UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

JULIA DE SOUZA QUEIROZ

Efeitos da alga *Chlorella vulgaris* sobre a resposta hematopoética e capacidade funcional de neutrófilos em ratos submetidos ao estresse agudo físico e psicogênico e infectados com *Listeria monocytogenes*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento da Faculdade de Psicologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento: Psicologia Experimental

Área de Concentração:
Neurociências e Comportamento

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto
Co-orientador: Profa. Dra. Marize Campos Valadares

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 Psicologia da Universidade de São Paulo)

Souza-Queiroz, Julia
Efeitos da alga *Chlorella vulgaris* sobre a atividade hematopoética e capacidade funcional de neutrófilos em ratos submetidos ao estresse agudo físico e psicogênico e infectados com *Listeria monocytogenes* / Julia de Souza Queiroz. – São Paulo: Souza-Queiroz, J, 2006. 180 fls. :il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Psicologia. Departamento de Psicologia Experimental, 2006.

Programa de Pós-graduação: Neurociências e Comportamento.
Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto

1. Neuroimunomodulação. 2. Mielopoese 3. Mielossupressão. 4.CFU-GM. 5.Choque inescapável. 6. Choque escapável 7. Imunidade Inata. 8. Citometria de fluxo.
I. Título

Email para contato com autores: juliasq@uol.com.br
jpalermo@usp.br

DEDICATÓRIA

À minha família

À minha mãe, por todo amor, por me ensinar a ter calma e aceitação perante os eventos da vida, uma vez que coisas são da forma que elas têm que ser, e que cabe a nós tirar o nosso aprendizado disso, sendo o momento de sofrimento que mais deve ser aproveitado, pois é através de sua superação que mais amadurecemos;

Ao meu pai, pelo investimento e preocupação com a minha formação, por sempre acreditar em mim e me mostrar que eu poderia sim, ser uma vencedora, independente da minha escolha, e por colocar em pratica na minha educação o ensinamento de Goethe, que dizia ser através do respeito que desenvolvemos por nossos pais e professores que podemos respeitar aquilo que há de mais alto em nós mesmos;

Ao meu irmão, que nunca soube do que se tratava o meu trabalho, e mesmo assim, sempre foi um grande motivo para eu me lembrar o quanto família é importante, e o quão forte pode ser o laço emocional e o amor entre irmãos;

À minha Tia Suzana, por ter me acolhido em sua casa e ter sido tão especial, fortalecendo muito o amor que eu sempre senti por ela;

A minha prima Lucia, pelos meses de convivência, pela paciência, pela amizade, pelas conversas e acima de tudo, pelas “lições de vida” e conselhos.

Ao meu orientador Professor Doutor João Palermo-Neto, pela amizade, encorajamento e apoio ao meu desenvolvimento científico. Pela oportunidade que eu tive de participar de um grupo tão forte e sempre em ascensão.

Transmitir conhecimentos é fácil para aqueles que têm segurança e gostam do que fazem, amam a profissão e a ela dedicam parte de suas vidas. Ensinar é uma arte e, como tal, uma tarefa reservada para poucos; porém privilegiados.

A fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, proc nº 04/05066-0 e 04/14128-0.

Agradecimentos

Á minha co-orientadora, Marize (CFU-FCM-UNICAMP), por me mostrar que às vezes complicamos coisas que, ao serem vistas com mais calma, tornam-se muito simples.

Ao departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo, local onde este trabalho foi realizado.

Ao programa de Neurociências e Comportamento – (NEC-IP-USP).

Ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felício (VPT-FMVZ-USP) pelo carinho e atenção em todos momentos difíceis, e por ter sempre estado de portas abertas, deixando claro que poderíamos contar com sua ajuda.

Aos funcionários do biotério (VPT-FMVZ-USP): Claudia, Idalina, Herculano, Rosires, Nelson e Luís por cuidarem tão bem de meus animais e serem tão atenciosos.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (VPT-FMVZ-USP): Priscila, Magali e Ricardo por toda a ajuda nos experimentos, sempre muito prestativos e não obstante, com um excelente humor.

Ao Laboratório de microbilogia – UNICAMP.

Às funcionárias da secretaria do VPT-FMVZ-USP: Cristina, Cláudia, Silvia, Romeika e Marguiti.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação do programa de Neurosciências e Comportamento (NEC-IP-USP): Maria Clarice, Aida, Ari e Ronaldo, por toda atenção que me deram no decorrer de todo o mestrado.

À Idalina, secretária da coordenação do programa de Neurociências e Comportamento (NEC-IP-USP), por ter sido sempre muito receptiva.

Aos funcionários da informática da FMVZ, Miro, Antônio e Rúbens, por todo o apoio e amizade.

À Sueli, (CFU-Hemocentro-UNICAMP) secretária, auxiliar, mão direita, amiga, que sempre me ajudou nos experimentos, sempre alegrou muito o nosso laboratório, passando para todos uma energia muito boa e favorecendo um ambiente de trabalho bastante agradável.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ-USP.

Aos meus professores Sandra Farsky, Gerson Chadi, Britto, que foram tão atenciosos e compreensíveis quanto ao fato de terem uma aluna formada em psicologia, com mínima noção em assuntos relacionados à imunologia e neurologia, e aos meus professores Ana Maria Loffredo, por ter me mantido em contato com a Psicanálise, e ainda da forma mais bela que me foi apresentada, Maria Helena Humbziker, por ter me proporcionado um grande crescimento pessoal, muito importante não só para meu papel de aluna, Avelino Luiz Rodrigues, por ter me introduzido o tema fascinante da Neuropsicanálise e Teresa, por ter encorajado ainda mais a minha caminhada nesta área interdisciplinar.

À Profa. Dra. Solange, por ter me orientado e tirado minhas dúvidas, por ter sido sempre tão receptiva.

À Dra. Evinha, por ter se mostrado sempre muito verdadeira, por ter me ajudado muito com experimentos, estatística, redação da dissertação, etc. Mostrou-me o caminho, com pouquíssimas palavras, que, de fato, não foram muito necessárias, umas vez que, o que diz ecoa por muito tempo.

Ao Prof. Dr. Fred, por ter enriquecido a minha discussão e por ter me dado dicas as quais acrescentaram em minha forma de pensamento científico.

À Dra. Cristina Massoco, por ter sido sempre tão receptiva quando eu a procurei, por ter participado da minha banca de qualificação e ter aberto mais meu horizonte, propondo questões extremamente pertinentes.

À Elaine, pessoa que tanto me ajudou com minhas apresentações, discussões, e sempre esteve presente nos meus momentos mais difíceis, torcendo por mim. Foi sempre tão paciente e amiga.

À Moniquinha, por ter sido ponto de amparo para momentos de dúvidas, e ter se mostrado sempre disposta à ajudar.

Ao Renato, pelas inúmeras dicas e por toda a ajuda durante a minha fase de adaptação.

À minha grande amiga Karin, que agora tenho como irmã, pessoa que caiu na minha vida e muito nela acrescentou. Juntas tivemos muitas conquistas e aprendizados. Tenho a sorte de poder dividir com ela, não só o espaço que moramos, como também os momentos de companheirismo e verdadeira amizade.

À minha amiga querida Cíntia por ter sido sempre uma grande companheira, ter me mostrado uma verdadeira amizade e por ter sido fundamental para a boa realização dos meus experimentos na UNICAMP.

À Samara, Aline, Paulinha, Gustavo, por terem participado da realização desse trabalho, pelas dicas maravilhosas, por terem ensinado procedimentos e terem sido pessoas maravilhosas.

À Luciana V., Domênica, Dario, Bebel, Marcinha, Nato, Ricardo L., Vanessa, Lú, Andréia, Fabiana, Luciana M., Portela, Daniel, Glaucie, João Paulo, Luciana R., Wanderley, Milena, Caio, Vivi e Camila pelos momentos de trabalho, de lazer, por todo apoio e amizade.

Um obrigada especial a todas as pessoas do grupo de Neuroimunomodulação VPT (FMVZ-USP) e do grupo de estudos imunohematopoéticos do laboratório de CFU (FCM-UNICAMP). Tivemos ótimos momentos.

If a man should conquer in battle
A thousand and a thousand more,
And another should conquer himself,
His would be the great victory,

Because the gratest of victories
Is the victory over oneself;
And neither the gods in heaven above
Nor the demons bellow can turn
Into defeat the victory of such a man

The Buddha

A parte experimental desta dissertação relacionada às células progenitoras hematopoéticas foi realizada no Laboratório de Estudos Imunohematopoéticos da Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP e, a parte de experimetos relacionada à atividade funcional de neutrófilos foi realizada no Depto. de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Mecicina Veterinária – Universidade de São Paulo – USP.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOUZA-QUEIROZ, Julia

Título: Efeitos da alga *Chlorella vulgaris* sobre a resposta hematopoética e capacidade funcional de neutrófilos em ratos submetidos ao estresse agudo físico e psicogênico e infectados com *Listeria monocytogenes*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento da Faculdade de Psicologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

RESUMO

SOUZA QUEIROZ, J. Efeitos da alga *Chlorella vulgaris* sobre a resposta hematopoética e capacidade funcional de neutrófilos em ratos submetidos ao estresse agudo físico e psicogênico e infectados com *Listeria monocytogenes*. [Effects of the algae *Chlorella vulgaris* on hematopoietic response and on functional activity of neutrophils in rats submitted to physical and psychogenic acute stress and infected with *Listeria monocytogenes*]. 2006. 180fls. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Psicologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Evidências experimentais sugerem que uma variedade de estressores ativa o controle hipotalâmico das respostas neuroendócrinas e autonômicas que estão envolvidas na produção de células do sangue e na liberação destas células da medula óssea para a circulação. A alga *Chlorela vulgaris* (CV) exibe várias atividades imunomoduladoras como, por exemplo, a capacidade de estimulação das células hematopoéticas e de ativação de leucócitos maduros. No presente trabalho analisamos o efeito imunoprotetor da CV em animais submetidos aos estressores físicos (estresse por choque escapável - CE e inescapável - CI) e ao estressor psicogênico (grupo de animais que testemunhou a exposição ao choque inescapável - T) e inoculados com a bactéria *Listeria monocytogenes* (LM). Os parâmetros imunológicos observados foram: 1) Crescimento e diferenciação de progenitores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea; 2) Atividade funcional (*burst* e fagocitose) de neutrófilos circulantes avaliados por citometria de fluxo; 3) Sobrevida de animais inoculados com dose letal de LM e/ou submetidos aos estressores físicos e psicogênico. Nos grupos CI e T observamos uma redução no número de CFU-GM na medula óssea. Por outro lado, não houve redução deste parâmetro nos animais do grupo CE quando comparado ao medido no grupo controle. Observamos uma maior susceptibilidade do organismo a infecção por

LM quando o estresse foi aplicado previamente à inoculação com dose subletal desta bactéria. No entanto, o tratamento com 200 mg/Kg/dia de CV por 5 dias consecutivos mostrou uma ação protetora, restabelecendo a mielossupressão induzida pelo choque inescapável ou pelo estressor psicogênico e/ou pela infecção. A aplicação de choques escapáveis não alterou significativamente o perfil da resposta hematopoética produzida pela infecção. O estudo da eficácia terapêutica de alga, avaliada pelo tratamento de animais infectados com dose letal de LM, demonstrou uma sobrevida de 50% no grupo infectado e de 20% nos grupos infectados e submetidos aos diferentes tipos de estresse, inclusive naquele exposto ao estresse escapável. Ao considerarmos os efeitos dos estressores sobre a atividade funcional de neutrófilos sanguíneos, observamos uma redução na capacidade de fagocitose nos grupos CI e T, e um aumento do *burst* induzido pela fagocitose. No grupo CE houve um aumento na capacidade de fagocitose destas células, enquanto que o *burst* não foi alterado. O estudo dos efeitos da CV sobre a atividade funcional de neutrófilos demonstrou uma capacidade da alga de impedir a redução da fagocitose produzida pelo estresse físico por choque inescapável e psicogênico, sem interferir com o *burst* oxidativo, que estava aumentado nestes grupos. Impediu também o aumento da capacidade de fagocitose verificado no grupo CE. Esses resultados sugerem que a CV possua propriedades protetoras contra os efeitos induzidos pelo diferentes tipos de estressores sobre a série granulocítica/macrofágica, a atividade funcional de neutrófilos e sobre a sobrevida de animais estressados e infectados com dose letal de LM.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação. Mielopoese. CFU- GM. Mielossupressão.Choque Inescapável. Choque Escapável. Imunidade Inata.Citometria de fluxo.

ABSTRACT

SOUZA QUEIROZ, J. Effects of the algae *Chlorella vulgaris* on hematopoietic response and functional activity of neutrophils in rats submitted to physical and psychogenic acute stress and infected with *Listeria monocytogenes*. [Efeitos da alga *Chlorella vulgaris* sobre a resposta hematopoética e capacidade funcional de neutrófilos em ratos submetidos ao estresse agudo físico e psicogênico e infectados com *Listeria monocytogenes*]. 2006. 180fls. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Psicologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Evidence suggests that a variety of stressors can activate the hypothalamic control of the neuroendocrine and autonomic responses involved in the production´s control of blood cells and their release from bone marrow to circulation. The algae *Chlorella vulgaris* (CV) has several imunomodulatory activities, as the stimulation of hematopoietic cells and the activation of mature leukocytes. The present study evaluated the mieloprotective effects of CV in rats exposed to physical stressors (inescapable - CI and escapable footshock - CE) and to psychogenic stressors (animals that witnessed the inescapable shock application - T), which were inoculated or not with a sublethal dose of the bacterium *Lysteria monocytogenes* (LM). The immunologic parameters observed were: 1) The growth and differentiation of bone marrow progenitors into granulocytes and macrophages (CFU-GM); 2) the functional activity (oxidative *burst* and phagocytosis) of blood neutrophils, using flow citometric methods; 3) The rate of survival of animals infected with lethal dose of LM and submitted or not to the stressors. The CI and T groups were mielossupressed. On the other hand, in the CE group, no differences in the number of CFU-GM were observed, when compared to controls. An increase in the susceptibility of the organism was observed when the animals received the inescapable shock application and the psychogenic stressor before the inoculatium of sublethal dose ($7{,}8 \times 10^8$) of the

bacterium. However, this mielopoietic response was recovered with the pre-treatment with 200 mg/Kg/day for 5 consecutive days of CV, reestablishing the mielossupression caused by the stress and the infection. The escapable shock didn´t produce any significant difference in the hematopoetic response observed in the infection. The study of the survival rate of rats infected with the letal dose of LM showed that the pre-treatment with CV protected 50% of the animals that were only infected with LM, whereas in the group previously stressed the protection was of 20%. Here, the same response was observed in the animals submitted to the different types of stressors evaluated in this work. To assess the effect of CV treatment in the response of mature blood cells, we considered the functional activity of neutrophils of animals submitted to the stressors. We observed a reduction in phagocytosis in the CI and T groups, and an increase in the oxidative *burst* induced by the phagocytosis. In the CE group there was an increase in the blood neutrophil phagocytosis, while the production of oxidative *burst* remained equal to that of control group. The treatment with CV reestablished the changes in phagocytosis to normal values in all the groups, but it produced no changes in the respiratory *burst,* which was increased in the circunstances of the inescapable shock and of the psychogenic stressor, when compared to the values of control group. Considering our results, we suggest that CV has protective properties against the effects produced by the different types of stressors on the CFU-GM, the functional activity of neutrophils and on the rate of survival of animals stressed and infected with lethal dose of LM.

Keywords: Neuroimunomodulation. Mielopoesis. CFU-GM. Mielossupression. Inescapable Footshock. Escapable Footschok. Innate Immunity. Flow cytometry.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH - Hormônio adrenocorticotrópico

CRH - Hormônio liberador de corticotrofinas

CV - *Chlorella vulgaris*

BLA - Núcleo basolateral da amigdala

Eixo HHA - Eixo hipotálamo-Hipófise-Adrenais

LM - *Listeria monocytogenes*

CFU-GM - Unidade Formadora de Colônias para Granulócitos e Macrófagos

CE - Choque escapável

Células NK - Células Natural Killer

CI - Choque inescapável

DCFH-DA - 2'7' diacetato de diclorofluoresceína

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FSC - Feixe óptico de luz que indica o tamanho da célula

GM-CSF - Fator estimulador de colônias para granulócitos e macrófagos

IFN - Interferon

IgE - Imunoglobulina E

IL - Interleucina

LM - Listeria monocytogenes

LPS - Lipopolisácarídeo

OVA - Ovalbumina

PI - Iodeto de Propídeo

PMA - Miristato de forbol acetato

PMN - Células polimorfonucleares

PVN - Núcleo paraventricular do hipotálamo

SAPI - Staphylococcus aureus conjugado com iodeto de propídeo

SI - Sistema imunológico

SNAS - Sistema Nervoso Autônomo Simpático

SNC - Sistema nervoso central

SSC - Feixe óptico de luz que indica granulosidade da célula

TNF - Fator de necrose tumoral

T - Testemunha do choque inescapável

Th - Linfócito T auxiliar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

2 REVISÃO DA LITERATURA 24

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO 24

2.2 ESTRESSE E FUNÇÃO IMUNE 30

2.3 SISTEMA HEMATOPOÉTICO.....38

2.3.1 Células Progenitoras Hematopoéticas.....39

2.3.2 Células Tronco-Hematopoéticas.....40

2.3.3 Células Progenitoras Hematopoéticas Multipotentes.....41

2.3.4 Células Progenitoras Hematopoéticas Linhagem-Específicas.....42

2.3.5 O conceito de cascata de diferenciação de progenitores.....43

2.3.6 Citocinas Reguladoras da Hematopoese.....43

2.3.7 Receptores de Citocinas e diferenciação de Progenitores.....44

2.4 CHLORELLA VULGARIS 47

2.5 MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR LISTERIA MONOCYTOGENES 50

2.6 ESTUDO SOBRE CITOMETRIA DE FLUXO E NEUTRÓFILOS 53

2.6.1 Princípios básicos sobre citometria de fluxo.....53

2.6.2 Neutrófilos.....58

3 OBJETIVOS 62

3.1 HIPÓTESE 62

3.2 OBJETIVO GERAL 62

3.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 63

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS 64

4.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS.....65

4.3 CHLORELLA VULGARIS 66

4.4 LISTÉRIA MONOCYTOGENES 66

4.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA CHLORELLA VULGARIS EM ANIMAIS ESTRESSADOS (CURVA DE SOBREVIDA) 67

4.6 ESTRESSE 67

4.6.1 MODELO PARA A PRODUÇÃO DE ESTRESSE FÍSICO E PSICOGÊNICO 67

4.6.2 INDUÇÃO DE ESTRESSE POR CHOQUE 68

4.7 LISTERIA MONOCYTOGENES.....70

4.8 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS PARA A ANÁLISE DOS NEUTRÓFILOS EM CITÔMETRO DE FLUXO.....70

4.8.1 Reagentes e estímulos para a análise do burst oxidativo.....72

a) Preparo das Soluções.....72

b) Preparo dos Reagentes.....72

c) Preparo dos Estímulos.....73

4.9 ATIVIDADE FUNCINAL DOS NEUTRÓFILOS - MEDIDA DO BURST OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE ATRAVÉS DO CITOMETRO DE FLUXO.....75

4.10 CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS DE GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA (CFU-GM) 79

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA 81

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DAS DOSES DE C. VULGARIS ATRAVÉS DA ANÁLISE DA SOBREVIDA DE RATOS INOCULADOS COM DOSE LETAL DE L. MONOCYTOGENES.....82

5.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM C. VULGARIS NA SOBREVIDA DE ANIMAIS SUBMETIDOS AOS ESTRESSESORES FÍSICO E PSICOGÊNICO E INOCULADOS COM DOSE LETAL DE L. MONOCYTOGENES 85

5.3 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM C. VULGARIS SOBRE O CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO PARA PRECURSORES DE GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS (CFU-GM) DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS SUBMETIDOS AOS ESTRESSESORES FÍSICO E PSICOGÊNICO 88

5.4 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM C. VULGARIS SOBRE O NÚMERO DE CFU-GM NA MEDULA ÓSSEA DE RATOS INFECTADOS COM L. MONOCYTOGENES.....91

5.5 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM C. VULGARIS SOBRE O NÚMERO DE CFU-GM NA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS ESTRESSADOS E INFECTADOS COM L. MONOCYTOGENES.....93

5.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA *C. VULGARIS* SOBRE A ATIVIDADE FUNCINAL DE NEUTRÓFILOS 98

5.7 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM *C. VULGARIS* SOBRE A ATIVIDADE FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS AOS ESTRESSES FÍSICOS E PSICOGÊNICO.....102

6. DISCUSSÃO 107

7. CONCLUSÕES 127

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 130

ANEXO.....175

1. INTRODUÇÃO[1]

As relações entre estresse e sistema imunológico são há muito tempo pesquisadas e reconhecidas. Sabe-se que a exposição do organismo a estímulos estressantes físicos, psicossociais e ambientais altera de forma significativa o funcionamento do sistema imunológico, estando relacionada a uma variedade de doenças imunológicas. Os efeitos do estresse sobre a resposta imunológica têm sido atribuídos á ativação do eixo adrenocortical, com conseqüente aumento dos níveis de glicocorticóides e de catecolaminas. O estresse altera o número e o funcionamento das células mielóides e linfóides, assim como a liberação de citocinas. A medula óssea é o sítio de origem das células pluripotenciais das quais se originam as células do sistema hematopoético, incluindo as famílias de células imunologicamente ativas. Portanto, é essencial que qualquer estudo sobre alterações no funcionamento do sistema imunológico causadas por estímulos externos considere possíveis alterações no crescimento e diferenciação de células precursoras.

O modelo de infecção com *L. monocytogenes* tem sido empregado para avaliar o circuito de interações entre os sistemas imunológico e neuroendócrino, os quais estão envolvidos na supressão da resistência do hospedeiro induzida pelo estresse. Em condições normais, já está bem estabelecido na literatura que a pronta mobilização dos precursores de granulócitos-macrófagos da medula óssea para o local de deposição bacteriana tem um papel importante no controle da infecção nos seus estágios iniciais.

Nos últimos anos a alga verde unicelular *Chlorella vulgaris* tem despertado interesse da comunidade científica por exercer seus efeitos sobre as defesas do

[1] As referências bibliográficas são apresentadas na revisão da literatura.

hospedeiro. Estudos demonstram que o restabelecimento da geração de granulócitos-macrófagos nos órgãos hematopoéticos e a ativação das funções efetoras dos fagócitos é crucial na expressão da atividade antibacteriana dessa alga.

Dessa forma questionamos a eficácia terapêutica da *C. vulgaris* em proteger animais expostos aos estressores agudos (físico, por choques com e sem escape e psicogênico), e à infecção com a bactéria *L. monocytogenes,* assim como a essas situações associadas. Para isso, iremos considerar o crescimento de células tronco pluripotenciais da medula óssea e sua diferenciação em granulócitos e macrófagos e a atividade funcional de neutrófilos circulantes.

Nesse sentido, nosso grupo de trabalho na UNICAMP já observou que o pré-tratamento com *C. vulgaris* interfere positivamente nos parâmetros de sobrevida, crescimento e diferenciação de progenitores hematopoéticos de animais submetidos à exposição ao chumbo, à inoculação com o tumor ascítico de Ehrlich e à bactéria *L. monocytogenes* e, demonstrei em meu trabalho de iniciação científica a mieloproteção de animais submetidos ao estresse agudo de contenção e frio. Assim, pareceu-nos interessante verticalizar um pouco mais a análise desse fato, utilizando modelos de estresse físico e psicogênico e a avaliação, por citometria de fluxo, da atividade funcional de neutrófilos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

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

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

Muito antes do conhecimento da existência das múltiplas interações entre os zsistemas nervoso, endócrino e imune, já se suspeitava que as emoções pudessem influenciar o bem estar dos seres humanos e dos animais. Aproximadamente 200 AC, Galeno ensinava que mulheres melancólicas eram mais susceptíveis ao desenvolvimento de um tumor de mama que as chamadas, “mulheres de sangue quente” (Dunn, 1988; Sternberg, 1997).

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

Segundo a definição de Ader (2000), a psiconeuroimunologia vem a ser a ciência que estuda as interações entre o comportamento, as funções neurais e endócrinas, e os processos imunológicos; parte da premissa de que a adaptação seja o produto de um único e integrado sistema orgânico em que cada uma de suas partes evoluiu para

executar uma função especializada. Conseqüentemente, a imunoregulação não pode ser entendida completamente sem que se leve em consideração o organismo como um todo e os meios externos e internos no qual as respostas imunes ocorrem.

Um dos pioneiros no desenvolvimento da psiconeuroimunologia foi George Salomon, que iniciou a pesquisa clínica nesta área examinando a historia de vida e as características de personalidade de seus pacientes relacionando-as com doenças autoimunes. Convencido da necessidade de realizar pesquisas nesta área, Salomon fundou um laboratório de psiconeurologia, para analisar detalhadamente a influência de efeitos comportamentais, sociais e endócrinos sobre a função imunológica; avaliou principalmente a resposta orgânica a antígenos bacterianos, e à inoculação de tumores, tendo verificado a existência de correlações positivas entre as variáveis estudadas (para revisão veja (Solomon, Amkraut, 1981). Algum tempo depois, adapta seus conceitos de psiconeuroimunologia às pesquisas clínicas relacionadas ao HIV e à AIDS (Ader, 2000).

A influência da atividade do sistema neuroendócrino sobre o sistema imunológico foi explicada magistralmetne por Hans Seyle em um artigo que se tornou um marco na história do estudo do estresse (Reiche, Nunes, Morimoto, 2004).

Seyle descreveu o desenvolvimento de uma síndrome decorrente da exposição de um animal a um conjunto muito diversificado de estímulos nocivos que incluía exposição ao frio, injúria tecidual, excesso de exercícios e intoxicações, entre tantos outros. Os achados característicos dessa síndrome foram: hipertrofia das glândulas adrenais, aparecimento de úlceras gástricas e, curiosamente para a época, atrofia dos órgãos linfóides, incluindo-se aqui o baço e os linfonodos. Como tais achados eram independentes do agente empregado, Seyle concluiu que representavam uma resposta orgânica à injúria, denominando-os coletivamente de “síndrome de adaptação geral”, que propositalmente passou a ser chamada de estresse. Deste trabalho nasciam dois conceitos fundamentais sobre o estresse: 1) as respostas aos estressores parecia ser

adaptativa, representando uma tentativa do organismo de acomodar-se a uma nova situação, e 2) ela não dependia do estímulo, era esteriotipada (Seyle, 1936). Como esta síndrome pode ser gerada por estímulos físicos e psicológicos, e como tem decorrências tanto comportamentais quanto endócrinas, incluindo-se aqui a influência destas sobre a atividade de órgãos linfóides, e consequentemente sobre o sistema imunológico, parece natural supor que o SNC e o SI interajam na preparação do organismo para acomodar mudanças impostas pelo estressor.

Depois de Selye (1956), outros trabalhos mostraram a interação funcional entre os sistemas nervoso, endócrino e imune (Friedman, Glasgow, Ader, 1969; Ader, 1980; Brooks et al., 1982; Felszeghy, Gaspar, Nyakas, 1996; Spector, 1996). Sabe-se que o SNC, pela mediação que exerce sobre as funções neurovegetativas durante o estresse, é capaz de influenciar a resposta do SI (Besedovsky et al., 1985; Blalock, 1994b; Weigent e Blalock, 1995; Fonseca, 2005). Desta forma, várias doenças, aparentemente desconectadas entre si, como infecções, asma, alergias, câncer, anorexia nervosa, doença de Alzheimer e esclerose múltipla podem ter uma etiologia neuroimunológica (Dinarello, Savage, 1989). Nesse contexto, foi demonstrado que, animais expostos a diferentes tipos de estresse são mais susceptíveis a infecções e tumores (Rabin, 1999).

Por outro lado, durante a década de 70, Hugo Besedovsky começou a avaliar a interação entre os sistemas neuroimunológico e endócrino. Em 1975, demonstrou que a imunização com diferentes antígenos era capaz de induzir mudanças neuroendócrinas e de atividade no SNC. Nascia então o outro braço da neuroimunomodulação: o estudo de produtos originários de processos imunológicos/inflamatórios sobre a atividade do SNC.

Há uma razão bioquímica clara para a ocorrência de interações entre o Sistema Nervoso e o Sistema Imunológico. Esses sistemas compartilham de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos (Blalock, 1984). Além disso, produtos originalmente tidos como específicos para cada um deles coexistem em tecidos

linfóides, endócrino e nervoso. Assim, por exemplo, há células linfóides produzindo ACTH e TSH (Blalock, 1984) e citocinas sendo produzidas no SNC (Basedovsky et al., 1986). A presença de receptores para citocinas no cérebro e a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) por citocinas pró-inflamatórias fornecem vias igualmente importantes, através das quais o sistema imunológico influencia a atividade neuroendócrina (Besedovsky et al., 1991; Blalock, 1994a; Kelley et al., 1994; Weigent e Blalock, 1997; Turnbull e Rivier, 1999). Essas observações reforçam a noção da existência de comunicações e relacionamento bidirecional entre o sistema neuroendócrino e imunológico (Madden, Felten, 1995).

Assim, a busca de um substrato molecular que suportasse e justificasse a interação entre os sistemas endócrino e imunológico foi, e continua sendo, foco de estudo de muitos grupos de pesquisa que trabalham em neuroimunomodulação; buscam, especificamente, entender a “sintaxe” da conversa entre esses dois sistemas (Blalock, 1994b). Já está bem aceito, nos dias atuais, que as células do sistema imunológico possuem β-adrenoceptores (Madden, Sanders, Felten, 1995), assim como o fato de que têm a capacidade de sintetizar alguns hormônios, entre eles o ACTH (Blalock, Harbour-McMenamin, Smith, 1995). Por outro lado, já se demonstrou que as citocinas como a IL-1 podem ser sintetizadas dentro do SNC, tendo ali importante papel em funções anteriormente descritas como sendo exclusivas do sistema nervoso como, modulação das emoções, de comportamentos e da memória (Schneider et al., 1998). Um trabalho de Costa-Pinto et al. (2005) mostrou amento de marcação fós em áreas do SNC relacionadas com o comportamento ansioso e com a emoção (como o núcleo paraventricular do hipotálamo e o núcleo central da amigdala) após um único desafio intranasal com OVA em camundongos tornados alérgicos ao antígeno.

As citocinas são produtos que regulam processos biológicos relevantes como inflamação, febre, proliferação e diferenciação celular, síntese de proteínas de fase

aguda, quimiotaxia, catabolismo, fibrose, ações antivirais e produção de outras moléculas, de citocinas e moléculas de adesão. Originam-se de diversas células, sendo as principais os macrófagos, os linfócitos, as células Natural Killer (NK), os monócitos, as células dendríticas, endoteliais e epiteliais, os fibroblastos e os astrócitos. Alguns representantes desta “família” de glicoproteínas são a IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon gama (INF-γ) (Fonseca, 2005).

Quando administradas *in vivo,* algumas citocinas, como IL-1 e IL-6, afetam a atividade do SNC. Neste sentido, o tamanho e a estrutura química das citocinas dificultam a difusão simples destas moléculas para o interior do SNC, através da barreira hemato-encefálica. Entretanto, existem sítios neurológicos no SNC que estão fora desta barreira, como por exemplo, o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e a área Préoptica (Poa) (Blatteis, 1992). Mais que isto, alguns autores têm descrito a existência de um sistema de transporte ativo para as citocinas no SNC (Banks; Kastin; Gutierrez, 1994). Uma vez no SNC, algumas citocinas exercem múltiplas funções, como indução de febre, sono de ondas lentas, anorexia, diminuição de motivação e do comportamento exploratório (síndrome conhecida como comportamento doentio) (Otterness et al., 1988; Dunn, Antoon, Chapman, 1991) e aumento da secreção de hormônio liberador de corticotrofinas (CRF) (Dunn, Antoon, Chapman, 1991).

O hipotálamo apresenta diversas conexões neurais com o sistema límbico, que está envolvido nos processos de adaptação e nas respostas neuro-endócrinas e emocionais ao estresse. A ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-adrenal (HHA) e a conseqüente liberação de ACTH e de glicocorticóides fazem parte das respostas neurovegetativas ligadas às situações de estresse e de ansiedade (Graef, 1989). A ativação do HHA pela IL-1, que pode ser produzida durante um processo inflamatório ou infeccioso passa, então, a ser considerada como uma situação capaz de induzir e potencializar o estresse ou a ansiedade desencadeados por estímulos ambientais ou físicos (Dunn, 1995).

Outra evidência da existência de comunicações entre o SNC e o SI foi inaugurada pelos trabalhos de Metalnikov e Chorine na década de 20. Estes trabalhos mostraram que o sistema imune poderia ser condicionado (Metalalnikov; Chorine; 1926, citado em Fonseca, 2005). Cara, Conde e Vaz, (1994) mostraram que era possível alterar a preferência de camundongos ao sabor doce se esse estímulo fosse pareado com um agente aversivo. Utilizando o mesmo modelo experimental de alteração de preferência ao sabor, Basso et al. (2004) mostraram que esta alteração era acompanhada tanto por um aumento da ansiedade mediada comportamentalmente como pela expressão de *c-fos* no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Estes autores ainda mostraram que o aumento da *c-fos* era dependente de imunoglobulina E. De fato, o uso de bloqueadores da IgE preveniu não só o aumento de *c-fos* no PVN, mas também a alteração de preferência ao sabor (Basso et al., 2003).

Trabalhos da literatura têm mostrado que o sistema imune adaptativo tem um papel importante nas funções cerebrais superiores. Neste particular, muito interessantes são os relatos sugerindo que a excessiva produção de IL-2 ou de seus receptores em linfócitos T esteja relacionada ao aparecimento de alguns dos sintomas da esquizofrenia (Maes et al., 1995; Kim et al., 1999), e que o tratamento por 8 semanas com haloperidol foi capaz de reverter a produção alterada dessa interleucina (Kim et al., 1999). Foi também demonstrado que, a deficiência em células T leva a prejuízos cognitivos, os quais podem ser revertidos com uma vacina feita com um agonista sintético de baixa afinidade de clones de células T auto-reativas (Kipnis et al., 2004).

Nesse contexto apesar de recente, enquanto área organizada do conhecimento, a neuroimunomodulação acumulou um corpo de dados e de conhecimentos suficientes para justificar a idéia agora inequívoca de que existem extensas relações entre os sistemas imunológico e neuroendócrino. Tais relações neuroimunes não devem ser desprezadas ou subestimadas em qualquer área de pesquisa da saúde, pois podem ser responsáveis

por fenômenos ainda pouco compreendidos, e considerados como anedóticos ou como artefatos em passado recente (Cohen, 2004; Maestroni, 2004). Quer nos parecer como já afirmado por Ader (2000) que o envolvimento de outras áreas da pesquisa ou da clínica com a psiconeurologia será mais intenso quando forem mais bem identificadas e manipuladas as variáveis que governam os processos imunoregulatórios.

2.2. ESTRESSE E FUNÇÃO IMUNE

Para começarmos a abordar o tema proposto neste item faz-se necessário uma definição da palavra estresse, uma vez que a mesma apresenta diversos significados. É relativamente comum ver o uso da palavra estresse empregado tanto para se referir ao estímulo estressor como à resposta induzida pelo estímulo estressor. Um estressor é qualquer estímulo (psicológico, físico ou imunológico) capaz de provocar uma resposta fisiológica de estresse, que pode ser mensurada pelo aumento dos níveis de glicocorticóides (cortisol no homem e corticosterona em camundongos) (Creel, 2001). As conseqüências desta resposta são geralmente adaptativas a curto prazo (Dhabhar, McEwen, 1996; 1997), porém podem ser prejudiciais quando o estressor se mantém por período crônico (Dhabhar, McEwen, 1997; McEwen, 1998).

Desta forma, podemos definir estresse como sendo uma condição complexa e dinâmica na qual a homeostase é alterada (Chrousos e Gold, 1992; Stratakis e Chrousos, 1995; Berczi, 1998). Esta alteração pode ser provocada por vários agentes estressores físicos e psicológicos, os quais têm um impacto significativo na resposta imune em geral (Khansari et al., 1990; Sternberg, 1997). Uma das vias pela qual o estresse pode influenciar a homeostase dá-se através de alterações no equilíbrio de vários hormônios, que podem ter um impacto significativo na resposta imunológia do organismo (Dantzer e

Kelley, 1989; Vollhardt et al., 1991; Sandi et al., 1992; Lysle e Coussons-Read, 1995; Stratakis e Chrousos, 1995; Dhabhar et al., 1996; McEwen et al., 1997; Elenkov et al., 1999). A inervação de órgãos linfóides primários e secundários pelo Sistema Nervoso Autônomo Simpático (Calvo, 1968; Felten et al., 1984; Tabarowski et al., 1996; Stevens-Felten e Bellinger, 1997; Miyan et al., 1998), a presença de receptores específicos para muitos fatores neuroendócrinos em células imunocompetentes (Weigent e Blalock, 1987; Blalock, 1994a) e a modulação da atividade dessas células por esses fatores, incluindo-se o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônios esteróides, opióides endógenos entre outros, constituem vias importantes através das quais o sistema neuroendócrino influencia as respostas imunológicas (Besedovsky et al., 1985; Blalock, 1994b; Weigent e Blalock, 1995).

A resposta ao estresse tem por objetivo coordenar a adaptação do organismo a alterações internas ou externas. Essa resposta inclui a liberação de CRH pelo PVN, que estimula a secreção de ACTH pela hipófise, produzindo a liberação dos glicocorticóides. Dessa forma, o principal componente desta resposta é o eixo HHA. No entanto, o caminho noradrenérgico/autonômico do *locus ceruleus* é também de grande importância. A ação destes dois sistemas é sinérgica. Enquanto as catecolaminas facilitam a obtenção de energia para os órgãos vitais, os glicocorticóides liberados pela adrenal funcionam como “hormônios anti-estresse”, ajudando a conter as reações neurais defensivas deflagradas pelo estresse. Entretanto, a falta de controle sobre a secreção de glicocorticóides representa uma ameaça à saúde e ao bem-estar do organismo (Fonseca, 2005). Por exemplo, a regulação inapropriada da resposta ao estresse já foi implicada na patogênese da asma, da hipertensão (McEwen, Stellar, 1993), da depressão, das desordens pós-traumáticas (Tagay et al., 2005) e da doença de Alzheimer (Landfield et al., 1991).

Existem vários estudos sobre os efeitos do estresse no sistema imune, alguns dos quais demonstram que o estresse afeta a distribuição e a migração de leucócitos, a produção de citocinas, a razão de células T CD4/CD8, além de inibir a produção de anticorpos, a atividade de macrófagos e de células “natural killer” (NK) e a resposta de linfócitos a mitógenos (Dhabhar et al.,1995; Dobbs et al., 1996; Bauer et al., 2000, Palermo-Neto et al., 2001, 2003; Fonseca et al., 2002).

Estudos clínicos e experimentais demonstraram que a exposição a várias formas de estresse altera a atividade de diferentes populações celulares comprometidas com a resposta imunológica, tais como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Chrousos, 2000). Considerando-se que todas as células do sangue derivam das células progenitoras da medula óssea, as quais proliferam e se diferenciam em resposta a vários fatores humorais, qualquer estímulo adverso capaz de influenciar o desenvolvimento destas células poderia resultar em alterações nas funções imunes. A importância das citocinas como mediadores de numerosos processos fisiológicos e patológicos e a demonstração das relevantes interações homeostáticas entre o cérebro e o sistema imuno-hematopoiético, têm estimulado estudos para identificar as implicações funcionais da modulação dos efeitos desses mediadores em eventos de imunossupressão induzida por estresse (Marx et al., 1998; Miyan et al., 1998; Elenkov et al., 1999). Neste sentido, são particularmente interessantes os trabalhos sobre a produção e ação de citocinas pró-inflamatórias nesses eventos. Evidenciou-se que IL-1, TNF-α e IL-6, separadamente ou sinergicamente, causam estimulação do eixo HHA *in vitro* (Perlstein et al., 1993). A IL-6 é considerada uma das principais citocinas endócrinas, provocando aumento nos níveis de ACTH e cortisol (Stratakis e Chrousos, 1995). Esta citocina possui amplo espectro de atividades e é um dos fatores reguladores positivos da hematopoese, atuando em sinergismo com a interleucina-3 (IL-3) (Ikebuchi et al., 1987). Evidências da literatura sugerem que a IL-3 medeia as interações entre os sistemas imune e hematopoético

comprometido com a geração das células granulocíticas e macrofágicas, responsáveis pela defesa e pelo reparo. Além disso, a IL-3 parece ser um mediador importante da resposta do sistema hematopoiético ao estresse (Bessler et al., 2000).

De forma geral, o estresse está relacionado à imunossupressão. Trinchieri et al. (1993) demonstraram que a exposição de ratos a um choque na cauda resultava em diminuição da proliferação de linfócitos em resposta ao mitógeno fitohemaglutinina, da citotoxicidade das células NK, da produção de IL-2 e IFNγ e da densidade de receptores para IL-2.

Alguns estudos mostraram que, peptídeos opióides são também fatores que estão envolvidos com o mecanismo do estresse. Como exemplo, o trabalho de Malacrida (1996) demonstrou que a administração de naloxona, a qual promove bloqueio dos receptores opióides, ocasiona uma reversão da mielossupressão causada pelo estresse, demonstrando claramente que essa mielossupressão é mediada principalmente por receptores opióides. Complementando esses dados, Fonseca (2005) conclui que é possível prevenir os efeitos do estresse pré-natal bloqueando o sistema opioidérgico durante a exposição das fêmeas grávidas ao estímulo estressor.

O mecanismo de ação dos opióides endógenos se dá, provavelmente, através da inibição da liberação de CRH por uma ação direta em neurônios presentes no PVN ou por outra, indireta, que se faria via redução do efeito estimulatório da Noradrenalina nesta região (Weinstock, 1997).

No entanto, é importante ressaltar que a severidade, o tipo de estresse (físico x psicológico) e a resposta comportamental emitida pelos animais em resposta ao agente estressor determinam a magnitude e a qualidade das alterações dos parâmetros celulares a serem medidos (Herman, Cullinan, 1997). Dessa forma, justifica-se a aparente contradição entre os resultados relatados acerca dos efeitos do estresse agudo ou crônico

(Moynihan, 1992) e físico ou psicológico (Palermo-neto et al., 2003) sobre a imunocompetência.

Neste sentido, acredita-se que as situações indutoras de estresse podem progredir dentro de uma linha contínua que vai desde os estressores físicos, de um lado, às complicadas condições que envolvem o estresse psicológico, de outro. Há pouca discordância entre os autores no que se refere aos processos que envolvem estressores de natureza física. Assim, por exemplo, o estresse físico por choques de 1mA aplicados nas patas de ratos, conforme utilizamos em nosso trabalho, não apresentará dificuldade em ser aceito como estressor. A contrapartida humana desta situação, poderia ser encontrada, segundo Lazarus e Cohen (1977) na vivência de um cataclisma, que afeta grande número de pessoas da mesma maneira. Já os chamados estressores psicológicos, devido à complexidade da situação envolvida (luto, confronto social, etc), podem variar mais em sua qualidade e intensidade de resposta que aquelas aos estressores físicos. De qualquer forma, é inegável que o estresse psicológico produz alterações de homeostase em animais de laboratório: medo condicionado e predictibilidade, conflitos, novidade, encontros agonísticos e comunicação emocional (Paré, Glavin, 1993).

Para a aplicação do estresse psicogênico em animais, utilizamos em nosso trabalho a “caixa de comunicação”. Este modelo foi inicialmente proposto por Kawasaki et al. (1978) e por Fuchimoto et al., (1973), que investigaram os efeitos de um estresse psicológico sobre o desenvolvimento de úlceras gástricas. Neste modelo, um choque com variada intensidade, é aplicado através de grades metálicas em um grupo de animais. Outro grupo de animais presenciam a aplicação do estímulo aversivo, isto é, não recebem o choque, mas recebem estimulações visuais, olfativas e auditivas dos animais que recebem o choque. Nesta condição, os animais estimulados aversivamente foram chamados de “*senders*” e aqueles que presenciam o choque de “*responders*”. O uso

deste procedimento mostrou o aparecimento de um elevado número de úlceras gástricas não apenas nos *"senders"*, mas também e, principalmente, nos "responders" (Ichimaru et al., 1980; 1984; Ichimaru, Gomita, 1987). O mais interessante foi a observação de que a incidência de úlceras gástricas foi maior nos "*responders*" (Fukushima et al., 1981). Análises adicionais conduzidas com este modelo mostraram que o turnover de noradrenalina no SNC estava aumentado não apenas nos "*senders*", mas também nos "*responders*", confirmando a presença de estresse nesses animais (Iimori et al., 1982).

Considerando-se a variabilidade que o estresse tem frente à resposta imune, é relevante dizer que as catecolaminas e os glicocorticóides produzem vários efeitos imunomoduladores que podem ser tanto imunoestimulantes como supressores (Elenkov et al, 2000). A maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre este assunto centra-se nos efeitos das catecolaminas sobre os linfócitos e indicam que elas exercem importante papel nas respostas Th1 e Th2. De modo geral, a maioria dos trabalhos indica que as catecolaminas promovem uma diminuição de citocinas Th1 e um aumento de citocinas Th2. Neste contexto, recordamos que o sistema nervoso autônomo simpático também se ativa na presença de estresse (Carrasco, Van de Kar, 2003). Uma ativação como esta tem, sabidamente, repercussões na periferia, em especial sobre a atividade de macrófagos peritoneais.

Neste sentido, o tratamento de animais adultos ou de células imunes com morfina muda o perfil de secreção de citocinas de Th1 para Th2. Quando se bloqueia a atividade opioidérgica com o uso da naloxona, a secreção de citocinas do tipo Th2 deixa de ser o padrão das células imunes, e por isso previne-se o efeito do estresse (Fonseca, 2005).

O mecanismo de modulação da atividade imune via glicocorticóide faz-se através de efeitos no balanço Th1/Th2. As respostas imunes são reguladas por células apresentadoras de antígenos, que são os monócitos/macrófagos, células dendríticas e outros fagócitos, que são os componentes da resposta imune inata, e por linfócitos das

subclasses Th1 e Th2, que compõem a resposta imune adquirida. As respostas Th1 e Th2 são mutualmente inibitórias, a IL-12 e o IFNγ (Th1) inibem respostas do tipo Th2 e a IL-4 e a IL-10 (Th2) inibem as respostas do tipo Th1, como em um prato de balança (Abbas, Murphy, Sher, 1996; Mosmann, Sad, 1996). Importante ressaltar que as citocinas IL-4 e IL-10 inibem a ativação dos macrófagos, a proliferação de células T e a síntese das citocinas pró-inflamatórias. Por isso, a IL-4 e a IL-10 são as principais citocinas anti-inflamatórias (Abbas, Murphy, Sher, 1996; Mosmann, Sad, 1996). O estresse via liberação de glicocorticóides, atua favorecendo as respostas do tipo Th2 (Iwakabe et al., 1998). A corticosterona atua sobre monócitos, macrófagos e células dendríticas, inibindo a produção de IL-12, TNFα e INFγ, e, consequentemente, a diferenciação dos linfócitos em Th1. Como resultado, as citocinas Th1 deixam de inibir aquelas citocinas importantes para a resposta Th2, e o “prato da balança” pende para a diferenciação dos linfócitos em Th2. Nesta situação, há uma diminuição da resposta imune celular concomitante com o aumento da resposta imune humoral, o que aumenta a susceptibilidade a alergias e a doenças auto imunes mediadas por anticorpos (Elenkov, Chrousos, Wilder, 2000). Por isso, e também por outros fatores, na dependência do parâmetro analisado, o estresse pode aumentar ou diminuir a resposta imune/inflamatória. Quando se avaliam respostas mediadas por anticorpos, a exposição ao estresse tende a aumentar esta resposta, por favorecer respostas do tipo Th2. Por outro lado, se a avaliação dos efeitos do estresse for feita sobre a imunidade celular, os resultados indicarão diminuição desta resposta (Elenkov, Chrousos, Wilder, 2000, Elenkov, 2000).

Além dos fatores físicos, também o estresse psicológico pode debilitar as defesas do hospedeiro contra patógenos externos, estimulando ou facilitando o desenvolvimento de tumores e de doenças neurodegenerativas (Khansari et al., 1990; Dobbs et al., 1993; Elenkov et al., 1999; Yang e Glaser, 2000; Conti, 2000; Palermo-Neto et al., 2003).

Um dado importante nesse sentido, é o de que animais que testemunham outros expostos ao estresse por choque inescapável também desenvolvem lesões gástricas e perda de apetite (Ogawa e Kuwahara, 1986; Ishikawa, et al., 1992). De fato, evidências da literatura sugerem que a secreção de vários neuropeptídeos no sistema vascular que supre o trato gastrintestinal e de prostaglandinas da mucosa estomacal fornecem uma ligação direta com o sistema imunológico, além do sistema neuroendócrino (Stratakis e Chrousos, 1995).

Foi também demonstrado que ratos expostos a um choque inescapável na cauda apresentavam função linfocitária diminuída, enquanto animais que tinham a possibilidade de escapar do choque não apresentavam qualquer alteração (Maier, Laudenslager, 1988). Palermo-Neto, et al., (2003) mostraram resultado semelhante. Neste trabalho, foi observado que a exposição dos animais a um estresse por choque inescapável, de natureza física, e um estresse de psicogênico (animais que testemunhavam o choque), apresentavam as mesmas respostas imunológicas (aumento no nível de glicocorticóides) e comportamentais (dentre elas, a diminuição da atividade locomotora), assim como diminuição no espraiamento e fagocitose e aumento no *burst* oxidativo de macrófagos e um maior crescimento do tumor ascítico de Ehrlich. Já os animais expostos aos choques escapáveis apresentaram apenas o aumento nos níveis de glicocorticóides. Propuseram, nesse sentido, que outros fatores estariam relacionados a essas respostas observadas nos grupos submetidos ao estresse físico por choque inescapável e psicogênico, sugerindo-se a participação de fibras nervosas autonômicas simpáticas e dos peptídeos opióides. Foi também demonstrado em outro estudo, um aumento nos níveis de 5-HT extracelulares do hipocampo ventral apenas nos animais submetidos ao estresse por choque inescapável, e não naqueles com possibilidade de controle do choque, (Amat et al., 1998), e o mesmo foi observado com relação aos níveis do hormônio T3 (Helmreich et al., 2005). Esses dados reforçam a idéia de que a habilidade de controlar ou escapar de

uma situação estressante é um fator crítico para as respostas comportamentais e imunes ao estresse (Amat et al., 1998; Palermo-Neto et al., 2003; Helmreich et al, 2005)

2.3 O SISTEMA HEMATOPOÉTICO

O sistema hematopoético é caracterizado por uma contínua produção de células que circulam através dos vasos sanguíneos e linfáticos sendo fundamental na manutenção do organismo desde a vida fetal até a senescência. Esta produção é dependente da proliferação e diferenciação das células progenitoras nos tecidos hematopoéticos. Nestes, as diversas linhagens são produzidas e cada uma delas tem sua própria dinâmica. Diante de estímulos aproriados, como nas infecções ou hemorragias, são induzidas alterações na produção para atender à demanda específica ou global das células para o organismo. Quando estes estímulos cessam, observa-se um efeito corretivo, e as diversas populações retornam às proporções que são estabelecidas pela homeostase (Lee et al., 1993).

Na vida embrionária e fetal a hematopoese ocorre em diferentes sítios do organismo. Na vida adulta, a principal fonte de células progenitoras é a medula óssea; neste ambiente, ocorre a maior parte da produção de células, que pode ser controlada em seus vários níveis. As etapas que abrangem a proliferação de uma célula progenitora até a diferenciação em uma célula madura, são dependentes de controles intrínsecos e extrínsecos ao ambiente medular. Neste sentido, as células do estroma, a matrix extracelular, as citocinas e até mesmo as células produzidas, desempenham importante papel na seqüência de eventos que se definem desde a produção até a saída das células deste ambiente.

Os mecanismos de regulação da hematopoese podem ser classificados como sendo “locais” ou “distantes” (Metcalf, 1981). Os primeiros referem-se à regulação por fatores do microambiente hematopoético (por exemplo, células do estroma, macrófagos, linfócitos T) e o último à regulação por substâncias de natureza hormonal (por exemplo, eritropoetina, timosina, hormônios do córtex adrenal, da tireóide) (Dorshkind, 1990; Goldberg et al., 1990). Vários fatores humorais são capazes de influenciar a hematopoese sob condições de estresse. Neste sentido, resultados obtidos pelo nosso grupo da UNICAMP assim como outros da literatura (Goldberg et al., 1990; Roy et al., 1991; Malacrida et al., 1997 a b; Justo et al., 2001; Queiroz et al. 2003; Souza-Queiroz et al., 2004) demonstraram alterações hematopoéticas em resposta a diferentes estímulos estressantes, as quais seriam mediadas pelo sistema neuroendócrino.

2.3.1 Células progenitoras hematopoéticas

As células progenitoras hematopoéticas são definidas como uma população heterogene e hierárquica. Estas propriedades estão relacionadas com o comprometimento para as várias linhagens e ao mesmo tempo com o potencial de auto-renovação destas células (Rosendall; Hodgson; Bradley, 1979). Considerando estas características podemos distinguir: células com capacidade de auto-renovação ilimitada e potencial para originar os demais progenitores, que são conhecidas como células tronco-hematopoéticas; progenitores multipotentes, que têm a capacidade de auto-renovação limitada e potencial de diferenciação restrito a duas ou mais linhagens; e células progenitoras linhagem-específicas que têm a capacidade de auto-renovação limitada em relação às anteriores e potencial de produção restrito a somente uma linhagem.

2.3.2 Células tronco-hematopoéticas (HSCs)

Tem sido atribuído a essas células a capacidade de manutenção da hematopoese durante toda a vida. Essa propriedade é dependente da ilimitada auto-renovação e ao mesmo tempo da capacidade de reconstituição dos demais progenitores.

As HSCs são raramente encontradas na circulação sanguínea. Na medula óssea, onde se localizam com maior freqüência, apresentam-se numa proporção de 1 para cada 10.000 células e uma taxa de proliferação muito baixa, coforme observações da biologia dessas células em animais irradiados ou tratados com agentes quimioterápicos (Boggs et al., 1982; Visser, vanBekkun, 1990; Bradford et al., 1997). O isolamento desta população envolve o uso de métodos de seleção que elimina as células diferenciadas e os demais progenitores. As HSCs estão presentes entre as células que expressam os marcadores de superfície celular: Sca-1 e Thy-1.1 ou o receptor c-Kit e não expressam alguns antígenos encontrados em células diferenciadas (CD4, CD8, CD3, CD5, B-220, Mac-1 ou Gr-1), por isso são consideradas Lin (Orlic et al., 1993; Yamamoto et al., 1996)

Os ensaios in vivo que buscam evidenciar as HSCs, utilizam a transferência de células progenitoras para animais previamente irradiados ou geneticamente modificados. A presença das HSCs entre as células é confirmada pela manutenção da hematopoese por um período maior que seis meses nestes animais recipientes. A transfusão somente de 30 células Sca 1 $^{+}$Thy1.1^{low}Lin^{-} em camundongos irradiados permite a reconstituição de todas as linhagens do sistema hematopoético. Eficiência de reconstituição comparável com aquela foi também obtida com transfusão de células com alta expressão para o receptor c-Kit e negativas para os marcadores de células diferenciadas (Orlic et al., 1993).

Os modelos *in vitro* utilizados para revelar as HSCs geralmente apresentam uma evidência indireta destes progenitores. Estes modelos são derivados do sistema de

cultura de longa duração de células da medula óssea e são utilizados para estabelecer a freqüência de HSCs em uma suspensão de células obtida de tecidos hematopoéticos (Dexter, Allen, Lajtha, 1977; Sutherland et al., 1989; Ploemacher et al., 1989; Lemieux et al., 1995). Nestes sistemas, as HSCs formam colônias na superfície de células aderentes de medula óssea após quatro a cinco semanas de cultivo. A freqüência do aparecimento destas colônias correlaciona-se com as células da medula que têm capacidade de reconstituição da hematopoese completa, quando transfundidas em animais irradiados (Ploemacher, 1991).

2.3.3 Células progenitoras hematopoéticas multipotentes

As células progenitoras multipotentes são provenientes da diferenciação das HSCs. As tentativas de isolamento de HSCs produziram parte dos métodos que hoje são utilizados para evidenciar estes progenitores.

Inicialmente o ensaio considerado para evidenciar as HSCs era a determinação de células formadoras de colônias no baço de camundongos (Colony forming Units – Spleen, CFU-S) (Till, McCulloch, 1961). Este método consiste na transferência de células do tecido hematopoético para animais previamente irradiados. As células progenitoras que colonizam o baço do animal inoculado formam colônias, que são quantificadas no 12º dia após a inoculação. Durante muitos anos este ensaio foi utilizado para o estudo de HSCs.

Os ensaios clonogênicos *in vitro* que permitem o isolamento de progenitores, os quais formam colônias de células mielóides e eritróides (colony forming units-mix – CFU-mix) (Johnson, Metcalf, 1977) ou constituídas por granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e macrófagos (Colony forming units – Granulocyte, Eritrocyte, Magacariocyte and Macrophage – CFU-GEMM), as colônias constituídas por células blásticas (Colony

Forming Units – blast –CFU-blast) (Nakahata, Ogawa, 1982), ou colônias de progenitores com alta taxa de proliferação (High Proliferative Potential – Colony Forming Units – HPP-CFC) (McNiece et al., 1986) revelam vários níveis de restrição para a produção de linhagens. Ensaios de subclonagens destes progenitores mostram que possuem limitada capacidade de auto-renovação (Moore, 1991).

2.3.4 Células progenitoras hematopoéticas linhagem-específicas

A produção de células sanguíneas maduras e linhagem-específicas, mostra que ocorre um fenômeno altamente regulado, abrangendo sucessivos estágios da diferenciação, durante a proliferação das células progenitoras multipotentes que termina com a produção de progenitores restritos para cada linhagem. Os estágios clonogênicos realizados pela imobilização dos progenitores em gel de ágar ou multicelulose e por diluição limitante em cultura líquida, vêm sendo utilizados no estudo desses progenitores (Bradley, Metcalf, 1966; Testa, Molineux, 1993) Nestes sistemas as células progenitoras isoladas proliferam e se diferenciam na presença de fatores de crescimento hematopoéticos, formando colônias constituídas por células de uma única linhagem. O número de células que cada progenitor produz é relativo ao grau de diferenciação em que se encontra entre os demais. Assim, quanto mais diferenciada for a célula progenitora, menor será o número de células totais produzidas. Cada célula progenitora pode gerar clones de até 10^5 células restritas à linhagem, que se diferenciam em células especializadas (Metcalf, 1989).

As células blásticas encontradas na medula óssea representam estágios finais da diferenciação dos progenitores linhagem-específicos. A partir de um número reduzido de divisões elas dão origem às células maduras (Willians et al., 1991).

2.3.5 O Conceito da cascata de diferenciação dos progenitores

A grande heterogeneidade morfológica e funcional das células sanguíneas e a existência de uma população homogênea de progenitores responsáveis pela origem de todo o sistema, demonstram que uma complexa rede de eventos se estabelece do início ao fim desse processo.

O programa de diferenciação das células progenitoras é determinado intrinsecamente. No entanto, uma variedade de estímulos externos pode influenciar na definição e diferenciação das linhagens. Esses estímulos geram sinais para a expressão de fatores de transcrição, os quais ativam conjuntos de genes que são responsáveis pela escolha de linhagens, por diversos fenótipos da maturação, ou para a progressão do ciclo celular (Shivdasani, Orkin, 1996).

Os fatores externos e intrínsecos, que dirigem a diferenciação, permitem que várias alternativas se estabeleçam no sistema a fim de atender a demanda específica ou global das células produzidas. Esta plasticidade sustenta a hematopoese durante toda a vida.

2.3.6 Citocinas reguladoras da hematopoese

A hematopoese está sob a influência de grande variedade de citocinas, as quais são produzidas ao nível medular ou em tecidos periféricos. A produção destas citocinas pode ser aumentada por reações imunológicas, hemorrágicas e até mesmo por produtos de agentes infecciosos (Cheers, Haigh, Kelso, 1988; Nicola, 1989; Shieh, Peterson, Moore, 1994).

Os fatores estimuladores de colônias (Colony Stimulating Factors – CSFs) são os mais estudados no sistema hematopoético. Eles foram inicialmente encontrados em meio

de cultura condicionado, que são obtidos pelo cultivo de linfócitos ativados, linhagens celulares e tecidos. São assim denominados por sua ação sobre as células progenitoras que, imobilizadas em sistemas de cultivo, geram colônias. Estes fatores foram isolados e seus genes clonados. A partir destes avanços suas atividades biológicas vêm sendo estudadas *in vitro* e *in vivo.* Eles representam um grupo de glicoproteínas que regulam a produção e também a atividade funcional de células maduras (Nicola, 1989).

Os efeitos estimulantes ou inibidores sobre a hematopoese são induzidos pela ação direta ou indireta de citocinas sobre as HPCs. Esta regulação pode ocorrer ao nível de expressão gênica de receptores membranares, das enzimas de degradação, dos elementos da matrix estracelular, das moléculas de adesão e outros níveis de controle da hematopoese (Nicola, 1989).

2.3.7 Receptores de citocinas e diferenciação de progenitores

As respostas celulares induzidas por citocinas são dependentes da disponibilidade de seus respectivos receptores na superfície celular. A associação de uma citocina com o seu receptor específico no meio extracelular aumenta a complexidade da regulação que essas citocinas apresentam no organismo (Gordon, 1991).

Têm sido identificados receptores específicos de alta afinidade para os fatores hematopoéticos em linhagens celulares, tecidos normais e células leucêmicas da linhagem mielóide. Os receptores do fator estimulador de colônias de macrófagos (Macrophage – Colony Stimulating Factor, M-CSF), são essencialmente restritos a células da linhagem monocítico-macrofágica, possivelmente com poucos receptores em alguns neutrófilos, centenas em monócitos e seus precursores e milhares em macrófagos ativados (Nicola, 1989). Similarmente, os receptores para o fator estimulador de colônias de granulócitos (Granulocyte – Colony Stimulating Factor, G-CSF) são predominantes

nas células da linhagem dos granulócitos/neutrófilos, com pequeno número de receptores em monócito/macrófagos e de acordo com o estágio de diferenciação dos neutrófilos pode atingir centenas por células (Nicola, Begley, Metcalf, 1985; Nicola, Metcalf, 1986) Por outro lado, os receptores para o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (Macrophage and Granulocyte – Colony Stimulating Factor, GM-CSF) e IL-3 são mais uniformemente distribuídos em neutrófilos e monócitos ou macrófagos e geralmente diminuem para centenas ou menos por célula ao se tornarem maduras (Nicola, Metcalf, 1986; Nicola, 1987).

A estrutura dos receptores para as citocinas promove a base da redundância funcional entre elas. Os receptores de alta afinidade são constituídos de subunidades múltiplas. Um grupo de citocinas, que apresentam funções similares em determinada célula alvo, compartilha um componente comum, essencial na transdução de sinais. Inclui-se neste contexto a resposta induzida por IL-3, GM-CSF e IL-5; outro grupo de citocinas que compartilham o mesmo receptor é constituído por IL-6, LIF (Leukemia Inhibitor Factor – Fator Inibidor de Leucemia) e IL-11; e possivelmente a IL-13 e a IL-4 também partilham receptores (Lopez et al., 1992; Miyajima et al., 1993).

A ocupação de um grupo de receptores por um fator correspondente pode influenciar o comportamento destes receptores para outros fatores na mesma célula, isto é, o receptor de um determinado fator pode ser modulado por outros fatores (Walker et al., 1985; Horiguchi, Earren, Kufe, 1987; Jacobsen et al., 1991).

A **Figura 1** mostra uma representação esquemática do Sistema Hematopoético e de alguns fatores que nele atuam.

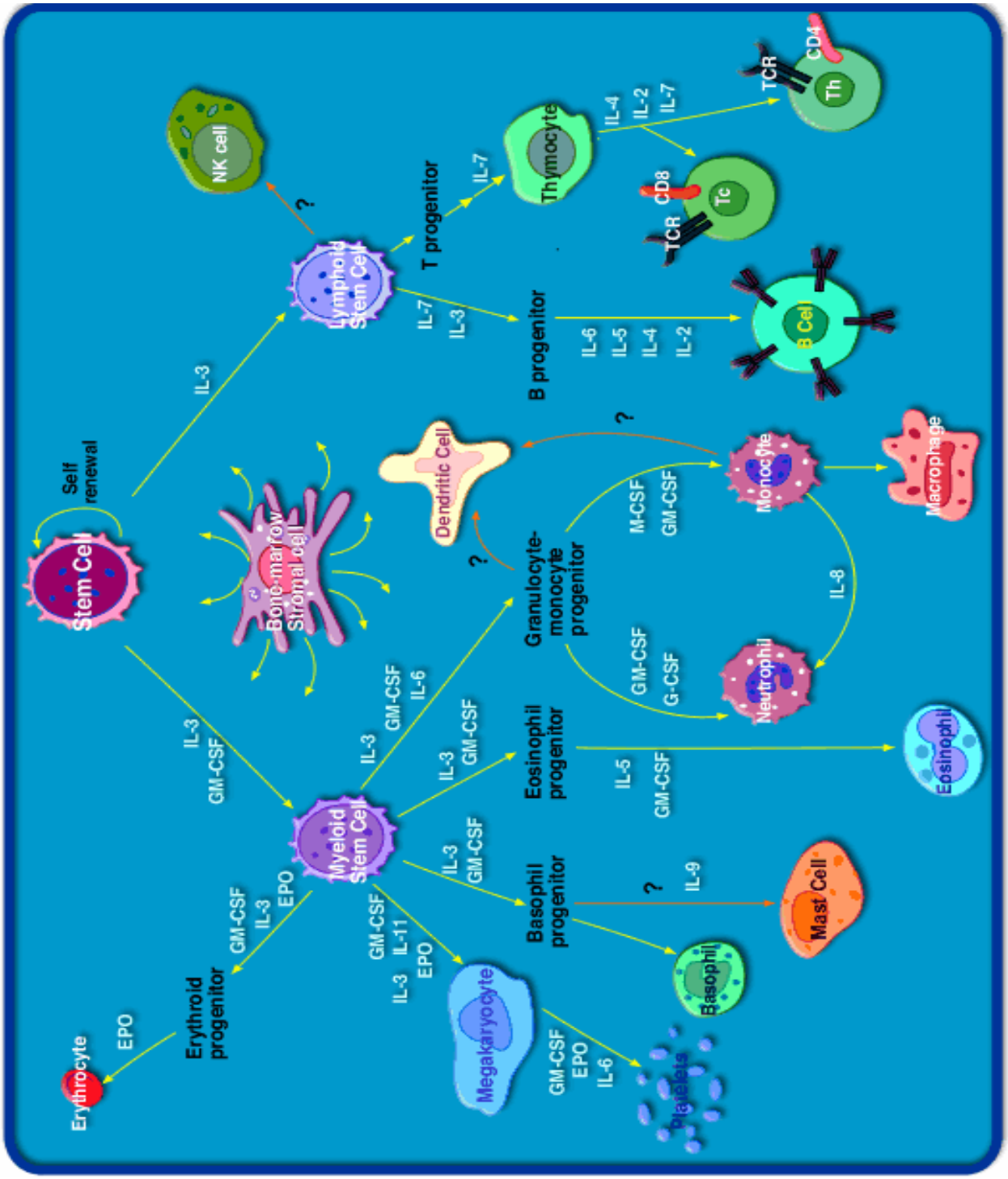


Figura 1: Representação esquemática do Sistema hematopoético.

2.4. *CHLORELLA VULGARIS*

A Chlorella vulgaris (CV) é uma alga verde unicelular, empregada como complemento alimentar há mais de 30 anos no Japão e em outros países. Essa alga é considerada um modificador da resposta biológica, como demonstrado pela sua capacidade de aumentar as defesas do hospedeiro contra infecções virais e bacterianas em camundongos normais e imunossuprimidos (Tanaka et al., 1986; Hasegawa et al., 1994, 1995; Dantas e Queiroz, 1999). O estudo das atividades antitumoral e antimetastática demonstrou que frações ricas em glicoproteínas extraídas da CV são particularmente importantes para aumentar as defesas do hospedeiro, sem afetar diretamente as células tumorais (Tanaka et al., 1998).

Tanaka et al. (1997), analisaram o efeito protetor da *C. vulgaris* no modelo de úlcera péptica induzida por estresse de contenção e frio em ratos. Segundo estes autores, o efeito antiulcerogênico da CV seria mediado pelo aumento das defesas do hospedeiro, envolvendo a participação das células T e/ou macrófagos, através da ativação do eixo neuro-imuno-intestinal. Tal hipótese estaria relacionada às observações de que a administração oral da alga aumenta a resposta antitumoral mediada por células T (Tanaka et al., 1990) e a produção das citocinas inflamatórias IL-1β, TNF-α e IL-12 por macrófagos ativados nas infecções oportunistas (Hasegawa et al., 1997).

Hasegawa et al. (2000) demonstraram que o extrato rico em glicoproteínas da *C. vulgaris* é capaz de prevenir a imunossupressão induzida por estresse psicológico em camundongos, reduzindo significativamente o número de timócitos, neutrófilos e células do baço em apoptose. Embora IL-1β ative o eixo HHA e a liberação de glicocorticóides, o tratamento com o extrato da alga suprimiu a elevação nos níveis de corticosteróide após o estresse psicológico. Este efeito, aparentemente contraditório, foi interpretado como sendo consequência da produção de IL-1α e TNF-α induzida pelo extrato da alga, as

quais inibem a síntese de glicocorticóides pelo córtex adrenal. Ademais, a IL-1α também reduz a translocação e a função dos receptores de glicocorticóides (Hasegawa et al., 2000). Como amplamente apresentado, o eixo HHA e o sistema imunológico atuam de forma coordenada no estado fisiológico. Durante uma infecção aguda, citocinas pró-inflamatórias induzem glicocorticóides pela estimulação do eixo HHA e este hormônio pode proteger o hospedeiro contra doenças mediadas pelas citocinas (Ruzek et al., 1999).

As células fagocíticas possuem um papel fundamental na expressão das atividades antitumoral e antibacteriana da *C. vulgaris*. Resultados sugerem que estes efeitos estão relacionados à estimulação da geração destas células nos órgãos hematopoéticos (precursores comprometidos com a série granulocítica-macrofágica – CFU-GM) e à ativação de suas funções efetoras por esta alga (Hasegawa et al, 1989; Konishi et al., 1990; Hasegawa et al, 1994; Dantas e Queiroz, 1999; Justo et al., 2001). A proteção contra infecção por *Escherichia coli* observada em animais imunossuprimidos tratados com a CV corrobora estes estudos (Konishi et al., 1990; Hasegawa et al., 1990). Em trabalho recente demonstrou-se a capacidade que tem a CV de aumentar a resistência de camundongos expostos ao chumbo e infectados com a bactéria *Listeria monocytogenes* (Queiroz et al., 2003). Uma das alterações induzidas pelo chumbo, na presença da *L. monocytogenes*, é a produção elevada de interleucina-6 (IL-6). O aumento nos níveis desta citocina parece estar relacionado ao aumento da concentração de hormônios glicocorticóides, pela ativação do HHA, secretados em resposta aos mecanismos de defesa ativados pelo estresse (Fukata et al., 1993; Kishikawa et al., 1997).

Nossos resultados anteriores mostraram tanto um efeito mieloprotetor da CV como um estímulo na produção de fatores estimuladores de colônias (CSFs) no soro de animais submetidos ao estresse agudo de contenção e frio (Souza-Queiroz et al., 2004), corroborando dados da literatura sobre a capacidade da *C. vulgaris* de modular a

hematopoese (Konishi e al., 1990; Vacek et al., 1990; Dantas e Queiroz, 1999). Esses efeitos foram interpretados tomando-se como base trabalhos da literatura (Hasegawa et al., 1997, 2000) que sugerem um aumento na produção de GM-CSF, IL-1α, IL-12 e TNF-α por macrófagos, após a administração da *C. vulgaris*.

Informações adicionais sobre os mecanismos que afetam a hematopoese foram obtidas *in vivo* com o emprego da cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC); esta cultura é tida como um modelo *in vitro* deste órgão para o estudo das interações entre as células progenitoras hematopoéticas e as células do estroma (Dexter et al., 1977). Nesta cultura a sobrevivência, proliferação, diferenciação e auto-renovação das células progenitoras é totalmente dependente da formação de uma camada de células aderentes, derivadas das células do estroma da medula óssea, provavelmente devido à combinação de vários fatores que incluem moléculas de adesão celular, comunicação intercelular, síntese, secreção e apresentação pelas células do estroma de concentrações apropriadas de fatores de crescimento estimuladores e inibitórios, além da síntese de moléculas da matriz extracelular. Nossos resultados (Souza-Queiroz, artigo em preparação) demonstraram que células da medula óssea de camundongos expostos ao estresse são capazes de formar um estroma confluente, mas com diminuição da celularidade, e reduzido potencial clonogênico em relação à cultura controle. Além disso, poucas áreas de hematopoese ativa ("cobblestone") foram observadas nessas culturas. A *C. vulgaris* foi capaz de reverter esse efeito. Inúmeros sítios de hematopoese ativa foram observados no estroma das culturas de células provenientes de animais tratados com a alga, estressados ou não (Souza Queiroz et al., artigo em preparação). O efeito radioprotetor da *C. vulgaris* também foi estudado utilizando-se o modelo de transplante de células da medula óssea em camundongos letalmente irradiados (Till, McCulloch, 1961), através da avaliação do aumento no número

e na capacidade proliferativa de CFU no baço (CFU-S) e de CFU-GM da medula óssea de animais tratados (Souza Queiroz et al., artigo em preparação).

2.5 MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR *LISTERIA MONOCYTOGENES*

A *Listeria monocytogenes* (LM) é um bacilo gram-positivo, de replicação intracelular (North et al., 1997). Tornou-se um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos na década de 80, devido à eclosão de diversos surtos de listeriose (Schlech, 1996). Os indivíduos com risco potencial de infecção são gestantes, recém-nascidos, idosos e imunossuprimidos (McLauchlin, 1996).

A listeriose tem sido o modelo experimental de infecção mais utilizado em camundongos para identificar e estudar os mecanismos envolvidos na defesa antimicrobiana não humoral. É um modelo de fácil manipulação onde respostas definidas podem ser obtidas dentro de poucos dias (Mackaness 1969; Kaufmann, 1995; Unanue, 1997b; Poros – Gluchowska, 2003), além de não produzir risco potencial para o manipulador (Czuprynski, 1997).

Ao entrar em contato com o organismo, a bactéria deixa rapidamente a corrente sanguínea, alojando-se preferencialmente em células hepáticas e macrófagos (Czuprynsky, 1997; Mocci et al., 1997; Guleria I, 2001). Após ser fagocitada, a LM produz uma listeriolisina O, que rompe o fagossoma da célula, permitindo sua saída para o citoplasma, onde ocorre a replicação e conseqüente migração para a célula adjacente, dando início à sua disseminação (Milon, 1997; Nomura, 2002).

A destruição destes hepatócitos infectados permite a exposição da LM no compartimento extracelular, tornando-a susceptível ao ataque de neutrófilos e macrófagos

(Conlan, 1994; Mocci et al., 1997; Milon, 1997; Unanue 1997b; Edelson, 2000; Guleria I, 2001; Nomura, 2002).

Neste sentido, o primeiro componente envolvido na resistência à LM é o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, promovendo a lise de células infectadas abortando o espalhamento célula-célula da LM no fígado (Conlan, 1994; Edelson, 2000).

Os macrófagos residentes por sua vez, assim como outras células infectadas liberam GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-12 e TNFα (Unanue, 1997c; Kuhn, 1997). Estas duas últimas citocinas atuam sinergicamente estimulando a liberação de IFNγ pelas células NK. O IFNγ promove a ativação dos macrófagos, tornando-os listericidas através da produção de óxido nítrico e de reativos de oxigênio (Czuprynsky, 1997; Unanue 1997c; Suzue, 2003).

A destruição da LM pelos macrófagos resulta na apresentação de antígenos às células T $CD4^+$ e $CD8^+$, aumentando assim a atividade antimicrobiana e promovendo eventualmente a imunidade de extermínio (Jensen, 1997; Bouwer, 1997; Pamer 1997; Flesch, 1998).

Na fase inicial da infecção, a migração de fagócitos da medula óssea para o sítio de replicação da bactéria é crucial para a sobrevivência do animal, limitando a multiplicação bacteriana (Wing, 1985). Como já salientado, os neutrófilos e macrófagos são células derivadas dos progenitores pluripotenciais da medula óssea (CFCs – células formadoras de colônias) que crescem e diferenciam-se na presença de fatores de crescimento específicos (CSFs) (Metcalf, 1986; Kayashima, 1993). Animais geneticamente resistentes à *L. monocytogenes* apresentam um aumento precoce no influxo de fagócitos para o sítio da infecção em conseqüência de um maior número de precursores hematopoéticos presentes na medula óssea dos mesmos em relação a uma linhagem susceptível, que apresenta uma mielossupressão nas primeiras 24 horas após a

inoculação da bactéria (Cheers e Mackenzie, 1978; Cheers e Stanley, 1988). Isto indica que a pronta mobilização dos precursores de granulócitos e macrófagos representa um papel importante no controle da infecção nos seus estágios iniciais.

O sucesso para resolução da listeriose, no entanto, requer a participação dos mecanismos de imunidade celular inata e adquirida, envolvendo neutrófilos, macrófagos, células NK, linfócitos T e uma grande seleção de citocinas (Harty, 1996).

A resposta das células T $CD4^+$ é do tipo Th1, induzida pelo IFNγ liberado pelas células NK e também pela IL-12 (Unanue 1997b; Song et al., 1995). As células Th1 ativadas sintetizam mais IFNγ, amplificando a resposta dos macrófagos, IL-2, TNFα, GM-CSF e moléculas de adesão (North et al., 1997). As células T $CD8^+$ lisam as células infectadas, liberando a bactéria para o ambiente extracelular, favorecendo a fagocitose. Estas células exercem esta função através das enzimas perforina e granzima (Edelson e Unanue, 2000). Induzem, também, a apoptose através da interação da proteína Fas-ligante com Fas na célula alvo (Kagi et al., 1996). Os linfócitos T γ/δ, por sua vez, participam do mecanismo de resposta a listeriose estimulando também a secreção de IFNγ contribuindo desta forma para a manutenção da resposta do tipo Th1 (Ferrick, 1995; Fargeas, 1992).

O IFNγ possui papel essencial na listeriose, assim como em outras infecções intracelulares, sendo responsável pela ativação dos macrófagos (Kaufmann, 1995; Unanue, 1997b; Bouwer et al., 1997) e pela prevalência da resposta Th1 (Mielke et al., 1993). A IL-1 é outra citocina importante que favorece a quimioatração de neutrófilos para o fígado, além de atuar sinergicamente com a IL-12 aumentando a produção de IFNγ (Unanue, 1997b). A IL-6 atua na produção de colônias de granulócitos e na manutenção da viabilidade de neutrófilos maduros (Harty et al., 1996., Mocci et al., 1997). Ao contrário das citocinas relacionadas anteriormente, a IL-10 inibe a produção de IL-12 que culmina na redução da ativação dos macrófagos e na morte dos animais devido à disseminação

descontrolada da infecção (Unanue, 1997 b e c). Portanto, a listeriose experimental induz quase que exclusivamente uma resposta de células Th1, com pouca interferência na ativação de Th2, podendo, desta forma, ser utilizada como modelo para estudos do mecanismo de ação de substâncias imunomoduladoras.

O nosso grupo de pesquisa na UNICAMP vem utilizando com sucesso este modelo de infecção para a investigação da atividade imunomoduladora de diversos compostos de origem natural ou sintética sobre os vários componentes da resposta imunológica do hospedeiro envolvidos na defesa contra a LM (Quadros et al., 1999; Dantas et al.,1999; Queiroz et al., 2000; Melo, Justo e Queiroz et al., 2001; Queiroz et al., 2001, 2003). A reversão da mielossupressão, o aumento na atividade das células NK e a elevação dos níveis de IFNγ são parâmetros constantes que vêm sendo observados sempre em paralelo ao aumento no tempo ou na taxa de sobrevida dos animais com todos os compostos até agora testados que apresentaram atividade antibacteriana.

2.6 ESTUDO SOBRE CITOMETRIA DE FLUXO E NEUTRÓFILOS

2.6.1 Princípios básicos sobre citometria de fluxo

Citometria de fluxo é uma técnica que mensura e analisa simultaneamente as múltiplas características de partículas simples, geralmente de células, suspensas em um sistema de fluxo desenvolvido de forma tal a permitir que estas células passem por um foco de luz (laser). Quando as células passam por esse foco de luz, sua imagem (sombra) e sua fluorescência são registradas por um leitor óptico. Estas são, posteriormente, enviadas para um sistema eletrônico que converterá o sinal óptico recebido em outro, eletrônico, que possibilita a leitura dos dados por um computador. Outra importante

característica da citometria de fluxo é o fato de que as células são analizadas individualmente.

Dentre os paramentros possíveis de serem medidos por citometria de fluxo, citam-se o tamanho, a granulosidade, a complexidade interna e a fluorescência relativa das células. Esta capacidade de medir múltiplos parâmetros celulares pela incidência de luz, e também, por fluorescência, torna possível separar fisicamente subpopulações celulares. Devido a isto, o uso da citometria de fluxo como um intrumento de diagnóstico tem aumentado muito nos últimos anos, quer em biologia, quer em medicina. Suas aplicações têm sido numerosas, permitindo a realização de pesquisas verticalizadas em diversos parâmetros celulares como: quantidade de ácidos nucléicos, atividade enzimática, fluxo de cálcio, potencial de membrana e pH. Além disso, também é possível usar fluorocromos ligados a anticorpos mono e policlonais para estudar a densidade, a função e a distribuição de células e de receptores.

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

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

O citômetro de fluxo, como se vê na figura 2 é composto basicamente por 3 sistemas principais: um sistema fluídico, um sistema óptico e um sistema eletrônico.

Figura 2 – Citômetro de fluxo modelo FACScalibur de Becton Dickinson acoplado a um computador Macintoch (G4) da Apple utilizado no presente trabalho para avaliar a atividade de neutrófilios. As setas indicam: 1- Local de injeção da amostra, 2- Painel de controle do citômetro e 3- Obtenção dos gráficos dos dados adquiridos. Figura retirada da tese de Alves, 2005.

- O sistema fluídico consiste de um fluxo de única direção que pode ser chamado de bainha e que controla a direção e regula o fluxo e a velocidade das células através do foco de luz.
- O sistema óptico é composto por um laser que pode ter diferentes comprimentos de onda, sendo o mais comum, aquele que usa o comprimento de onda de 480nm. Além disso, há também um conjunto de filtros ópticos para focalizar e direcionar a luz.
- O sistema eletrônico é responsável por converter o sinal óptico em um sinal eletrônico que será analisado por um computador.

Dentro do sistema óptico existem 2 parâmetros, denominados canais ópticos, para análise das células que são de grande importância. Estes são o “Forward Scatter” (FSC), usado quando o feixe de luz que passa pela célula é detectado por um sensor posicionado horizontalmente, indicando o tamanho da célula, e o “Side Scatter” (SSC), usado quando o feixe de luz, após incidir sobre a célula, é projetado sobre sensores posicionados perpenticularmente ao laser, indicando a granulosidade da célula. Apesar de existirem canais de fluorescência, estes dois canais não dependem desta. O aparelho utilizado neste trabalho possui 3 canais de fluorescência, permitindo a análise de 5 parâmetros para cada evento simultaneamente, sendo o FSC, SSC e outros 3 ligados aos canais de fluorescência. Para se verificar a fluorescência é necessária a utilização de fluorocromos. Dentre os mais comuns, podem ser citados o isoticianato fluorescente (FITC), que emite uma fluorescência verde e a phicieritrina (PE), que emite uma fluorescência vermelha.

Outro exemplo de análise que pode ser efetuada por esse aparelho é a da fagocitose de células imunológicas. Nesse sentido, o *burst* oxidativo expresso na geração de peróxido de hidrogênio por macrófagos e neutrófilos estimulados pode ser monitorado

quantitativamente por citometria de fluxo usando como reagente o 2´7´ diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), o *Staphilococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo (PI) e o miristato-acetato de forbol (PMA) (Hasui, Hirabayashi; Kobayashi, 1989). Keton e Brandt (1965), citado em Alves, 2005, descreveram originalmente um método fluorométrico para a mensuração do peróxido de hidrogênio em solução aquosa. Este método é baseado na oxidação do DCFH-DA não fluorescente, pelo peróxido de hidrogênio e pela peroxidase, que o transforma em um composto fluorescente que não pode se difundir para fora da célula. Por esta razão, é possível detectar a oxidação do DCFH-DA nos neutrófilos e macrófagos usando análises unicelulares pela citometria de fluxo.

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

Em nosso laboratório, a técnica de citometria de fluxo já foi usada para avaliar o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais ou de neutrófilos em vários trabalhos (Palermo-Neto, 2003; Silva, 2003, Stankevicius, 2004, Costa, 2004, Alves, 2005, Fonseca, 2005).

2.6.2 Neutrófilos

Os neutrófilos correspondem aproximadamente metade dos leucócitos circulantes em muitas espécies animais; são diferenciados de outros polimorfonucleares por apresentarem núcleos multilobulados e grânulos citoplasmáticos distintos. Esses incluem grânulos primários ou azurófilos, secundários ou específicos e grânulos terciários, os quais contém enzimas, proteínas e glicosaminoglicanas que se acredita participarem de muitas de suas funções (Hellewell, Williams, 1994). Em esfregaços de sangue, os grânulos dos neutrófilos não se apresentam nem azuis, como os dos basófilos, nem vermelho-alaranjados, como os dos eosinófilos, daí o nome que receberam: neutrófilos (Bainton, 1988).

De uma maneira geral, os neutrofilos, juntamente com os macrófagos, exercem um papel importante na defesa orgânica contra microorganismos, sendo a migração desta célula dentro dos tecidos considerada como crucial e de grande importância para a sobrevivencia dos mesmos (Lehrer et al., 1988). Animais “depletados” experimentalmente de neutrófilos circulantes mostraram-se incapazes de combater bactérias gram-negativas presentes em seus pulmões (Rehm et al., 1980).

Os neutrófilos podem ser atraídos quimiotaticamente por bactérias e por corpos estranhos presentes na área de inflamação, além de mastócitos e basófilos. Em seguida ocorre a fagocitose e em conseqüência desta, os microorganismos fagocitados são mortos por proteínas citotóxicas derivadas de grânulos citoplasmáticos e/ou produção local de espécies reativas de oxigênio (Stites, Terr, 1991). Sabe-se que estas células também estão envolvidas na produção de citocinas (por exemplo, de IL-1, IL-6 e TNFα) e que modulam os efeitos de linfócitos T e B (Lloyd, Oppenhein, 1992). Portanto é possível concluir que os neutrófilos tenham duas funções relacionadas à resposta imune

inflamatória: uma função ligada à fagocitose e à desgranulação e a outra relacionada com a liberação de citocinas imunomodulatórias.

A ligação de partículas a receptores específicos localizados na superfície da célula é o primeiro passo para a fagocitose. Inúmeros caminhos de transdução intracelular foram identificados, incluindo-se a ativação das Tirosinas Kinases, o que leva à fosforilação de receptores e de outras proteínas recrutadas no foco da fagocitose (Kwitkowska, Sobota, 1999).

É de amplo conhecimento que os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil, ânion superóxido e o oxigênio *singlest* (Pick, Mizel, 1981; Badwey, Karnovsky e Tauber, 1983) estas são produzidas *in vivo* durante o metabolismo de células aeróbicas ou são produto de secreção de fagócitos ativados (Badwey, Karnovsky e Tauber, 1983; Root, Metcalf, 1975). Em ambos os casos resultam de uma seqüência de reações bioquímicas em que ocorre alto consumo de oxigênio conhecidas como *burst* oxidativo.

As espécies reativas de oxigênio geradas por neutrófilos desempenham um papel importante como oxidantes microbicidas, ou como mediadores da inflamação e da lesão tecidual. Uma vez estimulados, a maior parte de oxigênio consumido por neutrofilos é convertida em ânion superóxido pela enzima NADPH oxidade. A produção das espécies reativas de oxigênio inicia-se com a redução do oxigênio e superóxido, com a NADPH atuando como doador de elétrons. Desta maneira, a produção de NADPH constitui etapa limitante do processo de produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos. (Babior, 1995).

O ânion superóxido produzido sob estímulo de neutrófilos é rapidamente convertido em H_2O_2 e radical hidroxil (Allen, 1982), que contribuem para a atividade microbiana dentro do fagolisossomo e no meio extracelular. A quantidade de H_2O_2 produzida no fagolisossomo de neutrofilos não é suficiente para eliminar totalmente as

bactérias e os outros microorganismos. Contudo, a enzima mieloperoxidase (MPO) produzida nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos quando combinada com H_2O_2 gera hipoclorito que apresenta uma atividade microbiana mais eficaz. Assim, uma das técnicas utilizadas para análise de atividade neutrófilica é a mensuração da atividade da MPO, pois vários trabalhos já demonstraram que o sistema dependente dessa enzima é mais eficaz contra bactérias, fungos e parasitas do que aquele relacionado à ação dos radicais de oxigênio sozinho (Oda et al., 1995).

A mensuração dos níveis de liberação de peróxido de hidrogênio é considerado como um parâmetro relevante da avaliação da ativação de fagócitos (Nathan, 1978; Root, 1975). Esta mensuração pode ser realizada através da oxidação do “phenol-red” dependente de peroxidase (Horseradish peroxidase-HRPO), sendo este método utilizado, por exemplo, para análise da ativação de células da cavidade peritoneal (Pick, Mizel, 1981; Robinson, Badwey, 1994).

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

Através da produção de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase-desmutase, os neutrófilos protegem-se dos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio. Além disso, também produzem compostos antioxidantes como as vitaminas E e C (Cheson et al., 1976; Halliwell, Gutteridge, 1989; Pereira et al., 1995)

Com relação ao papel imunoregulatório dos neutrófilos, é possível relacionar essa atividade com a produção de IL-1 por estas células (Tiku et al., 1986; Dinarello, 1991; Lord et al., 1991). A IL-1, que possui inúmeras atividades biológicas, também é produzida por polimorfonucleares (PMN) em duas formas, a IL-1α e a IL-1β.

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

Os neutrófilos circulantes também sintetizam e liberam outras citocinas imunoregulatórias tais como TNFα (Dubravec et al., 1990) e GM-CSF (Lindemann et al., 1989) em resposta à estimulação com LPS. A produção pelos neutrófilos de TNFα e de IL-1 pode ter funções regulatórias, principalmente na formação do edema inflamatório, devido ao aumento da permeabilidade vascular induzido por estas citocinas (Abe et al., 1990).

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

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

Os neutrófilos têm sua atividade modulada pelo eixo HHA e pela atividade dos SNAS em situações de estresse e ansiedade.

3.OBJETIVOS

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

3.1. HIPÓTESE

Tendo em vista o efeito protetor da suspensão da alga *C. vulgaris* em diversas situações, como mencionado no escopo desse projeto, formulou-se a seguinte hipótese de trabalho: "A suspensão da alga *C. vulgaris* tem um efeito protetor sobre a mielopoese e atividade funcional de neutrófilos em animais submetidos ao estressor agudo físico, (choque inescapável / escapável) e psicogênico e inoculados com doses letal e sub-letal da bactéria *Listeria monocytogenes*"

Os objetivos que seguem procuram avaliar essa hipótese.

3.2. OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito imunoprotetor da *C. vulgaris*, em animais infectados com a bactéria *Listéria monocytogenes* e submetidos aos estressores agudos físicos e psicogênico.

3.3.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os seguintes parâmetros serão avaliados:

- Efeito da exposição à estressores agudos físicos (choques inescapáveis e escapáveis) e psicogênico sobre o crescimento de precursores hematopoéticos da medula óssea de ratos e sua diferenciação em granulócitos e macrófagos;

- Efeito do tratamento com a *C. vulgaris* sobre o crescimento de precursores hematopoéticos da medula óssea e sua diferenciação em granulócitos e macrófagos em ratos submetidos à estressores agudos físicos (choques inescapáveis e escapáveis) e psicogênico;

- Efeito do tratamento com a *C. vulgaris* sobre o crescimento de precursores hematopoéticos da medula óssea e sua diferenciação em granulócitos e macrófagos em ratos submetidos à estressores agudos físicos (choques inescapáveis e escapáveis) e psicogênico e infectados com a *L. monocytogenes*;

- Efeitos do tratamento com *C. vulgaris* na sobrevida de animais submetidos à estressores agudos físicos (choques inescapáveis e escapáveis) e psicogênico e incoculados com dose letal da *L. monocytogenes;*

- Atividade funcional (*burst* e fagocitose) de neutrófilos por citômetria de fluxo em animais submetidos à estressores agudos físicos (choques inescapáveis e escapáveis) e psicogênico;

- Efeitos do tratamento com *C. vulgaris* sobre a atividade funcional dos neutrófilos de animais submetidos à estressores agudos físicos (choques inescapáveis e escapáveis) e psicogênico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1. ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar machos, com idade entre 8 e 10 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de 22 $\pm$ 2^{0}C, com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz ligada às 7:00 hrs). O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecidas *ad libitum*. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório durante um período de pelo menos 72 horas previamente à realização dos experimentos. Os animais foram utilizados

de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da FMVZ-USP (Protocolo n° 788/2005).

4.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Os animais foram divididos ao acaso em 8 grupos de 6 animais cada, para os experimentos sobre hematopoese e de 8 animais cada para os experimentos sobre neutrófilos sendo submetidos a um tratamento feito de acordo com o protocolo experimental a seguir:

a) Animais controle, apenas manipulados;
b) Animais tratados com a alga *Chlorella vulgaris* (CV);
c) Animais submetidos a um dos 3 tipos de estressores;
d) Animais tratados com o CV e, em seguida, submetidos a um dos 3 tipos de estressores.

Os grupos descritos abaixo foram delineados apenas para os estudos sobre a hematopoese:

e) Animais infectados com dose sub-letal da bactéria *L. monocytogenes;*
f) Animais infectados com dose sub-letal da bactéria *L. monocytogenes* e submetidos a um dos 3 tipos de estressores;
g) Animais tratados com a CV, infectados com dose sub-letal da bactéria *L. Monocytogenes* e submetidos a um dos 3 tipos de estressores.

4.3. *CHLORELLA VULGARIS*

A alga *Chlorella vulgaris* foi obtida da Chlorella Industry Co. Ltd. (Tokyo, Japão).

Para o tratamento dos animais, a *C. vulgaris* foi ressuspensa em água destilada a 40°C e administrada por via oral, durante 5 dias previamente à aplicação dos 3 estressores. O composto foi armazenado em geladeira pelo período do tratamento (5 dias).

4.4 *LISTERIA MONOCYTOGENES*

A *L. monocytogenes* foi obtida do Laboratório de Microbiologia (Departamento de Patologia Clínica, Hospital das Clínicas, UNICAMP) sendo utilizada para infectar os animais. Antes da utilização, cada amostra foi diluída em concentrações apropiadas de NaCl 0,9%. Os ratos foram inoculados via intraperitonial (i.p.) (0,2 ml por animal), com dose sub-letal de $7{,}8 \times 10^{8}$ por rato para o estudo do CFU-GM. Para a avaliação da taxa de sobrevida, os animais foram inoculados i.p. com a dose letal de $7{,}8 \times 10^{9}$ por rato. Essas doses foram padronizadas para ratos para esse trabalho. Para a padronização da dose letal, foi realizado um estudo da sobrevida, utilizando-se diferentes doses e para a dose sub-letal foi estabelecido um valor 10 vezes menor do que a dose letal.

4.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA *C. VULGARIS* EM ANIMAIS ESTRESSADOS (CURVA DE SOBREVIDA)

A atividade antibacteriana da *C. vulgaris* (CV) foi avaliada em animais estressados e infectados com a dose letal da bactéria *L. monocytogenes* através da observação do aumento da duração ou taxa de sobrevida, utilizando-se os seguintes grupos:

a) Animais apenas infectados com LM;
b) Animais submetidos a um dos 3 tipos de estressores e infectados com LM;
c) Animais tratados com CV e infectados com LM;
D) Animais tratados com CV, infectados com LM e submetidos a um dos 3 tipos de estressores.

4.6. ESTRESSE

4.6.1. MODELO PARA PRODUÇÃO DE ESTRESSE FÍSICO E PSICOGÊNICO

O modelo para produção de estresse compreende o uso de 3 grupos experimentais: a) grupo de animais submetidos a uma sessão de choques sem possibilidade de fuga, inescapáveis; b) grupo de animais submetidos a uma sessão de choques com possibilidade de fuga, escapáveis; c) grupo de animais que presenciam a aplicação de choques inescapáveis. Os grupos a e b compreendem o estresse físico, enquanto o grupo c, o estresse psicogênico.

4.6.2. INDUÇÃO DO ESTRESSE POR CHOQUES

A produção do estresse por choques foi realizada no laboratório de Imunotoxicologia do Departamento de Farmacologia da UNICAMP e no Laboratório de Comportamento do Departamento de Patologia Experimental da USP. Para produção do estresse um grupo de animais recebeu 60 choques não sinalizados com intensidade de 1 mA, por 8 segundos e com possibilidade de fuga, um segundo grupo recebeu a mesma densidade (tempo de choque/tempo de sessão) de choques sem possibilidade de fuga, um terceiro grupo permaneceu em uma caixa posicionada na frente da caixa do animal submetido ao choque inescapável, presenciando as reações emitidas por esse animal.

O objetivo do uso do equipamento de choques escapáveis é permitir a aplicação não sinalizada de estímulos elétricos de baixa intensidade (pulsos regulares de 1 mA) com a possibilidade de escape do animal, sendo útil, portanto, em estudos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos que requeiram o desenvolvimento e manutenção, pelo animal, de um comportamento aprendido de escape ao agente estressor (o choque elétrico). O equipamento é constituído por uma gaiola de choques e um estimulador. A gaiola, construída em acrílico transparente, tem o piso formado por barras metálicas, que são eletrificadas durante a aplicação dos choques. A gaiola tem 2 compartimentos, separados por uma parede contendo uma passagem. Cada compartimento apresenta uma porta, pela qual o animal é introduzido e retirado da gaiola. Nas paredes laterais opostas dos compartimentos, há um sensor óptico que identifica a presença do animal. A gaiola ainda dispõe de uma bandeja deslizante para recolhimento das fezes do animal. O estimulador é formado por uma fonte de corrente com amplitude fixa do estímulo (1 mA), um circuito *scrambler* e um temporizador. O *scrambler* rapidamente “embaralha” a polaridade das várias barras que formam o piso da gaiola de modo a impedir que o animal possa escapar ao choque permanecendo imóvel, apoiado

em barras de igual polaridade. O temporizador tem programado uma seqüência pseudo-aleatória dos intervalos entre os choques (entre 5 e 25 s). Além disso, esta unidade controla a habilitação dos sensores ópticos nas paredes da gaiola (o compartimento no qual o sensor está ativo é indicado por um LED vermelho, próximo ao sensor óptico). O comportamento requerido do animal para escape (interrupção do choque) é passar de um compartimento para o outro. O sensor óptico habilitado é aquele do compartimento diferente do qual o animal é colocado. Uma vez atingindo o outro compartimento, o animal bloqueia o feixe de luz, e isto leva à interrupção da aplicação do estímulo elétrico ao piso da gaiola. Após um dado intervalo, novo estímulo é aplicado, porém, o animal necessita mover-se novamente para o compartimento oposto, para que possa interrompê-lo. Caso o animal permaneça no mesmo compartimento durante a aplicação, o estímulo é interrompido depois de decorrida sua duração máxima.

Para a sessão de choques do tipo inescapável, foi utilizada a mesma caixa medindo 25x25x30 cm, de acrílico transparente. O piso consiste de barras de metal através das quais os 60 choques com intensidade de 1 mA, foram deflagrados, na mesma densidade de choques do grupo escapável. Neste caso, não houve interrupção do choque quando o animal passa de um compartimento para outro.

Para a realização do estresse psicogênico (animal testemunha do grupo submetido ao choque inescapável), foi utilizada a caixa descrita para o grupo inescapável/escapável, sem acoplar a mesma a um gerador de choques. Essa caixa foi colocada de frente àquela que recebia os choques inescapáveis, para que o animal testemunha pudesse ouvir o som e observar o comportamento emitido pelo animal recebendo o choque.

4.7. LISTERIA MONOCYTOGENES

Para a manutenção da patogenicidade dessa bactéria, a mesma foi periodicamente repassada por vinte e cinco vezes em camundongos, através da inoculação intraperitoneal da *Listeria monocytogenes* em solução salina 0,85%. Quarenta e oito horas após a inoculação desse microorganismo, os baços dos camundongos foram isolados em ambiente estéril, macerados e mantidos em BHI por 24-48 horas. Para a obtenção das colônias, a *Listeria monocytogenes* foi plaqueada em ágar-sangue e incubada por 24 horas em estufa a 37° C. Após o isolamento de colônias de bactérias, estas foram diluídas até atingir a concentração apropriada para uso.

Para a infecção dos animais, a bactéria *L. monocytogenes*, isolada pelo laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia clínica (HC-UNICAMP), foi incubada em meio de cultura BHI por 24-48 horas a 37° C. As colônias obtidas das culturas frescas de ágar-sangue foram ressuspendidas em solução salina 0,85% e a concentração determinada espectrofotometricamente, utilizando-se a Escala de Mc Farland como padrão (Vitek Colorimeter). A infecção dos animais pela adminitração intraperitoneal de 7,8 x 10^{8} bactérias/mL em sua dose sub-letal e 7,8 x 10^{9} em sua dose letal.

4.8 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS PARA A ANÁLISE DOS NEUTRÓFILOS EM CITÔMETRO DE FLUXO

- Diacetato 2´7´Diclorofluorisceína (DCFH-DA/Molecular Probes, Eugene, OR)- empregado na citometria de fluxo. Este reagente foi mantido congelado (-20° C), e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento do uso;

- EDTA (Sigma®) na concetração de 3 mM. Utilizado na técnica de fagocitose com o objetivo de interrompê-la após o período de incubação das amostras;

- Heparina (Liquemine® - Roche) – utilizado para evitar a coagulação das amostras após a coleta;

- Iodeto de Propídeo (PI) (Sigma®) – Responsável pela emissão de fluorescência vermelha das amostras captadas pelo citômetro;

- NaCl 0,2% e 1,6% - Soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras.

- NaCl 0,85% e 0,9% - Soluções utilizadas na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus.*

- PBS (Phosfate-buffered saline, pH=7,2-7,4) - Solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose;

- PBS glicosado – Solução utilizada na técnica de conjugacao do *Staphylococcus aureus;*

- PMA – Miristato-acetato de forbol (Calbiochem®) - utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo dos neutrófilos.

4.8.1 REAGENTES E ESTÍMULOS PARA A ANALISE DO *BURST* OXIDATIVO

a) Preparo das soluções

- PBS 1x:

No momomento do uso, dilui-se 100ml da solução estoque 10x concentrada e completou-se com H_2O destilada para um volume de 1000 ml.

- PBS glicosado:

-PBS 10x	100 ml
-glicose	0,9 g
-gelatina	1 g
- H_2O destilada qsp	1000 ml

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

Pesou-se 2g, 8,5g, 9g e 16g respectivamente de NaCl e completou-se cada solução com 1000 ml de H_2O destilada.

b) Preparo dos reagentes

- DCFH-DA mM-Soluções Estoque

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

- Solução de DCFH-DA

No momento do uso, dilui-se a solução estoque em PBS 1x de modo tal a permitir que o volume final desta seja suficiente para contemplar todas as amostras do experimento, que varia de acordo com o número de animais. Para 13 animais utilizamos 100 µL de DCFH-DA (solução estoque) + 8,2 ml de PBS.

- Solução de EDTA 3mM

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

c) Preparo dos Estímulos

- Solução de PMA

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

- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923-SAPI

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

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

7.1 Cultivar bactérias viáveis em ágar sangue por 48 horas;

7.2 Colocar as colônias de bactérias em tubos de ensaio estéreis, em fluxo laminar próprio para bactérias;

7.3 Ressuspendê-las em NaCl 0,85% e centrifugá-las por 10 minutos a 2500rpm;

7.4 “Inativar” as bactérias a 60° C por 30 minutos;

7.5 Lavar 3x com NaCl 0,85% e após cada lavada, centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm;

7.6 Ajustar a concentração de bactérias de modo tal que sua leitura no espectrofotômetro (Uv/visível) a uma absorbância de 620 nm tenha um valor que varie entre 2.4 e 2.7. Estes valores, nesta absorbância, são aqueles em que as bactérias em suspensão apresentam uma tribidez que corresponde ao n ^{o} 8 escala Mc Farland. Para a leitura no citômetro é necessário que as bactérias estejam nestas concentrações;

7.7 Preparar uma solução de iodeto de propídeo a 5%;

7.8 Centrifugar nas mesmas condições, desprezar o sobrenadante e adicionar 25 µL da solução de iodeto de propídeo a 5%;

7.9 Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro; lavar a suspensão de bactéria marcada mais 3x com NaCl 0,85% e centrifugando após cada lavagem por 10 minutos a 2500 rpm;

7.10 Ressuspender a bactéria em 5 ml de PBS glicosado (livre de Ca^{++} e Mg^{++});

7.11 “Aliquotar em eppendorfs de 2 ml, proteger da luz e congelar a –80° C;

7.12 Descongelar imediatamente antes do uso;

Para evitar contaminações, todo o procedimento acima descrito foi realizado dentro de um fluxo laminar empregando-se, sempre, soluções estéreis.

4.9. ATIVIDADE FUNCIONAL DOS NEUTRÓFILOS

MEDIDA DO *BURST* OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE ATRAVÉS DO CITÔMETRO DE FLUXO

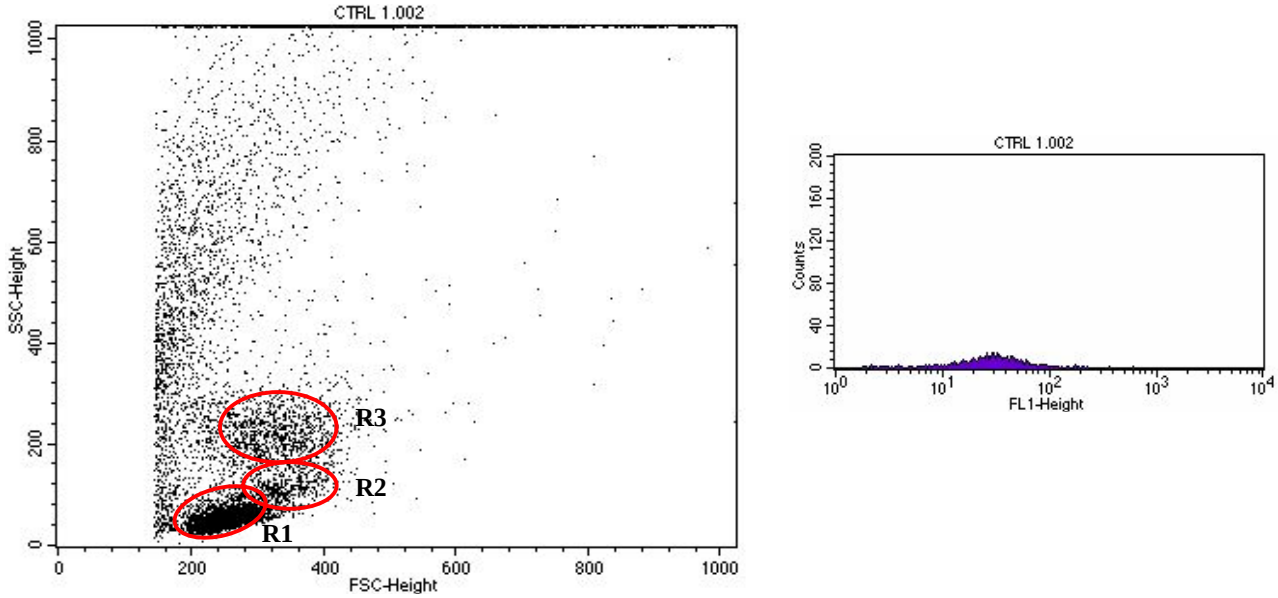
Foi utilizado o método proposto por Hasui et al., (1989). Resumidamente, para cada amostra foi montada uma bateria de cinco tubos de propileno: 1° tubo: 100μL de sangue em 1 mL de PBS; 2° tubo: 100μL de sangue, 200μL de DCFH-DA (0,3 μM) em 800μL PBS. O DCFH-DA reage com os radicais livres de oxigênio produzidos por monócitos e neutrófilos do sangue e emite fluorescência verde. 3° tubo: 100μL de sangue, 200μL de DCFH-DA (0,3 μM), 100μL de PMA (1ng/μL) em 700μL PBS; 4° tubo: 100μL de sangue, 100μL de SAPI (1ng/μl) em 900μL PBS; 5° tubo: 100μL de sangue, 200μL de DCFH-DA (0,3 μM), 100μL de *Staphilococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo (SAPI) em 700μL PBS. O iodeto de prodídeo (PI) intercala-se no DNA do *S. aureus* e emite uma fluorescência vermelha. O PMA e a SAPI foram usados como estímulos *in vitro* para a produção de radicais livres de oxigênio. O tubo com a SAPI sozinha foi utilizado para avaliação da fagocitose dos leucócitos. As amostras foram colocadas em banho-maria, sob agitação, a 37°C por 30 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 2 mL de solução gelada de EDTA (3mM). A seguir as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 260 giros e os eritrócitos foram lisados por uma solução estéril de NaCl 0,2% (2,0 mL) durante 20 segundos. Logo em seguida, uma solução estéril de NaCl 1,6% (2 mL) foi colocada em cada amostra para restaurar a isotonicidade. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 260 giros e os botões celulares obtidos foram ressuspendidos adicionando-se 0,5 mL de PBS gelado (3mM). A magnitude do *burst* oxidativo e da fagocitose foi avaliada pela citometria de fluxo.

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Macintosh

Apple). Foram analisados 10000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). As propriedades celulares foram reconhecidas por meio das propriedades FSC/SSC (tamanho e complexidade interna da célula, respectivamente). Os dados de neutrófilos, monócitos e macrófagos peritoneais foram coletados excluindo-se as demais populações da amostra por meio da análise dos g*ates*. A fluorescência verde do DCFH é mensurada a 530±30 nm (detector FL1). A fluorescência vermelha do PI é mensurada a 585±42 nm (detector FL2). A quantificação do *burst* oxidativo e da fagocitose foi estimada pela intensidade média de fluorescência/células emitida pelo DCFH-DA ou pelo PI, respectivamente. O tubo 1 (branco) foi utilizado apenas para calibrar o aparelho, como controle de fluorescência negativa, por isso os valores deste tubo não serão analisados.

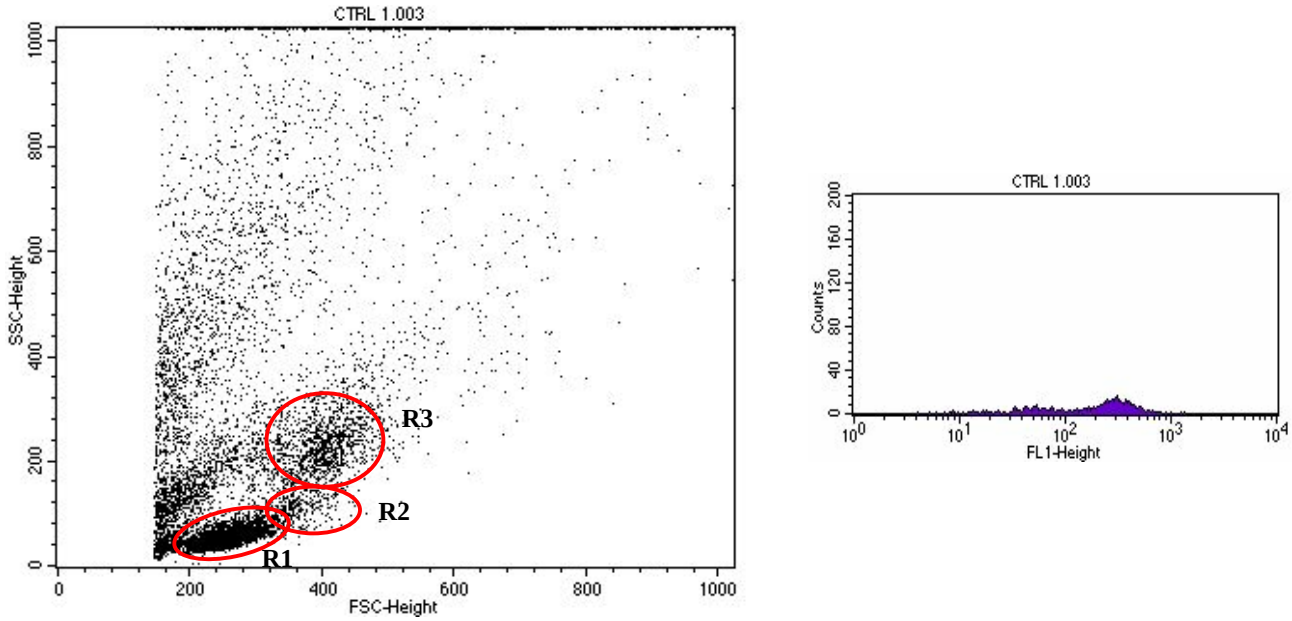
As figuras 3,4,5 e 6 mostram uma representação da atividade funcional dos leucócitos sanguíneos incubados com o DCFH, PMA, o *S. aureus* e o DCFH + *S. aureus* de animais do grupo controle, avaliada por por citômetria de fluxo.

Na figura 3 o *burst* espontâneo de neutrófilos incubados com o DCFH foi avaliado. Na figura 4 avaliamos o *burst* induzido pelo PMA. Na figura 5 avaliamos a capacidade de fagocitose (% - quantos neutrófilos fagocitaram - e índice de fagocitose - quantas partículas de SAPI foram fagocitadas por cada neutrófilo) de neutrófilos incubados com o *S. aureus* e na figura 6 avaliamos o *burst* induzido pela fagocitose de neutrófilos incubados com o DCFH e com o *S. aureus*.



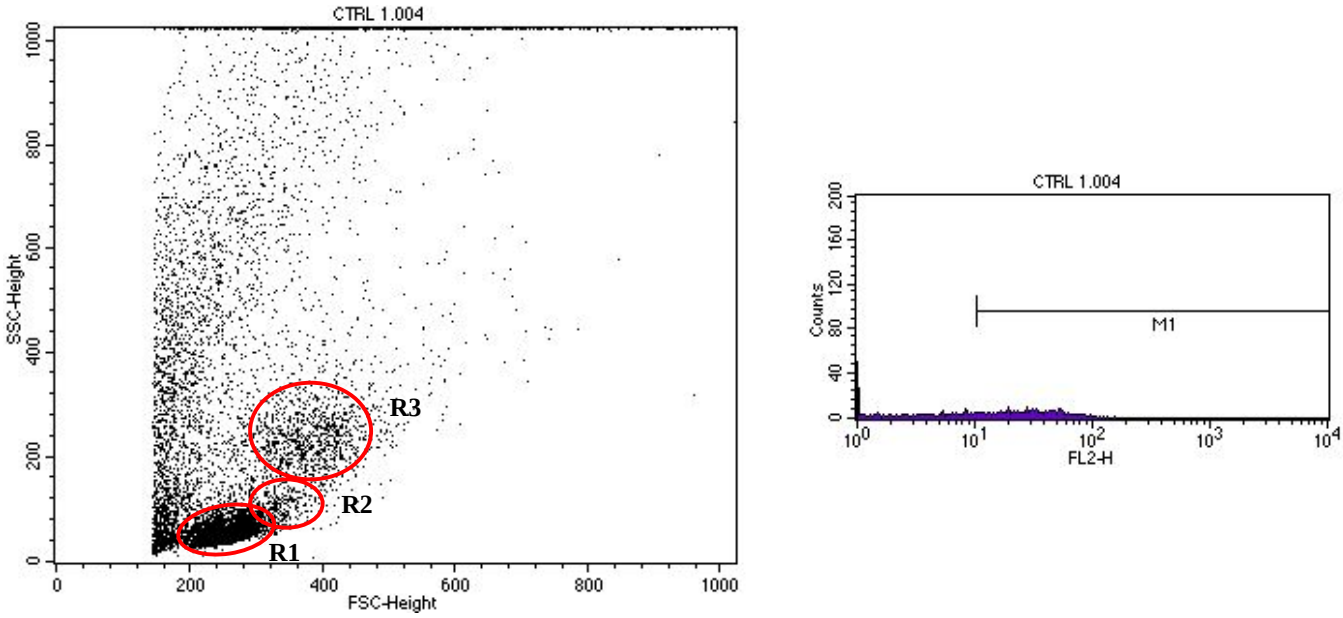
(A) **(B)**

Figura 3 – Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos após a incubação com o DCFH de animais do grupo controle. R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.



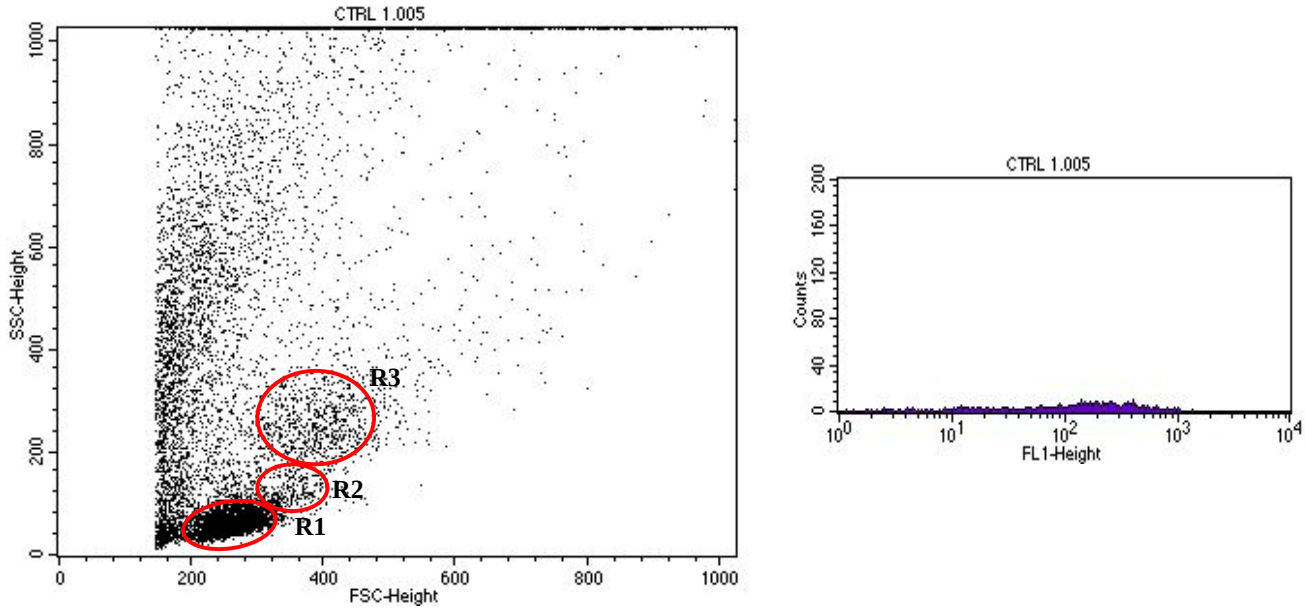
(A) **(B)**

Figura 4 – Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos após a incubação com o PMA de animais do grupo controle. R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.



(A) **(B)**

Figura 5 – Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos após a incubação com o *S. aureus* de animais do grupo controle. R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.



(A) **(B)**

Figura 6 – Citograma dos leucócitos (A) e Histograma (B) dos neutrófilos após a incubação com o DCFH + ***S. aureus*** de animais do grupo controle. R1=linfócitos; R2=monócitos; R3=neutrófilos.

4.10. CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS DE GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA (CFU-GM)

Após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical e realização da assepsia da pele com álcool 70%, o fêmur foi exposto. A cartilagem foi removida sobre o orifício na extremidade distal e o osso cortado na junção superior. A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, USA).

O número de células na suspensão foi determinado em câmara hematocitométrica após diluição 1:10 das células em eosina 10% e a concentração ajustada para 1 x 10^5 células/mL.

A seguir, foi preparado o meio contendo soro bovino fetal e DMEM (ver abaixo) adicionado de ágar, considerando-se dados satisfatórios de experimento realizado anteriormente em nosso laboratório (Bincoleto et al., 1996) que consiste de:

· 20% de soro bovino fetal (SBF);

30% DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium, Sigma) 2x concentrado;

50% de ágar (Bacto-ágar, Difco) (concentração final 0,6%)

O volume apropriado de células da medula óssea (1x10^5 cels/mL) foi então adicionado e alíquotas de 2 mL foram distribuídas em cada placa de Petri (35mm) contendo 0,1 mL do estímulo apropriado (meio condicionado de células do baço – SCM). Após geleificar, as placas foram incubadas por 7 dias, a 37°C, em presença de 5% de O2 no ar. Após esse período, as placas foram divididas em 4 e o número de colônias foi contado em cada um dos quadrantes usando-se um microscópio de dissecção em aumento de 40x.

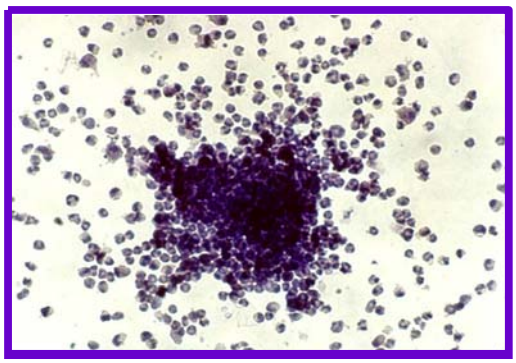


Figura 7: Morfologia das colônias de CFU-GM após coloração com Luxol-Fast blue / Hematoxylina

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes de aplicar a análise estatística destinada à interpretação dos resultados, procurou-se verificar, através do teste de Bartlet, qual o tipo de análise – paramétrica ou não paramétrica – seria a mais adequada para avaliar cada situação experimental. Como teste paramétrico foi utilizado o teste “t” de student com correção de Welch para comparar 2 grupos ou ANOVA de 1 via seguida do teste de Tukey-Kramer para avaliação dos contrastes, quando mais de 2 grupos estavam sendo comparados. Para essa análise utilizamos o software Graphpad Instat. Para as curvas de sobrevida dos animais foi aplicado o teste de análise de Kaplan-Meier seguido de Cox-Matel, utilizando-se o software Winstat. Com o objetivo de obter uma melhor observação dos resultados obtidos, os dados (média ± desvio padrão) foram transformados em porcentagem em relação ao valor do controle, em alguns dos experimentos. O software utilizado para fazer os gráficos foi o Prisma. Empregou-se em todas as medidas um α de 5% bicaudal, ou seja, a significância estatística foi considerada para valores de $P < 0,05$.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Trancreve-se abaixo o delineamento dos experimentos realizados e os resultados obtidos no presente trabalho.

5.1. PADRONIZAÇÃO DAS DOSES DE *C. vulgaris* (CV) PARA RATOS ATRAVÉS DO ESTUDO DA SOBREVIDA FRENTE A UMA DOSE LETAL DE *L. MONOCYTOGENES*

Foram utilizados 24 animais dividos ao acaso em 4 grupos (1 grupo controle e 3 grupos experimentais) de 6 animais cada. Os animais dos grupos experimentais foram tratados por gavagem por 5 dias com as doses de 100mg/Kg; 200mg/Kg e 400mg/Kg por dia de *C. vulgaris*, respectivamente. O grupo controle foi apenas manipulado.

Passadas 24 horas do término do tratamento com CV, todos os animais foram inoculados com dose letal de *L. monocytogenes* i.p. ($7,8X10^9$) e observados por 45 dias.

Resultados

A figura 8 mostra as curvas de sobrevida dos animais de cada um dos grupos. Observamos que as doses de 200 e 400 mg/Kg de CV resultaram em uma sobrevida de 50% dos animais infectados, enquanto que a dose de 100 mg/Kg protegeu apenas 30% desses animais.

Diante desses resultados, escolhemos a dose intermediária de 200 mg/Kg para o prosseguimento dos experimentos. Os animais do grupo controle, que não receberam o tratamento com a alga, foram a óbito antes do 5º dia após a inuculação com a bactéria.

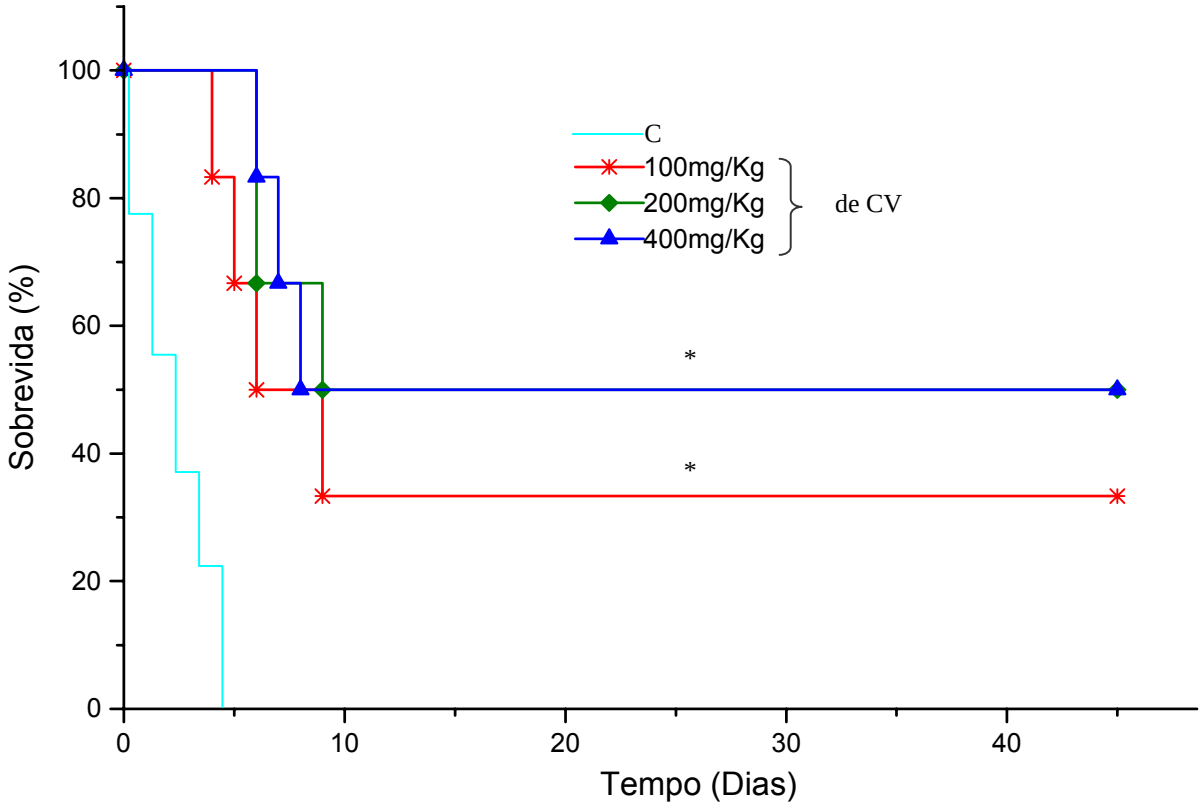


Figura 8: Curva de sobrevida de ratos Wistar pré-tratados com diferentes doses de C. *vulgaris* (CV) e infectados com dose a letal de *L. monocytogenes* ($7{,}8x10^9$). *P<0,05 em relação ao grupo controle. Os animais do grupo controle (C) foram apenas manipulados. Análise de Kaplan-Meier seguido do teste de Cox-Mantel. N=6 animais por grupo.

5.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM *C. vulgaris* (CV) NA SOBREVIDA DE ANIMAIS SUBMETIDOS AOS ESTRESSESORES FÍSICOS E PSICOGÊNICO E INCOCULADOS COM *L. monocytogenes* (LM).

Foram utilizados 64 animais dividos ao acaso em 8 grupos de 8 animais cada (2 grupos controle, sendo um apenas manipulado e outro pré-tratado com CV na dose de 200mg/Kg/dia via gavagem por 5 dias e 6 grupos experimentais). Os animais dos 6 grupos experimentais, foram submetidos aos estressores físico por choque inescapável (CI –2 grupos) ou escapável (CE –2 grupos) ou estresse psicogênico (T- 2 grupos). No entanto, em cada condição, os animais de 1 dos grupos receberam o pré-tratamento com *C. vulgaris* (200mg/Kg) por 5 dias até o dia anterior à aplicação dos estressores.

Duas horas após a aplicação dos estressores, todos os animais dos grupos experimentais e controle foram inoculados com a dose letal da bactéria *L. monocytogenes* i.p. ($7,8x10^9$) e observados por 45 dias.

Resultados

Foi avaliado o efeito protetor da CV na sobrevida dos animais inoculados com a dose letal da LM. Os dados obtidos estão apresentados na figura 9. Observamos um aumento de 50% na sobrevida dos animais que foram tratados com CV previamente à inoculação com a bactéria. No contexto em que um dos estressores físicos (grupos submetidos aos choques escapáveis e inescapáveis) ou psicogênico (grupo dos animais testemunha da aplicação dos choques inescapáveis) foi aplicado nos animais em que se faz à infecção bacteriana, a eficácia terapêutica da CV foi reduzida para uma taxa de sobrevida de 20%. Os grupos de animais que não foram tratados com a alga *C. vulgaris* foram a óbito até o

5º dia após a infecção. Tanto nos animais tratados quanto nos não-tratados, o padrão de resposta observado pela aplicação dos diferentes tipos de estressores (físico por choque escapável e inescapável e psicogênico) foi o mesmo.

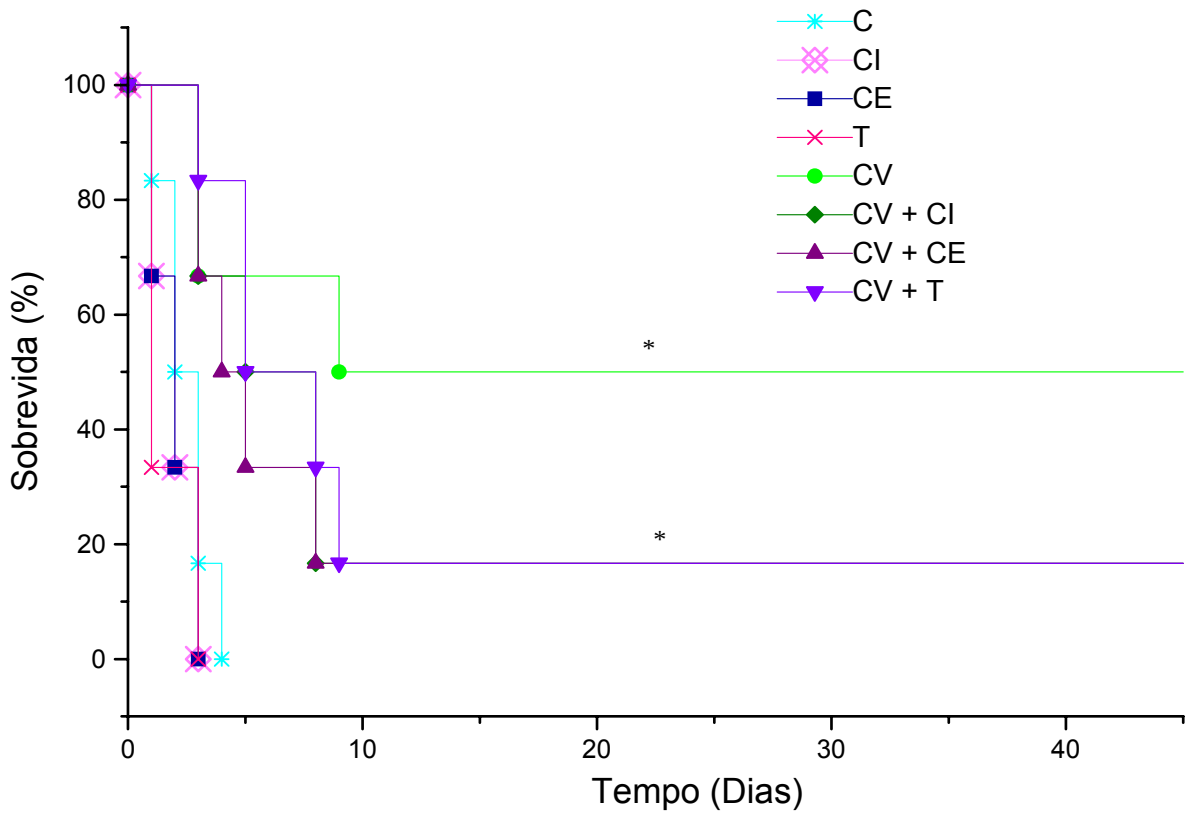


Figura 9: Efeitos do pré-tratamento com 200mg/Kg/dia da C. *vulgaris* (CV), por 5 dias consecutivos, sobre a sobrevida de ratos Wistar. Após o término da administração de CV, os animais foram inoculados com dose letal de L. *monocytogenes* ($7{,}8 \times 10^9$ bac/ml) e submetidos ou não aos estressores físico por choque (escapável-CE e inescapável-CI) e psicogênico (testemunha da aplicação dos choques inescapáveis-T). Os animais do grupo controle (C) foram apenas manipulados. Análise de Kaplan-Meier seguido do teste de Cox-Mantel. * $P<0{,}05$ em relação aos grupos infectados e infectados e estressados. N=8 animais por grupo.

5.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM A *C. vulgaris* (CV) SOBRE O CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE PRECURSORES PARA GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS (CFU-GM) DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSORES FÍSICOS E PSICOGÊNICO

Foram utilizados 48 animais dividos ao acaso em 8 grupos de 6 animais cada (2 grupos controle, sendo um apenas manipulado e outro pré-tratado com CV na dose de 200mg/Kg/dia via gavagem por 5 dias e 6 grupos experimentais). Os animais dos 6 grupos experimentais foram submetidos aos estressores físico por choque inescapável (CI – 2 grupos) ou escapável (CE – 2 grupos) ou ao estressor psicogênico (testemunhas do choque inescapável- T – 2 grupos). No entanto, em cada condição, os animais de 1 dos grupos receberam o pré-tratamento com *C. vulgaris* (200mg/Kg) por 5 dias até o dia anterior à aplicação dos estressores.

Duas horas após a aplicação dos estressores, retiramos o fêmur dos animais dos grupos experimentais e controle para a análise do CFU-GM, como descrito no item 4.10.

Resultados

Conforme mostra a Figura 10, os choques inescapáveis (CI) e o estressor psicogênico (T) produziram um grau equivalente de mielossupressão nos animais. A aplicação de choques com a possibilidade de escape (CE) não produziu alteração no número de CFU-GM quando comparado ao grupo controle. Um efeito mieloprotetor significativo ($F(7,40)=5,949$, $p<0,0001$) foi produzido pelo pré-tratamento com a alga, restaurando o número de CFU-GM ao nível do medido no grupo controle nos animais submetidos ao choque inescapável e ao estressor psicogênico. Nos animais não

estressados, a administração da CV não produziu alterações na resposta mielopoética, em relação ao controle não tratado.

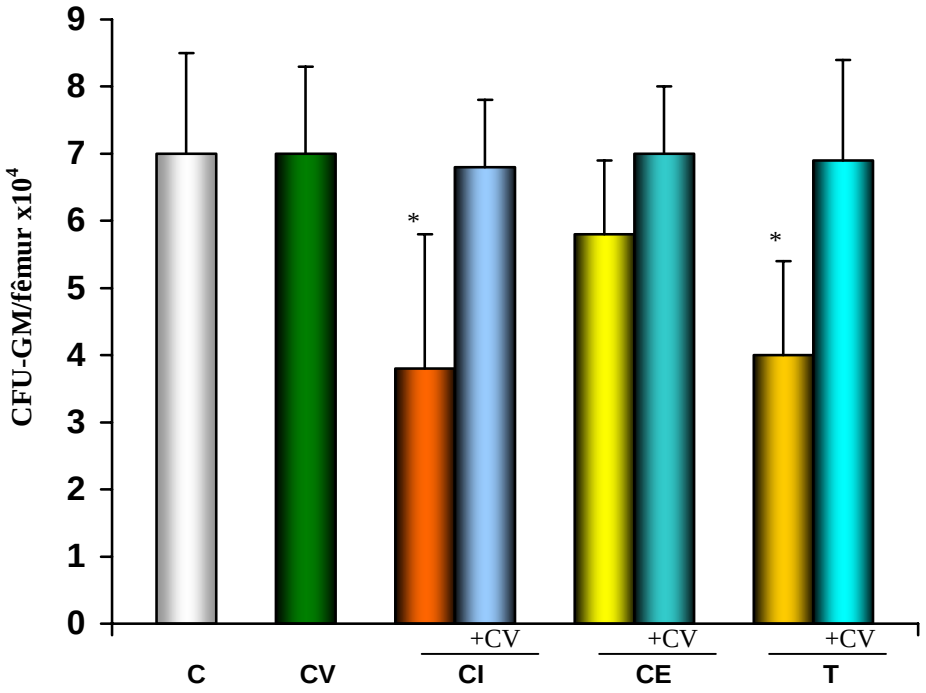


Figura 10: Efeito do pré-tratamento por 5 dias consecutivos de C*. vulgaris* (CV-200mg/Kg/dia) sobre o número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea (CFU-GM/fêmur x10^4) em ratos submetidos ou não aos estressores por choque físico (inescapável -CI e escapável -CE), e ao estressor psicogênico (testemunha do choque inescapável - T). Os animais do grupo controle (C) foram apenas manipulados. ANOVA, teste Tukey. *P<0,05 com relação aos demais grupos. Os resultados representam média ± DP de 6 animais por grupo.

5.4. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM A *C. vulgaris* (CV) SOBRE O NÚMERO DE CFU-GM NA MEDULA ÓSSEA DE RATOS INFECTADOS COM A *L. monocytogenes* (LM)

Foram utilizados 48 animais dividos ao acaso em 8 grupos de 6 animais cada (2 grupos controle, sendo um apenas manipulado e outro pré-tratado com CV na dose de 200mg/Kg/dia via gavagem por 5 dias e 6 grupos experimentais). Os animais dos 6 grupos experimentais foram inoculados com dose sub-letal ($7,8x10^8$) da bactéria LM e foram avaliados 24 horas (2 grupos), 48 horas (2 grupos) e 72 horas (2 grupos) após a infecção. No entanto, em cada condição, os animais de 1 dos grupos receberam o pré-tratamento com *C. vulgaris* (200mg/Kg/dia) por 5 dias até o dia anterior à inoculação com LM.

Os fêmures dos animais foram retirados nas 24h, 48h e 72h após a inoculação com LM sendo utilizados para análise do CFU-GM, como descrito no item 4.10.

Resultados

Como pode ser observado na figura 11, a infecção por LM produziu uma redução significativa ($F(7,40)=6,037$, $P<0,0001$) no número de CFU-GM apenas 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria. No entanto, houve uma tendência de recuperação observada às 72 h após a inoculação da LM. O tratamento com CV preveniu a redução no número de CFU-GM dos grupos avaliados.

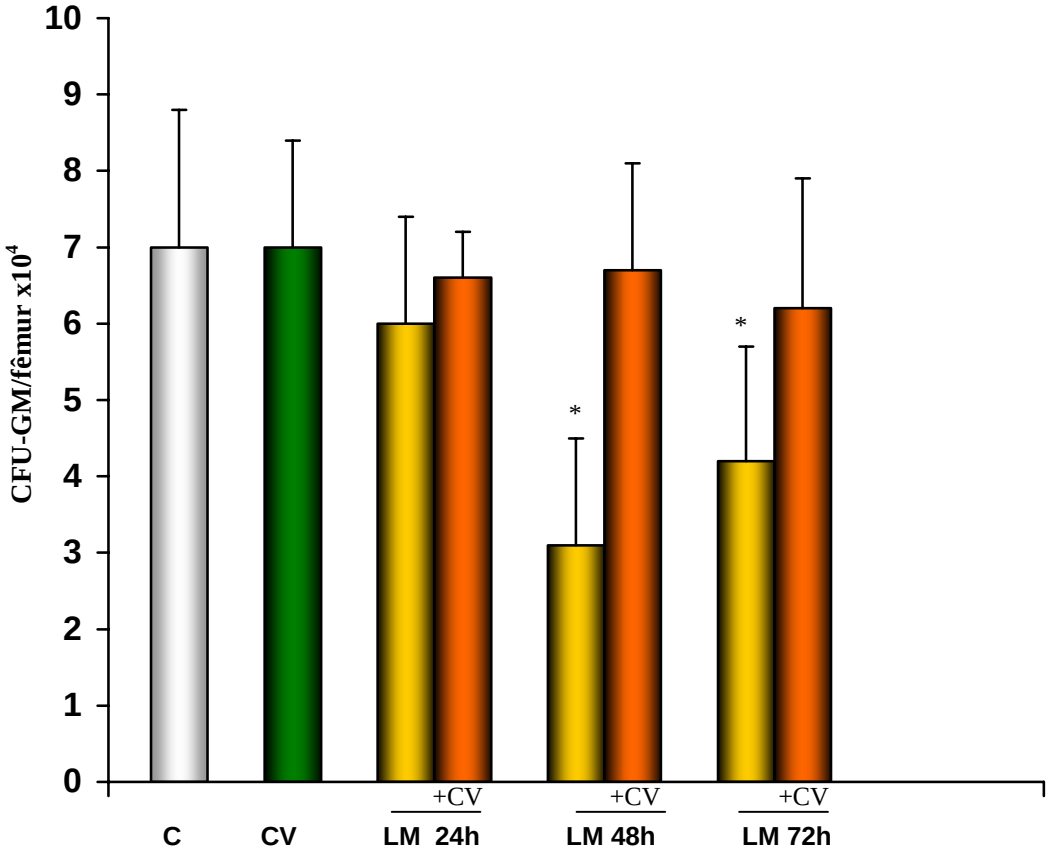


Figura 11: Efeito do pré-tratamento por 5 dias consecutivos com C. *vulgaris* (CV-200mg/Kg/dia) sobre o número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medúla óssea de ratos, 24, 48 e 72 horas após a infecção com dose sub-letal da *L. monocytogenes* (LM - $7,8x10^8$). Os animais do grupo controle (C) foram apenas manipulados. *P<0,05 com relação aos demais grupos. ANOVA, Teste Tukey. Os resultados representam média ± DP de 6 animais por grupo.

5.5. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM A *C. vulgaris* (CV) SOBRE O NÚMERO DE CFU-GM NA MEDULA ÓSSEA DE RATOS ESTRESSADOS E INFECTADOS COM A *L. monocytogenes* (LM)

Este experimeto foi feito em 3 repetições iguais em seu delineamento, diferindo entre si apenas quanto ao tipo de estímulo estressor utilizado: choque inescapável (CI – Fig 12), estressor psicogênico (grupo de animais que testemunharam a aplicação do choque inescapável) (T - Fig 13) e choque escapável (CE – Fig 14);

Em cada repetição foram usados 96 animais divididos ao acaso em 16 grupos iguais a saber:

Grupo 1 – Controle (animais apenas manipulados) (C);

Grupo 2 – Animais apenas tratados com *Chlorella vulgaris* (CV);

Grupo 3 – Animais submetidos apenas ao choque inescapável, ou ao estressor psicogênico ou ao choque escapável;

Grupo 4 – Animais pré-tratados com a *Chlorella vulgaris* e submetidos a um dos 3 tipos de estressores;

Grupo 5, 6 e 7 – Animais inoculados com dose sub-letal de *Listeria monocytogenes* (LM) e avaliados 24h, 48h e 72h após a infecção, respectivamente;

Grupo 8, 9, 10 – Animais pré-tratados com a *Chlorella vulgaris* e inoculados com dose sub-letal de *Listeria monocytogenes* e avaliados 24h, 48h e 72h após a infecção, respectivamente;

Grupo 11, 12, 13– Animais submetidos a um dos três tipos de estressores e inoculados com dose sub-letal de *Listeria monocytogenes* e avaliados 24h, 48h e 72h após a infecção, respectivamente;

Grupo 14, 15, 16 – Animais pré-tratados com a *Chlorella vulgaris* e submetidos a um dos três tipos de estressores e inoculados com dose sub-letal de *Listeria monocytogenes* e avaliados 24h, 48h e 72h após a infecção, respectivamente;

A bactéria LM foi inoculada nos animais (grupos 4 em diante) 2 horas após a aplicação de um dos diferentes estressores. O tratamento com CV (grupos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16) foi realizado 5 dias antes da aplicação de um dos estressores.

Os fêmures dos animais de todos os grupos foram retirados nas 24h, 48h e 72h após a inoculação de LM, sendo utilizados para realização da técnica de CFU-GM, como descrito no item 4.10.

Resultados

Observou-se que a mielossupressão mais severa causada pela inoculação com LM ocorreu nas 48 e 72 horas após a infecção em todos os experimentos. Os choques inescapáveis e o estressor psicogênico, quando aplicados previamente à inoculação, produziram um aumento da susceptibilidade do organismo frente à bactéria LM, o que foi observado por uma redução ainda mais severa no número de CFU-GM nos três períodos avaliados ($F(15,80)=12,77$, $p<0,001$ para choque inescapável e $F(15,80)=11,822$, $p<0,001$ para o estressor psicogênico). O mesmo não foi observado nos animais submetidos aos choques escapáveis, nos quais tivemos apenas a mielossupressão causada pela inoculação com LM ($F(15,80)=12,77$, $p<0,0001$). O pré-tratamento com CV levou a uma recuperação total na capacidade de crescimento e diferenciação desses progenitores da medula óssea em animais infectados e infectados/submetidos aos estressores.

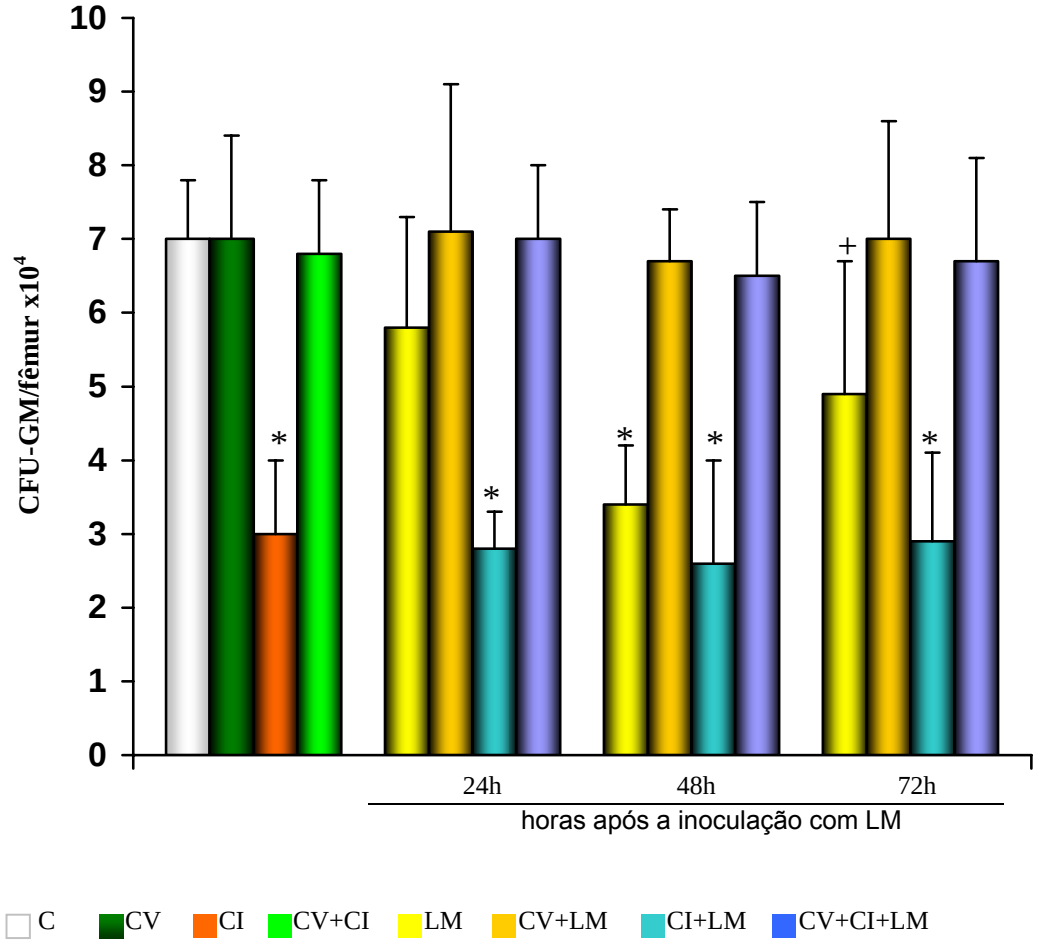


Figura 12: Número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea de ratos submetidos ao estressor físico por choque inescapável (CI) e infectados com dose subletal de *L. monocytogenes* (LM - 7,8x10^8) 24 h após o término do tratamento por 5 dias consecutivos com dose oral de 200mg/Kg/dia da C*. vulgaris* (CV). O número de CFU-GM foi determinado 24, 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria, que foi realizada duas horas após a aplicação dos choques inescapáveis. Os animais do grupo controle (C) foram apenas manipulados. *P<0,05 com relação a todos os demais grupos. +P<0,05 com relação a * e todos os demais grupos. ANOVA, Teste Tukey. Os resultados representam a média ± DP de 6 animais.

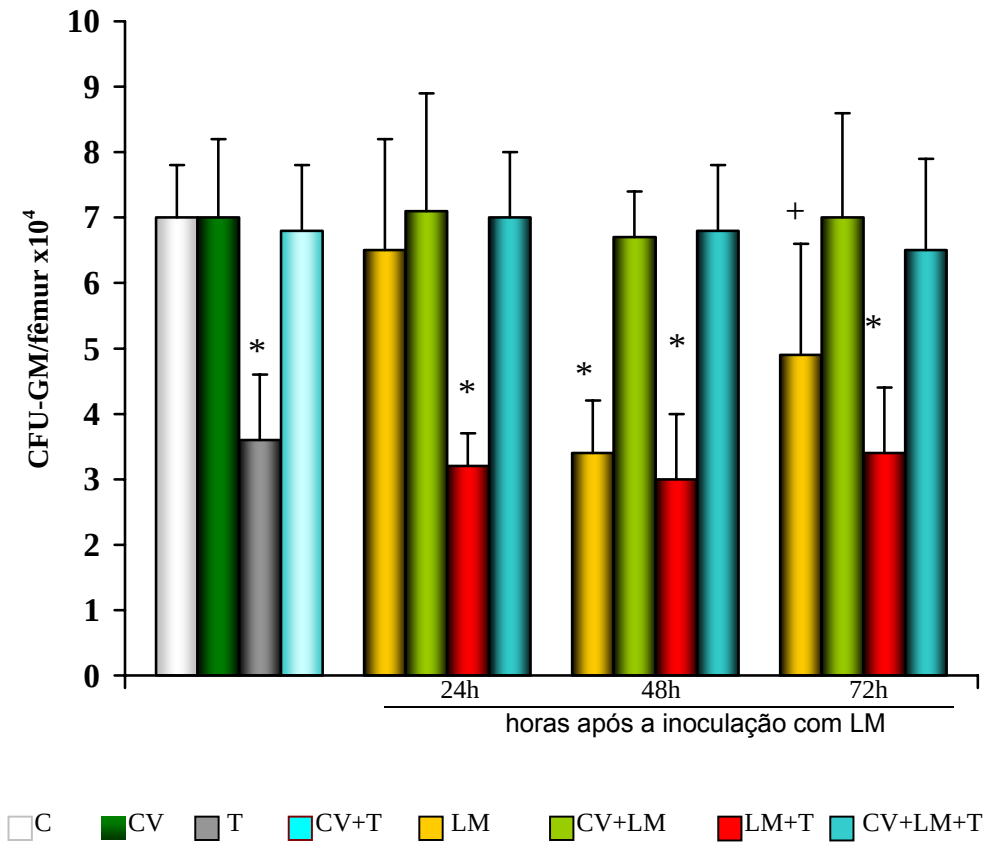


Figura 13: Número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea de ratos submetidos ao estressor psicogênico (ato de testemunhar o choque inescapável –T) e infectados com a dose subletal de *L. monocytogenes* (LM - $7{,}8 \times 10^8$) 24 horas após o tratamento por 5 dias consecutivos com dose oral de 200mg/Kg/dia da C*. vulgaris* (CV). O número de CFU-GM foi determinado 24, 48 e 72 horas após a inoculação com a bactéria, que foi realizada 2 horas após a aplicação do estressor psicogênico (T). Os animais do grupo controle (C) foram apenas manipulados.*P<0,05 quando comparados a todos os demais grupos. +P<0,05 com relação a * e todos os demais grupos. ANOVA, Teste Tukey. Os resultados representam a média ± DP de 6 animais.

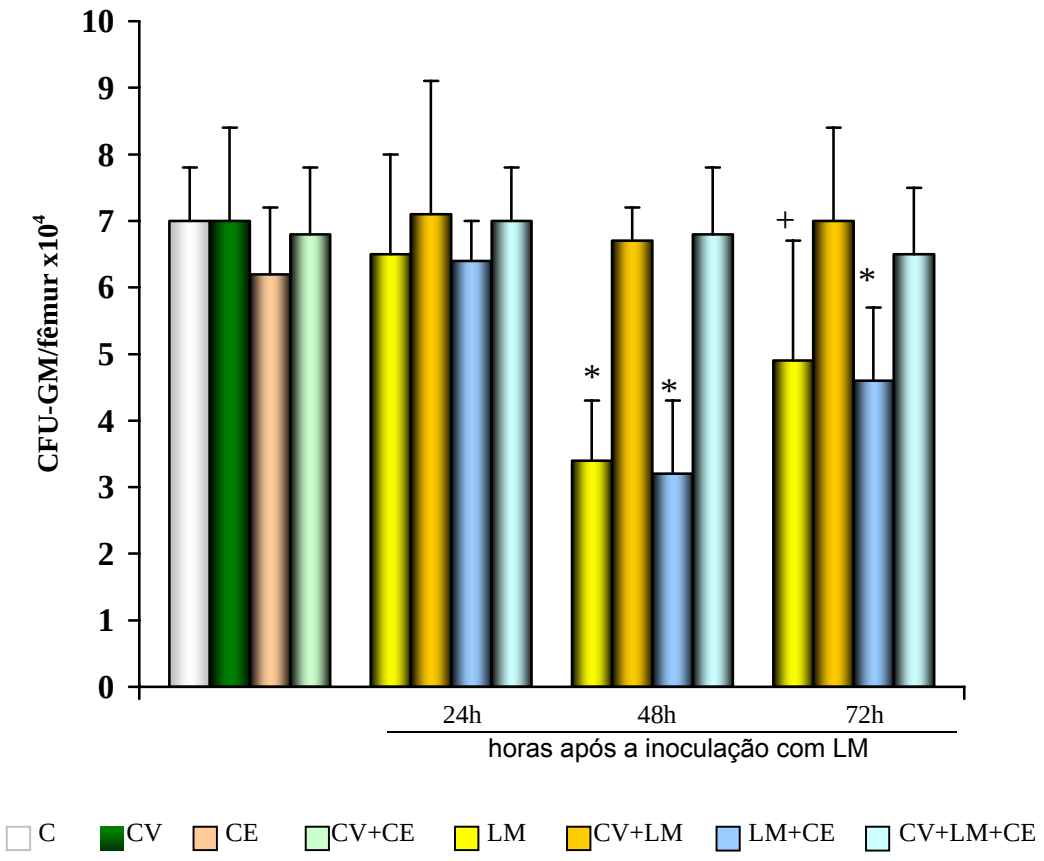


Figura 14: Número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea de ratos submetidos ao estressor físico por choque escapável (CE) e infectados com a dose subletal de *L. monocytogenes* (LM - $7{,}8 \times 10^8$) 24 horas após o término do tratamento por 5 dias consecutivos com dose oral de 200mg/Kg/dia da C*. vulgaris* (CV). O número de CFU-GM foi determinado 24, 48 e 72 horas após a inoculação com a bactéria, que foi realizada 2 horas após a aplicação dos choques escapáveis. Os animais do grupo controle (C) foram apenas manipulados. *P<0,05 quando comparamos a todos os demais grupos. +P<0,05 com relação a * e todos os demais grupos. ANOVA, Teste Tukey. Os resultados representam a média ± DP de 6 animais.

5.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA *C. VULGARIS* SOBRE A ATIVIDADE FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS

Foram utilizados 16 animais divididos ao acaso em 2 grupos iguais de 8 animais (controle e experimental). Os animais do grupo experimental receberam o pré-tratamento por gavagem com 200mg/Kg/dia de *C. vulgaris* por 5 dias consecutivos. No primeiro dia após o término do tratamento dos animais do grupo experimental foram colhidas amostras de sangue de todos os animais para a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose dos neutrófilos, os quais foram avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita em 4.9.

Resultados

Conforme demonstramos na figura 15, o tratamento com CV não provocou alterações significativas na produção basal de radicais livres de oxigênio por neutrófilos de ratos Wistar, tampouco após o estímulo *in vitro* destas células com PMA ou SAPI, quando comparados com o grupo controle.

A figura 16 mostra os efeitos do tratamento com CV sobre a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sanguíneos. A fagocitose foi medida através de dois parâmentros: 1. % de fagocitose - dentro do gate de neutrófilos, indica quantas células fagocitaram partículas de SAPI (*Staphilococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo); 2. índice de fagocitose (expresso pela intensidade de fluorescência emitida pelas células): indica quantas partículas de SAPI foram fagocitadas pelos neutrófilos. Quanto maior a intensidade de fluorescência, mais partículas de bactérias foram ingeridas. Como pode ser observado, o tratamento com CV não alterou a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sanguíneos de ratos.

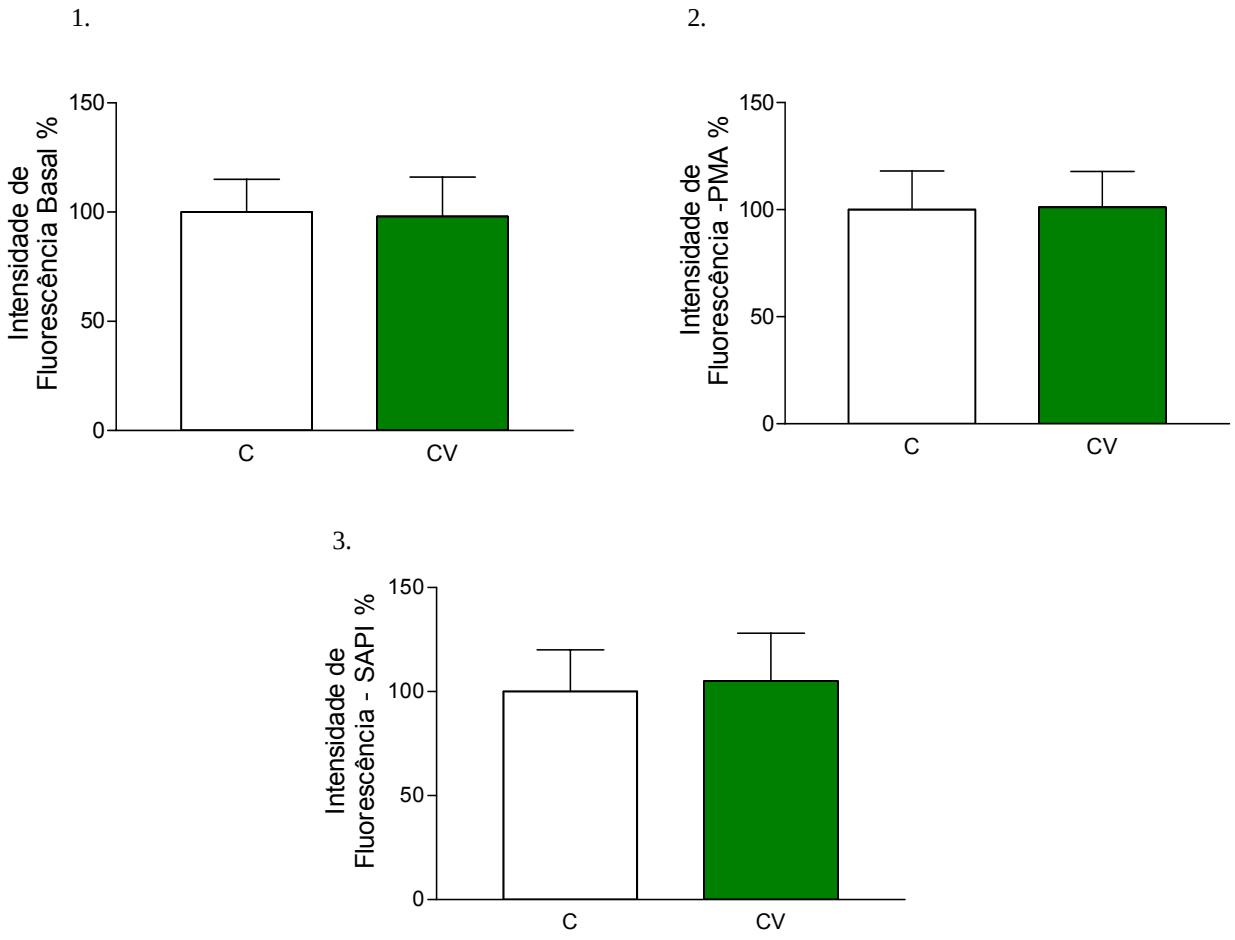


Figura 15: Efeitos do pré-tratamento com *C. vulgaris* (CV - 200 mg/Kg/dia) por 5 dias consecutivos de sobre a atividade funcional de neutrófilos. Foi avaliado o *burst* oxidativo de neutrófilos sanguíneos: 1-*burst* oxidativo basal, 2-*burs*t oxidativo após o estímulo in vitro com PMA, 3- *burst* oxidativo após o estímulo *in vitro* com SAPI. Os animais do grupo controle (C) foram apenas manipulados. Não houve diferença significativa entre os grupos. Teste "t" de Student. Os resultados representam a média ± DP de 8 animais.

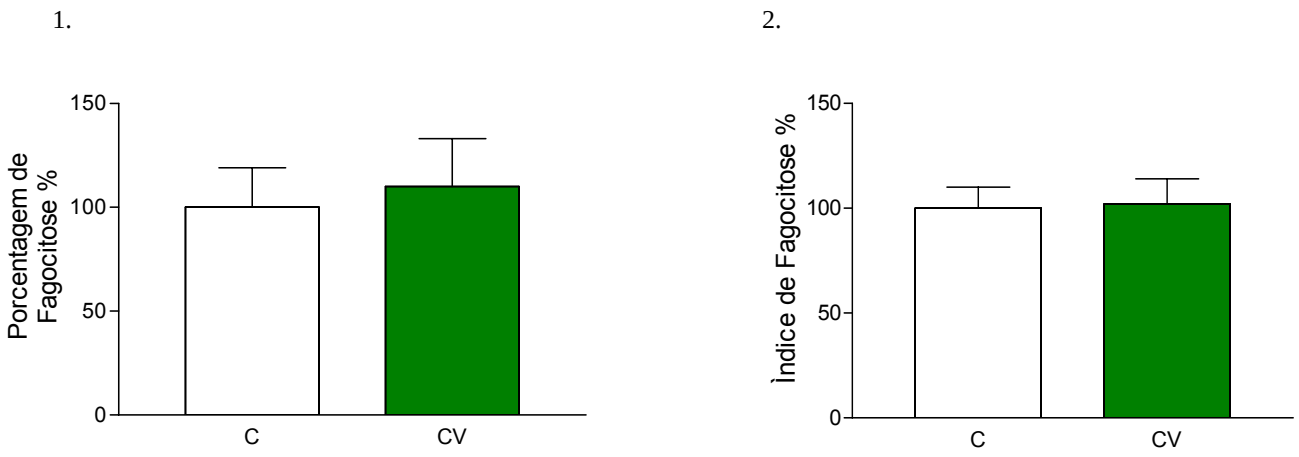


Figura 16: Efeitos do pré-tratamento com *C. vulgaris* (CV - 200 mg/Kg/dia) por 5 dias consecutivos sobre a atividade funcional de neutrófilos. Foi avaliada a capacidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos. 1– Porcentagem de fagocitose (quantidade de neutrófilos que fagocitaram partículas de SAPI). 2 – Índice de fagocitose (quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos). O grupo controle (C) foi apenas manipulado. Teste "t" de Student. Os resultados representam a média ± DP de 8 animais.

Tabela 1: Efeitos do pré-tratamento com *C. vulgaris* (200mg/Kg/dia) por 5 dias consecutivos sobre a atividade funcional dos neutrófilos sanguíneos (*burst* e fagocitose) de ratos Wistar avaliada por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± DP.

GRUPOS[1]	Burst Oxidativo			Fagocitose	
	Basal	PMA	SAPI	Ìndice	Porcentagem
C	20 ± 3	167 ± 31,2	84 ± 12	35 ± 3	70 ±11,4
CV	19,5 ± 3,3	168,2± 29,5	86,3 ± 17	38 ± 4,1	72 ± 13

[1] C – Controle, CV – Tratados com *Clorella vulgaris.* Teste "t" de student.

Índice: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos. **Porcentagem:** Quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI

5.7 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM *C. VULGARIS* SOBRE A ATIVIDADE FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS AOS ESTRESSORES FÍSICOS (ESTRESSE POR CHOQUE INESCAPÁVEL – CI E ESCAPÁVEL – CE) E PSICOGÊNICO (TESTEMUNHA DO CHOQUE INESCAPÁVEL - T)

Foram utilizados 56 animais divididos ao acaso em 7 grupos. Um grupo controle (apenas manipulado) e 6 experimentais. Os animais dos grupos experimentais foram submetidos a um dos três tipos de estresse: psicogênico (2 grupos), físico por choque inescapável (2 grupos) e escapável (2 grupos). No entanto, em cada condição, os animais de 1 dos grupos receberam pré-tratamento com CV (200mg/Kg/dia) por 5 dias antes da aplicação dos entressores.

Duas horas após a aplicação dos estressores foram colhidas amostras de sangue dos animais dos diferentes grupos para a determinação do *burst* oxidativo e da fagocitose dos neutrófilos deles retirados os quais foram avaliados por citometria de fluxo conforme a técnica descrita em 4.9.

Resultados

Como pode ser avaliado na figura 17 (1 e 2), não foram observadas diferenças significativas nos dados de *burst* oxidativo espontâneo (DCFH) ($F(6,49)=2,001$, $p=0,0834$), e no *burst* oxidativo induzido por PMA ($F(6,49)=2,112$, $p=0,0687$) após a aplicação dos três tipos de estressores. Observou-se apenas uma pequena tendência de redução, em ambos os *bursts*, nos grupos submetidos aos choques inescapáveis e ao estressor psicogênico. O pré-tratamento com CV não produziu mudanças significativas nestes parâmetros.

Por outro lado, a porcentagem de fagocitose (quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI- Fig 18–1) e índice de fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas pela população de neutrófilos- Fig 18–2), foram sigificativamente menores nos grupos submetidos aos choques inescapáveis e ao estressor psicogênico. Já nos animais que receberam o choque escapável, houve um aumento tanto na porcentagem quanto no índice de fagocitose: um maior número de neutrófilos fagocitaram e um número superior de partículas foram ingeridas por cada neutrófilo. O pré-tratamento com CV dos animais submetidos aos choques inescapáveis e ao estressor psicogênico preveniu a diminuição da capacidade de fagocitose. No grupo que recebeu o choque escapável, o pré-tratamento com CV impediu o aumento do índice e da porcentagem de fagocitose observado nos animais não tratados ($F_{\%fagocitose}(6,49)=13,907$, $p<0,0001$; $F_{indice\ fagocitose}(6,49)=.21,816$, $p<0,0001$).

No entanto, inversamente à redução na porcentagem e no índice de fagocitose, observou-se um aumento no *burst* oxidativo induzido pela fagocitose nos grupos submetidos aos choques inescapáveis (grupo CI) e ao estressor psicogênico (grupo T) ($F(6,49)=16,736$, $p<0,001$) (Fig 17-3). Nos animais submetidos aos choques escapáveis (grupo CE), não houve diferença significativa, em relação à medida no controle (C). Interessante observar que mesmo na presença do tratamento com CV, o *burst* induzido pela fagocitose permaneceu elevado nos animais dos grupos submetidos aos choques inescapáveis ao estressor psicogênico, enquanto que nos animais submetidos aos choques escapáveis, não se observou diferenças em relação àquela do controle (Fig 17-3). A tabela 2 apresenta a Média ± Desvio Padrão dos valores obtidos neste experimento.

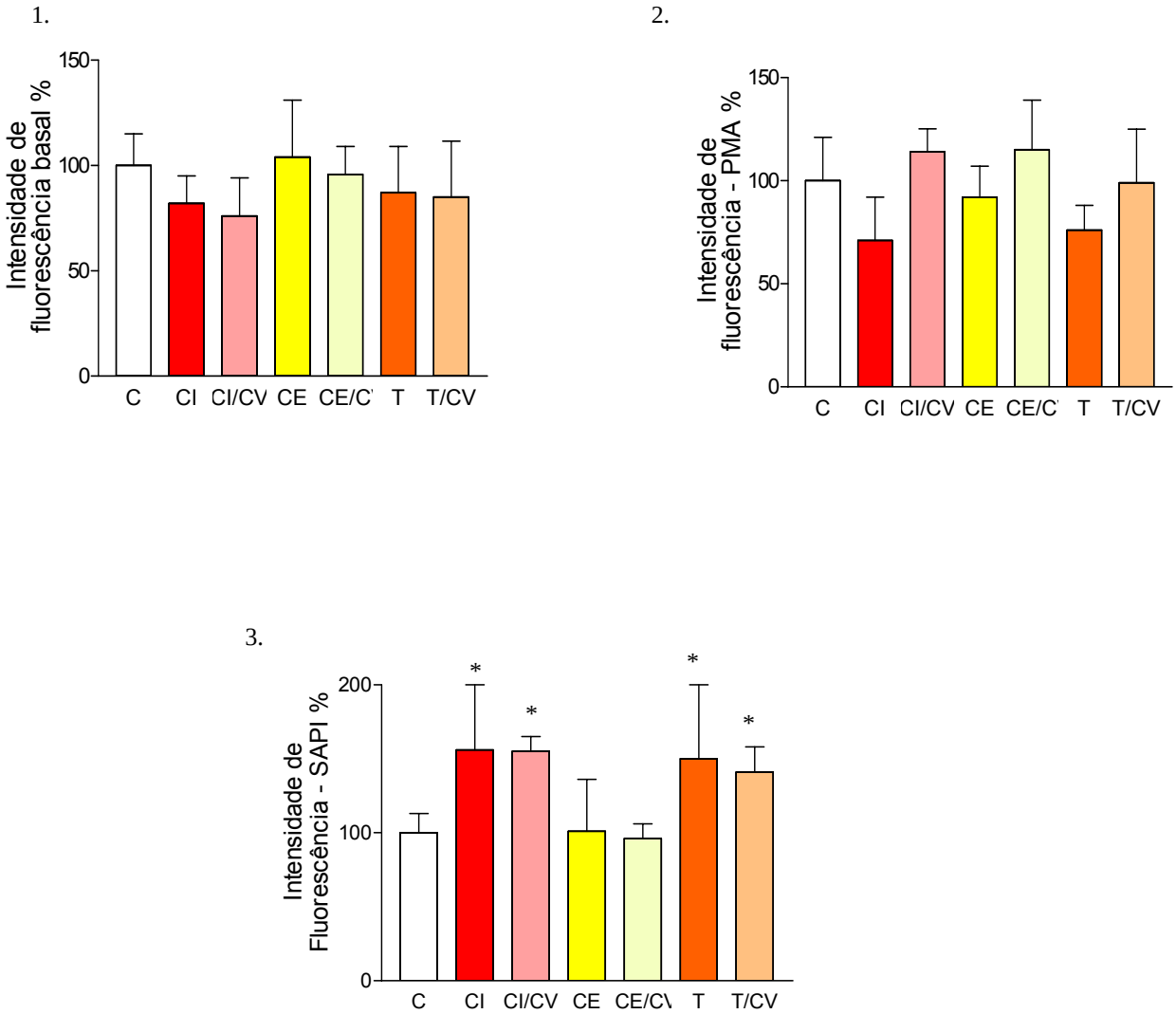


Figura 17: Efeitos do pré-tratamento com *C. vulgaris* (CV - 200 mg/Kg/dia) por 5 dias consecutivos sobre a atividade funcional de neutrófilos de animais submetidos ao estressor físico (CI – choque inescapável; CE – choque escapável) e psicogênico (T – grupo de animais testemunha do choque inescapável). Foi avaliado o *burst* oxidativo de neutrófilos sanguíneos: 1 – *burst* oxidativo basal, 2 – *burst* oxidativo após o estímulo in vitro com PMA, 3 – *burst* oxidativo após o estímulo *in vitro* com SAPI. * P<0,05 com relação ao grupo C (controle), CE e CE/CV. ANOVA – Tukey/Krammer. Os resultados representam a média ± DP de 8 animais.

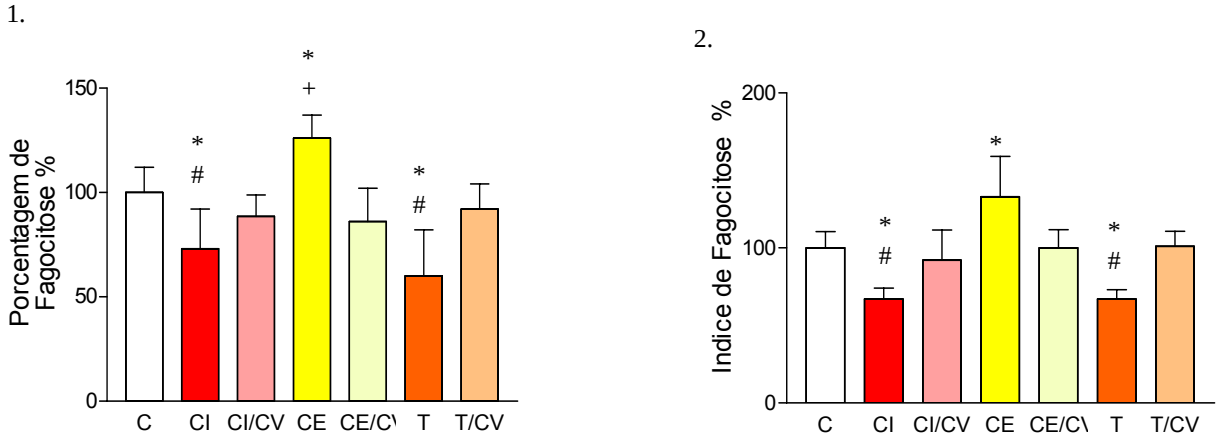


Figura 18: Efeitos do pré-tratamento com *C. vulgaris* (CV - 200 mg/Kg/dia) por 5 dias consecutivos de sobre a atividade funcional de neutrófilos de animais submetidos ao estresse físico (CI – choque inescapável; CE – choque escapável) e psicogênico (T – grupo de animais testemunha do choque inescapável). Foi avaliada a capacidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos. 1– Porcentagem de fagocitose (quantidade de neutrófilos que fagocitaram partículas de SAPI), 2 – Índice de fagocitose (quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos). * P<0,05 com relação ao grupo C (controle), CI/CV, CE/CV, T/CV. # P<0,05 com relação ao grupo CE. +P<0,05 com relação ao grupo CI e T. ANOVA – Tukey/Krammer. Os resultados representam a média ± DP de 8 animais.

Tabela 2: Efeitos do pré-tratamento com *C. vulgaris* (200mg/Kg/dia) por 5 dias consecutivos sobre a atividade funcional dos neutrófilos sanguíneos (*burst* e fagocitose) analisada por citometria de fluxo de animais submetidos ao choque inescapável (CI), escapável (CE) e ao estressor psicogênico (T). Os dados representam a média ± DP.

GRUPOS[1]	Burst Oxidativo			Fagocitose	
	Basal	PMA	SAPI	Porcentagem	Ìndice
C	20 ± 3	170 ± 25,5	79 ± 10,5	67,5 ±11,4	34 ± 3,5
CI	15 ± 2,4	144 ± 36	123 ± 34,5 *	49,5 ± 13 • #	22,5 ± 2,4 • #
CI/CV	17 ± 3,9	174,5± 17	155,3 ± 9,9 *	62,7 ± 8,4	27,5 ± 5,8
CE	19,5 ± 5	187 ± 31	82,5 ± 14,5	85,3 ± 7 • +	45 ± 8,8 •
CE/CV	20,9 ± 2,9	177 ± 34,5	87 ± 9,4	60,3 ± 11,1	30 ± 3,5
T	16,4 ± 4	153 ± 28	115,2 ± 24 *	42,5 ± 11,7 • #	22,5 ± 2 • #
T/CV	18,6 ± 4,7	151,8 ± 38,3	135,6 ± 17,5 *	64,5 ± 8,5	30,3 ± 2,9

* P<0,05 com relação ao grupo C, CE, CE/CV. • P<0,05 com relação ao grupo C, CI/CV, CE/CV, T/CV. # P<0,05 com relação ao grupo CE. +P<0,05 com relação ao grupo CI e T. ANOVA – Tukey/Krammer.

[1] C – Controle, CI - Estresse físico por Choque Inescapável, CI/CV - Estresse físico por Choque Inescapável após o tratamento com *C. vulgaris*, CE – Estresse físico por Choque Escapável, CE/CV - Estresse físico por Choque Escapável após o tratamento com *C. vulgaris*, T- Estresse Psicogênico, T/CV - Estresse Psicogênico após o tratamento com *C. vulgaris.* - One way ANOVA seguido de Tukey/Krammer.

Índice: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos. **Porcentagem:** Quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI

6. DISCUSSÂO

Analisando-se nossos resultados em seu conjunto, depreende-se que o pré-tratamento com a solução aquosa de CV protegeu os animais da redução induzida pelos estressores físicos por choque inescapável e psicogênico e pela infecção pela LM na capacidade de crescimento e diferenciação de células progenitoras hematopoéticas em granulócitos e macrófagos. Além disso, observou-se uma alteração na atividade funcional de neutrófilos sanguíneos de animais submetidos aos estressores físicos ou psicogênico, alteração esta que foi revertida pela CV. De forma específica, observamos que o pré-tratamento com CV: 1) Preveniu a mielossupressão induzida pelos estressores físico (por choque inescapável - CI) e psicogênico (T), pela infecção por LM, assim como pela associação do choque inescapável ou psicogênico + infecção; 2) Preveniu a redução da fagocitose de neutrófilos observada em animais dos grupos CI e T; 3) Impediu o aumento da fagocitose induzida pelo choque escapável (grupos CE); 4) Não interferiu com o *burst* oxidativo de neutrófilos colhidos de animais dos grupos CI e T e 5) Aumentou em 50% a sobrevida de animais inoculados com dose letal de LM e em 20% a sobrevida de animais submetidos aos estressores físicos (CI e CE) ou psicogênico (T) previamente à infecção.

Os resultados de supressão da resposta mielopoética frente aos estressores físicos e psicogênico ou à infecção com LM observados no presente trabalho, são corroborados por dados previamente obtidos pelo nosso grupo da UNICAMP. Neste sentido, observou-se que o crescimento e diferenciação de células progenitoras hematopoéticas em granulócitos e macrófagos (CFU-GM), na presença de um fator de crescimento específico para essas linhagens celulares (GM-CSF), foi comprometido ou pela exposição ao chumbo (Rodrigues, 2005), ou a uma infecção pela bactéria LM

(Malacrida, 2003, Queiroz et al., 2003), ou ao tumor ascítico de Ehrlich (Justo et al, 2001) ou a estressores de natureza física (Malacrida, 1997; Souza-Queiroz et al., 2004).

Neste sentido, Rodrigues (2005), relatou a existência de um comprometimento significativamente maior no número de CFU-GM da medula óssea de animais expostos ao mesmo tempo ao chumbo e a uma infecção com uma dose sub-letal de LM. Da mesma forma, obtivemos no presente trabalho uma maior susceptibilidade do organismo frente à infecção por LM quando aplicamos os estressores físico (por choque inescapável) e psicogênico previamente à inoculação desta bactéria.

Este aumento da susceptibilidade à LM observado neste trabalho bem como após exposição ao chumbo ou aos estressores físico (choque inescapável) e psicogênico corrobora, também, as respostas observadas *in vitro* através de uma cultura líquida e de longa duração de células precursoras hematopoéticas (LTBMC). Esta técnica permite uma medida quantitativa da capacidade proliferativa hematopoética *in vitro* (Rodrigues, 2005; Souza-Queiroz, artigo em preparação). Observou-se, nesta cultura, uma redução intensa das áreas ativas de hematopoese quando as células hematopoéticas eram colhidas de animais expostos ao chumbo (Rodrigues, 2005) ou submetidos ao estressor de natureza física por contenção e frio (Souza-Queiroz, artigo em preparação).

Tanto os presentes resultados como aqueles obtidos *in vitro* parecem ser conseqüência de alterações induzidas pelo estressor ou pela exposição ao chumbo, no microambiente do organismo. De fato, sabe-se que as células hematopoéticas dependem de interações celulares com o microambiente formado pelo estroma medular para manterem seu crescimento e diferenciação em equilíbrio (Salgado, 1996). Nas situações acima descritas, pode ter ocorrido um comprometimento dessa interação, muito provavelmente por alterações induzidas pelo estressor ou pelo chumbo na atividade das citocinas (Khansari et al., 1990; Turbull e River, 1999, Bessler et al., 2000, Rodrigues, 2005).

Sabe-se, neste sentido, que o controle da mitose e diferenciação das células hematopoéticas depende de diferentes citocinas, particularmente os fatores estimuladores de colônias (CSFs), IL-6, entre outros (Cheers, Haigh, Kelso, 1988; Nicola, 1989; Shieh, Peterson, Moore, 1994; Anjos et al., 2000). Assim, por exemplo, a produção de IL-6 foi modificada mais pela situação de exposição ao chumbo + LM, que pela aplicação destes estímulos separadamente (Rodrigues, 2005). No entanto, devem também, ser considerados nesta situação experimental, possíveis alterações nos níveis dos fatores estimuladores de colônias (CSFs) visto que estes fatores regulam a produção, maturação e função dos granulócitos e monócitos-macrófagos (Zhan et al., 1998; Rodrigues, 2005). Neste contexto, sabe-se que um efeito essencial dos CSF's é o de ativar as células hematopoéticas, aumentando a mielopoese (Dantas e Queiroz, 1999). Por outro lado, sabe-se também que a maior produção de CSFs provém de populações de monócitos/macrófagos (Zhan et al., 1998**,** Dantas e Queiroz, 1999). Assim, é possível supor que as condições experimentais usadas neste trabalho (choque inescapável ou estressor psicicogênico e/ou infecção por LM) tenham modificado o perfil de citocinas hematopoéticas interferindo, desta forma com a resistência dos animais à infecção, aumentando sua mortalidade. De fato, observamos alterações na atividade de neutrófilos induzidas tanto pelo estresse como pela CV e estes, sabidamente interferem com a produção de CSFs (Hasegawa et al., 1997, 2000).

Neste sentido, situações como aquelas geradas na presença de diferentes estressores, incluindo a evolução de processos infecciosos e tumorais e exposição a metais pesados podem comprometer a atividade do sistema hematopoético através de mudanças induzidas nos sistemas neuroendócrino e/ou imunológico. Neste sentido, a modulação da atividade de células hematopoéticas por glicocorticóides, catecolaminas e peptídeos opióides constitui uma via importante através da qual os sistemas

neuroendócrino e opioidérgico influenciam as respostas imunológicas (Besedovsky et al., 1985; Blalock, 1994 a; Weigent e Blalock, 1995). Por outro lado, além desta rede de controle humoral, têm sido descritas vias diretas de interação entre fibras neurais e células imunes em gânglios e na medula óssea (Elenkov et al., 2000). De particular importância para esta discussão são os estudos que demonstraram serem as fibras neurais que chegam até a medula óssea uma fonte para a liberação de catecolaminas e de neuropeptídeos que são capazes de modular a atividade hematopoética quer *in vivo* e quer *in vitro* (Miyan et al., 1998, Elenkov et al., 2000).

Maestroni e Conti (1994) demonstram *in vivo* que o antagonista α-adrenérgico prazozin, muito provavelmente por atuar em receptores presentes em células precursoras de granulócitos e macrófagos, aumenta a produção destas células pela medúla óssea, fato que demonstra que a mielopoese está sob influência inibitória autonôma simpática. Neste sentido, experimentos *in vitro* mostraram ser a noradrenalina capaz de inibir o crescimento e diferenciação de unidades formadoras de granulócitos e macrófagos e, também, que o bloqueio da transmissão adrenérgica (por 6-hidroxidopamina ou prazozin) resulta em um aumento deste parâmetro (Maestroni e Conti, 1994).

Neste sentido, Tang et al. (1999) observaram que exposição ao frio aumentou em 36% o *turnover* de noradrenalina na medula óssea de roedores, enquanto que em animais infectados com *Pseudomonas aeruginosa* este aumento chegou a 131%. Assim, é provável que as variáveis por nós usadas (choque inescapável ou estressor psicogênico e/ou infecção por LM) tenham produzido seus efeitos, pelo menos em parte, via ativação do SNAS.

Neste contexto Malacrida (1996) demonstra que os peptídeos opióides participam dos efeitos supressores do estresse sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos em granulócitos e macrófagos, uma vez que a administração do

antagonista opióide (naloxona) foi capaz de reverter o efeito mielossupressor induzido pelo estresse. Igualmente, Fonseca et al. (2005) obtiveram resultados que mostraram a relevância do sistema opióidérgico nos efeitos produzidos por um estressor. Observaram em especial, que o bloqueio de receptores opióides pela naloxona preveniu as alterações comportamentais e imunológicas produzidas por um estresse pré-natal. Assim, ao menos *a priori*, não se pode descartar uma participação também do sistema opioidérgico em nossos resultados de mielopoese após o choque inescapável ou estresse psicogênico e/ou infecção por LM.

Por outro lado, dados da literatura vêm demonstrando que os efeitos induzidos pelo estresse na atividade de células sanguíneas maduras dependem das comunicações entre o SN e SI. Assim, por exemplo, estudos clínicos e experimentais demonstraram que a exposição a estressores altera a atividade de diferentes populações celulares comprometidas com a resposta imunológica, tais como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Chrousos, 2000; Palermo-Neto et al., 2001; Palermo-Neto et al., 2003). Neste contexto, mostramos, no presente trabalho, que tanto o choque inescapável quanto o estressor psicogênico diminuíram o número de neutrófilos que realizaram fagocitose e a quantidade de partículas fagocitadas por cada neutrófilo (porcentagem e índice de fagocitose, respectivamente) e aumentaram o *burst* oxidativo induzido pela fagocitose destas células. No entanto, ao contrário do que se encontrou nos animais submetidos ao choque inescapável ou ao estressor psicogênico, nos animais submetidos ao choque escapável, observou-se um aumento na porcentagem e no índice de fagocitose, e não se encontraram alterações no *burst* oxidativo induzido pela fagocitose. Os nossos resultados de fagocitose após choque inescapável e estressor psicogênico concordam com aqueles obtidos em macrófagos por Palermo-Neto et al. (2001 e 2003) após a aplicação de um estressor por choque inescapável pré-natalmente e sugerem o envolvimento direto ou

indireto da imunidade celular inata com os achados agora relatados frente às situações estressoras e infecção por LM.

Neste contexto, vale lembrar que células maduras como os neutrófilos têm sua atividade modificada por ativação do eixo HHA e/ou do SNAS (Hasegawa et al, 2000; Kohm e Sanders, 2000; Rice et al., 2001) e que elas estão ligadas à defesa orgânica contra infecções (Hasegawa et al., 2000), em particular contra LM (Dantas e Queiroz, 1999; Rice et al., 2001; Eberlin et al., 2005). De fato, neste trabalho, assim como em muitos outros, mostrou-se ser um estressor capaz de diminuir a atividade fagocítica de neutrófilos, fato também relatado em macrófagos (Marino et al., 2001; Fonseca et al., 2002; Palermo-Neto et al., 2001 e 2003). Ishigami (1919), em especial, relatou pela primeira vez uma diminuição da fagocitose de bacilos da tuberculose por macrófagos provenientes de crianças que passavam por uma situação de severo estresse emocional. Da mesma forma, tem sido relatado que o estresse por contenção, assim como aquele induzido por choque inescapável em animais de laboratório, diminui a fagocitose de partículas de zymosan e de carbono por macrógagos, muito provavelmente, devido a uma ativação do eixo HHA e/ou do SNAS (Okimura et al., 1986; Palermo-Neto et al., 2001 e 2003). No entanto, assim como Palermo-Neto et al. (2003), observamos agora um aumento do *burst* oxidativo induzido pela fagocitose após choque inescapável e estressor psicogênico, fato que não concorda com dados obtidos em outras situações experimentais (Palermo-Neto et al., 2001; Righi e Palermo-Neto, 2005). Estas diferenças de resultados devem-se, muito provavelmente, aos tipos de estressores usados e à complexidade das interações entre o SNC e SI.

Neste sentido, diversos trabalhos têm apontado que as respostas de linfócitos T são afetadas de forma diferencial pelas atividades do eixo HHA e do SNAS. De modo geral, sabe-se que as catecolaminas e os glicocorticóides atuam favorecendo as respostas do tipo Th2, devido a uma inibição por eles induzidas nas citocinas Th1 (IL-12,

TNF-α e INF-γ) (Carrasco; Van De Kar, 2003), resultando este fato geralmente em uma diminuição no número de células imunocompetentes no sangue, incluindo-se aqui timócitos e linfócitos T periféricos (Dhabhar et al., 1995, Stratakis e Chrousos, 1995; Dominguez-Gerpe et al., 1998). Sabe-se, por outro lado, que além dos efeitos diferenciais do estresse sobre o balanço Th1 e Th2 1) nem todo estressor produz o mesmo padrão de resposta neuroquímica; 2) nem toda espécie e sexo de animais responde a um determinado estressor da mesma maneira, tanto do ponto de vista comportamental como neuroquímico e imunológico, e, 3) nem toda "função imune" é igualmente afetada pela aplicação de um mesmo agente estressor. Portanto, em resposta a um agente agressor a "função imune" pode ser suprimida, incrementada ou até mesmo, permanecer inalterada (Moyanahan et al., 1994).

Neste contexto, sabe-se que a secreção de espécies reativas de oxigênio (O_2^-, H_2O_2, OH^-) por neutrófilos e macrófagos é extremamente complexa. No entanto, embora muito estudada, é pouco compreendida em seu nível molecular (Johnston, 1978; Adams, Hamilton, 1984). Parece ser consenso geral, entre os pesquisadores que a secreção/produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) depende de pelo menos 3 sub-capacidades: 1) número ou afinidade do receptor (Fc e complemento) pelo "triggering" ligante; 2) eficiência de ligação destes receptores às oxidases e 3) níveis de oxidase necessários para produzir O_2^- e outros EROs. A principal enzima responsável pela produção de EROs é a NADPH oxidase, que está localizada, pelo menos na sua forma ativa, principalmente na e/ou próxima à membrana plasmática. Portanto, a geração de O_2^- e outros EROs por estímulos externos, como a presença de bactéria, requer a ativação do NADPH oxidase (Mcphail, Synderman, 1983; Sasada et al., 1983). Parece, pois, razoável sugerir frente aos nossos dados que os eventos estressantes por choque inescapável e estresse psicogênico por nós utilizados foram capazes de interferir com a produção de H_2O_2, por alterar a via de ativação da NADPH oxidase. Se tal mecanismo

ocorre, ele não foi induzido pelo choque escapável e foi tão pouco foi afetado pelo tratamento com CV em todos os grupos.

Neste sentido, as citocinas desempenham um papel relevante na produção de EROs (Stites, Terr, 1991), o que torna possível sugerir que os efeitos diferenciais das condições experimentais agora usadas sobre o *burst* oxidativo induzido pela fagocitose, sejam conseqüência de alterações também diferenciais nos padrões de citocinas produzidas e/ou liberadas pelas células imunes, na presença de um cenário em que predominam glicocorticóides e/ou catecolaminas. Neste sentido, Ortega et al. (2000) mostraram que diferentes concentrações de noradrenalina aplicadas *in vitro* podem aumentar ou diminuir a produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais de ratos, na dependência da dose usada. Alves (2005), neste sentido, não encontrou qualquer diferença nos níveis séricos de glicocorticóides de animais submetidos a um estressor psicogênico crônico, fato que sugere o não envolvimento do eixo HHA com os efeitos observados. Palermo-Neto et al (2003) relataram ativação do eixo HHA após aplicação de um estresse por choque escapável e não observaram alterações induzidas por esta situação experimental na atividade de macrófagos peritoneais ativados por onco-BCG.

Uma vez que a CV não interferiu com o *burst* oxidativo dos animais estressados e os protegeu da infecção por LM, descarta-se, ao menos *a priori*, o envolvimento dos radicais livres de oxigênio com os efeitos protetores da alga. No entanto, a prevenção induzida pela CV nos efeitos dos estressores sobre a fagocitose persiste e pode ser relevante para a compreensão dos fenômenos agora observados.

Neste sentido, alguns estudos têm demonstrado que a CV aumenta não apenas a quantidade, mas também a atividade funcional de fagócitos, principalmente de neutrófilos,

em camundongos tornados neutropênicos por exposição a quimioterápicos (Tanaka et al., 1998; Konishi et al., 1985, 1990, 1996). Tem sido relatado que a *Chlorella* induz um aumento nos níveis de mRNA específico para o fator de crescimento para granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Sabe-se que o GM-CSF desempenha papel essencial na geração de células fagocíticas mediadoras da defesa e reparo tecidual. (Hasegawa et al., 1997, 2000). Observamos no presente trabalho que o pré-tratamento com CV não só impediu o comprometimento da fagocitose induzido pelo estresse físico por choque inescapável e psicogênico, mas que também manteve o aumento induzido pela fagocitose no *burst* oxidativo.

É importante ressaltar, que os processos ligados à fagocitose e ao *burst* oxidativo de neutrófilos podem ser eliciados por vias diferentes que os regulam de forma independente (Van Eaden et al., 1999). Esta independência de ações justificaria o fato de termos observado que o choque inescapável e o estressor psicogênico tenham produzido diminuição na capacidade de fagocitose e aumento no *burst* oxidativo. No entanto, cabe a pergunta: porque o choque escapável aumentou a fagocitose e não interferiu com o *burst* ?

A fagocitose é um fenômeno complexo que se inicia pela ligação da partícula a ser fagocitada a receptores específicos presentes na superfície da célula imune. Existem vários receptores fagocíticos; dentre eles citamos o Fc γR (receptores para a porção Fc da IgG ligada a partícula), receptores CR (receptores para alguns componentes do sistema complemento depositado em algumas superfícies das partículas), receptores de lectina e receptores *scavenger*. A internalizarão da partícula é o resultado de muitas vias de sinalização que, em seu conjunto, coordenam o rearranjo do citoesqueleto da célula imune e, portanto a formação do fagócito.

Sabe-se que neutrófilos, assim como macrófagos têm receptores de superfície para glicocorticóides (Madden, Sanders e Felten, 1995; Pujols et al., 2002); estes

receptores, se ativados, modulam a resposta destas células. Esta imunomodulação, associada ao estresse, está descrita em vários trabalhos que correlacionaram alterações dos níveis de glicocorticóides com a atividade de neutrófilos e macrófagos (Massoco et al., 1999; Okimura et al., 1986; Righi et al., 1999; Palermo-Neto et al 2003).

Assim, uma vez que os glicocorticóides modulam a atividade Th1 e Th2 e, desta forma, através de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, a atividade do sistema imunológico (Schwarz et al., 2001; Pujols et al., 2002), pode-se sugerir o envolvimento dos mesmos com os diferentes achados experimentais. Especificamente, o choque inescapável e o estressor psicogênico poderiam modular o eixo HHA de forma diferenciada daquela induzida pelo choque escapável. Entretanto e como mencionado anteriormente, não foram encontrados níveis alterados de glicocorticóide em estudos que relataram efeitos do estresse sobre a resposta imunológica (Moynihan, Cohen, 1992; Ader, Cohen, 1993; Alves, 2005), o que abre espaço para a análise de outros fatores que poderiam estar atuando de forma intercorrente como, por exemplo, a ativação do SNAS e, dentre tantos outros, o envolvimento do sistema opioidérgico.

À luz dos presentes achados experimentais, parece-nos razoável sugerir que tanto o choque inescapável quanto o estresse psicogênico estejam ativando de forma semelhante áreas do SNC como, por exemplo, o hipotálamo e a amigdala e, como conseqüência disto, produzindo respostas idênticas de mielossupressão, diminuição na capacidade de fagocitose de neutrófilos e aumento no *burst* oxidativo por estas células. Neste contexto, o etressor físico por choque escapável atuaria de forma diferenciada. Parece-nos que a amigdala desempenha papel fundamental nas diferenças agora apresentadas para os efeitos de estressores de diferentes tipos.

A amigdala é uma pequena estrutura em forma de amêndoa, situada no interior da região antero-inferior do lobo temporal. Interconecta-se com o hipocampo, com os núcleos

septais, com a área pré-frontal e o com o núcleo dorso-medial do tálamo. Está envolvida na produção de comportamentos associados ao medo e à ansiedade e tem sido considerada por diversos autores como o centro identificador de perigo, colocando o animal em situação de alerta e, preparando-o para se evadir ou lutar. A função da amígdala é, portanto, a de avaliar os estímulos provenientes do meio ambiente, sinalizando para a matéria cinzenta periaquedutal e hipotálamo o grau de perigo ou ameaça que eles representam para o organismo (Kander, 2005; Bear, 2002). Após uma avaliação da situação pelo animal, a amigdala pode mediar a liberação de adrenalina, noradrenalina e/ou cortisol através do núcleo pontino coeruleus (Kandel, 2005; Bear, 2002).

Desta forma, informações sensoriais de todo tipo chegam até a amigdala via projeções do córtex e uma variedade de estruturas sub-corticais que convergem para o núcleo basolateral da amigdala (BLA) (Ledoux et al., 1990). Este núcleo faz parte dos circuitos que modulam o comportamento afetivo (RosenKranz et al., 2005). Neste sentido, mostrou-se que vários neurotransmissores são liberados em grande quantidade no BLA durante situações emocionais, dentre eles, a noradrenalina (Quirarte et al., 1998; Willians et al., 2000), a serotonina (Amat et al., 1998), a dopamina (Uehara et al., 2003) e a acetilcolina (McIntyre, 2003). Mais especificamente, relatou-se um aumento da liberação de noradrenalina no BLA em situações específicas de choque inescapável e do estressor psicogênico (ato de testemunhar a aplicação de choque inescapável) (Uehara et al., 2005). De fato, segundo este autor a aplicação aguda destes dois tipos de estressores aumenta a atividade neural e a demanda de energia dos neurônios do BLA. Assim, é possível que a amigdala tenha sido ativada de forma diferencial no presente experimento pelo choque inescapável e pelo estressor psicogênico que pelo choque escapável. Uma ativação diferencial, como esta agora proposta, poderia responder por níveis diferentes de estimulação do eixo HHA e/ou do SNAS e, conseqüentemente por toda cascata

neuroimunológica que culminaria com os efeitos agora obtidos. Neste caso, a CV poderia estar atuando indiretamente via modulação da atividade do SNC, em especial da amigdala e/ou diretamente modulando o perfil de citocinas envolvidas com a mielossupressão e/ou ativação de neutrófilos. Neste sentido, teria a CV um efeito ansiolítico? De fato, já se observou que os efeitos produzidos pelo choque inescapável e pelo estressor psicogênico sobre a atividade neural foram revertidos pela administração de diazepan, um conhecido ansiolítico (Nagy et al., 1979). Futuros experimentos poderão esclarecer este fato.

Assim, e dentro deste contexto, uma explicação lógica para as respostas diferenciais observadas ao aplicarem-se os estressores por choque inescapável e psicogênico de um lado e choque escapável de outro envolveria um fator emocional que estaria associado ao estressor físico por choque escapável. Este fator alteraria dramaticamente o impacto do estressor sobre o organismo. Em outras palavras, o fato de poder controlar uma reação adversa, como a possibilidade de escapar de um choque nas patas, permitiria ao cérebro deflagrar uma resposta diferenciada, através de um mecanismo conhecido como “coping” (Hansen et al., 1978).

Acredita-se, neste sentido, que a geração do mecanismo de *‘coping’* esteja vinculada à atividade do sistema límbico. Este sistema foi descrito como um circuito de estruturas corticais e subcorticais responsável pela gênese e controle das emoções. Considera-se que o sistema límbico seja uma rede de estruturas que faz a interface entre o neocórtex e o hipotálamo, sendo o responsável pelo controle das reações autonômicas características das emoções (Bear, 2002; Kandel, 2005). De fato, as estruturas do sistema límbico funcionam de maneira integrada compondo um sistema mediador de funções viscerais e comportamentos emocionais (McLean, 1952)

Neste contexto, parece-nos relevante destacar que já foi demonstrado que a exposição a estressores incontroláveis (como a um choque inescapável) leva a modificações comportamentais e imunológicas que não estão presentes quando se pode controlar o estressor (choque escapável), mesmo se estes forem idênticos em sua intensidade, duração e distribuição temporal (Weiss et al., 1981; Anisman et al., 1991; Maier, 1993; Palermo-Neto, 2003). Neste sentido, Helmreich (2005) demonstrou que a capacidade de um animal em controlar um choque preveniu o aparecimento de úlceras gástricas, que foram encontradas em animais que não tinham possibilidade de escapar deste choque. Da mesma forma, Swenson e Vogel (1983) verificaram que ratos expostos a uma única sessão de choques inescapáveis exibiram um pico mais alto de adrenalina e noradrenalina no plasma, quando comparados a outros que receberam choques escapáveis. Talvez este último achado seja importante para nossos resultados. De fato, como já mencionado anteriormente, as catecolaminas têm íntima participação nos fenômenos imunológicos e/ou na qualidade/quantidade de citocinas liberadas por estímulos imunes.

Neste sentido, vários trabalhos da literatura têm demonstrado que a estimulação do SNAS pelo estresse pode ter um importante papel no aumento da susceptibilidade do organismo frente à uma infecção. Assim, Tran et al (1985), constataram que o tratamento com agonistas adrenérgicos aumentou a mortalidade durante infecções com bactérias gram-negativas. Rice et al. (2001) evidenciaram que a simpatectomia química por 6-OHDA diminuiu a carga da bactéria LM no baço, fato que estaria relacionado a um aumento do número de neutrófilos esplênicos durante a fase inicial da infecção. O aumento no número dessas células seria responsável por potencializar a eliminação da bactéria pelo sistema imunológico do hospedeiro. Dessa forma, quer nos parecer que um aumento da atividade do SNAS induzida pelo choque inescapável e estresse pisicogênico tenha resultado em aumento subseqüente da susceptibilidade orgânica às infecções por

LM por diminuir a resposta inata à infecção, alterando a habilidade do hospedeiro de eliminar o patógeno, como já proposto em outro local (Rice et al., 2001). Neste contexto, e como já sugerido, o choque inescapável/estressor psicogênico e o choque escapável estariam modulando de forma diferencial o SNAS dos animais. Estaria este fato ligado à ativação diferencial do SNC pelos estressores? Estudos futuros podem buscar esta resposta.

Análises adicionais de nossos resultados mostram que eles corroboram estes estudos que demonstram ser o estresse capaz de aumentar a susceptibilidade dos organismos às infecções. Acreditamos que este aumento de susceptibilidade seja conseqüente principalmente da mielossupressão induzida pelos estressores nos animais, como agora encontrado nos ratos submetidos ao choque inescapável e ao estressor psicogênico. No caso específico de uma infecção, como na listeriose, sabe-se que a capacidade da medula óssea de produzir e mobilizar granulócitos e macrófagos para o local da infecção é um componente essencial da defesa do hospedeiro durante a resposta inflamatória inicial sendo, conseqüentemente, relevante para a sobrevivência dos animais (Wing et al., 1984; Metcal et al., 1986; Cheers et al., 1988; Kayashima et al., 1993; Zhan et al., 1998; Dantas e Queiroz, 1999). Assim, uma redução na atividade de precursores hematopoéticos induzida pelo estresse implicaria em uma resposta inflamatória deficiente e em uma resistência natural prejudicada (Wing et al., 1985; Bincolleto et al., 1996; Quadros et al., 1999; Dantas et al., 1999; Melo, Justo e Queiroz, 2001; Queiroz et al., 2000 e 2003). Em animais previamente estressados, esta queda da resistência seria traduzida, em última instância pelo aumento da susceptibilidade do organismo às infecções.

Assim por exemplo, a aplicação de um choque elétrico nas patas, aumentou a susceptibilidade de camundongos ao vírus *Herpes simplex* (Kusnecov et al., 1992); um

estresse sonoro foi capaz de suprimir as respostas mediadas por linfócitos T e B (Sobrian et al., 1997); um choque elétrico aplicado de forma inescapável aumentou o número de células encontradas no lavado broncoalveolar de ratos sensibilizados com ovalbumina (Portela et al., 2001); estressores de natureza física e psicológica foram capazes de diminuir tanto a atividade de macrófagos peritoneias ativados por onco-BCG como a resistência de camundongos ao tumor de Ehrlich (Palermo-Neto et al., 2003). Neste último trabalho, mostrou-se que esta redução na imunidade estava inversamente correlacionada aos níveis de ansiedade apresentada pelos camundongos, como avaliado através do campo aberto, do labirinto em cruz elevada e dos níveis séricos de corticosterona.

Neste sentido, na presença do choque inescapável e do estressor psicogênico, constatamos uma mielossupressão significativa logo nas primeiras 24 horas após a infecção. Entretanto, na ausência destes tipos de estressores, este efeito só apareceu 48 horas após a inoculação de LM. Além disso, deixamos de observar nos animais estressados a tendência de recuperação observada nos animais apenas infectados às 72 horas após a inoculação de LM.

Existem algumas hipóteses para justificar a diminuição do crescimento e da diferenciação das células progenitoras da medula óssea em situações de estresse e infecção com LM. Uma delas pressupõe que durante a fase inicial desta infecção ocorra uma diminuição no número de CFU-GM da medula óssea, o que estaria relacionado com a migração maciça destas células para o baço. Ocorreria, neste caso, uma hematopoese extramedular com conseqüente esplenomegalia e aumento nas concentrações séricas de fatores estimuladores de colônias (CSFs) em detrimento da medula óssea (Metcalf, 1984; Young e Cheers, 1986; Olfert et al., 1993;). Outra hipótese, conforme sugerido por Wing et al. (1985), pressupõe a ocorrência de um estresse por “excesso de produção” nas células progenitoras frente às demandas do organismo infectado. Esta última hipótese

torna-se mais atraente se lembrarmos que a mielossupressão foi observada apenas 48 horas após a inoculação de um animal com a bactéria.

Join-Lanbert et al. (2005), neste contexto, apresentaram uma justificativa inédita para este fato. Estes autores sugeriram que esta diminuição nos números de CFU-GM da medula óssea possa ser conseqüência de uma invasão e crescimento da bactéria LM nas células mielomonocíticas imediatamente após sua inoculação intravenosa, fato que impediria assim a atividade natural destas células. Sugere-se, neste sentido, que esta invasão estaria ocorrendo devido ao intenso recrutamento dos neutrófilos para a periferia durante a fase inicial da infecção, o que reduziria a capacidade de proteção do hospedeiro (Kratz and Kurlander, 1988; Conlan and North, 1991). Destacamos, neste momento, e como já descrito, que no presente trabalho observamos alterações significativas na atividade de neutrófilos (na % e índice de fagocitose e *burst* oxidativo) após os diferentes tipos de estresse.

De destacar-se, ainda, que a solução aquosa de *C. vulgaris* tem sido utilizada profilaticamente em situações de inoculação de tumor (tumor ascítico de Ehrlich) (Justo et al., 2001), bactéria (*L. monocytogenes*) (Dantas & Queiroz, 1999; Dantas et al., 1999; Queiroz et al., 2002, 2003), exposição ao chumbo (Queiroz et al., 2003) e ou ao estresse agudo por contenção e frio. De uma forma geral, tem sido demonstrado um efeito mieloprotetor para a alga, uma vez que ela protege o organismo da diminuição do crescimento e diferenciação das células progenitoras hematopoéticas que está presente nas condições descritas (Dantas et al., 1999; Justo et al., 2001; Queiroz et al., 2002; Souza-Queiroz et al., 2004; Queiroz et al., 2003). Nestas condições, a maior demanda sobre o sistema hematopoético resulta em redução significativa no número de células precursoras para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea. Um experimento com camundongos da linhagem C57BL/10, geneticamente resistentes à

infecção com LM, demonstrou que estes animais apresentaram maiores números de CFU-GM na medula óssea antes e depois da infecção, quando comparados com camundongos BALB/c, demonstrando o quão importante são estas células para a sobrevivência do hospedeiro infectado. Além disso, foi observado um aumento precoce do influxo de fagócitos para o foco da infecção nos BALB/c, o que se deve provavelmente, à presença de uma maior quantidade de células precursoras hematopoéticas na medula óssea e no baço destes animais (Cheers et al., 1988; Cheers e Stanley, 1988).

O aumento de resistência à infecção por LM proporcionada pelo pré-tratamento com CV justifica-se, em grande parte, pelo aumento de citocinas hematopoéticas (CSFs) às 48h e 72h após a infecção (Dantas e Queiroz, 1999). Sabe-se, a esse respeito, que a mobilização de neutrófilos maduros durante a infecção depende da produção destas glicoproteínas, o que as torna fundamentais para a sobrevivência dos animais durante a infecção com LM (Dantas e Queiroz, 1999). Neste contexto, o pré-tratamento com CV impediu a diminuição no número de células progenitoras na medula óssea, diminuição esta provocada pelas situações experimentais de estresse e de infecção, como descrito anteriormente (Dantas & Queiroz, 1999; Dantas et al., 1999; Queiroz et al., 2002, 2003; Souza Queiroz et al., 2004).

Ao se investigar os mecanismos subjacentes do efeito mieloprotetor da *Chlorella,* demonstrou-se que o pré-tratamento com essa alga provocou um aumento significativo tanto dos níveis de INF-γ como da expressão gênica de citocinas ativas no sistema hematopoético, como a IL-12, IL-1α, assim como do fator estimulador do crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e do fator de necrose tumoral-α (TNF-α) (Hasegawa et al. 1997; Queiroz et al., 2002; Queiroz et al., 2003). A atividade de células natural killer (NK), potentes indutores da produção de INF-γ, também esta aumentada em presença da

Chlorella (Dantas et al., 1999). Não se conhece ao certo, no entanto, o mecanismo último pelo qual as citocinas atuam, sozinhas ou de forma sinérgica no desencadeamento do tráfego de fagócitos da medula óssea em animais pré-tratados com a CV. Neste sentido, está bem aceito o fato de que tanto GM-CSF quanto IL-12 e IL-1α constituem fatores importantes para a promoção da mielopoese e para o recrutamento de fagócitos para a periferia (Metcalf, 1985; Wang et al., 1987).

Neste sentido, recordamos que se têm demonstrado que as citocinas podem modular a fagocitose de neutrófilos e macrófagos *in vitro* e *in vivo* (Lehn et al., 1989; Keller et al., 1990). Sendo assim, podemos supor que a ação da alga sobre o mecanismo de fagocitose dos neutrófilos relatada neste trabalho e discutida anteriormente esteja relacionada a sua capacidade de estimular a produção de algumas citocinas, como IL-1, IL-12, IL-4, TNF-α, G-CSF, GM-CSF e INF-γ.

Nesse contexto, uma ativação da resposta do tipo Th1 pela *C*V poderia, também, explicar a proteção hematopoética de animais submetidos ao estressor por contenção e frio (Souza-Queiroz, em preparação) e expostos ao chumbo (Rodrigues, 2005). Esses achados confirmam a capacidade da CV de modular a mielopoese no estresse, estimulando o crescimento e diferenciação de células precursoras hematopoéticas e sugerem uma ação para a alga no microambiente envolvido com a regulação da maturação das células-tronco.

Igualmente, o aumento na sobrevida de animais inoculados com a dose letal de agente infeccioso serve como indicação da eficácia terapêutica desta alga. Observamos que o pré-tratamento com CV aumentou em 50% a sobrevida dos animais apenas inoculados. No entanto, quando os três estressores foram aplicados previamente à inoculação, houve uma redução neste parâmetro para 20%. Interessante que esta redução na taxa de sobrevida foi também observada nos animais submetidos ao choque

escapável, os quais não apresentaram respostas imunossupressoras em nenhum dos parâmetros avaliados. É possível pois que mielossupressão e o aumento da sobrevida após infecção com dose letal de LM sejam fenômenos que ocorram simultaneamente mas que não estejam diretamente e/ou totalmente relacionados. No entanto, e conforme já especificado, alguns trabalhos têm sugerido que a capacidade da alga em aumentar a sobrevida de animais infectados com LM estaria relacionada, em grande parte, à capacidade mieloprotetora da mesma (Dantas e Queiroz, 1999). Poder-se-ia sugerir desta forma que outros fatores além da mielossupressão, os quais teriam suas ações potencializadas na presença da aplicação dos diferentes tipos de estresse, estariam envolvidos, impedindo assim a recuperação total dos animais inoculados com dose letal desta bactéria. Curiosamente, observou-se neste trabalho um aumento da fagocitose nos animais submetidos ao choque escapável, fato que sugere não estar a capacidade de fagocitose envolvida com a mortalidade após LM. No entanto e de relevância, a fagocitose de neutrófilos foi avaliada *in vitro* e para o *S. aureus*, e poderia não estar refletindo a real situação experimentada pelos ratos após a infecção por LM.

Um importante aspecto demonstrado neste trabalho é que, a administração da alga não altera o estado basal de importantes indicadores da atividade fisiológica no hospedeiro normal**.** Em presença de condições adversas, no entanto, o hospedeiro que vem recebendo *Chlorella* reage mais prontamente e com maior vigor na indução de mecanismos essenciais de defesa imunológica.

Diante do exposto e considerando-se todos os dados obtidos parece-nos possível sugerir que a CV possua propriedades protetoras contra os efeitos induzidos pelos diferentes tipos de estressores sobre a série granulocítica/macrofágica, a atividade funcional de neutrófilos e sobre a sobrevida de animais estressados e infectados com

dose letal de LM. Embora os mecanismos últimos desta ação mereçam análises adicionais, estes dados são importantes uma vez que abrem novas perspectivas para estudos que envolvam a viabilidade terapêutica em infecções e/ou situações de estresse.

7. CONCLUSÕES

- A aplicação do estresse físico (choque inescapável) e psicogênico (testemunha do choque inescapável) provocou uma redução significativa no número de CFU-GM da medula óssea. O mesmo não foi observado com a aplicação do estresse por choque escapável, o qual não produziu alterações neste parâmetro.

- O pré-tratamento com CV foi capaz de reverter a mielossupressão causada pelos estresses físico por choque inescapável e testemunha.

- Quando os animais foram inoculados com dose subletal da bactéria *L. monocytogenes*, observamos uma mielossupressão apenas nas 48h e 72h. Dentre os três períodos avaliados, foi nas 48 horas seguidas da inoculação que os animais apresentaram a mielossupressão mais severa, com uma redução no número de CFU-GM semelhante à observada na aplicação dos estresses por choque inescapável e psicogênico. Nas 72h o organismo já estava se recuperando, mas ainda observamos uma redução significativa no crescimento e diferenciação das células progenitoras da medula óssea. Ao aplicar esses dois procedimentos em conjunto (os dois tipos de estresse foram administrados 2 horas antes da inoculação com LM), observou-se uma redução significativa no número de CFU-GM nas 24h e uma potencialização dessa redução nas 72h. Não observamos nenhum efeito adicional nas 48h.

- O pré-tratamento com CV foi também capaz de reverter a mielossupressão causada pela infecção com a bactéria LM e pela aplicação dos procedimentos de infecção e posterior aplicação dos 3 tipos de estresse.

- O estresse não diminuiu a taxa de sobrevida de ratos inoculados com a dose letal de *L. monocytogenes*, já que todos eles morreram até o 4º dia. O pré-tratamento com o CV protegeu 50% dos animais que foram apenas inoculados com a bactéria e 20% dos animais que foram estressados previamente à inoculação.

- O estresse diminuiu a porcentagem e o índice de fagocitose de neutrófilos circulantes e aumentou o *burst* oxidativo induzido pela fagocitose nos grupos submetidos ao estresse por choque inescapável e testemunha desse choque. Já a aplicação do choque escapável causou um aumento significativo na porcentagem e no índice de fagocitose enquanto que o *burst* permaneceu constante.

- O pré-tratamento com CV preveniu a diminuição da porcentagem e do índice de fagocitose dos neutrófilos circulantes, e manteve o *burst* oxidativo elevado nos grupos submetidos ao estresse físico por choque inescapável e psicogênico. A CV também impediu o aumento na porcentagem e no índice de fagocitose dos animais submetidos ao choque escapável.

Estes resultados em seu conjunto mostram que os estressores físico (por choque inescapável) e psicogênico afetam o sistema imune desde a fase inicial de proliferação das células até a atividade funcional de neutrófilos maduros. Mostramos, também, que o tratamento com CV protegeu o organismo dos efeitos destes estressores sobre os parâmetros analisados nos animais infectados pela LM. Finalmente, mostramos que a possibilidade de evitar o estressor é um fator relevante para os efeitos sobre o sistema imune.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v.383, p.787-793, 1996.

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

ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Annu Rev Immunol**, v. 2, p. 283-318, 1984. Review.

ADER, R. Psychossomatic and psychoimmunologic research. **Psychomsom Med**, v. 42, p. 307-321, 1980.

ADER, D.N.; JOHNSON, S.B.; HUANG, S.W.; RILEY, W.J. Group size, cage shelf level, and emotionality in non-obese diabetic mice: impact on onset and incidence of IDDM. **Psychossom Med**, v. 53(3), p. 313-321, 1991.

ADER, R.; COHEN, N. Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. **Annu Rev Pschol**, v. 44, p. 53-85, 1993.

ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **Eur J of Pharmacol**, v. 405, p. 167-176, 2000.

ALLEN, R.C. Biochemiexcitation: chemiluminescence and the study of biological oxygenation reactions. **In: Adam, W; & Cilento, G. eds. Chemical and biological generation of excited states.** New York: Academic Press, p. 309, 1982.

ALVES, G.J. **Coabitação com um parceiro doente: Conseqüências sobre o comportamento, à atividade imune inata e o crescimento tumoral.** 199 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

AMAT, J.; MATUS-AMAT, P.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal pariaqueductal gray of rat. **Brain res**, v. 797, p. 12-22, 1998.

ANISMAN, H.; ZALEMAN, N.S.; ZACHARKO, R.M. Multisystem regulation of performance deficits induced by stressors. An animal model of depression. **Humana Press, Clifton, N J**, p. 1-61, 1991.

ANJOS, A. R.; ÁLVARES-SILVA, M.; BORELLI, P. Matriz extracelular e leucemia. **Rev Bras hematol hemoter**, v. 22 (3), p. 404-412, 2000.

BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidative. **Curr opin Hematol**, v. 2 (1), p. 55-60, 1995. Review.

BADWAY J.A.; TAUBER A.I.; KARNOVSKY M.L. Properties of NADH-cytocrome-b5 reductase from human neutrophils. **Blood.** V. 62(1), p. 152-157, 1983.

BAINTON, D.F. **In "Inflamation: Basic Principles and Clinical Correlates** (eds Jl. Gallin, I.M. Goldstein and R Snyderman) p. 265-280. Raven press, New York, 1988.

BANKS, W. A.; KASTIN, A.J.; GUTIERREZ, E.G. Penetration of intereleukin-6 accross the murine blood-brain-barrier. **Neurosci Lett**, v. 179, p. 53-56, 1994.

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

BASSO, A.S.; COSTA-PINTO, F.A.; BRITTO, L.R.; DE SÁ-ROCHA, L.C.; PALERMO-NETO, J. Neural pathways involved in food alergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. **Brain Res**, v. 1009, p. 181-188, 2004.

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

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.: PARADISO, M.A. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. Tradução: Quillfeldt, J.A. 2ª Ed. Artmed, 2002.

BERCZI, I. The stress concept and neuroimmunoregulation in modern biology. **Ann. N Y Acad Sci,** v. 851, p. 3-12, 1998.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.E.; SORKIN, E. Immune-neuroendocrine interactions. **J Immunol**, v. 135, p. 750S-754S, 1985.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C.A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 223, p. 652-654, 1986.

BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A.E.; KLUSMAN, I.; FURUKAWA, H.; MONGE-ARDITI, G.; KABIERSCH, A. Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 40, p. 613-618, 1991.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A. Immuno-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocr Rev**, v. 17, p. 64-102, 1996.

BESSLER, H.; BERGMAN, M.; SLAMAN, H. Interleukin-3 and stress. **Biomed Pharmacother,** v. 54, p. 299-304, 2000.

BINCOLETTO, C.; QUEIROZ, M.L.S. The effect of lead on the bone marrow stem cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Vet Human Toxicol**, v. 38, p. 186-190, 1996.

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

BLALOCK, J.E. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. **Ann N Y Acad Sci**, v. 741, p. 292-298, 1994a.

BLALOCK, J.E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunol Today**, v. 15, p. 504-510, 1994b.

BLALOCK, J.E.; HARBOUR-MCNENAMIN, D.; SMITH, E.M. Peptide hormonoes shared by the neuroendocrine and immunology systems. **J of Immunol**, v. 35, n.2, p. 858s-8612, 1995. Suplement.

BLATTEIS, C.M. Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. **Prog Brain Res,** v. 91, p. 409-412, 1992.

BOGGS D.R.; BOGGS S.S.; SAZE D.F.; ET AL., Hematopoietic stem cell with high proliferative potential: assay of their concentration in marrow by the frequency and duration of cure of W/W^v mice. **J Clin Invest**, v. 70, p. 242, 1982.

BOUWER, H.G.A.; BARRY, R.A.; HINRICHS, D.J. Acquired immunity to an intracellular pathogen: immunologic recognition of *Listeria monocytogenes*-infected cells. **Immunological Reviews**, v. 158, p. 137-46, 1997.

BRADFORD G.B.; WILLIAMS S.; ROSSI, R.; ET AL. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoetic stem cell compartment. **Exp Hematol**, v. 25, p. 445, 1997.

BRADLEY T.R.;, METCALF D. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. **J Exp Biol Med Sci**, v. 44, p. 287, 1966.

BROOKS, W.H.; CROSS, R.J.; ROSZMAN, T.L.; MARKESBERY, W.R. Neuroimmunomodulation: neural anatomical basis for impairment and facilitation. **Ann Neurol,** v. 12, p. 56-61, 1982.

CALVO, W. The innervation of the bone marrow in laboratory animals. **Am J Anat**. v.123, p. 315-328, 1968.

CARA, D.C.; CONDE, A.A.; VAZ, N.M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, p. 1331-1341, 1994.

CARRASCO, G.A; VAN DE KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol**, v. 463 (1-3), p. 235-272, 2003. Review.

CASSATELA, M.A. The production of cytokines by polimorphonuclear neutrophils. **Immunol Today**, v. 16, p. 21-26, 1995.

CHEERS, C.; MCKENZIE, I.F.C.; PAVLOV, H.; WAID, C.; YORK, J. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: course of listeriosis in resistant or susceptible mice. **Infect Immun**; v. 19(3): p.763-770, 1978.

CHEERS, C.; HAIGH, A.M.; KELSO, A.; ET AL. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of Macrophage-, Granulocyte-, Granulocyte-macrophage-, and Multi-CSF. **Infect Immuun**, v. 56 (1), p. 247, 1988.

CHEERS, C.; STANLEY, E.R. Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice**. Infect Immun**, v. 56(11), p. 2972-2978, 1988.

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

CHROUSOS, G.P., GOLD, P.W. The concept of stress and stress system disorders: an overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA** v. 267, p. 1244-1252, 1992.

CHROUSOS, GP. The HPA axis and the stress response. **End Research**, Nov; v. 26 (4): p. 513-4, 2000.

COE, C.L.; ROSENBERG, L.T.; FISHER, M.; LEVINE, S. Psychological factors capable of preventing the inhibition of antibody responses in separated infant monkeys. **Child Dev**., v. 58, p. 1420-1430, 1987.

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

CONLAN, J.W.; NORTH, R.J. Neutrophils are essencial for early anti-*Listeria* l defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. **J of Exp Med**, v. 179, p. 259-68, 1994.

CONTI. Oncology in neuroimmunomodulation. What progress has been made? **Ann N Y Sci**, v. 917, p. 68-83, 2000.

COSTA, E.C.R. **Neuroimunomodulação: efeitos da morfina sobre o comportamento e a atividade de macrófagos**. 128 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

CREEL, S. Social dominance and stress hormones. **Trends in Ecology and Evolution**. V. 16, no. 9, 2001.

CZUPRYNSKI, C.J.; HAAK-FRENDSCHO, M. Non-specific resistance mechanisms to listeriosis: implications for experimental and naturally occurring infection. **Immunol Rev**, v. 158, p. 47-56, 1997.

DANTAS, D.C.M.; KANENO, R.; QUEIROZ, M.L.S. The effects of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*: role of Natural Killer cells. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 21, p. 609-619, 1999.

DANTAS, D.C..M.; QUEIROZ, M.L.S. Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Int J Immunopharmacol**, v. 21, p. 499-508, 1999.

DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. **Life Sci**, v. 44, p.1995-2008, 1989.

DEXTER T.M.; ALLEN T.D.; LAJTHA L.G. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells *in vitro*. **J Cell Physiol**, v. 91, p. 335, 1977.

DHABHAR, F.S.; MILLER, A.H.; MCEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. Effects of stress on immune cell distribution. **J Immunol**, v. 154, p. 5511-5527. 1995.

DHABHAR, F.S.; MILLER, A.H.; MCEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution: role of adrenal steroid hormones. **J Immunol**, v. 157, p. 1638-1644, 1996.

DHABHAR, F.; MCEWEN, B.S. Aucute stress enhances while chronic stress supresses cell-mediated immunity *in vivo:* a potential role for leukocyte trafficking. **Brain Behav Immun**, v. 11, p. 286-306, 1997.

DINARELLO, C.A.; SAVAGE.N.; Interleukin-1 and its receptor. **Crit Rev Immunol**, v. 9, p. 1-20, 1989.

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

DOBBS, C.M.; VASQUEZ, M.; GLASER, R.; SHERIDAN J.F. Mechanisms of stress induced modulation of viral pathogenesis and immunity. **J Neuroimmunol**. V. 48 (2), p. 151-160, 1993.

DOBBS C.M.; FENG, N.; BECK, F.M.; SHERIDAN, J.P. Neuroendocrine regulation of citokine production during experimental influenza viral infection: effects of restraint stress-induced elevation in endogenous corticosterone. **J Immunol**, v. 157 (5), p. 1870-1877, 1996.

DOMINGUÉZ-GERPE, L.; REY-MÉNDEZ, M. Modulation of stress induced murine linfoid tissue involution by age, sex, and strain: role of boné marrow. **Mech Ageing Dev**; v.104, 1998.

DORSHKIND, K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cell and their products. **Ann Rev Immunol**. 8, 111-137, 1990.

DUBRAVEC, D.B.; SPRIGGS, D.R.; MANNICK, J.A.; RODRICK, M.L. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor. **Proc Natl Acad Sci**., v.87, p. 6758, 6761, 1990.

DUNN, A.J. Nervous system - immune system interactions: an overview. **J Recept Res**, v.8, p. 589, 607, 1988.

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, p.539-542, 1991.

DUNN, A.J.; WANG. J. Citokine effects on CNS biogenic amines. **Neuroimmunomodulation**, v. 2 (6), p. 319-328, 1995. Review.

EBERLIN, S.; SANTOS, L.M.B.; QUEIROZ, M.L.S. *Uncaria Tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes***. Inter Immunopharmacol**, v. 5, p. 1235-1246, 2005.

EDELSON B.T.; UNANUE E.R. Immunity to *Listeria* infection. **Curr Opin Immunol**, v.12, p. 425-431, 2000

ELENKOV, I.J.; WEBSTER, E.L.; TORPY, D.J.; CHROUSOS, G.P. Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. **Ann N Y Acad Sci**, v. 876, p. 1-11, 1999.

ELENKOV, I.J.; CHROUSOS, G.P.; WILDER, R.L.; Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance: Clinical implications. **Ann N Y Acad Sci**, v. 917, p. 94-105, 2000.

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

FARGEAS, C.; WU, C.Y.; NAKAJIMA, T.; COX,D.; NUTMAN, T.; DELESPESSE, G. Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1 – and Th2 – like lymphokines by human T lymphocytes. **Eur J of Immun**, v. 22(8), p. 2173-2176, 1992.

FELSZEGHY, K.; GASPAR, E.; NYAKAS, C. Long-term selective down-regulation of brain glucocorticoid receptors after neonatal dexamethasone treatment in rats. **J Neuroendocrinol,** v. 8, p. 493-499, 1996.

FELTEN, D.L.; LIVNAT, S.; FELTEN, S.Y.; CARLSON, S.L.; BELLINGER, D.L.; YEH, P. Sympathetic innervation of lymph nodes in mice. **Brain Res**, Bull. 13, 693-699, 1984.

FERRICK, D.A.; SCHIRENZEL, M.D.; MULVANIA, T.; HSIEH, B.; FERLIN, WG.; LEPPER, H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1 and Th2 stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. **Nature,** v. 373, p. 255-257, 1995.

FLESCH, I.E.A.; COLLINS, H.; HESS, J.; KAUFMANN, S.H.E. Checkpoints in antibacterial immunity. **Res in Immunol**, v. 149, p. 693-97, 1998.

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

FONSECA, F.M.S. **Participação do sistema opioidérgico e dos glicocorticóides nas alterações comportamentais e da imunidade inata induzidas na prole pelo estresse pré-natal.** 164 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

FONSECA E.S.; SAKAI, M.; CARVALHO-FREITAS M.L.; PALERMO-NETO, J. Naloxone treatment prevents prenatal stress effects on peritoneal macrophage activity in mice offspring. **Neuroendocrinol**, v. 81 (5), p. 322-328, 2005.

FRIEDMAN, S.B.; GLASGOW, L.A.; ADER, R. Psychosocial factors modifying host resistence to experimental infections. **Ann N Y Acad Sci**, v. 164, p. 381-393, 1969.

FUKATA, J.; IMURA, H.; NAKAO, K. Cytokines as mediators in the regulation of the hypotalamic-pytuitary-adrenocortical function. **J. Endocrinol. Invest**, v. 16, p. 141-155, 1993.

FUCHIMOTO, H.; SAKATA, T.; OGAWA, N.; GOMITA, Y. Olfactory bulb as cues in the communication of affect between rats. **Hukuoka Acta Medica**, v. 64, p. 41-56, 1973.

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

GOL'DBERG, E.D.; DYGAI, A.M.; SHAKHOV, V.P.; BOGDASKIN, I.V.; MIKHLENKO, A.V. Lymphocytic mechanisms of myelopoiesis regulation under stress. **Biomed Sci**, v. 1, p. 366-372, 1990.

GORDON M.Y. Hematopoietic growth factors and receptors: bound and free. **Cancer Cells**, v. 3, p. 127, 1991.

GRAEFF, F.G. **Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação**. Editora Pedagógica e universitária (EPU), São Paulo, 135p, 1989.

GREGORY, S.H.; MAGEE, D.M.; WING, E. The role of colony-stimulating factors in host defenses. **Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine**, v. 197, p. 349-360, 1991.

GULERIA, I; POLLARD, J.W. Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to *Listeria monocytogenes* in colony-stimulating factor 1-deficient mice. **Infect Immun**, v. 69(3), p. 1795-1807. 2001.

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

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

HANSEN, J.R.; STOA, K.F.; BLIX, A.S. E URSIN, H. Urinary levels of epinephrine and norephinephrine in parachutist trainees. In: Stanford, S.C. e Salmon, P., the stress response. From synapse to syndrome, capítulo 1, p. 4-20. Ed. Academic Press, 1993.

HARTY, J.; LENZ, L.; BEVAN, M. J. Primary and secondary immune responses to *Listeria monocytogenes*. **Curr Opin Immunol**., v. 9 (4), p. 526-530, 1996.

HASEGAWA, T.; TANAKA, K.; UENO, K.; OKUDA, M.; YOSHIKAI, Y.; NOMOTO, K. Augmentation of the resistance against Escherichia coli by oral administration of hot water extract of *Chlorella vulgaris* in rats. **Int J Immunopharmacol**, v. 11, p. 971-976, 1989.

HASEGAWA, T., YOSHIKAI, Y., OKUDA, M., NOMOTO, K. Accelerated restoration of the leukocyte number and augmented resistance against Escherichia coli in cyclophosphamide-treated rats orally administered with a hot water extract of Chlorella vulgaris. **Int J Immunopharmacol**,v.12(8), p.883-891, 1990.

HASEGAWA, T.; OKUDA, M.; NOMOTO, K.; YOSHIKAI, Y. Augmentation of the resistance against *Listeria monocytogenes* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 16, p. 191-202. 1994.

HASEGAWA, T.; OKUDA, M.; MAKINO, M.; HIROMATSU, K.; NOMOTO, K.; YOSHIKAI, Y. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with *LP-BM5* murine leukemia viruses. Int. **J Immunopharmacol**, v. 17, p. 505-512, 1995.

HASEGAWA, T.; KIMURA, Y.; HIROMATSU, K.; KOBAYASHI, N.; YAMADA, A.; MAKINO, M.; OKUDA, M.; SANO, T.; NOMOTO, K.; YOSHIKAI, Y. Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. **Immunopharmacol**, v. 35, p. 273-282. 1997

HASEGAWA, T.; NODA, K.; KUMAMOTO, S.; ANDO, Y.; YAMADA, A.; YOSHIKAI, Y. *Chlorella vulgaris* culture supernatant (CVS) reduces psychological stress-induced apoptosis in thymocytes of mice. **Int J Immunopharmacol**, v. 22, p. 877-885, 2000.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxyde production of neutrophils in whole blood. **J of Immunol Met,** v. 117, p. 53-58, 1989.

HELLEWELL, P.G. & WILLIANS, T.J. The neutrophil. In: **Immunopharmachology of Neutrophils**. New York: Academic Press, p.1-4, 1994.

HELMREICH, D.L.; CROUCH, M.; NATHAN, P.D.; PARFITT, D.B. Peripheral triiodothyronine (T3) levels during escapable and inescapable footschock. **Physiol and Behav**, v. 87, p. 114-119, 2005.

HERMAN, J.P.; CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortcal axis. **Trend Neurosci**, v. 20, p. 78-84, 1997.

HIRABAYASHI, Y.; TANIUCH, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow citometry. **J Immunolol Methods**, v. 82 (2), p. 253-259, 1985.

HORIGUCHI, J.; WARREN, K.; KUFE, D. Expression of the macrophage-specific colony stimulating factor in human stimulating factor. **Blood**, v. 69, p. 1259, 1987.

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

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

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

IKEBUCHI, K.; WONG, G.G.; CLARK, S.C.; IHLE, J.N.; HIRAI, Y.; OGAWA, M. Interleukin-6 enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of multipotential hematopoietic progenitors. **Proc Natl Acad Sci**, v. 84 (24), p. 9035-9039, 1987.

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, p. 637-640, 1982.

ISHIGAMI, T. The influence of psychic acts on the progress of pulmonary tuberculosis. **American Rev Tuberculosis**, v. 2, p. 470-484, 1919.

ISHIKAWA, M.; HARA, C.; OHDO, S.;OGAWA, N. Plasma corticosterone response of rats with sociopsychological stress in the communication box. **Physiol Behav**, v. 52, p. 475. 1992.

IWAKABE, K.; SHIMIDA, M.; OTHA, A.; YAHATA, T.; OHMI, Y.; HABU, S.; NISHIMURA, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th-2-dominant immunity in mice. **Immunol Lett**, v. 62, p.39-43, 1998.

JACOBSEN, S.E.W., RUSCETTI, F.W., DUBOIS, C.M., ET AL. Transforming growth factor-β trans-modulates the expression of colony stimulating factor receptors on murine hematopoietic progenitor cell lines. **Blood**, v. 77, p. 1716, 1991.

JENSEN, E.R.; SHEN, H.; WETTSTEIN, F.O.; AHMED, R.; MILLER, J.F. Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle and a probe for studying cell-mediated immunity**. Immunological Reviews**, v. 158, p. 147-57, 1997.

JOHNSON, G.R.; METCALF, D. Pure and mixed erytroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erytropoietin. **Proc Natl Acad Sci** USA, v. 74, p. 3879, 1977.

JOHNSTON, R.B.JR. Enhancement of phagocytosis-associated oxidase metabolism as a manifestation of macrophage activation. **Lymbhokines**, v. 3, p. 33-56, 1978.

JOIN-LAMBERT, O.F.; ENZINE, S.; LE MONNIER, A.; JAUBERT, F.; OKABE, M.; BERCHE, P. E KAYAL, S. *Listeria monocytogenes* – infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of the central nervous system. **Cellular Microbiology**, v. 72, p. 167-180, 2005.

JUSTO, G.Z., SILVA, M.R., QUEIROZ, M.L.S. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 23 (1), p. 119-132, 2001.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Parte VII: **Excitação, emoção e comportamento da homeostase.** In:Princípios da Neurosciêcias. 4ª edição., p. 873-998. 2005.

KAGI, D., LENDERMANN B., BURK, K., ZINKERNAGEL, R.M., HENGARTNER, H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated citotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis *in vivo*. **Annu Rev Immunol**, v. 14, p. 207-232, 1996.

KAUFMANN, S.H.E. Immunity to intracellular microbial pathogens. **Immunol Today**, v. 16 (7), p. 338-342, 1995.

KAYASHIMA, S.; TSURU, S.; HATA, N.; ROKUTANDA, M. The therapeutic effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the protection against *Listeria* infection in SCID mice. **Immunol**, v. 80, p. 471-476. 1993.

KAWASAKI, S.; TANI, H.; AGARI, S.; SAKATA, T.; KUWAHARA, H.; OGAWA, N.; KAGI, M. The influence of conditional emotional stress on parainfluenza infection in mice. **Hukuoka Acta Medica**, v. 56, p. 969-971, 1978.

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

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

KELLEY, K.W.; JOHNSON, R.W.; DANTZER, R. Immunology discovers physiology. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 43, p. 157-165. 1994.

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

KIM, Y.K.; KIM, L.; LEE, M.S. Relationships between interleukin, neurotransmitters and psychopathology in drug-free male schizophrenics. **Schizof Research**. v. 0, p. 1-11, 1999.

KIPNIS, J.; COHEN, H.; CARDON, M.; ZIV, Y.; SCHWARTZ, M. T cell deficiency leads to cognitive disfunction: Implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and othe psychiatric conditions. **PNAS**. V., 101. p. 8180-8185, 2004.

KISHIKAWA, H., SONG, R., LAWRENCE, A., Interleukin-12 promoters enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection of lead-exposed mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 147, p. 180-189, 1997.

KOHN, A.P. E SANDERS V.M. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. **Trends- Immunol Today**, v. 21, p. 539-542, 2000.

KONISHI, F.; TANAKA, K.; KUMAMOTO S.; HASEGAWA, T.; OKUDA, M.; YANO, Y.; YOSHIKAI, Y.; NOMOTO, K. Enhanced resistance against Escherichia coli infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide-treated mice. **Cancer Immunol Immunother**, v. 32, p. 1-7. 1990.

KONISHI, F.; TANAKA, K.; HIMERO, K.; TANIGUCHI, K., NOMOTO, K. Antitumor effect induced by a hot extract of *chlorella vulgaris* (CE): resistance to meth a tumor growth mediated by CE – induced polymorphonuclear leukocytes. **Cancer Immunol Immunother**, v. 19, p. 73-78, 1985.

KONISHI, F.; MITSUYAMA, M.; OKUDA, M.; TANAKA, K.; HASEGAWA, T.; NOMOTO, K. Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* against myelossupression by 5-fluoracil. **Cancer Immunol Immunother**, v. 42, p. 268-274, 1996.

KRATZ, S.S. E KURLANDER, R.J. Characterization of the pattern of inflamatory cell influx and cytokine production during the murine host defense to listeria monocytogenes. **J Immunol**, v. 141, p. 598-606, 1988.

KUHN, M.; GOEBEL, W. Responses by murine macrophages infected with *listeria monocytogenes* is crucial for the developmento of immunity to this pathogen. **Immunol Rev**, v. 158, p. 57-67, 1997.

KUSNEKOV A.V.; GROTA, L.J.; SCHMIDT, S.G.; BONNEAU, R.H.; SHERIDAN, J.F.; GLASER, R.; MOYNIHAN, J.A. Decreased *herpes simplex* viral immunity and enhanced pathogenesis following stressor administration in mice. **J Neuroimmunol**, v. 38 (1-2), p. 129-137, 1992.

KWIATKOWSKA, K.; SOBOTA, A. Signaling pathways in phagocytosis. **Bioessays**. v. 21(5), p. 422-431, 1999. Review.

LANDFIELD, P.W.; APPLEGATE, M.D.; SCHMITZER-OSBORNE, S.E.; NAYLOR, C. E. Phosphate/calcium alterations in the first stages of Alzeimer,s disease: implications for etiology and pathogenesis. **J Neurol Sci**, v. 106, p. 221-229, 1991.

LAZARUS, R.S.; COHEN, J.B. Environmental stress: In: Attman and J.P. Wohlwill (Eds), **Human Behavior and the Envirnment**: Current Theory and research, vol. 2, Plenum Press, New York, p. 89-127, 1977.

LE DOUX, J. E.; CICCHETTI, A. X. P.; ROMANSK, L.M. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amigdala in fear conditioning. **J Neurosci**, v. 10, p. 1062-1069, 1990.

LEE G.R.; FOERSTER, J. ET AL. **Wintrobe´s Clinical Hematology**. Lea e Febiger, Philadelphia, London; p. 79, 1993.

LEHN, M.; WEISER, W.Y.; ENGELHORDN, S. GILLIS; RENOLD, H.G. **J of Immunol,** v. 143, p. 3020-3024, 1989.

LEHRER, R.I.; GANZ, T.; SELSTED, M.E.; BABIOR, B.M.; CURNUTTE, J.T. Neutrophils and host defense. **Ann Intern Med**, v. 109, p.127-142, 1988.

LEMIEUX, M.E.; REBEL, V.I.; LANSDORP, P.M.; ET AL. Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lynphomyeloid differentiation in long-term marrow “switch” culture. **Blood**, v. 86, p. 1339, 1995.

LINDEMAN, A.; RIEDEL, D.; OESTER, W.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L.; MERTELSMANN, R.; HERRMANN F. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. **J Clin Invest**, v. 83, p. 1308-1312, 1989.

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

LOPEZ, A.F.; ELLIOT, M.J.; WOODCOCK, J.; ET AL. GM-CSF, IL-3 and IL-5: cross competition on human haematopoetic cells. **Immunol Today**, v. 13, p. 495, 1992.

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

LYSLE, D.T., COUSSONS-READ, M.E. Mechanisms of conditioned immunomodulation. **Int J Immunopharmacol**, v. 17, p. 641-647. 1995.

MACKANESS, G.B.; HILL, W.C. The effect ant-lymphocyte globulin on cell-mediated resistance to infection. **J of Exp Medicine**, v. 129, p. 993-1012, 1969.

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

MADDEN, K.S.; FELTEN, D.L. Experimental basis for neuro-immune interactions. **Physiol Rev**, v. 75, p. 77-106, 1995.

MAES, M.; BOSMANS, E.; CALABRESE, J.; SMITH, R.; MELTZER, H.Y. Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers. **J Psychiatr Res**, v. 29, p. 141-152, 1995.

MAESTRONI, G.J. E CONTI, A. Modulation of hematopoiesis via alpha 1-adrenergic receptors on bone marrow cells. **Exp Hematol**, v. 22(3), p. 313-330, 1994.

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

MAIER, S.F.; LAUDENSLAGER, M.L. Inescapable shock, shock controllability, and mitogen stimulated lymphocyte proliferation. **Brain Behav Immun**, v.2, p.87-91, 1988.

MAIER S. Learned helplessness: relationship with fear and anxiety. In: Stanford C, Salmon P, editors. **Stress: from synapse to syndrome**. London: Academic Press, p. 207-243, 1993.

MALACRIDA, S. A. **Efeitos do estresse sobre o crescimento e diferenciação das células precursoras da medula óssea (CFU-C) em ratos**. 53 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas (FCM). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas. 1996.

MALACRIDA, S.A.; TEIXEIRA, N.A.; QUEIROZ, M.L.S. Hematopoietic changes in rats after inescapable and escapable shocks. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 19, p.523-533. 1997 a.

MALACRIDA, S.A.; TEIXEIRA, N.A.; QUEIROZ, M.L.S. Regulation of stress-induced reduced myelopoiesis in rats. **Int J Immunopharmacol**, v. 19, p. 227-233, 1997b.

MALACRIDA, S.A **Estudo da atividade imunomodulatória do extrato de maytenus ilícifololia em animais infectados com *Listeria monocytogenes*.** 95 fls. Tese (doutorado em farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

MARINO, F.; CATTANEO, S.; COSENTINO, M.; RASINI, E.; DI GRAZIA, L.; FIETTA, A.M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Diazepan stimulates migration and phagocytosis of human neutrophils: possible contribution of peripheral type benzodiazepine receptors and intracellular calcium. **Pharmacology**, v. 63 (1), p. 42-49, 2001.

MARX, C.; EHRHART-BORNSTEIN, M.; SCHERBAUM, W.A.; BORNSTEIN, S.R. Regulation of adrenocortical function by cytokines – relevance for immune-endocrine interaction. **Horm Metab Res**, v. 30, p. 416-420, 1998.

MASSOCO, C.O.; PALERMO-NETO, J. Diazepan effects of peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice. **Life Sci**, v. 65 (20), p. 2157-2165, 1999.

MCEWEN, B.S. Stress, adaptation and disease. Allostasis and allostatic load. **Ann N Y Acad Sci**, v. 840, p. 33-44, 1998.

MCEWEN, B.S.; STELLAR, E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. **Arch Intern Med**, v. 153, p. 2093-2102, 1993.

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 Res Rev**, v. 23, p. 79-133, 1997.

MCINTYRE, C. K.; MARRIOT, L.K; GOLD, P.E. Cooperation between memory systems: acetylcholine release in the amygdala correlates positively with performance on a hippocampus-dependent task. **Behav Neurosc**, v. 117, p. 320-326, 2003.

MCLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, v. 7(4/5), p. 187-93, 1996.

MC LEAN, P.D. Some psychiatric implications of psychologic studies on the frontotemporal portion of limbic system. **Eletroenceph Clin Neurophysiol**, v.4, p. 407-418, 1952.

MCNIECE, I.K.; BRADLEY, T.R.; KRIEGLER, A.B.; HODGSON, G.S. Subpopulations of mouse bone marrow high-proliferative-potential colony-forming cells. **Exp Hematol**, v. 14, p. 856, 1986.

MCPHAIL, L.C.; SNYDERMAN, R. Activation of the respiratory *burst* enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli. Evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms. **J Clin Invest**, v. 72(1), p. 192-200, 1983.

MELO A.; JUSTO, G.Z.; QUEIROZ, M.L.S. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Hum Exp Toxicol**, v. 20, p. 38-45, 2001.

METCALF, D. Control of hematopoietic cell proliferation and differentiation. **Prog Clin Biol Res**, v. 66, p. 473-486, 1981.

METCALF, D. The bioassay of colony-stimulating factors. The hematopoetic colony-stimulating factors. **Amsterdam: Elsevier**, p. 187-212, 1984.

METCALF, D. The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Science**, v. 229, p. 16-22, 1985.

METCALF D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. **Blood**, v. 67(2), p. 257-267, 1986.

METCALF D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and matturation in hematopoietic cells. **Nature**, v. 339, p. 27, 1989.

MIELKE, M.E.; EHLERS, S.; HAHN, H. The role of citokine in experimental listeriosis. **Immunobiol**, v. 189 (3-4), p. 285-315, 1993.

MILLER, A. H. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. **Psychiatr Clin North Am**, v. 21(2), p. 443-463, 1998. Review.

MILON, G. *Listeria monocytogenes* in laboratory mice: a model of short-term infectious and pathogenic processes controllable by regulated protective immune responses. **Immunol Rev**, v. 158, p. 37-46, 1997.

MIURA, T.; KUDO, T.; MATSUKI, A.; SEKIKAMA, K.; TAGAWA, Y.I.; IWAKURA, Y.; NAKANE, A. Effect of 6-hydroxidopamine on host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. **Infect Immun**, v. 69 (12), p. 7234-7241, 2001.

MIYAN, J.A.; BROOME, C.S.; AFAN, A.M. Coordinated host defense through an integration of the neural, immune and hemopoietic systems. **Domest Anim Endocrinol**, v. 15, p. 297-304. 1998.

MIYAJIMA, A.; MUI, ALF.; OGOROCHI, T.; ET AL. Receptors for granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor, Interleukin-3, and Interleukin-5. **Blood**, v. 82, p. 1960, 1993.

MOCCI., S.; DALRYMPLE, S.A.; NISHINAKAMURA, R.; MURRAY, R. The citokine stew and innate resistance to *Listeria monocytogenes*. **Immunol Rev**, v.158, p. 107-14, 1997.

MOORE, M.A.S. Clinicals implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. **Blood**, v. 78, v. 1, 1991.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol Today**, v. 17, p. 1-33, 1998.

MOYNIHAM, J.A.; COHEN, N. Stress and immunity. In: Schneiderman, N., Baum, A (Ed). **Stress and disease process: perpectives in behavioral medicine**. New York: Lawrence Erlbaum, p. 27-53, 1992.

NAGY, K.; ZAMBO, L.D. Anti-anxiety action of diazepan after intra-amygdaloid application in the rat. **Neuropharmacol**, v. 18, p. 573-576, 1979.

NAKAHATA, T.; OGAWA, M. Identification in culture of a class of hematopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential colonies. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.79, p. 3843, 1982.

NATHAN, C.F. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. **J of Clinical Invest**, v. 80, p. 1550-1560, 1978.

NICOLA, N.A.; BEGLEY, C.G.; METCALF, D. Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. **Nature**, v. 314, p. 625, 1985.

NICOLA, N.A.; METCALF, D. Binding of 124-labeled granulocyte colony-stimulating factor to normal murine hematopoietic cell. **J Cell Physiol**, v. 124, p. 313, 1985.

NICOLA, N.A.; METCALF, D. Down-modulation of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human neutrophils by granulocyte-activating agents. **J Cell Physiol**, v. 128, p. 180, 1986.

NICOLA, N.A. Hematopoietic cell growth factor and their interactions with specific receptors. **J Cell Physiol**, v. 5, p. 9, 1987.

NICOLA, N.A. Hematopoietic cell growth factor and their receptors. **Annu Ver Biochem**, v. 58, p. 45, 1989.

NOMURA, T.; KAWAMURA, I.; ISUCHIA, K.; KOHDA, C.; BABA, H.; ITO, Y.; KIMOTO, T.; WATANABE, I.; MITUSYAMA, M. Essencial role of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for gamma interferon production induced by listoriolysin O in mouse spleen cells. **Infect Immun**, v. 70(3), p. 1049-55, 2002.

NORTH, R.J.; DUNN, P.L.; CONLAN, J.W. Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. **Immunol Rev**, v. 158, p. 27-36, 1997.

ODA, T.; KATORI, M.; HATANAKA, K.; NAGAI, Y. Inhibition of neutrophil migration by a selective inhibitor of matrix metalloproteinase: analysis by intravital microscopy. **Med Inflamm**., v. 4, p. 133-137, 1995.

OGAWA, N.; KUWAHARA, K. Psychophysiology of emotion: communication of emotion. Jpn. **J Psychosom Med**, v. 6, p. 352-357. 1986.

OKIMURA, T.; OGAWA, M.; YAMAUCHI, T. Stress and immune response. III. Effect of restraint stress on delayed type hypersensitivity (DTH) response, natural killer (NK) activity and phagocytosis in mice. **Jpn J Pharmacol**, v. 41(2), p. 229-235, 1986.

OLFERT, E.D.; CROSS, B.M.; MC WILLIAN, A.A. In the guide to the care and use of experimental animals. **Otawa: Canadian Council on American Care**, v. 1,1, 1993.

ORLIC, D.; FISHER, R.; NISHIKAWA, S.I.; ET AL. Purification and characterization of heterogenous pluripotent hematopoetic stem cell populations expressing high levels of c-kit receptor. **Blood**, v. 82, p. 762, 1993.

ORTEGA, E.; GARCIA, J.J.; SAEZ, M.C., DE LA FUENTE , M. Changes with aging in the modulation of macrophages by norepinephrine. **Mech Aging Dev**, v. 118, p. 103-114, 2000.

OTTERNESS, I,G.; SEYMOUR, P.A.; GOLDEN, H.W.; REYNOLDS, J.A.; DAUMY, G.O. The effects of continuous administration of murine interleukin-1 alpha in the rat. **Physiol Behav**, v. 43, p. 797-804, 1988.

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

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

PAMER, E.G.; SIJTS, A.J.A.M.; VILLANUEVA, M.S.; BUSCH, D.H.; VIJH, S. MHC class I antigen processing of *Listeria monocytogenes* proteins: implications for dominant and subdominant CTL responses. **Immunol Rev**, v. 158, p. 129-36, 1997.

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

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

PERLSTEIN, R.S., WHITNALL, M.H., ABRAM, J.S., MOUGEY, E.H., NETA, R. Synergistic role of interleykin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccaride *in vivo*. **Endocrinol**, v. 132 (3), p. 946-952, 1993.

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

PLOEMACHER, R.E.; VAN DER SLUIJS, J.P.; VOERMAN, J.S.A.; ET AL. An *in vitro* limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. **Blood**, v. 74, p. 2755, 1989.

PLOEMACHER, R.E.; VAN DER SLUIJS, J.P.;, VAN BERDEN, C.A.J.; ET AL. Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse. **Blood**, v. 78, p. 2527, 1991.

POROS-GLUCHOWSKA, J.; KLOSZENWSKA, M.; MARKIEWIEZ, Z. Ampicilin resistance in listeria monocytogenes acquired as a result of transposon mutagenesis. **Acta Microbiol Pol**, v. 52 (2), p. 131-142, 2003.

PORTELA, C.P.; MASSOCO, C.O.; DE LIMA, W.T.; PALERMO-NETO, J. Stress induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats. **Physiol Behav**, v. 72 (3), p. 415-420, 2001.

PUJOLS, L.; MULLOL, J.; PEREZ, M.; ROCA-FERRER, J.; JUAN, M.; XAUBET, A.; CIDLOWSKI, J.A.; PICADO, C. Expression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 24 (1), p. 49-57, 2001.

QUADROS, M.R.; SOUZA BRITO, A.R.M.; QUEIROZ, M.L.S. *Petiveria Alliacea* L. extract protects mice against *Listeria monocytogenes* infection – effects on bone marrow progenitor cells. **Immunopharmacol and Immunotoxicol**, v. 21(1), p. 109-124. 1999.

QUEIROZ, M.L.S.; JUSTO, G.Z.; PEREIRA-DA-SILVA, F.R.R.; MULLER, A.H.; GUILHON, G.M.S.P. Stimulatory action of *Pluchea quitoc* extract on the hematopoietic response during murine listeriosis. **Immunopharmacol and Immunotoxicoly**, v. 22(4), p. 721-740, 2000.

QUEIROZ M.L.S.; JUSTO, G.Z.; VALADARES, M.C.; PEREIRA-DA-SILVA, F.R.R. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacol and immunotoxicol**, v. 23 (3), p. 367-382, 2001.

QUEIROZ, M.L.S.; BINCOLETTO, C.; VALADARES, M.C.; DANTAS, D.C.M.; SANTOS, L.M.B. Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokine production in *Listeria monocytogenes* infected mice. **Immunopharmacol and Immunotoxicol**, v. 24 (3), p. 483-496, 2002.

QUEIROZ, M.L.S.; RODRIGUES, A.P.; BINCOLETTO, C.; FIGUEIREDO, C.A.V.; MALACRIDA, S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacol**, v. 3, p. 889-900, 2003.

QUIRANTE, G.L.R.; ROOZENDAAL, G.B. Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid pepidergic drugs. **Brain Res**, v. 808, p. 134-130, 1998.

RABIN, B.S. Religion and medicine. **Lancet**, v. 22;353(9166), p. 1803-1804, 1999.

REHM, S.R.; GROSS, G.N.; PIERCE, A.K. Early bacterial clearance from murine lungs. Species-dependent phagocyte response. **J Clin Invest**, v.66, p. 194-199, 1980.

REICHE, E.M.; NUNES, S.O.; MORITO, H.K. Stress, depression, the immune system, and cancer. **The Lancet Oncology**, v. 5, p. 617-625, 2004.

RICE, P.A.; BOEHM, G.W.; MOYNIHAN, J.A.; BELLINGER, D.L.; STEVENS, S.Y. Chemical sympathectomy increases the innate immune response and decreases the specific immune response in the spleen to infection with *Listeria monocytogenes*. **J of Neuroimmunol**, v. 114, p. 19-27, 2001.

RIGHI, D.A.; PINHEIRO, S.R.; GUERRA, J.L.; PALERMO-NETO, J. Effects of diazepan on mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Braz J Med Biol Res**, v. 32 (9), p. 1145-1153, 1999.

RIGHI, D.A.; PALERMO-NETO, J. Effects of type II pyrethroid cyhalotrin on peritoneal macrophage activity in rats. **Toxicol**, v. 212 (2-3), p. 98-106, 2005.

ROBINSON, J.M.; BADWAY, J.A. Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. **Immunology Series**, v. 60, p. 159-178, 1994.

RODRIGUES, A.P.O. **Avaliação dos efeitos do Extrato de *Chlorella vulgaris* sobre a resposta imunológica do tipo celular em camundongos expostos ao chumbo e infectados com *Listeria monocytogenes***. 94fls. Tese (Doutorado em Farmacologia). Faculdade de Ciências Medicas. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

ROOT, R.K.; METCALF, J.; OSHINO, N.; CHANCE, B. H_2O_2 release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors**. J of clinical Invest**, v. 55, p. 945-955, 1975.

ROSENDAAL, M.; HODGSON, G.S.; BRADLEY, T.R. Organization of the stem cells: generation-age hypothesis. **Cell Tissue Kinet**, v. 12, p.17, 1979.

ROSENKRANZ, J.A.; BUFFALARI, D.M.; GRACE, A.A. Opposing influence of basolateral amygdala and footshock stimulation on neurons of the central amigdala. **Biol psychiatry**, p. 1-11, 2005.

ROY, S.; RAMAKRISHNAN, S.; LOH, H.H.; LEE, N.M. Chronic morphine treatment selectively supresses macrophage colony formation in bone marrow. **Eur J Pharmacol**, v. 195, p. 359-363, 1991.

RUZEK, M.; PEARCE, B.D.; MILLER, A.H.; BIRON, C.A. Endogenous glucocorticoids protect against cytokine-mediated lethality during viral infection. **J immunol**, v. 162 (6), p. 3527-3533, 1999.

SALGADO, P. E. T. Toxicologia dos metais. In: Oga, S**. Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Ateneu, p. 153-172, 1996.

SANDI, C.; BORRELL, J.; GUAZA, C. Behavioral, neuroendocrine, and immunological outcomes of escapable or inescapable shocks. **Endocrinol Behav**. 5, 651-656, 1992.

SASADA, M.; PABST, M.J.; JOHNSTON R.B.JR. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysacharide alters the kinetic parameters of the superoxide producing NADPH oxidase. **J Biol Chem**, v. 258 (16), p. 9631-9635, 1983.

SCHLECH, W.F. Pathogenesis ans immunology of Listeria monocytogenes. **Patho Biol (Paris),** v. 44, p. 775-782, 1996. Review.

SCHWARZ, M.J.; CHIANG, S.; MULLER, N.; ACKNHEIL, M. T-helper-1 and T-helper-2 responses in psychiatric disorders. **Brain Behav Immun**, v. 15, p. 340-370, 2001.

SCHNEIDER, H.; PITOSSI, F.; BALSCHUN, D.; WAGNER, A.; DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.O. A neuromodulatory role of interleukin-1 beta in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 7778-7783, 1998.

SEYLE, H. A syndrome produced by diverse nocious agents. **Nature**, v.138, p. 32., 1936.

SEYLE, H. The stress of life. New York, McGraw-Hill, p. 324, 1956.

SHIEH, J.H.; PETERSON, R.H.F.; MOORE, M.A. Bacterial endotoxin regulation of cytokine receptors on murine bone marrow cells: *in vivo* and *in vitro* study. **J Immunol**, v. 152, p. 859, 1994.

SILVA, F.R.; LAZZARINI, R.; SÁ-ROCHA, L.C.; MORGULIUS, M.S.F.A.; MASSOCO, C.O.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepan administrations on neutrophil activity: a flow cytometry study. **Eur J of Pharmacol**, v. 478, p. 97-104, 1994.

SHIVDASANI, R.A.; ORKIN, S.H. The transcriptional control of hematopoiesis. **Blood**, v. 87, p. 4025, 1996.

SOBRIAN, S.K.; VAUGHN, V.T.; ACHE, W.K.; MARKOVIC, B.; DJURIC, V.; JANKOVIC, B.D. Gestacional exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. **Environ Res**, v. 73(1-2), p. 227-241, 1997.

SOLOMON, G.F.; AMKRAUT, A.A. Psychoneuroendocrinal effects on the immune response. **Anual Rev of Microbiol**, v. 35, p. 155-184, 1981.

SPECTOR, N.H. Neuroimmunomodulation: a brief review. Can conditioning of natural killer cell activity reverse cancer and/or aging? **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 24, p. S32—38, 1996.

SONG, F.; MATSUZAKI, M.; MITSUYAMA, M.; NOMOTO, K. *In vivo* generation of interferon-gamma-producing *listeria* specific T cells is dependent of INF-gamma production by non-NK cells. **Cell Immunol**, v. 160 (2), p. 211-216, 1995.

SOUZA-QUEIROZ, J.; MALACRIDA, S. A.; JUSTO, G.Z.; QUEIROZ, M.L.S. Myelopoetic response in mice exposed to acute cold/restraint stress: Modulation by chlorella vulgaris prophylactic treatment. **Immunopharmacol and Immunotoxicol**, v. 26, p. 455-467, 2004.

SPENGLER, R.N.; ALLEN, R.M.; REMICK, D.G.; STRIETER, R.M.; KUNKEL, S.L. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. **J of Immunol**, v. 145, p. 1430-1434, 1990.

STANKEVICIUS, D. **Ansiedade induzida pela picrotoxina: reflexos comportamentais, bioquímicos e sobre a atividade de macrófagos peritoneais**. 2004. 184 fls. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

STERNBERG, E.M. Neural-immune interactions in health and disease. **J Clin Invest**, v. 100. P. 2641-2647, 1997.

STEVENS-FELTEN, S.Y.; BELLINGER, D.L. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs. **Chem Immunol**, v. 69, p. 99-131, 1997.

STITES, D.P.; TERR, A.L. In: Basic Human Immunology. Ed. Prentice Hall, 1991.

STRATAKIS, C.A.; CHROUSOS, G.P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. **Ann N Y Acad Sci**, v. 771, p. 1-18. 1995.

SWENSON R.M.; VOGEL W.H. Plasma catecholamine and corticosterone as well as brain catecholamine changes during coping in rats exposed to stressful footchock. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 18 (5), p. 689-693, 1983.

SUTHERLAND, H.J.; EAVES, C.J.; EAVES, A.C.; ET AL. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*. **Blood**, v. 74, p. 1563, 1989.

SUZUE, K.; ASAI, T.; TAKEUCHI, T.; KOYASU, S. *In vivo* role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. **Eur J Immunol,** v. 33(10), p. 2666-2675, 2003.

TABAROWSKI, Z.; GILSON-BERRY, K.; FELTEN, S.Y. Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow. **Acta Histochem**, v. 98, p. 453-457, 1996.

TAGAY, S.; HERPERTZ, S.; LANGKAFEL, M.; SENF, W. Posttraumatic stress disorder in a psychosomatic outpatient clinic Gender effects, psychosocial functioning, sense of coherence, and service utilization. **J Psychosom Res**, v. 58, p. 439-446, 2005.

TANAKA, K.; KOGA, T.; KONISHI, F.; NAKAMURA, M.; MITSUYAMA, M.; HIMENO, K.; NOMOTO, K. Augmentation of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. **Infect Immun**, v. 53, p. 267-271, 1986.

TANAKA, K., TOMITA, Y., TSURUTA, M., KONISHI, F., OKUDA, M., HIMENO, K., NOMOTO, K.Oral administration of *Chlorella vulgaris* augments concomitant antitumor immunity. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 12 (2), p. 277-291, 1990.

TANAKA, K.; YAMADA, A.; NODA, K.; SHOYAMA, Y.; KUBO, C.; NOMOTO, K. Oral adminstration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. **Planta Med**, v. 63, p. 465-466, 1997.

TANAKA, K.; YAMADA, A.; NODA, K.; HASEGAWA, T.; OKUDA, M.; SHOYAMA, Y.; NOMOTO, K. A novel glycoprotein obtained from *Chlorella vulgaris* strain CK22 shows antimetastatic immunopotentiation. **Cancer Immunol Immunother**, v. 45, p. 313-320, 1998.

TANG, Y.; SHANKAS, R.; GAMELLI, R.; JONES, S. Dynamic norepinephrine alterations in bone marrow. Evidence of functional innervation. **J Neuroimmunol**, v. 96, p. 182-189, 1999.

TESTA, N.G.; MOLINEUX, G. Hematopoiesis. **Oxford University Press**, p. 37, 1993.

TIKU, K.; TIKU, M.L.; SKOSEY, J.L. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. **J Immunol**, v. 136, p. 3677-3685, 1986.

TILL, J.E.; MCCULLOCH, E.A.; A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat Res**, v. 14, p. 213, 1961.

TRAN, D.T.; MILLER, S.H.; BUCK, D.; IMATANI, J.; DEMUTH, R.J.; MILLER, M.A. Potentiation of infection by epinephrine. **Plast Recontr**. Surg. V. 76, p. 933-934, 1985.

TRINCHIERI, G.; KUBIM, M.; BELLMORE, G.; CASSATELA, M.A. Cytokine cross talk between phagocytic cells and lymphocytes: relevance for differentiation/activation of phagocytic cells and regulation of adaptative immunity. **J Cell Biochem**, v. 53, p. 301-308, 1993.

TURNBULL, A.V.; RIVIER, C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiol Rev**, v. 79, p. 1-71, 1999.

UEHARA, T.; SUMIYOSHI, T.; ITOH, H.; KORACHI, M.K. Modulation of stress induced dopamine release by excitotoxic damage of the entorhinal cortex in the rat. **Brain Res**, v. 989, p. 112-116, 2003.

UEHARA, T.; SUMIYOSHI, T.; MATSUOKA, T.; TANAKA, K.; TSUNODA, M.; ITOH, H.; KURACHI, M. Enhancement of lactate metabolism in the basolateral amygdala by physical and psychological stress. Role of benzodiazepine receptors. **Brain research**, v. 1065, p. 86-91, 2005.

UNANUE, E.R. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and T-cell response. **Immunological Reviews**, v. 158, p. 11-25, 1997 a.

UNANUE, E.R. Why listeriosis? A perspective on cellular immunity to infection. Immunol Rev, v. 158, p. 5-9, 1997 b.

UNANUE, E.R. Inter-relationship among mscrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *listeria monocytogenes* resistance. **Curr Opin Immunol**, v. 9 (1), p. 35-43, 1997 c.

VACEK, A.; ROTKOVSKA, D.; BARTONICKOVA, A. Radioprotectionof hematopoiesis conferred by aqueous extract from Chlorococcal algae (Ivastimul) administered to mice before irradiation. **Exp Hematol**, v. 18, p. 234-237, 1990.

VAN EEDEN, S. F.; KLUT, M. E.; WALKER, B.A.M.; HOGG, J. C. The use of flow citometry to measure neutrophil function. **J of Immunol methods**, v. 232, p. 23-43, 1999.

VISSER, J.W.M.; VANBEKKUN, D.W. Purification of pluripotent hematopoietic stem cells: past and present. **Exp Hematol**, v. 18, p. 248, 1990.

VOLHARDT, L.T. Psychoneuroimmunology: a literature review. **Am J Orthopsychiat**, v. 61, p. 35-47. 1991.

WANG J.M.; COLELLA S.; ALLARENA, P.; MANTOVANI, A. Chemotactic activity of human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Immunol**, v. 60(3), p. 439-444, 1987.

WALKER, F.; NICOLA, N.A.; METCALF, D.; ET AL. Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. **Cell**, v. 43, p. 269, 1985.

WEIGENT, D.A.; BLALOCK, J.E. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors**. Immunol Rev**, v. 100, p. 79-108, 1987.

WEIGENT, D.A.; BLALOCK, J.E. Associations between the neuroendocrine and immune systems. **J Leukocyte Biol**, v. 58, p.137-150, 1995.

WEIGENT, D.A.; BLALOCK, J.E. Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system. **Chem Immunol**, v. 69, p.1-30. 1997.

WEISS, J. M.; GOODMAN, P.A.; LOSITO, S.; CORRIGAN, J.M.; CHARRY, W.H. BAYLEY. Behavioral depression produced by uncontrollable stressor: relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of rat brain. **Brain Res**, v. 3, p. 167-295, 1981.

WEINSTOCK, M. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal-axis? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21 (1), p. 1-10, 1997. Review.

WILLIANS, D.E.; FLETCHER, F.A.; LYMAN, S.D.; DE VRIES, P. Citokine regulation of hematopoietic stem cells. **Semin Immuno**l, v. 3 (6), p. 391-396, 1991.

WILLIANS, C.L.; MEN D., CLAYTON, E.C. The effects of noradrenergic activation of the nucleus tractus solitarius on memory and in potentiating norepinephrine release in the amygdala. **Behav Neurosc**, v. 114, p. 1131-1144, 2000.

WING, E.J.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R.K. Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infect Immun**, v. 45(1), p. 180-184, 1984.

WING, E.J.; BARCZYNSKI, L.K.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R.K. Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and non-immune animals. **Infect Immun**, v. 49, p. 325-328, 1985.

YAMAMOTO, Y.; YASUMIZU, R.; AMOU, Y.; ET AL. Characterization of peripheral blood stem cells in mice. **Blood**, v. 88, p. 445, 1996.

YANG, E.V.; GLASER, R. Stress-induced immunomodulation: impact on immune defenses against infectious disease. **Biomed Pharmacother**, v. 54, p. 245-250, 2000.

YONG, A.M.; CHEERS, C. Colony-forming cells and colony-stimulating acticity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice. **Cell Immunol**, v. 97, p. 227-237, 1986.

ZHAN, Y.; LIESCHKE, G.J.; GRAIL, D.; DUNN, A.R,; CHEERS C. Essential roles for granulocyte-macrophage colony-atimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoetic response of Listeria monocytogenes-infected mice. **Blood**, v. 91(3), p. 863-9, 1998.

Anexo

Figura 1: Efeitos do pré-tratamento por 5 dias consecutivos de C. *vulgaris* (CV-200mg/Kg/dia) sobre o número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea (CFU-GM/fêmur x10^4) em ratos submetidos ou não aos estressores por choque físico (inescapável -CI e escapável -CE), e ao estressor psicogênico (testemunha do choque inescapável - T).

Gupos [1]	**CFU-GM (x10^4)**
C	7 ± 1,5
CV	7 ± 1,3
CI	3,8 ± 2 *
CI/CV	6,8 ± 1
CE	5,8 ± 1,1
CE/CV	7 ± 1
T	4 ± 1,4 *
T/CV	6,9 ± 1,5

[1] C – controle, CI - estresse físico por choque Inescapável, CI/CV - estresse físico por choque inescapável após o tratamento com *C. vulgaris*, CE – estresse físico por choque escapável, CE/CV - estresse físico por choque escapável após o tratamento com *C. vulgaris*, T- estresse psicogênico, T/CV - estresse psicogênico após o tratamento com *C. vulgaris*. - One way ANOVA seguido Tukey/Krammer.
* P<0.05 com relação aos demais grupos.

Figura 2: Efeito do pré-tratamento por 5 dias consecutivos com C. *vulgaris* (CV-200mg/Kg/dia) sobre o número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medúla óssea de ratos, 24, 48 e 72 horas após a infecção com dose sub-letal da *L. monocytogenes* (LM - $7,8x10^8$).

Gupos [1]	**CFU-GM ($x10^4$)**
C	7 ± 1,8
CV	7 ± 1,4
LM 24h	6 ± 1,4
CV + LM 24h	6,6 ± 0,6
LM 48h	3,1 ± 1,4*
CV + LM 48h	6,7 ± 1,4
LM 72h	4,2 ± 1,5*
CV + LM 72h	6,2 ± 1,7

[1] C – controle, CV- tratamento com *Chlorella vulgaris,* LM 24h- infecção com a bactéria *Listeria monocytogenes* e avaliação dos números de CFU-GM 24h após a infecção, CV+LM 24h- infecção com *L. monocytogenes* de animais tratados *C. vulgaris* e avaliação do CFU-GM 24h após a infecção, LM 48h- infecção com a bactéria *Listeria monocytogenes* e avaliação dos números de CFU-GM após 48h após a infecção, CV+LM 48h- infecção com *L. monocytogenes* de animais tratados *C. vulgaris* e avaliação do CFU-GM 48h após a infecção, LM 72h- infecção com a bactéria *Listeria monocytogenes* e avaliação dos números de CFU-GM 72h após a infecção, CV+LM 72h- infecção com *L. monocytogenes* de animais tratados *C. vulgaris* e avaliação do CFU-GM 72h após a infecção. One way ANOVA seguido Tukey/Krammer.
***** $P<0,05$ com relação aos demais grupos.

Tabela 3: Efeitos do pré-tratamento com *C. vulgaris* (200mg/Kg/dia) por 5 dias consecutivos sobre o número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea de ratos submetidos ao estressor físico por choque inescapável (CI) e infectados com dose subletal de *L. monocytogenes* (LM - $7,8x10^8$) 24 h após o término do tratamento com C*. vulgaris* (CV). O número de CFU-GM foi determinado 24, 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria, que foi realizada duas horas após a aplicação dos choques inescapáveis.

Grupos[1]	CFU-GM (x 10^4)
C	7 ± 0,8
CV	7 ± 1,4
CI	3 ± 1 *
CV+CI	6,8 ± 1
LM 24h	5,8 ± 1,5
CV+LM 24h	7,1 ± 2
CI+LM 24h	2,8 ± 0,5 *
CV+CI+LM 24h	7 ± 1
LM 48 h	3.4 ± 0,8 *
CV+LM 48h	6,7 ± 0,7
CI+LM 48h	2,6 ± 1,4 *
CV+CI+LM 48h	6,5 ± 1
LM 72h	4,9 ± 1,8 +
CV+ LM 72h	7 ± 1,6
CI+LM 72h	2,9 ± 1,2 *
CV+CI+LM 72h	6,7 ± 1,4

[1] C- controle, CV- *Chlorella vulgaris*, CI- estresse físico por choque inescapável, CV+CI- estresse físico por choque inescapável após o tratamento com *C. vulgaris*, LM 24h- infecção com a bactéria *Listeria monocytogenes* e avaliação dos números de CFU-GM após 24h da infecção, CV+LM 24h- infecção com *L. monocytogenes* de animais tratados *C. vulgaris* e avaliação do CFU-GM 24h após a infecção, CI+LM 24h- aplicação do estresse físico por choque inescapável, inoculação da *L. monocytogenes* e avaliação do CFU-GM 24h após a infecção, CV+CI+LM 24h- aplicação do estresse físico por choque inescapável, inoculação da *L. monocytogenes* de animais tratados *C. vulgaris* e avaliação do CFU-GM 24h após a infecção. Animais submetidos aos mesmos procedimentos acima descritos foram avaliados nas 48h e 72h após a infecção com *L. monocytogenes.* One way ANOVA seguido Tukey/Krammer.

* P<0,05 com relação aos demais grupos, inclusive +

+ P<0,05 com relação aos demais grupos, inclusive *

Tabela 4: Efeitos do pré-tratamento com *C. vulgaris* (200mg/Kg/dia) por 5 dias consecutivos sobre o número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea de ratos submetidos ao estressor psicogênico (T) e infectados com dose subletal de *L. monocytogenes* (LM - $7,8x10^8$) 24 h após o término do tratamento com C*. vulgaris* (CV). O número de CFU-GM foi determinado 24, 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria, que foi realizada duas horas após a aplicação dos choques inescapáveis.

Grupos[1]	**CFU-GM (x 10^4)**
C	7 ± 0,8
CV	7 ± 1,2
T	3,6 ± 1 *
CV+T	6,9 ± 1
LM 24h	6,5 ± 1,5
CV+LM 24h	7,1 ± 1,8
T+LM 24h	3,2 ± 0,5 *
CV+T+LM 24h	7 ± 1
LM 48 h	3.4 ± 0,8 *
CV+LM 48h	6,7 ± 0,7
T+LM 48h	3 ± 1 *
CV+T+LM 48h	6,8 ± 1
LM 72h	4,9 ± 1,7 +
CV+ LM 72h	7 ± 1,6
T+LM 72h	3,4 ± 1 *
CV+T+LM 72h	6,5 ± 1,4

[1] C- controle, CV- *Chlorella vulgaris*, T- estresse psicogênico (grupo de animais que testemunharam aqueles submetidos aos choques inescapéveis), CV+T- estresse psicogêncico após o tratamento com *C. vulgaris*, LM 24h- infecção com a bactéria *Listeria monocytogenes* e avaliação dos números de CFU-GM 24h após a infecção, CV+LM 24h- infecção com *L. monocytogenes* de animais tratados *C. vulgaris* e avaliação do CFU-GM 24h após a infecção, T+LM 24h- aplicação do estresse psicogênico, inoculação da *L. monocytogenes* e avaliação do CFU-GM 24h após a infecção, CV+T+LM 24h- aplicação do estresse psicogênico, inoculação da *L. monocytogenes* de animais tratados *C. vulgaris* e avaliação do CFU-GM 24h após a infecção. Animais submetidos aos mesmos procedimentos acima descritos foram avaliados nas 48h e 72h após a infecção com *L. monocytogenes.* One way ANOVA seguido Tukey/Krammer.
* $P<0,05$ com relação aos demais grupos, inclusive +
+ $P<0,05$ com relação aos demais grupos, inclusive *

Tabela 5: Efeitos do pré-tratamento com *C. vulgaris* (200mg/Kg/dia) por 5 dias consecutivos sobre o número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea de ratos submetidos ao estressor físico por choque escapável (CE) e infectados com dose subletal de *L. monocytogenes* (LM - $7,8x10^8$) 24 h após o término do tratamento com C*. vulgaris* (CV). O número de CFU-GM foi determinado 24, 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria, que foi realizada duas horas após a aplicação dos choques inescapáveis.

Grupos[1]	**CFU-GM (x 10^4)**
C	7 ± 0,8
CV	7 ± 1,4
CE	6,2 ± 1
CV+CE	6,8 ± 1
LM 24h	6,5 ± 1,5
CV+LM 24h	7,1 ± 2
CE+LM 24h	6,4 ± 0,6
CV+CE+LM 24h	7 ± 0,8
LM 48 h	3.4 ± 0,9 *
CV+LM 48h	6,9 ± 0,5
CE+LM 48h	3,2 ± 1,1 *
CV+CE+LM 48h	6,8 ± 1
LM 72h	4,9 ± 1,8 +
CV+ LM 72h	7 ± 1,4
CE+LM 72h	4,6 ± 1,1 *
CV+CE+LM 72h	6,5 ± 1

[1] C- controle, CV- *Chlorella vulgaris*, CE- estresse físico por choque escapável, CV+CE- estresse físico por choque escapável após o tratamento com *C. vulgaris*, LM 24h- infecção com a bactéria *Listeria monocytogenes* e avaliação dos números de CFU-GM após 24h da infecção, CV+LM 24h- infecção com *L. monocytogenes* de animais tratados *C. vulgaris* e avaliação do CFU-GM 24h após a infecção, CE+LM 24h- aplicação do estresse físico por choque escapável, inoculação da *L. monocytogenes* e avaliação do CFU-GM 24h após a infecção, CV+CE+LM 24h- aplicação do estresse físico por choque escapável, inoculação da *L. monocytogenes* de animais tratados *C. vulgaris* e avaliação do CFU-GM 24h após a infecção. Animais submetidos aos mesmos procedimentos acima descritos foram avaliados nas 48h e 72h após a infecção com *L. monocytogenes.* One way ANOVA seguido Tukey/Krammer.

* P<0,05 com relação aos demais grupos, inclusive +

+ P<0,05 com relação aos demais grupos, inclusive *