae-treated guinea pigs. **Agents Actions**, v. 23, n. 1-2, p. 97-98, 1988a.

HENRICKS, P. A.; VAN ESCH, B.; VAN OOSTERHOUT, A. J.; NIJKAMP, F. P. Specific and non-specific effects of beta-adrenoceptor agonists on guinea pig alveolar macrophage function. **European Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 321-330, 1988b.

HESSING, M. J.; COENEN, G. J.; VAIMAN, M.; RENARD, C. Individual differences in cell-mediated and humoral immunity in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 45, n. 1-2, p. 97-113, 1995.

HESSING, M. J.; SCHEEPENS, C. J.; SCHOUTEN, W. G.; TIELEN, M. J.; WIEPKEMA, P. R. Social rank and disease susceptibility in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 43, n. 4, p. 373-387, 1994.

HOLSBOER, F.; STALLA, G. K.; VON BARDELEBEN, U.; HAMMANN, K.; MULLER, H.; MULLER, O. A. Acute adrenocortical stimulation by recombinant gamma interferon in human controls. **Life Science**, v. 42, n. 1, p. 1-5, 1988.

IIMORI, K.; TANAKA, M.; KOHNO, Y.; IDA, Y.; NAKAGAWA, R.; HOAKI, Y.; TSUDA, A.; NAGASAKI, N. Psychological stress enhances noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 16, n. 4, p. 637-640, 1982.

IRWIN, M.; HAUGER, R.; BROWN, M. Central corticotropin-releasing hormone activates the sympathetic nervous system and reduces immune function: increased responsivity of the aged rat. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1047-1053, 1992.

IRWIN, M.; HAUGER, R. L.; JONES, L.; PROVENCIO, M.; BRITTON, K. T. Sympathetic nervous system mediates central corticotropin-releasing factor induced suppression of natural killer cytotoxicity. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 255, n. 1, p. 101-107, 1990.

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

JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiology & Behaviour**, v. 72, n. 1, p. 165-229, 1992.

JAIN, S.; STEVENSON, J. R. Enhancement by restraint stress of natural killer cell activity and splenocyte responsiveness to concanavalin A in Fischer 344 rats. **Immunology Investation**, v. 20, n. 4, p. 365-376, 1991.

JENSEN, M. M. Changes in leukocyte counts associated with vaous stressors. **Journal of Reticuloendothelium Society**, v. 6, n. 5, p. 457-465, 1969.

KABIERSCH, A.; DEL REY, A.; HONEGGER, C. G.; BESEDOVSKY, H. O. Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 2, n. 3, p. 267-274, 1988.

KATAFUCHI, T.; TAKE, S.; HORI, T. Roles of sympathetic nervous system in the suppression of cytotoxicity of splenic natural killer cells in the rat. **Journal of Physiology**, v. 465, n., p. 343-57, 1993.

KELLEY, A. Locomotor activity and exploration. In: VAN HAAREN, F. **Methods in behavioral pharmacology**. Elsevier Science, 1993. p. 499-518.

KENT, S.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Effects of lipopolysaccharide on food-motivated behavior in the rat are not blocked by an interleukin-1 receptor antagonist. **Neuroscience Letters**, v. 145, n. 1, p. 83-86, 1992.

KHANSARI, D. N.; MURGO, A. J.; FAITH, R. E. Effects of stress on the immune system. **Immunology Today**, v. 11, n. 5, p. 170-175, 1990.

KIECOLT-GLASER, J. K.; GLASER, R.; GRAVENSTEIN, S.; MALARKEY, W. B.; SHERIDAN, J. Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, v. 93, n. 7, p. 3043-3047, 1996.

KLOSTERHALFEN, W.; KLOSTERHALFEN, S. Pavlovian conditioning of immunosuppression modifies adjuvant arthritis in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 97, n. 4, p. 663-636, 1983.

KNUDSEN, J. H.; CHRISTENSEN, N. J.; BRATHOLM, P. Lymphocyte norepinephrine and epinephrine, but not plasma catecholamines predict lymphocyte cAMP production. **Life Science**, v.59, p.639-647, 1996.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 154-159, 2002.

KOOLHAAS, J. M.; KORTE, S. M.; DE BOER, S. F.; VAN DER VEGT, B. J.; VAN REENEN, C. G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I. C.; RUIS, M. A.; BLOKHUIS, H. J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p. 925-935, 1999.

KORT, W. J. The effect of chronic stress on the immune response. **Advanced Neuroimmunology**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 1994.

KORTE, S. M.; DE KLOET, E. R.; BUWALDA, B.; BOUMAN, S. D.; BOHUS, B. Antisense to the glucocorticoid receptor in hippocampal dentate gyrus reduces immobility in forced swim test. **European Journal of Pharmacology**, v. 301, n. 1-3, p. 19-25, 1996.

ORTE, S. M.; KOOLHAAS, J. M.; WINGFIELD, J. C.; MCEWEN, B. S. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-38, 2005.

KUDRYAVTSEVA, N. N.; BAKSHTANOVSKAYA, I. V.; KORYAKINA, L. A. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 38, n. 2, p. 315-320, 1991.

LE MOAL, M.; SIMON, H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. **Physiology Reviews**, v. 71, n. 1, p. 155-234, 1991.

LIGNON, M. F.; BERNAD, N.; MARTINEZ, J. Pharmacological characterization of type B cholecystokinin binding sites on the human JURKAT T lymphocyte cell line. **Molecular Pharmacology**, v. 39, n. 5, p. 615-620, 1991.

LINNOILA, M.; VIRKKUNEN, M.; SCHEININ, M.; NUUTILA, A.; RIMON, R.; GOODWIN, F. K. Low cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid concentration differentiates impulsive from nonimpulsive violent behavior. **Life Science**, v. 33, n. 26, p. 2609-2614, 1983.

LOUCH, C. D.; HIGGINBOTHAM, M. The relation between social rank and plasma corticosterone levels in mice. **General Comparative Endocrinology**, v. 8, n. 3, p. 441-444, 1967.

LYTE, M.; NELSON, S. G.; BAISSA, B. Examination of the neuroendocrine basis for the social conflict-induced enhancement of immunity in mice. **Physiology & Behaviour**, v. 48, n. 5, p. 685-691, 1990.

LYTE, M.; NELSON, S. G.; THOMPSON, M. L. Innate and adaptive immune responses in a social conflict paradigm. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 57, n. 1, p. 137-147, 1990.

McCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Effect of centrally administered interleukin-1 and endotoxin on food intake of fasted rats. **Physiology & Behavior**, v.36, p.745-749, 1986.

MACPHEE, I. A.; ANTONI, F. A.; MASON, D. W. Spontaneous recovery of rats from experimental allergic encephalomyelitis is dependent on regulation of the immune system by endogenous adrenal corticosteroids. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 2, p. 431-445, 1989.

MADDEN, K. S. Catecholamines, sympathetic nerves, and immunity. R. F. Ader, D. L.; Cohen, N. **Psychoneuroimmunology**. 3. ed. San Diego, California: Academic Press, 2001. v.1, p. 197-216.

MADDEN, K. S.; BELLINGER, D. L.; FELTEN, S. Y.; SNYDER, E.; MAIDA, M. E.; FELTEN, D. L. Alterations in sympathetic innervation of thymus and spleen in aged mice. **Mechanisms of Ageing Development**, v. 94, n. 1-3, p. 165-75, 1997.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. **Physiology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 77-106, 1995.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Beta-adrenoceptor blockade alters thymocyte differentiation in aged mice. **Cell Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 189-196, 2001.

MADDEN, K. S.; MOYNIHAN, J. A.; BRENNER, G. J.; FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L.; LIVNAT, S. Sympathetic nervous system modulation of the immune system. III. Alterations in T and B cell proliferation and differentiation in vitro following chemical sympathectomy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 49, n. 1-2, p. 77-87, 1994.

MAIER, S. F.; COEHLER, L. E.; FLESHNER, M.; WATKINS, L. R. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. **Annals of New York Academy of Science**, v. 840, n., p. 289-300, 1998.

MAISEL, A. S.; KNOWLTON, K. U.; FOWLER, P.; REARDEN, A.; ZIEGLER, M. G.; MOTULSKY, H. J.; INSEL, P. A.; MICHEL, M. C. Adrenergic control of circulating

lymphocyte subpopulations. Effects of congestive heart failure, dynamic exercise, and terbutaline treatment. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 2, p. 462-467, 1990.

MANOGUE, K. R. Dominance status and adrenocortical reactivity to stress in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Primates**, v. 14, p. 457-463, 1975.

MARCHETTI, C.; DRENT, P. J. Individual differences in the use of social information in foraging by captive great tits. **Animal Behaviour**, v. 60, n. 1, p. 131-140, 2000.

MARCUSSON-STAHN, M. D. K. A. Flow-cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies. **Toxicology**, v. 193, p. 269-279, 2003.

MARTINEZ, M.; PHILLIPS, P. J.; HERBERT, J. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 20-33, 1998.

MARX, J. Cancer research: Mutant stem cells may seed cancer. **Science**, v. 301, n. 5638, p.1308-10, 2003.

MASON, U. G., 3RD; KIRKPATRICK, C. H. Modulation of immunologic responses in nontuberculous mycobacterial infections with indomethacin. **Journal of Clinical Immunology**, v. 4, n. 2, p. 112-117, 1984.

MCCANN, S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KARANTH, S.; RETTORI, V. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 10, p. 1121-1131, 2000.

MCCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Effect of centrally administered interleukin-1 and endotoxin on food intake of fasted rats. **Physiology & Behaviour**, v. 36, n. 4, p. 745-749, 1986.

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Annals of New York Academy of Science**, v. 840, n., p. 33-44, 1998.

MCEWEN, B. S. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 108-124, 2000.

MCEWEN, B. S. Interacting mediators of allostasis and allostatic load: towards an understanding of resilience in aging. **Metabolism**, v. 52, n. 10 Suppl 2, p. 10-16, 2003.

MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R. H.; KITSON, R. P.; MILLER, A. H.; SPENCER, R. L.; WEISS, J. M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research Reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 79-133, 1997.

MEI-TAL, V.; MEYEROWITZ, S.; ENGEL, G. L. The role of psychological process in a somatic disorder: multiple sclerosis. 1. The emotional setting of illness onset and exacerbation. **Psychosomatic Medicine**, v. 32, n. 1, p. 67-86, 1970.

MILLAR, D. B.; THOMAS, J. R.; PACHECO, N. D.; ROLLWAGEN, F. M. Natural killer cell cytotoxicity and T-cell proliferation is enhanced by avoidance behavior. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 144-153, 1993.

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

MORROW-TESCH, J. L.; MCGLONE, J. J.; NORMAN, R. L. Consequences of restraint stress on natural killer cell activity, behavior, and hormone levels in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Psychoneuroendocrinology**, v. 18, n. 5-6, p. 383-95, 1993.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of Tcell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.

MOSS, S. F.; BLASER, M.J. Mechanisms of disease: Inflammation and origins of cancer. **National Clinical Practise Oncology**, v. 2, p. 90-97, 2005.

MOYER, W. W. Countercontrol in hypnotic control groups. **Psychology Repiration**, v. 39, n. 3 Pt 2, p. 1083-1089, 1976.

MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocrinology Reviews**, v. 5, n. 1, p. 25-44, 1984.

NAITOH, Y.; FUKATA, J.; TOMINAGA, T.; NAKAI, Y.; TAMAI, S.; MORI, K.; IMURA, H. Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. **Biochemistry Biophysics and Research Commun**, v. 155, n. 3, p. 1459-1463, 1988.

NIKOLIC, V., K. JOVANOVA-NESIC, ET AL. Locus ceruleus and immunity. I. Suppression of plaque-forming cell response and antibody production in rats with lesioned locus ceruleus. **International Journal of Neuroscience**, v.68, n.3-4, p. 283-87, 1993.

NIESWANDT, B.; HAFNER, M.; ECHTENACHER, B.; MANNEL, D. N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. **Cancer Research**, v. 59, n. 6, p. 1295-300, 1999.

OTTERNESS, I. G.; BLIVEN, M. L.; ESKRA, J. D.; REINKE, M.; HANSON, D. C. The pharmacologic regulation of interleukin-1 production: the role of prostaglandins. **Cell Immunology**, v. 114, n. 2, p. 385-397, 1988.

OVADIA, H.; LUBETZKI-KORN, I.; ABRAMSKY, O. Dopamine receptors on isolated membranes of rat thymocytes. **Annals of New York Academy of Science**, v. 496, n., p. 211-216, 1987.

PALERMO NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FAVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, n. 5, p. 497-507, 2001.

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

PALERMO-NETO, J.; GUIMARAES, R. K. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats. **Life Science**, v. 68, n. 6, p. 611-623, 2000.

PANINA-BORDIGNON, P.; MAZZEO, D.; LUCIA, P. D.; D'AMBROSIO, D.; LANG, R.; FABBRI, L.; SELF, C.; SINIGAGLIA, F. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 6, p. 1513-1519, 1997.

PARMIGIANI, S.; FERRARI, P. F.; PALANZA, P. An evolutionary approach to behavioral pharmacology: using drugs to understand proximate and ultimate mechanisms of different forms of aggression in mice. **Neuroscience Biobehaviour Reviews**, v. 23, n. 2, p. 143-153, 1998.

PAVCOVICH, L. A.; CANCELA, L. M.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V. A.; RAMIREZ, O. A. Chronic stress-induced changes in locus coeruleus neuronal activity. **Brain Research Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 293-6, 1990.

PAWLAK, C. R.; JACOBS, R.; MIKESKA, E.; OCHSMANN, S.; LOMBARDI, M. S.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C. J.; SCHMIDT, R. E.; SCHEDLOWSKI, M. Patients with systemic lupus erythematosus differ from healthy controls in their immunological response to acute psychological stress. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 13, n. 4, p. 287-302, 1999.

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

PICK, G. E.; SRIVASTAVA, A. K.; SLINCHER, A. M.; PANG, P. K. T. The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the Killifish, *Fundulus heteroclitus*. I The chock sequence and the effects of hypophysectomy. **Jornal of Zoology**, v. 177, p. 89-96, 1971.

PORTELA CDE, P.; MASSOCO CDE, O.; DE LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats. **Physiology & Behaviour**, v. 72, n. 3, p. 415-420, 2001.

REDMOND JR., D. E.; HUANG, Y. H.; SNYDER, D. R.; MAAS, J. W. Behavioral effects of stimulation of the nucleus locus coeruleus in the stump-tailed monkey *Macaca arctoides*. **Brain Research**, v. 116, n. 3, p. 502-510, 1976.

RENZ, H.; SMITH, H. R.; HENSON, J. E.; RAY, B. S.; IRVIN, C. G.; GELFAND, E. W. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 89, n. 6, p. 1127-1138, 1992.

SACCO, S.; HEREMANS, H.; ECHTENACHER, B.; BUURMAN, W. A.; AMRAOUI, Z.; GOLDMAN, M.; GHEZZI, P. Protective effect of a single interleukin-12 (IL-12) pre-dose against the toxicity of subsequent chronic IL-12 in mice: role of cytokines and glucocorticoids. **Blood**, v. 90, n. 11, p. 4473-4479, 1997.

SANDERS, V. M.; BAKER, R. A.; RAMER-QUINN, D. S.; KASPROWICZ, D. J.; FUCHS, B. A.; STREET, N. E. Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 9, p. 4200-4210, 1997.

SANDERS, V. M.; KASPROWICZ, D. J.; SWANSON-MUNGERSON, M. A.; PODOJIL, J. R.; KOHM, A. P. Adaptive immunity in mice lacking the beta(2)-adrenergic receptor. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 55-67, 2003.

SANDOVAL, M. R.; PALERMO-NETO, J. Effect of manipulation of the GABA system on dopamine-related behaviors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 1, p. 88-99, 1995.

SANTAMBROGIO, L.; LIPARTITI, M.; BRUNI, A.; DAL TOSO, R. Dopamine receptors on human T- and B-lymphocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 45, n. 1-2, p. 113-119, 1993.

SAPHIER, D.; ABRAMSKY, O.; MOR, G.; OVADIA, H. Multiunit electrical activity in conscious rats during an immune response. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 1, n. 1, p. 40-51, 1987.

SCHEDLOWSKI, M.; HOSCH, W.; OBERBECK, R.; BENSCHOP, R. J.; JACOBS, R.; RAAB, H. R.; SCHMIDT, R. E. Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 1, p. 93-99, 1996.

SCHLEIMER, R. P.; FREELAND, H. S.; PETERS, S. P.; BROWN, K. E.; DERSE, C. P. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 250, n. 2, p. 598-605, 1989.

SCHOPF, R. E.; LEMMEL, E. M. Control of the production of oxygen intermediates of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes by beta-adrenergic receptors. **Journal of Immunopharmacology**, v. 5, n. 3, p. 203-216, 1983.

SELYE, H. What is stress? **Metabolism**, v. 5, n., p. 525-530, 1956.

SHAKHAR, G.; BEN-ELIYAHU, S. In vivo beta-adrenergic stimulation suppresses natural killer activity and compromises resistance to tumor metastasis in rats. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3251-3258, 1998.

SHARP, B. M.; MATTA, S. G.; PETERSON, P. K.; NEWTON, R.; CHAO, C.; MCALLEN, K. Tumor necrosis factor-alpha is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukin-1 beta. **Endocrinology**, v. 124, n. 6, p. 3131-3133, 1989.

SHERIDAN, J. F.; DOBBS, C.; JUNG, J.; CHU, X.; KONSTANTINOS, A.; PADGETT, D.; GLASER, R. Stress-induced neuroendocrine modulation of viral pathogenesis and immunity. **Annals of New York Academy of Science**, v. 840, n., p. 803-808, 1998.

SHURIN, M. R.; ZHOU, D.; KUSNECOV, A.; RASSNICK, S.; RABIN, B. S. Effect of one or more footshocks on spleen and blood lymphocyte proliferation in rats. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 8, n. 1, p. 57-65, 1994.

SIMON, P.; PANISSAUD, C.; COSTENTIN, J. The stimulant effect of modafinil on wakefulness is not associated with an increase in anxiety in mice. A comparison with dexamphetamine. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 114, n. 4, p. 597-600, 1994.

SMYTJ, M. J., GODFREY, D. I., TRAPANI, J. A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. **Nature Immunology**, v. 2, n., p. 293-299, 2001.

SNOW, D. H.; RICKETTS, S. W.; MASON, D. K. Haematological response to racing and training exercise in Thoroughbred horses, with particular reference to the leucocyte response. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 2, p. 149-154, 1983.

SOBUE, M.; TAKEUCHI, J.; TSUKIDATE, K.; TOIDA, M.; GOTO, K.; NAKASHIMA, N. Influence of fixed fibroblasts on glycosaminoglycan synthesis of human gastric carcinoma cells in vitro. **Experimental Cell Research**, v. 149, n. 2, p. 527-534, 1983.

SPADARO, F.; BERRIDGE, C. W.; BALDWIN, H. A.; DUNN, A. J. Corticotropin-releasing factor acts via a third ventricle site to reduce exploratory behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 36, n. 2, p. 305-309, 1990.

SPADARO, F.; DUNN, A. J. Intracerebroventricular administration of interleukin-1 to mice alters investigation of stimuli in a novel environment. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 4, n. 4, p. 308-322, 1990.

STEFANSKI, V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, n. 4, p. 389-406, 2000.

STEFANSKI, V.; BEN-ELIYAHU, S. Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and beta-adrenergic mechanisms. **Physiology Reviews**, v. 60, n. 1, p. 277-282, 1996.

STEFANSKI, V.; ENGLER, H. Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. **Physiology and Behaviour**, v. 64, n. 5, p. 733-741, 1998a.

STERLING, P.; EYER, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: FISHER, S.; REASON, J. (Ed.). **Handbook of life stress. Cognition and health**. New York: Wisley. 1988. p. 629-649.

STERNBERG, E. M.; YOUNG, W. S., 3RD; BERNARDINI, R.; CALOGERO, A. E.; CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W.; WILDER, R. L. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. **Annals of New York Academy of Science**, v. 86, n. 12, p. 4771-4775, 1989.

STRAUSBAUGH, H.; IRWIN, M. Central corticotropin-releasing hormone reduces cellular immunity. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 6, n. 1, p. 11-17, 1992.

SUGIMOTO, Y.; OGAWA, M.; TAI, N.; KAMEI, C. Inhibitory effects of glucocorticoids on rat eosinophil superoxide generation and chemotaxis. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 6, p. 845-852, 2003.

THOMASON, B. T.; BRANTLEY, P. J.; JONES, G. N.; DYER, H. R.; MORRIS, J. L. The relation between stress and disease activity in rheumatoid arthritis. **Journal of Behavioural Medicine**, v. 15, n. 2, p. 215-220, 1992.

TOFT, P.; SVENDSEN, P.; TONNESEN, E.; RASMUSSEN, J. W.; CHRISTENSEN, N. J. Redistribution of lymphocytes after major surgical stress. **Acta Anaesthesiology Scandinavian**, v. 37, n. 3, p. 245-249, 1993.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. **Annual Review Immunology**, v. 13, p. 251-276, 1995.

UEHARA, A. G., P. E.; DAHL, R. R.; ARIMURA, A. Stimulation of ACTH release by human interleukin-1b, but not interleukin-1a, in conscious, freely moving rats. **Biochemical and biophysical Research Communications**, v. 146, n., p. 1286-1290, 1987.

UNGERSTEDT, U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. **Acta Physiology Scandinavian Supplement**, v. 367, n., p. 1-48, 1971.

URSIN, H. Stress, distress, and immunity. **Annals of New York Academy of Science**, v. 741, n., p. 204-11, 1994.

VAN OVERVELD, F. J.; DEMKOW, U. A.; GORECKA, D.; ZIELINSKI, J.; DE BACKER, W. A. Inhibitory capacity of different steroids on neutrophil migration across a bilayer of endothelial and bronchial epithelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 477, n. 3, p. 261-267, 2003.

VAN TITS, L. J.; MICHEL, M. C.; GROSSE-WILDE, H.; HAPPEL, M.; EIGLER, F. W.; SOLIMAN, A.; BRODDE, O. E. Catecholamines increase lymphocyte beta 2-adrenergic receptors via a beta 2-adrenergic, spleen-dependent process. **American Journal of Physiology**, v. 258, n. 1 Pt 1, p. E191-E202, 1990.

VEENEMA, A. H.; MEIJER, O. C.; DE KLOET, E. R.; KOOLHAAS, J. M.; BOHUS, B. G. Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. **Hormones and Behaviour**, v. 43, n. 1, p. 197-204, 2003.

VEKOVISHCHEVA, O. U. S. I. A.; ZVARTAU, E. E. Co-housing in a stable hierarchical group is not aversive for dominant and subordinate individuals. **Neuroscience Behavioral Physiology**, v. 30, n., p. 64-102, 2000.

VERBEEK, M. E. M., DRENT, P. J.; WIEPKEMA, P. R. Consistent individual differences in early exploratory behaviour of male great tits. **Animal Behaviour**, v. 48, n., p. 1113-1121, 1994.

VERBEEK, M. E. M., De GOEDE, P., DRENT, P. J.; WIEPKEMA, P. R. Individual behavioral characteristic and dominance in aviary groups of great tits. **Behavior**, v. 136, n., p. 23-48, 1999.

VISINTAINER, M. A.; VOLPICELLI, J. R.; SELIGMAN, M. E. Tumor rejection in rats after inescapable or escapable shock. **Science**, v. 216, n. 4544, p. 437-439, 1982.

WALZER, P. D.; LABINE, M.; REDINGTON, T. J.; CUSHION, M. T. Lymphocyte changes during chronic administration of and withdrawal from corticosteroids: relation to *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, n. 5, p. 2502-2508, 1984.

WHALEN, M. M.; BANKHURST, A. D. Effects of beta-adrenergic receptor activation, cholera toxin and forskolin on human natural killer cell function. **Biochemistry Journal**, v. 272, n. 2, p. 327-331, 1990.

WIEGERS, G. J.; LABEUR, M. S.; STEC, I. E.; KLINKERT, W. E.; HOLSBOER, F.; REUL, J. M. Glucocorticoids accelerate anti-T cell receptor-induced T cell growth. **Journal of Neuroimmunology**, v. 155, n. 4, p. 1893-1902, 1995.

WIEGERS, G. J.; REUL, J. M.; HOLSBOER, F.; DE KLOET, E. R. Enhancement of rat splenic lymphocyte mitogenesis after short term preexposure to corticosteroids in vitro. **Endocrinology**, v. 135, n. 6, p. 2351-2357, 1994.

WILTROUT, R. H.; HERBERMAN, R. B.; ZHANG, S. R.; CHIRIGOS, M. A.; ORTALDO, J. R.; GREEN, K. M., JR.; TALMADGE, J. E. Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. **Journal of Immunology**, v. 134, n. 6, p. 4267-4275, 1985.

WOOD, P. G.; KAROL, M. H.; KUSNECOV, A. W.; RABIN, B. S. Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 121-134, 1993.

WON, S. J.; CHUANG, Y. C., HUANG, W. T.; LIU, H. S.; LIN, M.T. Suppression of natural killer cell activity in mouse splenic lymphocytes by several dopamine receptor antagonists. **Experientia**, v. 51, p. 343-348, 1995.

WU, W. J.; PRUETT, S. B. Ethanol decreases host resistance to pulmonary metastases in a mouse model: role of natural killer cells and the ethanol-induced stress response. **International Journal of Cancer**, v. 82, n. 6, p. 886-892, 1999.