

ZULEIDE MARIA IGNÁCIO

**EFEITOS DO ESTRESSE PSICOSSOCIAL SOBRE A
RESPOSTA IMUNE HUMORAL E A CORRELAÇÃO
COM O ESTADO DE ANSIEDADE EM
CAMUNDONGOS**

Florianópolis
1999

ZULEIDE MARIA IGNÁCIO

**EFEITOS DO ESTRESSE PSICOSSOCIAL SOBRE A
RESPOSTA IMUNE HUMORAL E A CORRELAÇÃO
COM O ESTADO DE ANSIEDADE EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Curso de Pós Graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Odival Cesar Gasparotto

Florianópolis
1999

“EFEITOS DO ESTRESSE PSICOSSOCIAL SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL E A CORRELAÇÃO COM O ESTADO DE ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS”

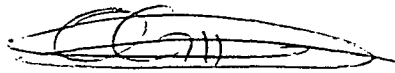
ZULEIDE MARIA IGNÁCIO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

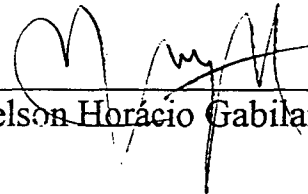
na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

Orientador



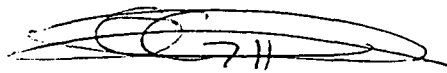
Odival Cezar Gasparotto

Coordenador do Curso

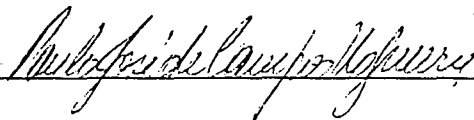


Nelson Horácio Gabilan

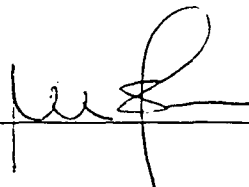
Banca Examinadora



Odival Cezar Gasparotto (Presidente)



Paulo Nogueira



Moacir Serralvo Farias

Sônia Gonçalves Carobrez

*"Se cada dia cai dentro de cada noite,
há um poço onde a claridade está presa.
Há que sentar-se na beira do poço da sombra
e pescar luz caída com paciência."*

(Pablo Neruda)

ALCEU

*Obrigada pelo amor, respeito e incentivo;
por me ensinar que sempre há tempo para nós e
nossos objetivos;
Obrigada por existir.*

EDER e GUILHERME

*A dimensão do amor e a empolgação pela vida
são imensuráveis com vocês.*

Aos meus pais, PEDRO e MARIA.

*meu carinho e eterna gratidão pelo
incentivo e pelo brilho nos olhos,
diante de meus objetivos e
realizações.*

Aos meus irmãos.

*pelo apoio e por acreditarem,
obrigada.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor ODMVAL, Orientador.

pela orientação, por ter acreditado e pela oportunidade de trabalhar em um projeto magnífico, muito obrigada.

À Professora SÔMA.

por sua contribuição imprescindível na orientação deste trabalho.

À Professora CRISTINA.

pelo seu desprendimento e humildade. Sua valiosa orientação e sua amizade sob estas virtudes são inesquecíveis.

À amiga CLADIS.

por sua amizade sem pretextos e limites; pela paciência e pela capacidade de enobrecer a realidade.

À amiga RITA

Antigas amizades são como obras clássicas. Obrigada pelo constante estímulo.

Ao Professor MOACIR

Suas críticas e sugestões foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À técnica e amiga LUCIANE.

por ter compartilhado e por suas importantes observações e sugestões.

Ao professor CLAUDIO.

pelo incentivo, apoio e constante disposição de colaborar para o desenvolvimento do trabalho.

Ao técnico CARLOS e aos funcionários WIVALDO e D. VILMA.

pela serenidade, humildade e pelo ambiente familiar.

Ao funcionário WIVALDO VICENTE.

pela competência no assessoramento e pela agradável convivência.

Aos professores MAURO, LAURA, MARMO E MARIA.

pela presença e sugestões.

Aos professores CARLOS BANETTE e ROGÉRIO GUERRA.

pelas críticas e sugestões abordadas no exame de qualificação.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do estresse psicossocial provocado pela interação agonística recorrente sobre a resposta imune humoral, verificando a possível correlação com o estado de ansiedade. Camundongos das linhagens Swiss e BALB/c foram utilizados e os protocolos de interação agonística e inoculação do antígeno (hemácias de carneiro) tiveram por objetivo verificar a relação temporal entre o evento estressante e o estímulo antigênico. Um grupo de interação longa (INL/SW) e um grupo de interação curta (INC/SW e INC/BC) foram submetidos a um período de interação agonística de 21 e 14 dias respectivamente. Nos grupos de interação longa o antígeno foi inoculado no sétimo e no décimo quarto dia de interação, enquanto que nos grupos de INC, o antígeno foi inoculado no primeiro e no sétimo dia de interação. Os animais da linhagem Swiss foram subdivididos em dois outros grupos, CMS/SW-14 e CMS/SW-21. Estes animais permaneceram na mesma sala dos animais que interagiram por 14 e 21 dias. O objetivo foi submetê-los aos odores e à vocalização dos animais interagentes. Como controles, um grupo da linhagem Swiss (CSS/SW) e um grupo da linhagem BALB/c (CSS/BC) foram alojados individualmente em uma sala separada. Esses animais foram inoculados e o sangue foi coletado conforme o protocolo dos demais grupos. Nas sessões de interação agonística foram caracterizados os dominantes (INL/SW-D, INC/SW-D e INC/BC-D) e os submissos (INL/SW-S, INC/SW-S e INC/BC-S) de acordo com suas posturas comportamentais. Um teste de correlação foi realizado entre os títulos de anticorpos e os índices de ansiedade para verificar a interação entre as características comportamentais e imunológicas. Na linhagem Swiss os efeitos do estresse de interação curta foram evidenciados nos animais submissos, que apresentaram uma redução dos títulos de anticorpos na resposta imune primária em relação aos animais controles. A resposta secundária dos animais dominantes aumentou apreciavelmente, diferindo significativamente daquela dos animais submissos. A interação por um período mais longo induziu um aumento na resposta imune humoral primária, tanto em relação aos animais do grupo controle como em relação àqueles que interagiram por um período menor. Os subgrupos de interação longa não apresentaram diferenças em suas respostas imunológicas. Na linhagem BALB/c não foi evidenciado diferenças entre os grupos experimentais. A comparação com os animais da linhagem Swiss mostra que os animais BALB/c sem a interferência do estresse possuem uma resposta imune primária menor. Os testes de ansiedade no labirinto em cruz elevado (*Plus-maze*) indicaram que os animais Swiss são naturalmente mais ansiosos do que os animais BALB/c. O teste de correlação indica uma tendência de aumento da resposta imune humoral nos animais mais ansiosos dominantes e uma diminuição nos submissos mais ansiosos. A observação dos animais do grupo CMS indica que o estresse psicossocial sem a agressão física direta induz alterações semelhantes àquelas produzidas nos animais interagentes, reforçando a influência de estruturas centrais sobre a atividade imunológica.

ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the effects of the psychosocial stress caused by the recurring agonistic interaction on the humoral immune response, verifying the possible correlation with the anxiety state. Mice of Swiss and BALB/c strains were used, and the protocols of agonistic interaction and antigen inoculation (sheep red blood cells) aimed to verify the temporal relation between the stressing event and the antigenic stimulation. A group of long interaction (LIN/SW) and a group of short interaction (SIN/SW and SIN/BC) were submitted to an agonistic interaction period of 21 and 14 days respectively. In the long-interaction group the antigen was inoculated on the seventh and on the fourteenth day of interaction, while in the SIN groups the antigen was inoculated on the first and the seventh day of interaction. The subjects of the Swiss strains were subdivided into two other groups, SRC/SW-14 and SRC/SW-21 (same room controls). These subjects remained in the same room of the subjects which interacted for 14 and 21 days. The object was to submit to the odours and to the vocalization of the interacting subjects. As controls, a group of the Swiss strain, DRC/SW (different room control) and a group of BALB/c strain (DRC/BC) were housed individually in a separate room. These subjects were inoculated and the blood was collected accordingly to the protocol of the other groups. In the session of the agonistic interaction, the subjects were characterized in dominating (LIN/SW-D, SIN/SW-D and SIN/BC-D) and submissive (LIN/SW-S, SIN/SW-S and SIN/BC-S) accordingly with their behavioral posture. A correlation test was carried out between the titers of antibodies and the rates of anxiety to check the interaction between the behavioral and immunological characteristics. In the Swiss strain the effects of short-interaction stress were shown up in the submissive subjects, which presented a reduction of the antibodies titers in the primary immune response in relation to the control subjects. The secondary response of the dominating subjects increased expressively, differing significantly from that of the submissive ones. The long interaction induced an increase in the primary humoral immune response, as much in relation to the control group subjects as in relation to those which interacted for a shorter time. The subgroups of long interaction did not present differences in their immunological responses. In the BALB/c strain there were no differences among the experimental groups. The comparison with the subjects of the Swiss strain shows that the BALB/c ones without the stress interference have a smaller primary immune response. The anxiety tests in the plus-maze indicated that the Swiss mice are naturally more anxious than the BALB/c. The correlation test indicates that the humoral immune response in more anxious dominating subjects has a tendency to increase, while in the more anxious submissive subjects this response decreases. The observation of the SRC group subjects shows that the psychosocial stress, without direct physical aggression, induces changes similar to those produced in the interacting subjects, reinforcing the influence of central structures on the immunological activities.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1. Interconexões Funcionais em Resposta aos Estímulos Estressantes	5
1.2. Estresse Social	8
2. Objetivos	15
2.1. Geral	15
2.2. Específicos	15
3. Material e Método	17
3.1. Animais	17
3.1.1. Grupo de Interação Curta (14 dias) – INC/SW e INC/BC	18
3.1.2. Grupo de Interação Longa (21 dias) – INL/SW	19
3.1.3. Grupo Controle de Mesma Sala de 14 e 21 dias – CMS/SWS e CMS/SW-21	20
3.1.4. Grupo Controle de Sala Separada – CSS/SW e CSS/BC	20
3.2. Obtenção de Hemácias de Carneiro.....	21
3.3. Coleta do Sangue do Camundongo e Extração do Soro	21
3.4. Avaliação da Produção de Anticorpos Anti-hemácia de Carneiro (Anti-HC)	22
3.5. Teste de Ansiedade	22
3.6. Análise Estatística dos Resultados	23
4. Resultados	26
4.1. Linhagem Swiss	26

4.1.1. Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Primária – H1	26
4.1.2. Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Secundária – H2	28
4.1.3. Comparação Entre as Respostas Imune Primária (H1) e Secundária (H2)..	32
4.1.4. Primeira Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado	32
4.1.5. Segunda Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado	35
4.1.6. Correlação da Resposta Obtida no Labirinto em Cruz Elevado com as Respostas Imune Primária e Secundária	38
4.2. Linhagem BALB/c	40
4.2.1. Títulos de Anticorpos Anti –HC na Resposta Imune Primária – H1	40
4.2.2. Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Secundária – H2	40
4.2.3. Comparação Entre as Respostas Imune Primária (H1) e Secundária (H2)	41
4.2.4. Primeira Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado	43
4.2.5. Segunda Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado	45
4.2.6. Correlação da Resposta Obtida no Labirinto em Cruz Elevado com as Respostas Imune Primária e Secundária	48
4.3. Comparação entre as Linhagens Swiss e BALB/c	49
4.3.1. Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Primária – H1	50
4.3.2. Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Secundária – H2	51
4.3.3. Primeira Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado	54
4.3.4. Segunda Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado	55
5. Discussão	58
5.1. Linhagem Swiss.....	58
5.1.1. Títulos de Anticorpos Anti-HC nas Respostas Imune Primária e Secundária	58
5.1.2. Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado	65

5.1.3. Ansiedade e Resposta Imune	69
5.2. Linhagem BALB/c	77
5.2.1. Títulos de Anticorpos Anti-HC nas Respostas Imune Primária e Secundária	77
5.2.2. Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado	78
5.2.3. Ansiedade e Resposta Imune	79
5.3. Comparação Entre as Características Observadas na Linhagem Swiss e na Linhagem BALB/c	80
5.3.1. Características Comportamentais	80
5.3.2. Resposta Imunológica	81
6. Referências Bibliográficas	83

1 - INTRODUÇÃO

Os sistemas ativados pelo estresse formam uma rede fisiológica altamente reativa e flexível que socorre e coordena o equilíbrio dinâmico do organismo. A resposta ao estresse envolve uma maquinaria central bastante complexa, cujo processamento pode ser ativo, conduzindo informações à periferia do organismo. Estruturas centrais também podem ser ativadas por sistemas periféricos, constituindo uma rede de informações entre o sistema nervoso central e os demais sistemas orgânicos. Os inúmeros experimentos visando o estudo do inter-relacionamento dos sistemas neural, endócrino e imune comprovam que existe uma íntima ligação funcional entre eles, cujo resultado é relevante para o equilíbrio homeostático. As condições adversas atuando sobre o ambiente mental e fisiológico têm a função de interferir no inter-relacionamento funcional desses sistemas, alterando a homeostasia. As pesquisas apontam na direção de que os estressores ou seus efeitos psicológicos contribuem para provocar ou potencializar doenças, tais como, alterações imunológicas, neoplasias, doenças cardiovasculares, distúrbios psicossomáticos como por exemplo, a ansiedade e a depressão.

Uma série de estudos realizados na espécie humana e em animais de laboratório, vêm apontando diversas alterações na função imunológica, como consequência da exposição a situações estressantes ou a características de um quadro de depressão psicológica. Eventos rotineiramente vivenciados pela população, como a morte de um membro da família, são considerados como estímulos altamente estressantes e podem estar relacionados com a manifestação de um quadro de depressão e um aumento na morbidade e mortalidade em uma variedade de doenças (Helsing *et al.*, 1981; Mor *et al.*, 1986). Indivíduos do sexo masculino,

diagnosticados como pacientes portadores de depressão maior ou indivíduos submetidos a eventos altamente estressantes, como a perda de um amigo íntimo ou a doença do cônjuge, apresentaram uma significativa redução da atividade das células NK (*Natural Killer*), quando comparada com a resposta obtida em indivíduos saudáveis ou que não passaram por episódios estressantes (Irwin *et al.*, 1990). Em indivíduos na fase de exame acadêmico foi mostrado um aumento de células B e T, redução da síntese de anticorpos “*in vitro*” e baixa resposta linfoproliferativa a mitógenos, duas semanas antes dos exames. Essas respostas foram normalizadas duas semanas após os exames. Surpreendentemente, as medidas de cortisol plasmático foram significativamente menores nos indivíduos estressados do que nos indivíduos controles (Dorian *et al.*, 1982). Glaser *et al.* (1985a) observaram em acadêmicos durante a fase dos exames uma redução significativa nas percentagens de linfócitos, células auxiliaadoras e supressoras e uma redução na resposta proliferativa de linfócitos T induzida por mitógenos, quando comparadas aos níveis basais dos mesmos indivíduos, seis semanas antes dos exames. Glaser *et al.* (1985b) observaram altos títulos de anticorpos para herpesvírus latentes, o vírus da herpes simples do tipo 1 (HSV-1), vírus Epstein-Barr (EBV) e citomegalovírus (CMV), em indivíduos submetidos a exames acadêmicos.

Em um estudo com indivíduos que vivenciaram um processo de separação ou divórcio foram observados altos títulos de anticorpos contra o EBV e o HSV-1 (Kieckhefer-Glaser *et al.*, 1988). Estes altos títulos de anticorpos para viroses latentes poderiam estar relacionados a uma falha na ativação de uma resposta imune mediada por célula. Esta falha da resposta imune celular seria responsável por um aumento nos antígenos virais e refletiria sobre a resposta imune humoral. Segundo os autores acima, a atividade de uma linfocina considerada como um fator de inibição da migração de leucócitos foi elevada durante a recrudescência da infecção do vírus da herpes simples tipo 2 observada em indivíduos na fase de exames

acadêmicos, enquanto que sua atividade normal deveria ser suprimida. O aumento na atividade dessa linfocina poderia então justificar as falhas da resposta imune mediada por células, diante dos eventos estressantes.

No plasma de camundongos machos da linhagem CD-1 submetidos a sessões de eletrochoques nas patas foram observados títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro significativamente menores e redução de células formadoras de placas no baço (Zalcman *et al.*, 1991). Estas respostas foram dependentes da idade e do tempo da aplicação do antígeno em relação ao estímulo estressante. Cocks *et al.* (1993) observaram que a exposição de camundongos aos odores emitidos por outros camundongos submetidos ao estresse através de eletrochoques nas patas diminuiu a produção de interleucina-2, estimulada pela Concavalina-A (ConA), reduziu a resposta das células NK e aumentou os títulos de anticorpos IgM e IgG anti-KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*), uma proteína extraída de um caracol não comestível de origem da costa sul da Califórnia.

Os eventos estressantes atuam acionando mecanismos sistêmicos de forma e intensidade variadas, dependendo da natureza e intensidade do estressor, da idade do indivíduo submetido ao estresse, da espécie, linhagem ou raça. Esses mesmos fatores são relevantes para o processamento da resposta imune. Brenner & Moynihan (1997) observaram alterações diferenciadas entre as respostas acionadas por estímulos de vias diferentes do sistema imune, as quais também variaram entre animais estressados e controles e entre diferentes linhagens. No experimento realizado por Brenner e Moynihan, o estresse induzido por eletrochoques nas patas de camundongos das linhagens BALB/c e C57Bl/6, reduziu a síntese de interleucina 2 (IL-2) estimulada pelo vírus HSV-1. A síntese de IL-4 foi reduzida nos grupos estressados da linhagem BALB/c e em todos os animais da linhagem C57Bl/6. Na

linhagem BALB/c, a síntese de IL-2 e IL-4 foi maior que na linhagem C57Bl/6. A contagem de células T CD4 e CD8 também variou em relação ao estresse e à linhagem. Surpreendentemente, o estresse provocou um aumento da produção de IgM anti-HSV-1 nas duas linhagens. A experiência pregressa e a habilidade individual para lidar com o estressor também são fundamentais no processamento da resposta fisiológica diante de um estressor. Kirschbaum *et al.* (1995) verificaram que em um grupo de homens saudáveis, um terço do grupo manteve a liberação de cortisol salivar alta em resposta a tarefas estressantes de falar em público, repetidas durante cinco dias, enquanto que em dois terços do grupo, a liberação voltou aos níveis basais no segundo dia de exposição a tarefas estressantes. A persistência do aumento da liberação de cortisol durante os cinco dias foi significativamente correlacionada com os traços de personalidade de insegurança e baixa auto estima.

Fatores genéticos podem contribuir significativamente para a expressão de alterações comportamentais e neuroquímicas eliciadas por estressores (Shanks *et al.*, 1988). Shanks *et al.* (1990) verificaram alterações diferenciadas nos níveis de corticosteróides plasmáticos, entre várias linhagens de camundongos, após sessões de eletrochoques incontroláveis nas patas.

A resposta fisiológica pode ser direcionada especificamente a um estímulo estressante ou ser generalizada, quando o estressor ultrapassa o limite da resposta específica. As variações de respostas, induzidas pela magnitude e duração do estressor, podem levar a um desequilíbrio homeostático, por alterar o sistema de retroalimentação de algum ramo da maquinaria fisiológica. Na depressão melancólica os sintomas são: ansiedade, produzida por um alerta geral do organismo; supressão do comportamento ingestivo e da libido; redirecionamento da energia, com sintomas de taquicardia e hipertensão. A disforia que

acompanha esta condição pode representar uma resposta a um estressor incontrolável e pode ser devida à taquifilaxia do sistema mesocorticolímbico à ativação orgânica pelo estresse (Stratakis & Chrousos, 1995). Segundo estes autores, a ativação crônica do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) foi mostrada em muitas condições, como anorexia nervosa, ansiedade pânica, desordens compulsivas obsessivas, alcoolismo ativo crônico, supressão ou retirada do álcool e narcóticos, exercícios excessivos, desnutrição e em mulheres vítimas de abuso sexual.

1.1 - Interconexões Funcionais em Resposta aos Estímulos Estressantes

A rede funcional ativada durante um evento estressante envolve estruturas centrais responsáveis pelo processo adaptativo, como as áreas que formam e aquelas que são reguladas pelo sistema límbico. Essas estruturas também são ativadas direta ou indiretamente por sistemas periféricos, constituindo uma rede bidirecional entre o sistema nervoso e outros sistemas orgânicos.

Os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) sintetizam o hormônio liberador da corticotropina (CRH), vasopressina arginina (AVP) e outros fatores de liberação hipotalâmicos, os quais dirigem-se até a hipófise anterior através do sistema porta-hipofisário e estimulam a secreção e liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Por sua vez, o ACTH estimula o córtex adrenal a sintetizar glicocorticóide, cuja ação bastante generalizada por todo o organismo interfere no metabolismo e nas reações inflamatória e imunológica. O CRH é a principal molécula que estimula a síntese de ACTH. O AVP parece potencializar os efeitos do CRH, mas sozinho não mostrou ser muito efetivo na estimulação do ACTH.

Trabalhando com ratos submetidos ao estresse social e neutralizando o CRH plasmático através do método de imunoneutralização periférica, Pich *et al.* (1993) não obtiveram uma resposta efetiva do AVP na estimulação do ACTH. Com estes resultados, estes autores sugeriram a participação do AVP como um modulador dos efeitos do CRH para algumas respostas ao estresse, mas não para todas.

As vias catecolaminérgicas do tronco cerebral são aferentes ao NPV (Sawchenko *et al.*, 1988; Sawchenko *et al.*, 1990, *apud* Cullinan *et al.*, 1995). O núcleo do trato solitário serve como um relê, levando as informações, via nervos vago e glossofaríngeo, como também, projeções não aminérgicas ao NPV e a vários outros núcleos, como os grupos celulares A1 e C1 e os grupos parabraquiais laterais, que por sua vez inervam o NPV (Norgren, 1980; Saper *et al.*, 1980; Hancock, 1988, *apud* Cullinan *et al.*, 1995). Projeções serotoninérgicas ao NPV parecem partir dos grupos celulares B7 a B9 do tronco cerebral (Sawchenko *et al.*, 1983, *apud* Cullinan *et al.*, 1995). Aferências partindo do mesencéfalo e da ponte foram descritas e caracterizadas como relês de informações sensoriais aos neurônios NPV (Levin *et al.*, 1987, *apud* Cullinan *et al.*, 1995).

Estruturas límbicas, tais como o hipocampo, córtex pré-frontal medial, septo e amígdala foram descritas como estruturas que influenciam a atividade do HPA (Matheson *et al.*, 1971; DuPont *et al.*, 1972; Redgate & Fahringer, 1973; Seggie *et al.*, 1973; Wilson *et al.*, 1980; Feldman & Conforti, 1981; Dunn & Orr, 1984; Dunn & Whitener, 1986; Beaulieu *et al.*, 1986; Saphier & Feldman, 1987; Seggie, 1987; Herman *et al.*, 1989; Sapolsky *et al.*, 1989; Van de Kar *et al.*, 1991; Herman *et al.*, 1992; Diorio *et al.*, 1993, *apud* Cullinan *et al.*, 1995). A destruição de estruturas límbicas como o hipocampo, fórnix dorsal e septum potencializou a hipersecreção do ACTH em ratos adrenalectomizados, enquanto que a

destruição da amígdala preveniu a hipersecreção induzida pela adrenalectomia, sugerindo uma importante função modulatória dessas estruturas sobre o hipotálamo (Feldman *et al.*, 1995) A ativação do eixo HPA por essas estruturas, mediadas por estressores, parece funcionar através de um relê neuronal, cuja região parece ser o núcleo leito da estria terminal (Swanson & Cowan, 1977; Krettek & Price, 1978; Swanson & Cowan, 1979; Weller & Smith, 1982; Sawchenko & Swanson, 1983; Swanson, Sawchenko & Lind, 1986; , *apud* Cullinan *et al.*, 1995). Regiões hipotalâmicas foram descritas como regiões que têm aferências para o NPV. Foi sugerido a modulação dos neurônios hipofisiotróficos do NPV pelo GABA, opióides e substância P, através das terminações hipotalâmicas mencionadas (Cullinan *et al.*, 1995).

O loco cerúleo tem receptores para o CRH, os quais, quando estimulados causam a liberação de norepinefrina. Esta, por sua vez ativa o sistema noradrenérgico central e adrenérgico periférico, causando a liberação de epinefrina pela medula adrenal e norepinefrina a partir de sítios periféricos, incluindo a inervação noradrenérgica direta de órgãos do sistema imune. Felten *et al.* (1987), *apud* Maier *et al.* (1994), demonstraram que o sistema nervoso simpático inerva órgãos imunes, como o timo, a medula óssea, o baço e os linfonodos. Os órgãos e células imunologicamente competentes contém receptores para as catecolaminas liberadas pelo sistema nervoso simpático. As regiões de contato dos terminais dos nervos simpáticos nos órgãos imunes fazem contato com os próprios linfócitos e apresentam características ultraestruturais de contato sináptico (Felten & Felten, 1991).

Os órgãos do sistema imune contribuem para processo bidirecional, respondendo aos estímulos originários do sistema nervoso central ou enviando mensageiros químicos liberados através do seu mecanismo fisiológico natural e assim, participando de um sistema de retroalimentação. As pesquisas tem sugerido que a interleucina 1 (IL-1) atua formando um

sistema de retroalimentação negativa para o controle de sua liberação. De acordo com Black, (1994); De kloet *et al.* (1994), *apud* Heninger (1995), a IL-1 estimula a liberação do CRH e consequentemente do cortisol, que por sua vez pode alterar a atividade imunológica, reduzindo os níveis de citocinas. Em um experimento com macacos Rhesus foi verificado que a IL-1 α estimulou a liberação do CRH no hipotálamo, cuja concentração permaneceu elevada no líquido cerebrospinal, até seis horas após a liberação. Este tempo foi o mesmo verificado para os níveis elevados de ACTH plasmático, conforme verificado em outros experimentos (Xia *et al.*, 1996).

1.2 - Estresse Social

Uma forma de estresse que atinge a espécie humana em uma extensão relevante, o estresse social, vem recebendo grande dedicação dos pesquisadores. Observações clínicas e modelos experimentais em animais, que tentam simular o estresse social humano têm sido utilizadas, na tentativa de conhecer quais os mecanismos acionados pelo estresse que interferem na homeostase fisiológica.

As estruturas centrais de vertebrados, como a amígdala e substância cinzenta periaquedutal dorsal, envolvidos na detecção do perigo e na produção de respostas de defesa, foram apontados em estudos recentes como partes de sistemas que apresentam semelhança muito forte com os da espécie humana. São sistemas fortemente conservados na evolução e por isso suas características apresentadas como respostas de defesa podem ser comparadas com as da espécie humana (Depaulis & Bandler, 1991; Davis, 1992; LeDoux, 1995, *apud*

Rodgers *et al.*, 1997).

Condições sociais estáveis são aspectos importantes para um bom processamento psicofisiológico. No contexto em que possa existir uma ameaça à existência ou ao sucesso individual, a interação social parece interferir no organismo como um estímulo estressante. Em diversas situações, o isolamento social parece traduzir-se em um certo grau de segurança, refletindo em maior equilíbrio de algumas funções orgânicas. Porém, alterações nas condições de alojamento, separando animais de seus grupos estáveis e alojando-os individualmente, parecem refletir no organismo como estímulos estressantes, ativando sistemas relacionados à ansiedade e interferindo na resposta imune. Shanks *et al.* (1994) observaram em camundongos da linhagem CD-1, que os animais alojados individualmente responderam diferencialmente à hemácia de carneiro, em função do tempo em que estavam separados de suas colônias. O alojamento individual por 5 e 10 dias provocou uma redução significativa nos títulos de anticorpos em relação aos animais alojados em grupos e aos animais alojados individualmente por 25 ou 30 dias. A redução da resposta imunológica nos animais alojados individualmente por 5 dias foi restabelecida aos níveis dos animais agrupados ou individuais de 25 e 30 dias, com a administração de diazepam, uma droga ansiolítica, durante os 5 dias antes e os 4 dias após a inoculação do antígeno. Os resultados obtidos por esses autores sugerem que os animais alojados individualmente por um período mais longo já estariam estabilizados naquele ambiente e, portanto, a situação ambiental não estaria influenciando os sistemas ativados pelo estresse. Por outro lado, em experimentos nos quais os animais são alojados individualmente logo após o desmame, algumas respostas imunológicas são aumentadas em relação aos animais alojados em grupos. De acordo com os resultados obtidos por Karp *et al.* (1993), em camundongos da linhagem C57Bl/6 alojados individualmente logo após o desmame foi observado uma maior produção de anticorpos IgM e IgG anti-KLH na

resposta imune secundária, quando comparados aos camundongos da mesma linhagem alojados em grupos de 6 ou 12 animais. Na linhagem BALB/c, os mesmos autores observaram produção de IgM anti-KLH significativamente maior nos animais alojados individualmente, em comparação com os animais alojados em grupos de 4, 6 ou 12. Karp *et al.* (1997) verificaram aumento de algumas, mas não de todas as respostas imunes testadas com o vírus HSV-1 (*Patton virus*) em camundongos da linhagem BALB/c alojados individualmente, quando comparadas às respostas de animais alojados em grupos de 4 camundongos por caixa. Em animais alojados individualmente, a proliferação de células do baço foi maior e a produção de IL-2 e Interferon- γ (IFN- γ) por células do baço aumentou depois de 24 horas de incubação com o vírus HSV-1 inativado. Com um período de incubação de 48 e 72 horas a produção de IL-2 e IFN- γ não diferiu entre animais alojados individualmente ou em grupos. A síntese de IL-10 foi maior em camundongos alojados individualmente, nos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação. Nas células dos nódulos linfóides popliteais, a produção das citocinas acima não foi diferente entre as condições de alojamento.

Em ambientes naturais, os mecanismos de defesas dentro de cada espécie são utilizados para enfrentar as variações ambientais, desenvolvendo uma função importante para a estabilidade dos grupos sociais. Contudo, uma falha nesses mecanismos pode levar a várias patologias desencadeadas pelos sistemas ativados pelo estresse (Koolhaas *et al.*, 1997).

Segundo Blanchard & Blanchard (1990), comportamentos agonísticos nos mamíferos são mais acentuados que em outras classes de animais e o conceito de dominância tornou-se o maior foco para os estudos das diferenças comportamentais entre os indivíduos envolvidos em

uma interação agonística. Para ratos selvagens e de laboratório a dominância a partir do comportamento agonístico é bem caracterizada, segura e relativamente consistente.

A submissão é uma condição social que envolve características psicológicas, comportamentais e fisiológicas, que muitas vezes, além de prejudicar diretamente a homeostasia, traduz-se em atitudes que submetem o indivíduo a situações ambientais menos adaptativas. Segundo Blanchard *et al.* (1993), na avaliação dos perigos de um ambiente, ratos machos submissos foram menos hábeis em seus movimentos, quando comparados com os dominantes. Na avaliação de um ambiente potencialmente perigoso, os submissos foram mais lentos em sua retirada do local, proporcionando maior facilidade a uma possível predação. Esta atitude, na opinião desses autores, pode ser atribuída a uma lentidão nos processos neurais dos submissos em relação aos dominantes. Em ratos submissos, Raab *et al.* (1986) detectaram perda de peso corporal, aumento dos níveis de corticosteróides plasmáticos, diminuição do peso do timo e diminuição da resposta linfocítica do baço à estimulação mitogênica. Em ratos machos, a derrota social produziu oscilação da pressão sangüínea e aumento do débito cardíaco e da temperatura corporal (Fokkema *et al.* (1986) e Miczek *et al.* (1991), *apud* Blanchard *et al.*, (1993). Analisando as características comportamentais individuais dentro de uma colônia de ratos, Fokkema *et al.* (1995) observaram aumento da pressão sangüínea em ratos agressivos que não estavam em posição de dominância, mas caracterizavam-se como subdominantes, pelo fato de apresentarem comportamentos agressivos frente aos ataques dos dominantes. Ratos dominantes apresentaram pressão sangüínea significativamente menor que os subdominantes mais agressivos. Nesse estudo, os autores registraram uma correlação positiva da frequência de fugas com a pressão sangüínea e com os níveis plasmáticos de corticosterona. Em ratos intrusos submetidos a encontros com ratos agressivos, a produção de anticorpos IgG anti-KLH foi menor nos ratos submissos que

despenderam um tempo maior com posturas de submissão, quando comparado com os animais controles e com os submissos que despenderam menos tempo com posturas de submissão (Fleshner *et al.*, 1989)

Assim como outras formas de estresse, o estresse social aciona mecanismos orgânicos, através de alterações neurais que também culminam em desordens, tais como a ansiedade e depressão. Na forma de experiência de derrotas, o estresse social é um potente estímulo do mecanismo de analgesia não opióide em camundongos, com evidências farmacológicas e comportamentais apontando para a ansiedade como um fator chave na reação de defesa antecipatória (Rodgers & Randall, 1986, *apud* Rodgers *et al.*, 1997). Ratos derrotados socialmente por uma ou duas vezes apresentaram redução da atividade locomotora no teste do campo aberto (*Open field*) e redução do contato social com um animal não familiar da mesma espécie. Após duas derrotas sociais, os animais apresentaram redução da ingestão de alimento por vários dias (Meerlo *et al.*, 1996). Pich *et al.* (1993) verificaram que ratos derrotados socialmente apresentaram no labirinto em cruz elevado, um grau de ansiedade significativamente maior do que os animais controles da mesma linhagem. Os níveis plasmáticos de CRH também são significativamente maiores nos animais derrotados em relação aos controles. Quando administrado um antagonista do CRH, não se observa diferença na resposta comportamental obtida anteriormente, sugerindo que os níveis de CRH aumentados nos animais estressados não estão correlacionados com a alteração nos níveis de ansiedade desses animais.

Na relação de dominância e submissão uma interação agonística que preserva condições semelhantes aos animais interagentes, ou seja, sem privilégios quanto ao tamanho do animal, a idade ou a situação social anterior, as características comportamentais entre

animais dominantes e submissos parecem diferir em alguns aspectos, daquelas observadas em animais submetidos à derrota social em condições totalmente desvantajosas quanto aos animais residentes. Ferrari *et al.* (1998) observaram que camundongos dominantes apresentaram um grau de ansiedade significativamente maior que os animais submissos, controles e também maior em relação aos animais que apenas reagem aos ataques, mas não atacavam espontaneamente.

Alterações fisiológicas também são relacionadas com o grau de agressividade da espécie, da linhagem ou de cada indivíduo. Utilizando duas linhagens de camundongos, Devoino *et al.* (1993) verificaram que houve aumento do título de anticorpos contra hemácia de carneiro em animais dominantes da linhagem CBA/Lac, enquanto que nos submissos a resposta não diferiu do grupo controle; na linhagem C57/BL, considerada menos agressiva que a CBA/Lac, a produção de anticorpos anti-hemácia de carneiro não diferiu nos dominantes, enquanto que foi significativamente diminuída nos submissos, quando comparada com a resposta dos controles. Os neurotransmissores dopamina e serotonina são discutidos como possíveis intermediadores das diferenças nas respostas imunológicas expressas pelas duas linhagens. Segundo os autores, na linhagem mais agressiva a atividade do sistema dopaminérgico parece estar mais acentuada enquanto que na linhagem menos agressiva é o sistema serotoninérgico que parece estar mais atuante. Paralelamente, segundo discussão feita pelos mesmos autores, a ativação da dopamina parece melhorar a atividade do sistema imune na produção de anticorpos enquanto que a ativação da serotonina parece prejudicar a atividade imunológica.

A revisão bibliográfica apresentada, além de uma vasta literatura neste campo da ciência mostram que um corpo substancial de pesquisas vem acumulando evidências, as quais

apontam para a confirmação de que alterações psicofisiológicas são desencadeadas a partir de eventos estressantes. Alterações neuroquímicas e endócrinas são extensamente relacionadas com desordens comportamentais rotineiras, como a ansiedade e a depressão. A imunossupressão é apontada em diversos trabalhos como uma alteração fisiológica desencadeada a partir de estímulos estressantes.

A partir de uma diversificação de resultados obtidos em experimentos, cujos objetivos eram semelhantes, a interferência de muitos fatores intrínsecos às situações experimentais está sendo extensamente investigada, na tentativa de obtenção de respostas que reflitam a realidade do organismo. Assim, este trabalho propõe-se a juntar alguns fatores relevantes no contexto da situação em evidência, especificamente o estresse psicossocial e o estímulo imunológico, no intuito de investigar as possíveis interações, as quais podem direcionar a resposta fisiológica.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Geral

Analisar os efeitos do estresse psicossocial provocado pela interação agonística recorrente sobre a resposta imune humoral, verificando a possível correlação com o estado de ansiedade do animal.

2.2 - Específicos

- Comparar as respostas imune humorais à hemácia de carneiro entre os animais controles e os animais submetidos ao estresse psicossocial.

- Comparar as respostas imune humorais à hemácia de carneiro entre grupos experimentais, observando a relação temporal entre a aplicação do antígeno e a submissão ao estresse.

- Verificar o efeito da dominância e da submissão nas respostas imune humorais primária e secundária à hemácia de carneiro.

- Analisar o grau de ansiedade nos animais dominantes e submissos e as respostas obtidas na primeira e segunda observações do labirinto em cruz elevado, entre os grupos experimentais.

- Analisar a possível correlação entre o estado de ansiedade manifestado no labirinto em cruz elevado e as alterações observadas na resposta imune.

- Comparar as respostas imune humorais e o comportamento no labirinto em cruz elevado entre as linhagens BALB/c e Swiss.

3 – MATERIAL E MÉTODO

3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos machos das linhagens BALB/c e albinos suíços (Swiss), com aproximadamente 90 dias de idade no início do experimento. Os animais da linhagem Swiss foram criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os camundongos da linhagem BALB/c foram cedidos pelo Biotério da Fundação Estadual de Pesquisa em Saúde, do Rio Grande do Sul. O desmame foi aos 21 dias de idade e aproximadamente aos 60 dias de idade, foram alojados individualmente por um período de trinta dias, em gaiolas de polipropileno com tampa de arame e forradas com serragem de madeira. A alimentação, ração convencional (produzida pela Empresa Nuvital Nutrientes Ltda) e água foram fornecidas "*ad libitum*". Foi utilizada iluminação artificial com ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo que o ciclo claro iniciou às 6:00 e terminou às 17:30 de cada dia. A temperatura ambiente foi mantida acima de 20°C e inferior a 28°C. Durante o período de adaptação os animais foram manuseados uma vez por semana, para troca de serragem e alimento. Dezoito dias antes do início dos experimentos foi administrado vermífugo à base de Mebendazol (nome comercial: Pantelmin) duas vezes por dia e por três dias consecutivos. A dosagem foi de 0,066µl/g, proporcional àquela estabelecida na bula para a espécie humana. O tratamento com o vermífugo teve por objetivo descartar a possibilidade de alterações comportamentais e/ou imunológicas induzidas por tais parasitas e que pudessem influenciar a resposta imune humoral.

Por ocasião dos experimentos, os animais foram divididos em grupos conforme o que segue¹:

3.1.1 – Grupo de Interação Curta (14 dias) – INC/SW e INC/BC

Foram utilizados um grupo de camundongos da linhagem Swiss (SW) e um grupo de camundongos da linhagem BALB/c (BC). No início dos experimentos os animais de cada linhagem foram subdivididos aleatoriamente em dois grupos, os quais foram denominados de intrusos e residentes. Cada animal intruso recebeu uma numeração que correspondeu à mesma numeração do animal residente com o qual ele foi pareado diariamente (formação da dupla). Na formação das duplas tomou-se o cuidado de não formar pares de camundongos irmãos, ou seja, da mesma ninhada. Para a distinção entre os indivíduos das duplas, o dorso dos animais residentes foi pintado com violeta de genciana dois dias antes do início da interação. Diariamente e por 14 dias os intrusos foram colocados durante 30 minutos no alojamento de seus respectivos pares residentes, no período de transição claro/escuro (aproximadamente às 17:30). No primeiro dia de interação, após o pareamento os animais receberam o primeiro inóculo de hemácia de carneiro. No sétimo dia de interação os animais foram inoculados pela segunda vez e neste dia não houve interação entre os animais para evitar uma debilitação excessiva, pois neste dia também foi realizada a primeira coleta de sangue para obtenção da amostra de soro.

Durante os trinta minutos de interação foram observados e identificados os animais

¹ Ver tabela experimental, p. 9

dominantes e os submissos, conforme os parâmetros comportamentais característicos, como cheirar a face e o ânus do outro animal, sacudir a cauda, perseguir, comportamento de auto limpeza, postura vertical de defesa, fuga, e submissão completa, através de vocalização e postura vertical simultaneamente (Hardy, *et al.*, 1990). Para a visualização dos animais, o ambiente foi iluminado difusamente com lâmpadas vermelhas. No décimo quarto dia foi realizada outra extração de sangue dos camundongos para obtenção da segunda amostra de soro e logo após os animais foram sacrificados.

3.1.2 – Grupo de Interação Longa (21 dias) – INL/SW

Para este grupo experimental foram utilizados camundongos da linhagem Swiss. Para a formação das duplas e a identificação dos animais dominantes e submissos, o procedimento foi o mesmo descrito para o grupo INC. O período de interação neste grupo experimental foi de 21 dias e os animais receberam o primeiro inóculo com hemácia de carneiro no sétimo dia após o início dos pareamentos. No décimo quarto dia de interação os animais foram inoculados pela segunda vez e não foram colocados para interagir, pois neste dia também foi realizada a primeira coleta de sangue. A segunda coleta de sangue foi realizada no vigésimo primeiro dia, após o que os animais foram sacrificados. O período de interação foi de 30 minutos diários, aproximadamente às 17:30.

3.1.3 – Grupo Controle de Mesma Sala de 14 e 21 dias – CMS/SW-14 e CMS/SW-21

O grupo CMS/SW-14 e o grupo CMS/SW-21 constaram de animais da linhagem Swiss selecionados aleatoriamente. Os animais dos grupos CMS/SW-14 e CMS/SW-21 foram mantidos em caixas individuais na mesma sala e mesmo período dos grupos que sofreram interação por 14 e 21 dias, respectivamente. Os animais foram inoculados com hemácia de carneiro e submetidos à punção retroorbital para coleta de sangue, juntamente com os animais dos grupos que interagiram, ou seja, nos mesmos dias. O objetivo foi submetê-los aos odores e sons emitidos pelos animais que interagiram.

3.1.4 – Grupo Controle de Sala Separada – CSS/SW e CSS/BC

Um grupo de animais da linhagem Swiss (CSS/SW) e um grupo de animais da linhagem BALB/c (CSS/BC) foram selecionados aleatoriamente e mantidos em sala separada dos animais que sofreram interação agonística. Estes animais foram inoculados por duas vezes com hemácia de carneiro, em um intervalo de sete dias entre as duas inoculações. No dia da segunda inoculação e sete dias após foram realizadas a primeira e a segunda coleta de sangue, através de punção retroorbital.

3.2 – Obtenção de Hemácias de Carneiro

As hemácias foram obtidas através da punção da veia jugular de carneiro em solução de Alsever e lavadas em solução salina tamponada com fosfatos (PBS), pH = 7,2 (0,01M), durante dez minutos e por três vezes, mediante centrifugação a 1.500 rotações por minuto. Na última lavagem o sobrenadante foi eliminado e as hemácias foram ressuspensas em solução PBS, ajustando-se a concentração de modo a conter 10^9 hemácias em um volume de 1ml. Logo após a preparação da solução de hemácias os animais foram inoculados com uma concentração de 10^8 /animal, em um volume de 0,1ml por via intraperitoneal.

3.3 – Coleta do Sangue do Camundongo e Extração do Soro

Cada animal foi anestesiado com éter etílico e aproximadamente 300µl de sangue foi coletado através de punção do plexo retroorbital e depositado em tubos Eppendorf. O soro foi extraído após centrifugação do sangue a 1.500 rpm durante 20 minutos e em seguida foi armazenado em freezer a -4°C para posterior avaliação da presença de anticorpos anti-hemácia de carneiro (anti-HC).

3.4 – Avaliação da Produção de Anticorpos Anti-hemácia de Carneiro (Anti-HC)

A avaliação da produção de anticorpos anti-HC foi realizada de acordo com a técnica descrita por Hudson & Hay (1989). O soro foi descongelado e aquecido em banho-maria a 56°C, durante 30 minutos para promover a inativação das proteínas do Sistema Complemento. Em placas de microhemaglutinação de 8 X 12 reservatórios foram colocados 50µl de PBS. Em seguida, no primeiro reservatório de cada linha da placa foram adicionados 50µl de soro de uma amostra de cada camundongo, cuja solução passou por diluição seriada de 1:2 (12X). Em seguida foram adicionados em cada reservatório, 50µl de solução de hemácia de carneiro diluída a 2% em PBS. Posteriormente, o conteúdo da placa foi homogeneizado, tomando-se o cuidado de não misturar as soluções entre os reservatórios. As placas ficaram em repouso por 12 horas em temperatura ambiente, e após esse período foi realizada a sua leitura em microscópio estereoscópio (Olympus). Cada linha representando uma amostragem de um animal foi observada e o último reservatório da linha que apresentou aglutinação de hemácias foi anotado e traduzido no valor do título do soro daquela amostragem.

3.5 – Teste de Ansiedade

Para medir o estado de ansiedade, cada animal foi testado individualmente em um labirinto em cruz elevado, “*Plus-maze*”, adaptado a partir do modelo utilizado por Lister (1987). O labirinto consistiu de dois braços abertos medindo 30 cm de comprimento e 5 cm de

largura, dois braços fechados medindo 30 cm de comprimento, 5 cm de largura e 15 cm de altura e uma plataforma central medindo 5 x 5 cm. A plataforma foi mantida a 40 cm do chão. As paredes e o assoalho do labirinto foram confeccionados com material de acrílico na cor cinza escuro, sendo que o assoalho de acrílico foi fixado em ripas de madeira. O teste foi realizado em uma sala com luz vermelha difusa, com intensidade suficiente para a filmagem do experimento. Este teste foi realizado um dia antes do início e no penúltimo dia de interação agonística. Em cada um dos testes com duração de cinco minutos o animal era colocado individualmente na entrada da plataforma central do labirinto, com a cabeça em direção ao braço aberto oposto. A filmagem permitiu uma análise posterior da atividade exploratória. Para medir o nível de ansiedade foram usados os seguintes índices: Percentual de entradas nos braços abertos (EA%) = Número de entradas nos braços abertos X 100 / número de entradas nos braços abertos e fechados; Percentual de tempo nos braços abertos (TA%) = Tempo de permanência nos braços abertos X 100 / tempo de permanência nos braços abertos e fechados. Durante o período de atividade exploratória, a passagem de um braço para outro do labirinto foi considerada cada vez que o animal cruzou os ambientes com as quatro patas.

3.6 – Análise Estatística dos Resultados

Os resultados de todos os grupos da linhagem Swiss foram comparados pelo teste não paramétrico para múltiplas variáveis independentes, *Kruskal-Wallis* e pelo teste não paramétrico para duas variáveis independentes, teste U de *Mann-Whitney*. Os resultados dos grupos da linhagem BALB/c foram comparados pelo teste U de *Mann-Whitney*. As variáveis dependentes das duas linhagens, como hemaglutinação primária e secundária e primeiro e

segundo teste no labirinto em cruz elevado foram comparadas pelo teste não paramétrico para duas variáveis dependentes, *Wilcoxon Matched Pairs*. Para correlacionar a resposta imune humoral com o nível de ansiedade, foi utilizado o teste de correlação de *Spearman*. O nível de significância admitido foi $p < 0,05$. Os resultados referentes aos títulos de anticorpos estão expressos pela média geométrica de cada grupo experimental e os resultados referentes aos índices medidos no teste de ansiedade estão expressos pela média aritmética, seguida do erro padrão da média ($M \pm EPM$).

Tabela Experimental das Linhagens Swiss e BALB/c

DIA DO EVENTO	GRUPOS E ATIVIDADES EXPERIMENTAIS				
	CSS/SW CSS/BC	INC/SW INC/BC	CMS/SW-14	INL/SW	CMS/SW-21
DIA ANTERIOR	1° Teste Labirinto	1° Teste Labirinto	1° Teste Labirinto	1° Teste Labirinto	1° Teste Labirinto
1° DIA	1° Inóculo HC Sala Separada	Interação Agonística 1° Inóculo HC	1° Inóculo HC Mesma Sala	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
2° DIA	Sala Separada Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
3° DIA	Sala Separada Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
4° DIA	Sala Separada Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
5° DIA	Sala Separada Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
6° DIA	Sala Separada Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
7° DIA	1° Coleta de Sangue 2° Inóculo HC	1° Coleta de Sangue 2° Inóculo HC	1° Coleta de Sangue 2° Inóculo HC	1° Inóculo HC	1° Inóculo HC
8° DIA	Sala Separada Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
9° DIA	Sala Separada Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
10° DIA	Sala Separada Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
11° DIA	Sala Separada Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
12° DIA	Sala Separada Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
13° DIA	2° Teste Labirinto Sala Separada	2° Teste Labirinto Interação Agonística	2° Teste Labirinto Mesma Sala	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
14° DIA	2° Coleta de Sangue Sacrifício	2° Coleta de Sangue Sacrifício	2° Coleta de Sangue Sacrifício	1° Coleta de Sangue 2° Inóculo HC	1° Coleta de Sangue 2° Inóculo HC
15° DIA	-	-	-	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
16° DIA	-	-	-	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
17° DIA	-	-	-	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
18° DIA	-	-	-	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
19° DIA	-	-	-	Interação Agonística	Mesma Sala Sem Interação
20° DIA	-	-	-	2° Teste Labirinto Interação Agonística	2° Teste Labirinto Mesma Sala
21° DIA	-	-	-	2° Coleta de Sangue Sacrifício	2° Coleta de Sangue Sacrifício

4 – RESULTADOS

4.1 – Linhagem Swiss

4.1.1 – Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Primária – H1

No presente item é analisado o efeito do estresse de interação agonística sobre a resposta imune humoral primária, considerando a relação temporal entre a administração do antígeno e o estímulo estressante. O efeito da dominância e da submissão sobre a resposta imune humoral primária também são objetos de análise.

A análise da resposta imune primária apresentada pelos animais dos grupos experimentais do protocolo de 14 dias, do protocolo de 21 dias e o grupo controle (CMS/SW-14, INC/SW, CMS/SW21, INL/SW e CSS/SW), através do teste *Kruskal-Wallis* apontou o seguinte resultado: $[H(4, N = 91) = 21,2972, p < 0,001]$.

O estresse psicossocial induzido por um período inicial de 7 dias de interação agonística, provocou no grupo INC/SW uma redução significativa nos títulos de anticorpos anti-HC expressos na resposta imune primária, quando comparados aos títulos de anticorpos dos animais controles de sala separada, CSS/SW ($p < 0,05$). Quando analisamos separadamente os animais dominantes e submissos no grupo INC/SW, verificamos que apesar de uma tendência a uma redução nos títulos de anticorpos dos animais dominantes, a resposta não difere significativamente da resposta apresentada pelo grupo controle. Existe entretanto,

uma redução significativa da resposta imune primária apresentada pelos animais submissos, em relação à resposta do grupo controle ($p < 0,05$). Nos animais que compuseram o grupo controle de mesma sala durante o período de 14 dias de interação agonística (CMS/SW-14), verificamos que os fatores característicos da situação à qual foram submetidos, possivelmente o odor e a vocalização emitidos pelos animais interagentes foram capazes de atuar sobre os sistemas ativados pelo estresse social, provocando uma redução na resposta imune primária, em relação aos animais controles, porém a diferença entre CMS/SW-14 e CSS/SW não ficou dentro dos níveis considerados estatisticamente significantes.

Nos animais que passaram pelo protocolo de 21 dias de interação agonística (INL/SW e CMS/SW-21) o antígeno foi inoculado no sétimo dia de interação agonística e a resposta imune primária foi observada sete dias após a inoculação do antígeno, no décimo quarto dia de interação agonística.

O estresse social induzido pelo período inicial de 14 dias de interação agonística nos animais de interação longa, provocou um aumento da resposta imune primária, tanto em relação aos animais do grupo controle (CSS/SW), quanto em relação aos animais que passaram pelo protocolo de interação curta. O grupo INL/SW apresentou uma resposta imune primária significativamente maior que o grupo CSS/SW e que o grupo CMS/SW-14 ($p < 0,05$) e com um nível de significância ainda mais expressivo, quando comparado ao grupo INC/SW ($p < 0,001$). A resposta imune primária também foi maior no grupo CMS/SW-21, quando comparada à resposta do grupo INC/SW ($p < 0,01$) e quando comparada ao grupo INC/SW-S ($p < 0,05$). O grupo de animais dominantes de interação longa (INL/SW-D) apresentou uma resposta imune primária significativamente maior que os grupos CSS/SW e CMS/SW-14 ($p < 0,05$) e com um grau de significância mais expressivo,

quando comparada à resposta dos animais dominantes e submissos de interação curta, INC/SW-D e INC/SW-S ($p < 0,01$). Nos animais submissos de interação longa (INL/SW-S), a resposta foi significativamente maior que a resposta do grupo INC/SW-D ($p < 0,05$) e obteve um grau de significância maior quando comparada ao grupo INC/SW-S ($p < 0,01$). A resposta imune primária não diferiu significativamente entre os grupos experimentais que passaram pelo protocolo de 21 dias de interação.

Os resultados da hemaglutinação primária estão resumidos na tabela 1 e na figura 1.

4.1.2 – Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Secundária – H2

Neste item é analisado o efeito do estresse da interação agonística sobre a resposta imune humoral secundária, considerando a relação temporal entre a administração do antígeno e o estímulo estressante. Também é avaliado o efeito da dominância e da submissão sobre a resposta imune humoral secundária.

O estresse induzido por um período de 14 dias de interação agonística provocou um aumento significativo da resposta imune secundária nos animais dominantes (INC/SW-D), quando comparada à resposta dos animais submissos (INC/SW-S) ($p < 0,05$). A resposta imune secundária do grupo INC/SW-S foi reduzida em relação aos demais grupos experimentais, porém a diferença não foi considerada estatisticamente significativa. Portanto, a diferença expressiva observada entre dominantes e submissos é atribuída a uma alteração apresentada pelos dois grupos, em relação à resposta do grupo controle (CSS/SW), mas com

uma contribuição mais acentuada do grupo dominante. Entre os demais grupos do protocolo de 14 dias não houve diferença quanto à resposta imune secundária.

Nos grupos experimentais que passaram pelo protocolo de 21 dias de interação, a resposta imune secundária foi avaliada no vigésimo primeiro dia de interação, coincidindo com o sétimo dia após o segundo inóculo do antígeno. O estresse induzido por um período de 21 dias de interação não alterou a resposta imune secundária nos grupos experimentais, a partir da resposta expressa pelos animais controles (CSS/SW). A resposta também não diferiu significativamente entre os grupos experimentais de 21 dias.

Os valores dos títulos de anticorpos da resposta imune secundária estão resumidos na tabela 1 e a representação gráfica dos resultados está expressa na figura 2.

Tabela 1 - Títulos de anticorpos anti-HC expressos pelas respostas imune primária (H1) e secundária (H2) na linhagem Swiss (Média Geométrica)

	N	H1	H2
CSS/SW	28	231,87 ^(a, b, c, e)	1187,92 #
CMS/SW-14	5	111,43 ^(j)	2352,53 *
INC/SW	15	92,63 ^(a, d, h)	1415,08 **
INC/SW-S	6	57,02 ^(b, g, i, k)	724,08 * ^(a)
INC/SW-D	9	128,00 ^(f, l)	2211,96 ** ^(a)
CMS/SW-21	17	266,65 ^(h)	1603,56 #
INL/SW	28	362,04 ^(c, d)	1487,28 #
INL/SW-S	13	352,51 ^(g, i, l)	1568,73 **
INL/SW-D	13	413,66 ^(e, f, j, k)	1410,06 **

As letras comuns entre dois grupos indicam diferenças significativas entre eles; ^{a, b, c, d, e, g, i, j, k, l} (p < 0,05); ^{f, h} (p < 0,01). Os sinais indicam diferenças entre H1 e H2. * (p < 0,05), ** (p < 0,01), # (p < 0,001).

RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA LINHAGEM SWISS

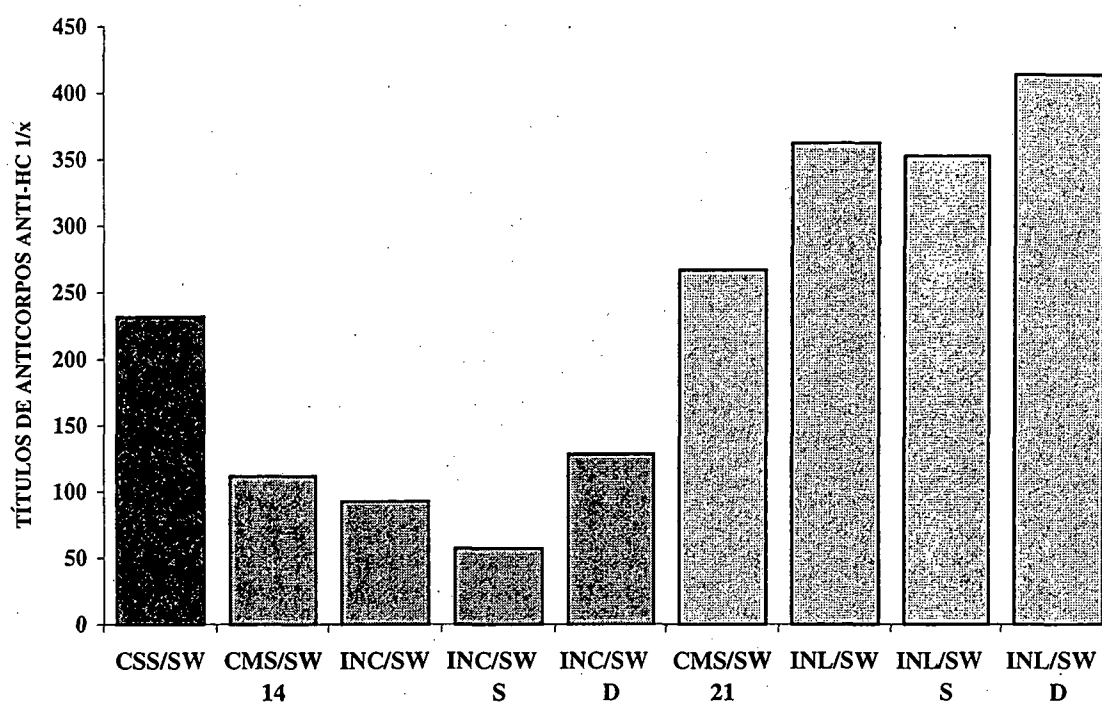


Figura 1 - Títulos de anticorpos expressos na resposta imune primária dos grupos da linhagem Swiss. Os valores representam a média geométrica dos títulos. As siglas significam: CSS = Controle de Sala Separada; CMS = Controle de Mesma Sala (14 e 21 dias); INC = Interação Curta (14 dias); INL = Interação Longa (21 dias); SW = Linhagem Swiss; S = Submisso; D = Dominante. Entre os grupos CSS CMS (14 e 21), INC e INL, houve diferença significativa: *Kruskal-Wallis* = $H(4, N=91) = 21,29718$, $p < 0,001$. Através do teste U de *Mann-Whitney*, as diferenças foram reveladas entre: CSS e INC e entre CSS e INC-S ($p < 0,05$); INL e CSS ($p < 0,05$); entre INL e INC ($p < 0,001$); INL-D e CSS ($p < 0,05$); INL-D e INC-D ($p < 0,01$); INL-S e INC-S ($p < 0,01$).

RESPOSTA IMUNE SECUNDÁRIA LINHAGEM SWISS

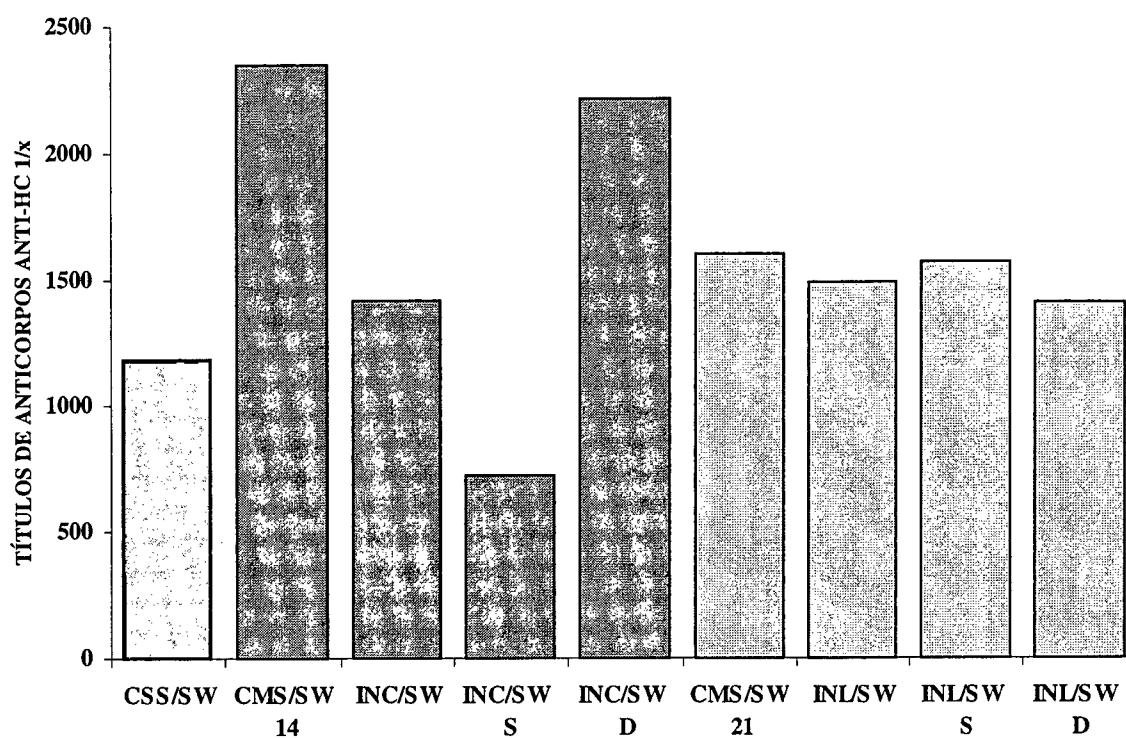


Figura 2 - Títulos de anticorpos expressos na resposta imune secundária da linhagem Swiss. Os valores representam a média geométrica dos títulos. O teste *Kruskal-Wallis* não detectou diferença significativa entre os grupos experimentais CSS, CMS-14, INC, CMS-21 E INL. O teste U de *Mann-Whitney* revelou uma diferença entre INC-D e INC-S ($p < 0,05$).

4.1.3 – Comparação entre as Respostas Imune Primária (H1) e Secundária (H2)

Os títulos de anticorpos anti-HC foram significativamente maiores na resposta imune secundária em todos os grupos da linhagem Swiss. O teste *Wilcoxon Matched Pairs* revelou as seguintes níveis de significância entre H1 e H2: CSS/SW ($p < 0,001$); CMS/SW-14 ($p < 0,05$); CMS/SW-21 ($p < 0,001$); INC/SW ($p < 0,01$); INL/SW ($p < 0,001$); INC/SW-D ($p < 0,01$); INC/SW-S ($p < 0,05$); INL/SW-D ($p < 0,01$); INL/SW-S ($p < 0,01$).

A representação gráfica comparando os títulos de H1 e H2 é mostrada na figura 3.

4.1.4 – Primeira Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado

A proposta da atividade exploratória no primeiro teste do labirinto em cruz elevado foi analisar o grau de ansiedade nos animais submetidos ao estímulo aversivo do labirinto, considerando as características individuais para uma possível diferenciação mais significativa no segundo teste.

No primeiro teste da atividade no labirinto em cruz elevado realizado um dia antes de iniciar a interação agonística, a exploração dos braços abertos por todos os grupos experimentais e grupo controle da linhagem Swiss foi reduzida, quando comparada a outras linhagens descritas na literatura. Os animais dominantes do grupo INC/SW e do grupo INL/SW apresentaram uma redução maior nos percentuais de tempo e de entrada nos braços abertos (TA%1 e EA%1), principalmente em relação aos seus pares submissos e ao

RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA LINHAGEM SWISS

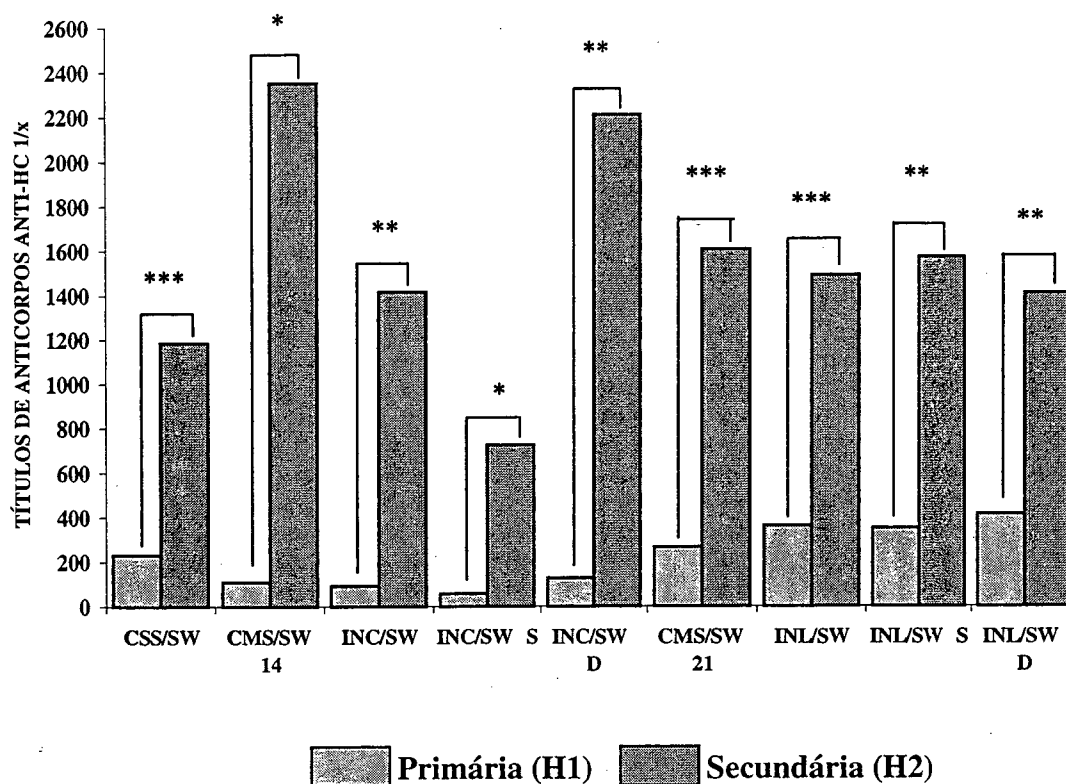


Figura 3 - Comparação entre os títulos de anticorpos da resposta imune primária e da secundária apresentados pela linhagem Swiss. Os valores representam a média geométrica dos títulos. Os asteriscos indicam diferença entre H1 e H2. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

grupo controle, porém, os testes estatísticos não detectaram diferenças significativas entre eles. Entre os demais grupos, tanto do protocolo de 14 quanto de 21 dias, não foram observadas variações expressivas na exploração dos braços abertos. Os testes estatísticos não revelaram qualquer diferença significativa entre os grupos experimentais.

Os resultados do primeiro teste estão resumidos na tabela 2. A figura 4 apresenta graficamente o percentual do tempo nos braços abertos (TA%1) e a figura 5 expressa o percentual de entradas nos braços abertos (EA%1).

Tabela 2 - Percentuais do tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado apresentados pelos animais da linhagem Swiss (Média \pm E. P. M.).

	N	TA%1	TA%2	EA%1	EA%2
CSS/SW	31	22 \pm 4	8 \pm 2 **	28 \pm 5	19 \pm 3 *
CMS/SW-14	6	11 \pm 6	9 \pm 5	15 \pm 7	17 \pm 7
INC/SW	14	16 \pm 4	9 \pm 4	22 \pm 5	12 \pm 4
INC/SW-S	7	22 \pm 7	11 \pm 6	29 \pm 7	14 \pm 7
INC/SW-D	7	10 \pm 4	7 \pm 4	15 \pm 7	9 \pm 5
CMS/SW-21	12	17 \pm 3	12 \pm 4	24 \pm 3	18 \pm 4
INL/SW	24	20 \pm 5	7 \pm 2	23 \pm 5	14 \pm 3
INL/SW-S	13	26 \pm 8	6 \pm 2 *	29 \pm 9	12 \pm 4
INL/SW-D	11	14 \pm 6	8 \pm 2	15 \pm 6	16 \pm 4

TA% = Percentual de tempo nos braços abertos; EA% = Percentual de entradas nos braços abertos; 1 = Primeiro teste; 2 = Segundo teste. Os sinais indicam diferença significativa entre o primeiro e o segundo testes. * (p < 0,05), ** (p < 0,01). Entre os grupos não houve diferença significativa.

4.1.5 – Segunda Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado

A avaliação dos animais no labirinto após o período de interação agonística teve como objetivo analisar o efeito do estresse psicossocial, considerando a dominância e a submissão sobre o estímulo comportamental aversivo do segundo teste, cuja resposta em animais controles, de acordo com a literatura é diferente quanto ao primeiro.

Os grupos experimentais, tanto do protocolo de 14 dias quanto de 21 dias de interação agonística, não apresentaram uma alteração significativa na atividade exploratória dos braços abertos. Observou-se apenas uma pequena redução nos percentuais de tempo e de entradas (TA%2 e EA%2), a qual não teve efeito estatístico significante. Uma redução significativa, expressa pelos animais do grupo controle (CSS/SW) foi observada no TA%2 ($p < 0,01$) e no EA%2 ($p < 0,05$), em relação ao primeiro teste. Os animais submissos da interação longa (INL/SW-S) também apresentaram uma redução significativa do TA%2 ($p < 0,05$) em relação ao TA%1. Entre os grupos experimentais não observamos qualquer alteração que pudesse ser destacada e os testes estatísticos também não revelaram qualquer alteração significativa.

Os resultados estão resumidos na tabela 2 e a representação gráfica do TA%2 e EA%2 está expressa nas figuras 4 e 5, respectivamente.

TEMPO DE PERMANÊNCIA NOS BRAÇOS ABERTOS LINHAGEM SWISS

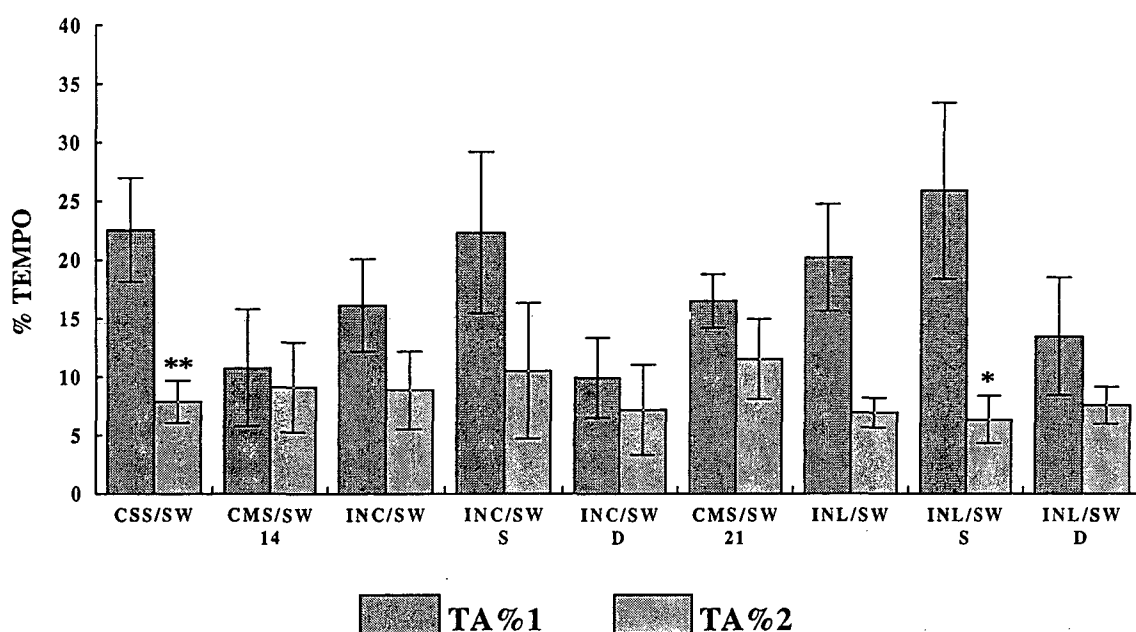


Figura 4 - Percentual de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. TA% = Tempo de permanência nos braços abertos X 100 / Tempo de permanência nos braços abertos + braços fechados. TA%1 = Primeiro teste; TA%2 = Segundo teste. Os testes estatísticos não revelaram diferença significativa entre os grupos e/ou subgrupos experimentais. Os asteriscos indicam diferença entre o primeiro e o segundo testes dos grupos. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$).

NÚMERO DE ENTRADAS NOS BRAÇOS ABERTOS LINHAGEM SWISS

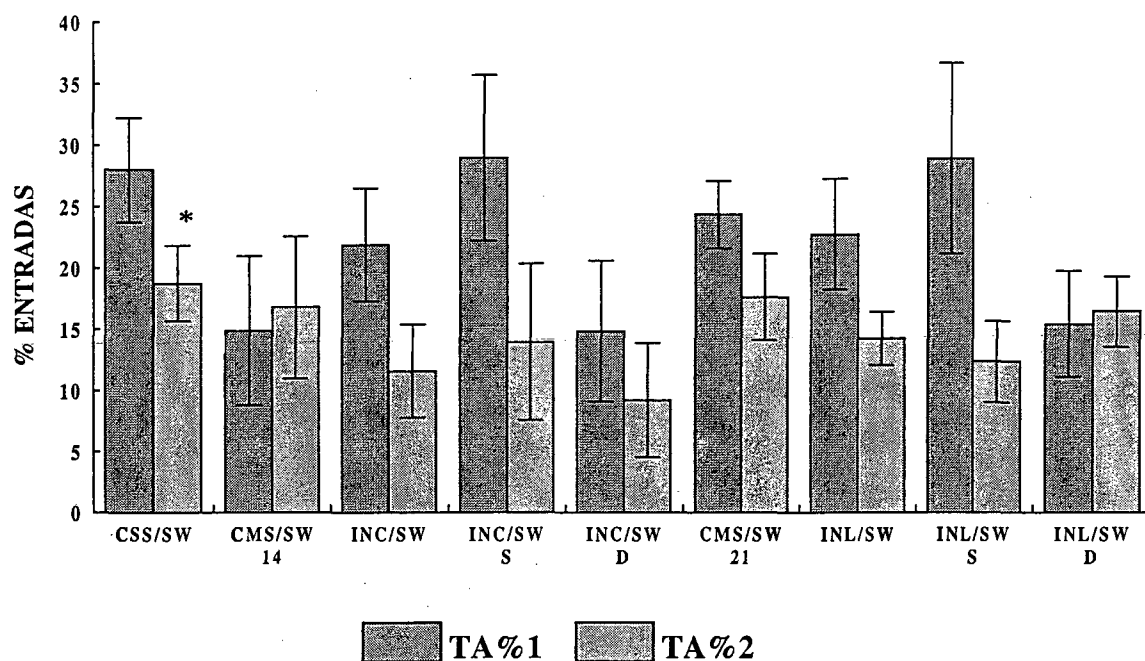


Figura 5 - Percentual de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (média \pm E.P.M.). EA% = Número de entradas nos braços abertos X 100 / número de entradas nos braços abertos + braços fechados. EA%1 = Primeiro teste; EA%2 = Segundo teste. Os testes estatísticos não revelaram diferenças significantes entre os grupos. * indica diferença significativa entre o primeiro e o segundo testes. ($p < 0,05$).

4.1.6 – Correlação da Resposta Obtida no Labirinto em Cruz Elevado com as Respostas

Imune Primária e Secundária

A proposta deste item é analisar se existe uma interação da atividade dos sistemas neurais relacionados à ansiedade com a atividade do sistema imune, possibilitando evidenciar características distintas entre os indivíduos.

Na linhagem Swiss, o teste de correlação de *Sperman*, revelou um índice positivo de correlação, com um nível de significância estatística de ($p < 0,01$) entre o percentual de tempo nos braços abertos da primeira avaliação (TA%1) e a resposta imune secundária (H2) apresentados pelos animais submissos de 14 dias. Todas as demais medidas da primeira e da segunda avaliação no labirinto em cruz elevado tiveram um índice expressivo de correlação positiva com as respostas imune primária e secundária, no grupo INC/SW-S, porém, não foram considerados significantes pelo teste. No grupo CSS/SW, o teste revelou um índice negativo de correlação entre as medidas da primeira avaliação do nível de ansiedade (TA%1 e EA%1) e a resposta imune secundária (H2) ($p < 0,01$). Nos demais grupos experimentais os índices de correlação não tiveram significância estatística.

Os índices de correlação positiva mostrados pelos animais submissos de 14 dias indicam que os animais menos ansiosos tiveram uma resposta imune maior. Embora o teste tenha revelado significância estatística somente entre H2 e TA%1, os demais índices são bastante expressivos para serem desprezados. No grupo dominante de 14 dias, a resposta imune primária não teve correlação com o nível de ansiedade dos animais. A correlação entre a resposta imune secundária e a primeira avaliação de ansiedade, embora sem significância

estatística, indica uma tendência a uma resposta imune secundária maior nos animais mais ansiosos. No segundo teste de ansiedade o grupo INC/SW-D apresentou uma tendência a um aumento da resposta imune secundária nos animais menos ansiosos. Nos grupos de 21 dias, os índices de correlação foram muito baixos, indicando que praticamente não houve correlação entre os níveis de ansiedade e a resposta imune humoral. No grupo CMS/SW-14, os dados de ansiedade e resposta imune não foram suficientes para serem correlacionados. Os índices de correlação para todos os grupos da linhagem Swiss estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3 - Correlação dos títulos de anticorpos expressos nas respostas imune primária e secundária com os índices de ansiedade medidos no primeiro e segundo testes do labirinto em cruz elevado – Linhagem Swiss

		TA% 1	TA% 2	EA% 1	EA% 2
CSS/SW	H1	- 0,33	0,03	- 0,35	- 0,07
	H2	- 0,54 **	- 0,17	- 0,62 **	- 0,35
CMS/SW-14	H1	-	-	-	-
	H2	-	-	-	-
INC/SW	H1	0,46	0,29	0,56	0,31
	H2	0,02	0,31	0,00	0,25
INC/SW-S	H1	0,87	0,79	0,87	0,79
	H2	0,97 **	0,63	0,82	0,63
INC/SW-D	H1	0,17	- 0,03	0,51	- 0,09
	H2	- 0,69	0,52	- 0,42	0,37
CMS/SW-21	H1	- 0,36	0,18	- 0,35	0,25
	H2	0,01	0,24	0,21	0,24
INL/SW	H1	0,22	0,10	0,39	0,20
	H2	0,13	0,07	0,23	0,11
INL/SW-S	H1	0,17	0,25	0,40	0,27
	H2	0,03	0,06	0,19	0,20
INL/SW-D	H1	0,34	0,00	0,42	0,41
	H2	0,40	0,14	0,30	0,22

H1 e H2 = Respostas imune primária e secundária, respectivamente; TA% = Percentual do tempo nos braços abertos; EA% = Percentual de entradas nos braços abertos; 1 = Primeiro teste; 2 = Segundo teste. (**) Indicam o nível de significância estatística ($p < 0,01$)

4.2 – Linhagem BALB/c

4.2.1 – Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Primária – H1

O presente item analisa o efeito do estresse provocado pela interação agonística e da posição social dos animais da linhagem BALB/c sobre a resposta imune humoral primária.

O estresse psicossocial induzido por um período inicial de 7 dias de interação agonística na linhagem BALB/c, provocou um aumento na resposta imune primária, tanto nos animais dominantes quanto nos animais submissos do grupo INC/BC, a partir dos níveis apresentados pelo grupo controle (CSS/BC). No entanto, apesar de expressiva, a diferença entre os grupos de INC/BC e o grupo CSS/BC não foi considerada estatisticamente significativa. Os grupos experimentais também não diferiram significativamente entre si.

A tabela 4 resume os resultados da resposta imune primária e a figura 6 mostra graficamente os resultados.

4.2.2 – Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Secundária – H2

Neste item é analisado o efeito do estresse provocado pela interação agonística e da posição social dos animais da linhagem BALB/c sobre a resposta imune humoral secundária.

A resposta imune secundária foi avaliada no décimo quarto dia de interação agonística, coincidindo com o sétimo dia da segunda inoculação do antígeno. Os sistemas atuantes sobre o processamento da resposta imune secundária foram capazes de inverter a ordem dos resultados, a partir daqueles obtidos na resposta imune primária, ou seja, em H2 os títulos de anticorpos expressos pelos animais dominantes e submissos do grupo INC/BC foram menores que os títulos expressos pelo grupo controle (CSS/BC). Todavia, as diferenças entre os grupos na resposta imune secundária também não foram consideradas significativas.

Os resultados estão resumidos na tabela 4 e a representação gráfica na figura 7.

Tabela 4 - Títulos de anticorpos expressos nas respostas imune primária (H1) e secundária (H2) da linhagem BALB/c (Média Geométrica)

	N	H1	H2
CSS/BC	12	67,81	1217,75 #
INC/BC	30	119,43	812,75 **
INC/BC-S	17	117,98	709,47 **
INC/BC-D	13	121,35	970,83 #

Os sinais indicam diferenças significativas entre H1 e H2. ** ($p < 0,01$), # ($p < 0,001$). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos.

4.2.3 – Comparação entre as Respostas Imune Primária (H1) e Secundária (H2) da

Linhagem BALB/c

Os títulos de anticorpos da resposta imune secundária foram maiores que os títulos da resposta imune primária, em todos os grupos da linhagem BALB/c. O teste *Wilcoxon*

RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA LINHAGEM BALB/c

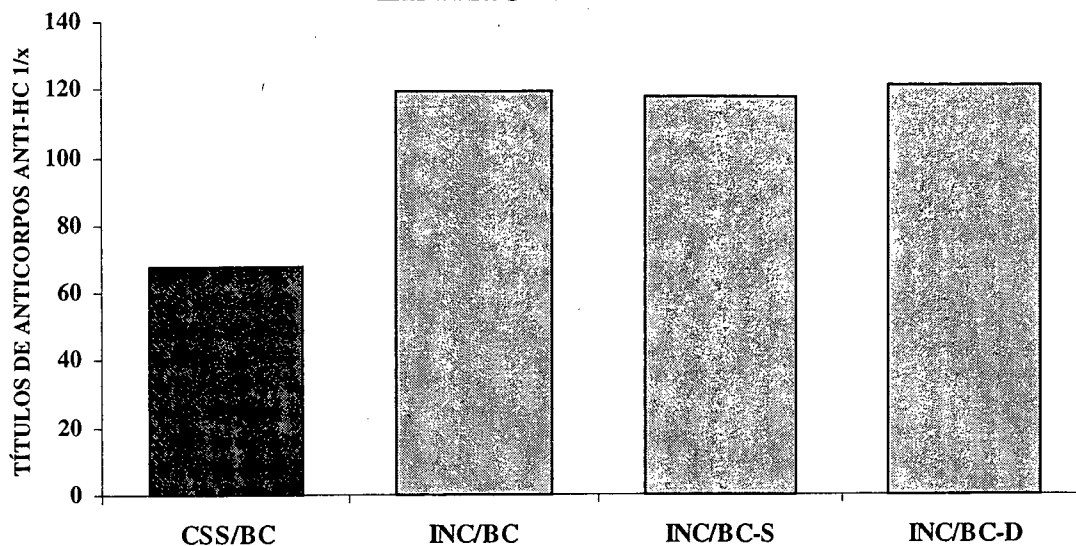


Figura 6 - Títulos de anticorpos expressos pela resposta imune primária na linhagem BALB/c. Os valores representam a média geométrica dos títulos. CSS = Controle de Sala Separada; INC = Interação curta (14 dias); S = Submisso; D = Dominante; BC = Linhagem BALB/c. Os testes estatísticos não detectaram diferenças significativas entre os grupos experimentais.

RESPOSTA IMUNE SECUNDÁRIA LINHAGEM BALB/c

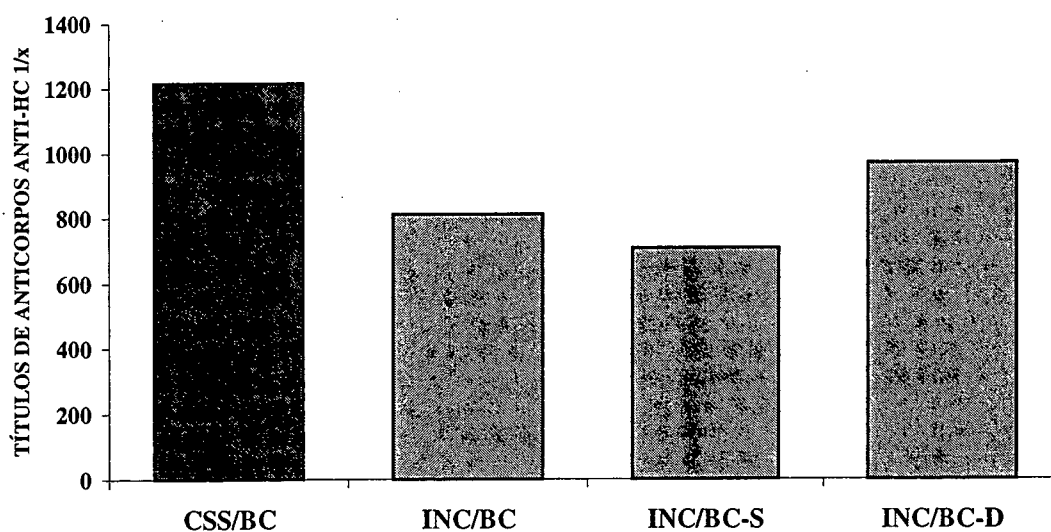


Figura 7 - Títulos de anticorpos expressos na resposta imune secundária da linhagem BALB/c. Os valores representam a média geométrica dos títulos. Os testes estatísticos não detectaram diferenças significativas entre os grupos

Matched Pairs revelou os seguintes níveis de significância nas diferenças entre H1 e H2: CSS/BC ($p < 0,01$); INC/BC ($p < 0,001$); INC/BC-D ($p < 0,01$); INC/BC-S ($p < 0,001$). A figura 8 expressa graficamente a comparação entre as duas respostas.

4.2.4 – Primeira Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado

A proposta da atividade exploratória no primeiro teste do labirinto em cruz elevado foi analisar o grau de ansiedade nos animais da linhagem BALB/c submetidos ao estímulo aversivo do labirinto, considerando as características individuais para uma possível diferenciação mais significativa no segundo teste.

Todos os grupos da linhagem BALB/c apresentaram altos níveis de exploração dos braços abertos, quando comparados a outras linhagens abordadas na literatura e também à linhagem Swiss. Os índices utilizados neste experimento (EA1% e TA1%) demonstraram que o nível baixo de ansiedade é uma característica desta linhagem, cujos grupos experimentais não apresentaram diferenças entre si, ou a partir do grupo controle. É importante observar que o erro padrão da média de cada grupo aponta para uma variação individual muito pequena nesta atividade comportamental.

Os resultados são apresentados na tabela 4 e os gráficos do TA1% e do EA1% são mostrados nas figuras 9 e 10, respectivamente.

RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA LINHAGEM BALB/c

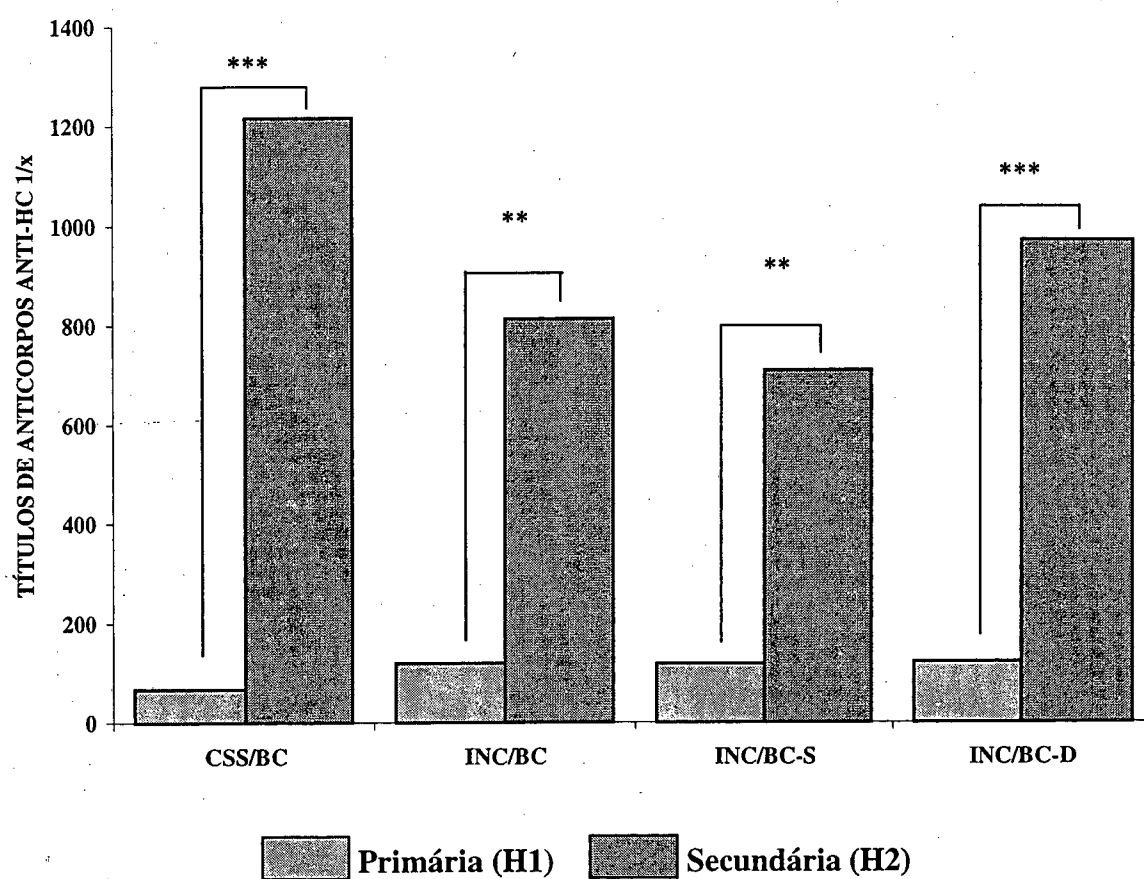


Figura 8 - Comparação entre os títulos de anticorpos da resposta imune primária e da secundária, expressos pela linhagem BALB/c. Os valores representam a média geométrica dos títulos. Os asteriscos indicam diferença entre H1 e H2. ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

4.2.5 – Segunda Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado

A avaliação dos animais da linhagem BALB/c no labirinto após o período de interação agonística teve como objetivo analisar o efeito do estresse psicossocial, considerando a dominância e a submissão sobre o estímulo comportamental aversivo do segundo teste.

Todos os grupos da linhagem BALB/c apresentaram uma redução significativa dos níveis de exploração dos braços abertos, quando comparados aos níveis do primeiro teste. As respostas apresentadas pelos grupos experimentais não diferiram das respostas do grupo controle, sugerindo que o reflexo na alteração da resposta comportamental não seja unicamente ou principalmente o estresse induzido pela interação agonística.

Tabela 5 - Percentuais do tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado apresentados pelos animais da linhagem BALB/c (Média ± E. P. M.).

	N	TA%1	TA%2	EA%1	EA%2
CSS/BC	18	70 ± 3	52 ± 5 **	66 ± 3	50 ± 4 **
INC/BC	34	76 ± 2	56 ± 4 #	68 ± 2	57 ± 3 **
INC/BC-S	16	77 ± 2	55 ± 8 **	67 ± 2	57 ± 6
INC/BC-D	18	75 ± 2	57 ± 5 **	68 ± 2	57 ± 3 **

TA% = Tempo de permanência nos braços abertos; EA% = Número de entradas nos braços abertos; 1 = Primeiro teste; 2 = Segundo teste. Os sinais indicam diferenças significativas entre o primeiro e o segundo testes. ** (p < 0,01); # (p < 0,001).

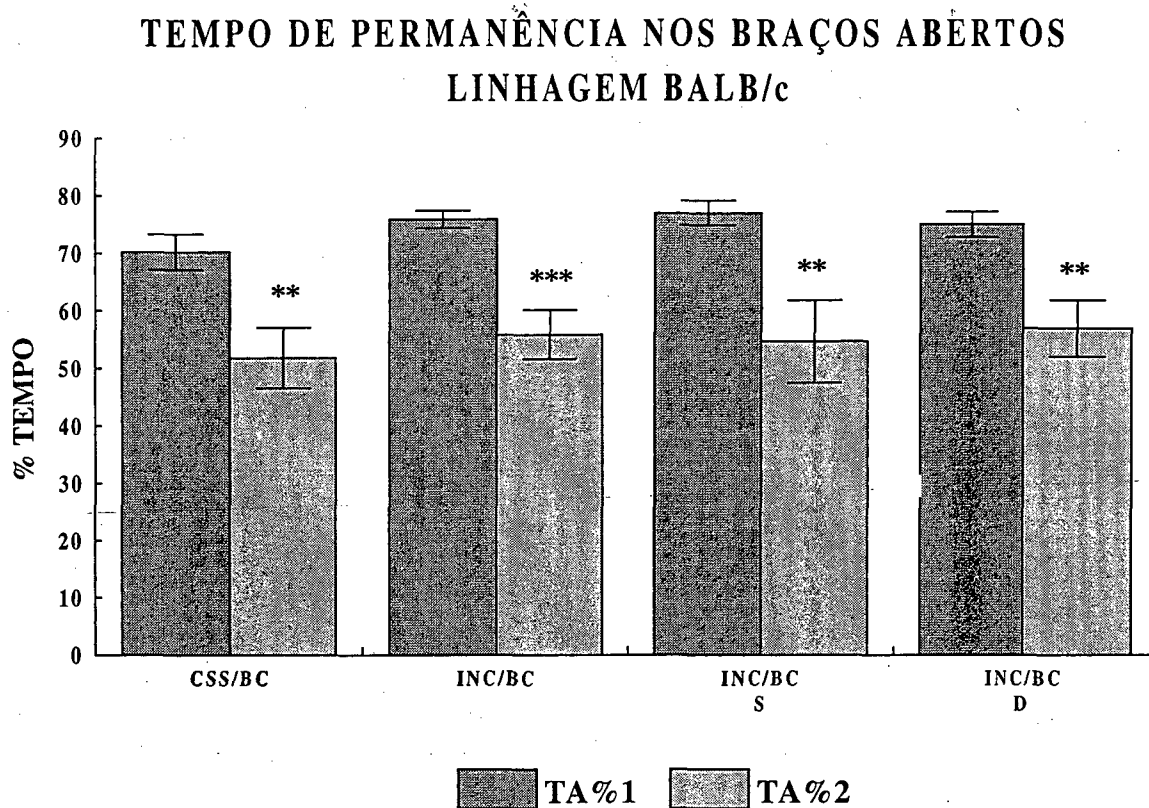


Figura 9 - Percentual de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. TA% = Tempo de permanência nos braços abertos X 100 / Tempo de permanência nos braços abertos + braços fechados. TA%1 = Primeiro teste; TA%2 = Segundo teste. Os testes estatísticos não revelaram diferença significativa entre os grupos e/ou subgrupos experimentais. Os asteriscos indicam diferença entre o primeiro e o segundo testes dos grupos. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

NÚMERO DE ENTRADAS NOS BRAÇOS ABERTOS
LINHAGEM BALB/c

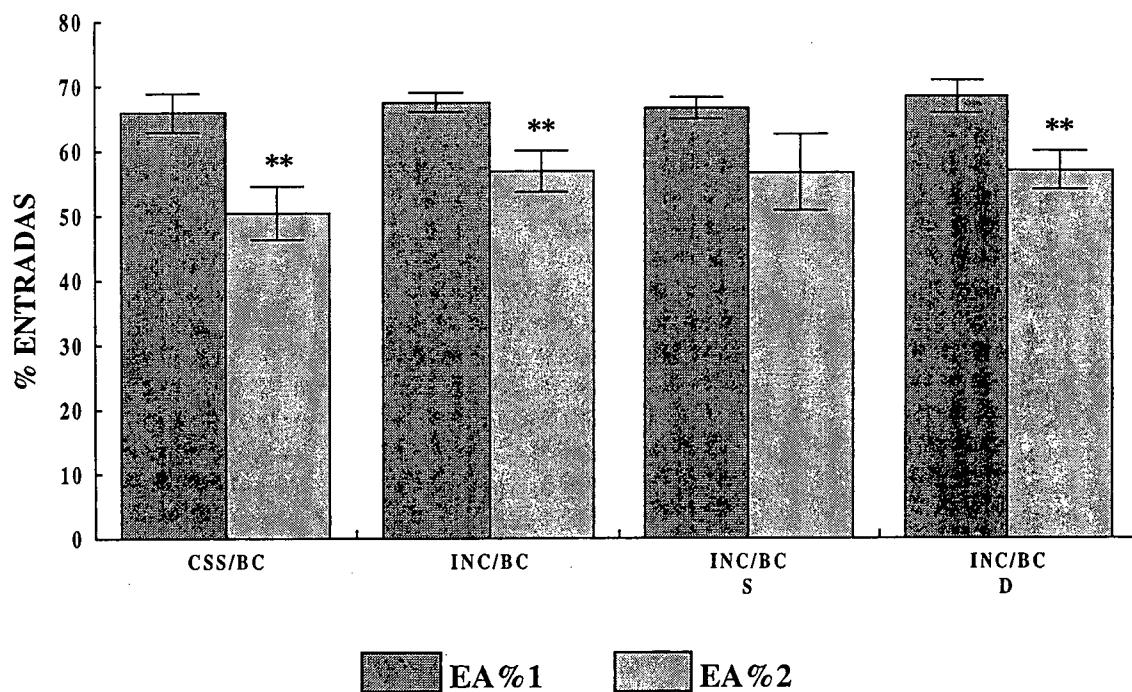


Figura 10 - Percentual do número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. EA% = Número de entradas nos braços abertos X 100 / Número de entradas nos braços abertos + braços fechados. EA%1 = Primeiro teste; EA%2 = Segundo teste. Os testes estatísticos não revelaram diferença significativa entre os grupos e/ou subgrupos experimentais. Os asteriscos indicam diferença entre o primeiro e o segundo testes dos grupos. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

4.2.6 – Correlação da Resposta Obtida no Labirinto em Cruz Elevado com as Respostas Imune Primária e Secundária

Neste item nos propomos investigar se existe nos animais da linhagem BALB/c, uma interação da atividade dos sistemas neurais relacionados à ansiedade com a atividade do sistema imune, possibilitando evidenciar características distintas entre os indivíduos.

Na linhagem BALB/c, o teste de correlação de *Sperman* apontou uma correlação significativamente positiva somente entre o percentual de entradas nos braços abertos obtido no primeiro teste e a resposta imune secundária dos animais controles ($p < 0,05$), indicando que os animais desse grupo que foram menos ansiosos no primeiro teste apresentaram uma resposta imune secundária maior. Os índices de correlação entre a resposta imune primária e os dois testes no labirinto, apresentados pelo grupo controle, não apresentaram um nível estatisticamente significativo, mas são bastante expressivos, indicando uma tendência de os animais menos ansiosos terem um melhor desempenho da resposta imune primária. No grupo dominante dos animais que interagiram, embora não sejam considerados significativos, a expressividade dos índices de correlação entre o tempo de permanência nos braços abertos no primeiro e no segundo testes de ansiedade e a resposta imune primária, indica uma tendência a uma resposta imune primária maior nos animais mais ansiosos desse grupo. Os demais índices de correlação entre a resposta imune e a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado foram pouco expressivos, indicando que não existiu uma correlação entre as respostas apresentadas nesses experimentos.

Os valores dos índices de correlação entre a avaliação comportamental no labirinto e a resposta imunológica apresentados pela linhagem BALB/c estão resumidos na tabela 6.

Tabela 6 - Correlação das respostas imune primária e secundária com os índices de ansiedade medidos no primeiro e segundo testes do labirinto em cruz elevado – Linhagem BALB/c

		TA% 1	TA% 2	EA% 1	EA% 2
CSS/BC	H1	0,37	0,52	0,44	0,37
	H2	0,28	- 0,06	0,63 *	- 0,06
INC/BC	H1	- 0,31	- 0,13	- 0,06	- 0,04
	H2	0,26	- 0,03	0,21	- 0,10
INC/BC-S	H1	- 0,19	0,12	- 0,21	0,26
	H2	0,39	- 0,05	0,14	- 0,13
INC/BC-D	H1	- 0,44	- 0,46	0,05	- 0,13
	H2	0,17	- 0,01	0,18	- 0,06

H1 e H2 = Respostas imune primária e secundária, respectivamente; TA% = Percentual do tempo nos braços abertos; EA% = Percentual de entradas nos braços abertos; 1 = Primeiro teste; 2 = Segundo teste. (*) Indica o nível de significância estatística ($p < 0,05$)

4.3 – Comparação entre as Linhagens Swiss e BALB/c

Entre as duas linhagens, foram comparados os grupos controles CSS/SW e CSS/BC e os grupos que sofreram interação por 14 dias, pelo fato de serem estes os grupos que passaram pelo mesmo protocolo experimental nas duas linhagens.

Os itens 4.3.1 e 4.3.2 avaliam os efeitos do estresse psicossocial sobre as resposta imune humoral primária e secundária, comparando as duas linhagens investigadas, um dos objetivos do presente trabalho.

4.3.1 – Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Primária – H1

O desempenho da resposta imune primária na linhagem BALB/c mostra uma inversão na atividade dos sistemas ativados pelo estresse psicossocial sobre os mecanismos da resposta imune, quando comparada à linhagem Swiss. Inicialmente, os títulos de anticorpos da resposta imune primária, expressos pelo grupo controle da linhagem Swiss (CSS/SW), foram significativamente maiores que os títulos de anticorpos expressos na resposta imune primária, pelo grupo controle da linhagem BALB/c (CSS/BC) ($p < 0,01$). O estresse induzido pelo período inicial de 7 dias de interação agonística provocou uma redução significativa dos títulos de anticorpos no grupo submisso e uma redução menos expressiva nos animais dominantes da linhagem Swiss, quando comparados ao grupo controle (CSS/SW). Na linhagem BALB/c, embora as diferenças entre os grupos não tenham sido consideradas estatisticamente significantes, os títulos de anticorpos da resposta imune primária foram maiores nos grupos dominantes e submissos, quando comparados aos seus controles. Outra característica observada é o fato de que o grupo submisso da linhagem Swiss apresentou uma resposta imune primária menor do que o grupo dominante. Na linhagem BALB/c, a resposta imune primária não foi diferente entre animais dominantes e submissos.

A figura 11 expressa graficamente a comparação da resposta imune primária entre as duas linhagens.

4.3.2 – Títulos de Anticorpos Anti-HC na Resposta Imune Secundária – H2

Na resposta imune secundária, os títulos de anticorpos do grupo controle da linhagem BALB/c aumentaram consideravelmente em relação à resposta imune primária, com um nível altamente significativo ($p < 0,001$). Este aumento na resposta imune secundária obtido pelo grupo CSS/BC atingiu a resposta imune secundária apresentada pelo grupo controle da linhagem Swiss. Os animais da linhagem BALB/c que sofreram o estresse da interação agonística, apesar de terem um aumento significativo na resposta imune secundária, não atingiram os níveis do grupo controle, ainda que não tenha havido diferença significativa entre eles. Por outro lado, na linhagem Swiss, os animais dominantes apresentaram um aumento dos títulos da resposta imune secundária, o qual ultrapassou inclusive a resposta do grupo controle daquela linhagem, ganhando significância estatística quando comparado aos seus pares submissos. Esta produção aumentada de anticorpos elevou significativamente a resposta dos dominantes da linhagem Swiss em relação à resposta dos dominantes e submissos da linhagem BALB/c ($p < 0,05$).

A representação gráfica da comparação do H2 entre as duas linhagens é mostrada na figura 12.

RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA LINHAGENS SWISS E BALB/c

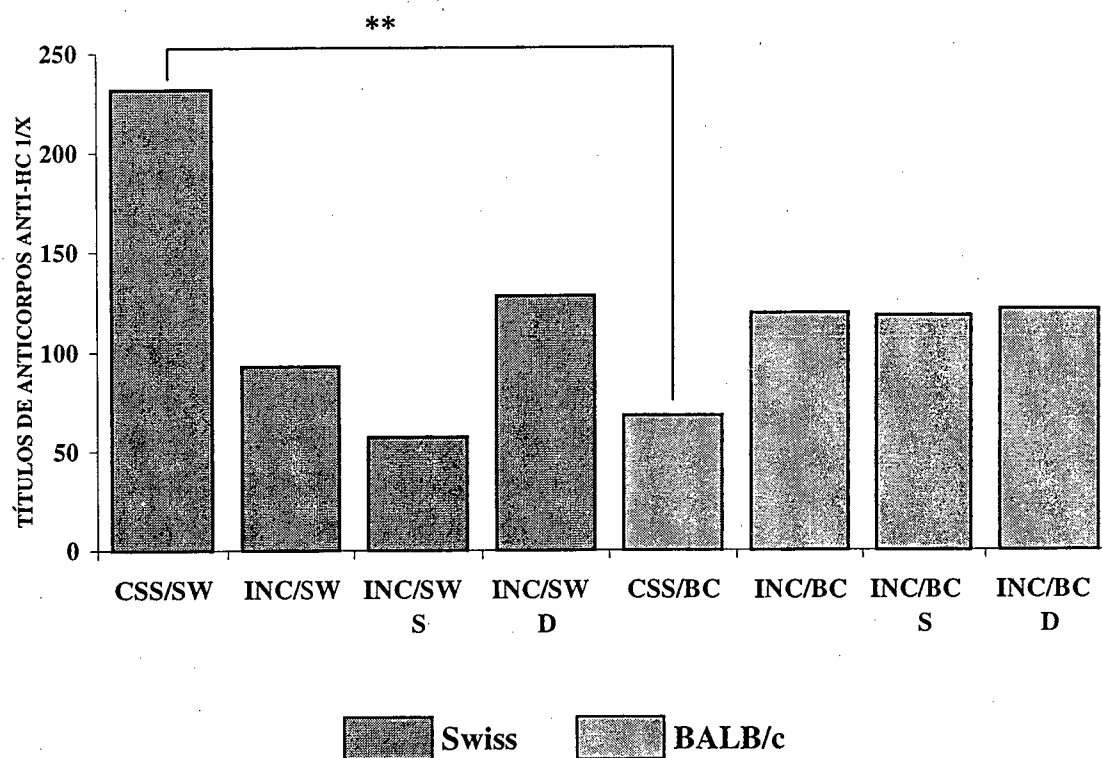


Figura 11 - Títulos de anticorpos expressos na resposta imune primária pelas linhagens Swiss e BALB/c. Os valores representam a média geométrica dos títulos. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos CSS/SW e CSS/BC. ** ($p < 0,01$).

RESPOSTA IMUNE SECUNDÁRIA LINHAGENS SWISS E BALB/c

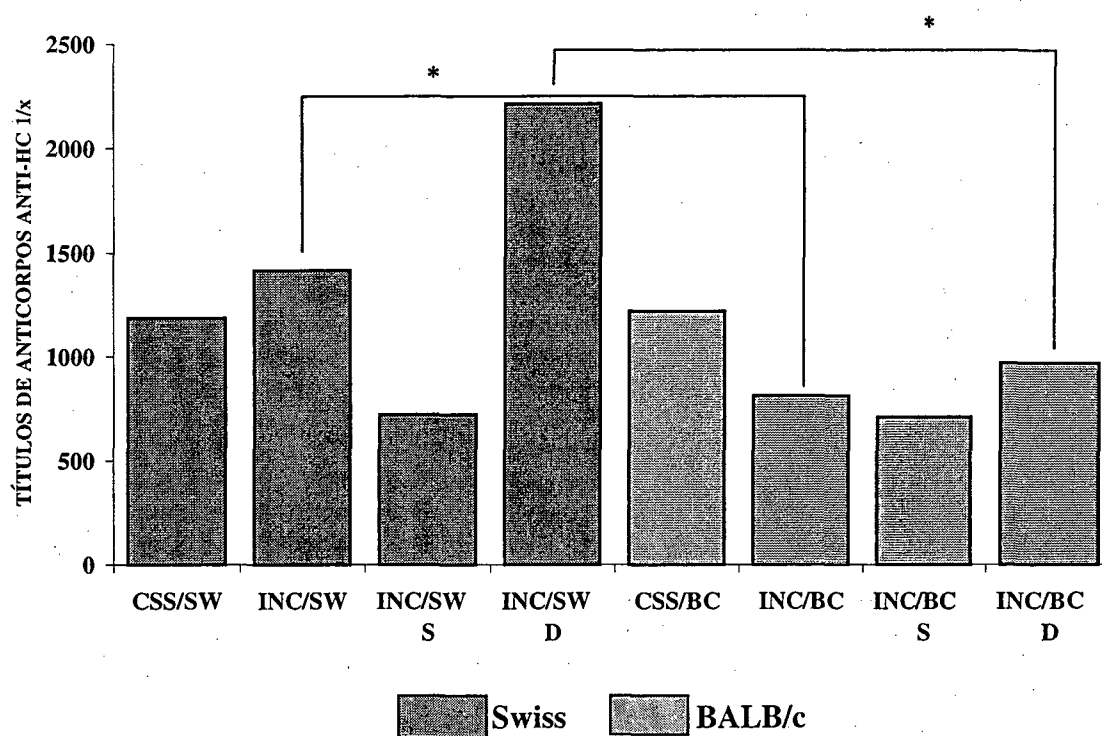


Figura 12 - Títulos de anticorpos expressos na resposta imune secundária pelas linhagens Swiss e BALB/c. Os valores representam a média geométrica dos títulos. Os asteriscos indicam diferença entre INC/SW e INC/BC e entre INC/SW-D e INC/BC-D. * ($p < 0,05$)

4.3.3 – Primeira Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado

Um dos objetos do presente trabalho foi a investigação das diferenças comportamentais, além de outras características, entre as linhagens Swiss e BALB/c. Assim, este item avalia o nível de ansiedade apresentado no labirinto, comparando as duas linhagens.

A atividade no labirinto em cruz elevado evidencia uma exploração ativa da linhagem BALB/c, contrastando com uma atividade bem mais reduzida da linhagem Swiss. O percentual do tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos (TA%1 e EA%1) foram significativamente maiores em todos os grupos da linhagem BALB/c, quando comparados aos grupos da linhagem Swiss ($p < 0,001$). Na linhagem BALB/c praticamente não houve variação entre os indivíduos, podendo ser observado pelas médias e o erro padrão das médias de cada grupo. Na linhagem Swiss, apesar de não termos detectado diferenças significativas entre os grupos, podemos observar que existe uma variação maior entre eles. O grupo dominante da linhagem Swiss demonstrou um nível de ansiedade maior que os submissos e os animais controles, embora a diferença entre eles não seja significativa. O erro padrão da média de cada grupo também aponta uma variação maior entre os indivíduos da linhagem Swiss.

As figuras 13 e 14 apresentam graficamente a comparação do TA% e do EA%, respectivamente, entre as duas linhagens.

4.3.4 – Segunda Avaliação da Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado

Comparando a atividade exploratória apresentada pelas linhagem Swiss e BALB/c, este item analisa se o estresse psicossocial influenciou o nível de ansiedade no segundo teste do labirinto, de forma diferente entre duas linhagens.

A atividade exploratória da linhagem BALB/c, embora reduzida no segundo teste em relação ao primeiro, ainda foi substancialmente maior que a atividade da linhagem Swiss. O percentual do tempo de permanência nos braços abertos (TA%) e o percentual de entradas nos braços abertos (EA%) foram significativamente maiores nos grupos da linhagem BALB/c, em relação aos grupos da linhagem Swiss ($p < 0,001$), com exceção do EA% entre os grupos submissos, INC/SW-S e INC/BC-S, cujo nível de significância foi ($p < 0,01$). As alterações que merecem destaque foram as reduções significativas da exploração dos braços abertos pela linhagem BALB/c e a variação entre os indivíduos verificada pelo erro padrão da média, o qual aumentou em todos os grupos desta linhagem, quando comparados ao primeiro teste. Na linhagem Swiss, os grupos que foram submetidos à interação agonística apresentaram uma redução pouco expressiva dos índices de exploração dos braços abertos, a qual não teve significância estatística, e o erro padrão não variou em relação ao primeiro teste. Uma exceção na linhagem Swiss e que também deve ser destacada, foi a redução significativa dos índices de exploração dos braços abertos, apresentada pelo grupo controle (CSS/SW).

A comparação entre as duas linhagens, da atividade exploratória no segundo teste está representada graficamente nas figuras 13 e 14.

TEMPO DE PERMANÊNCIA NOS BRAÇOS ABERTOS LINHAGENS SWISS E BALB/c

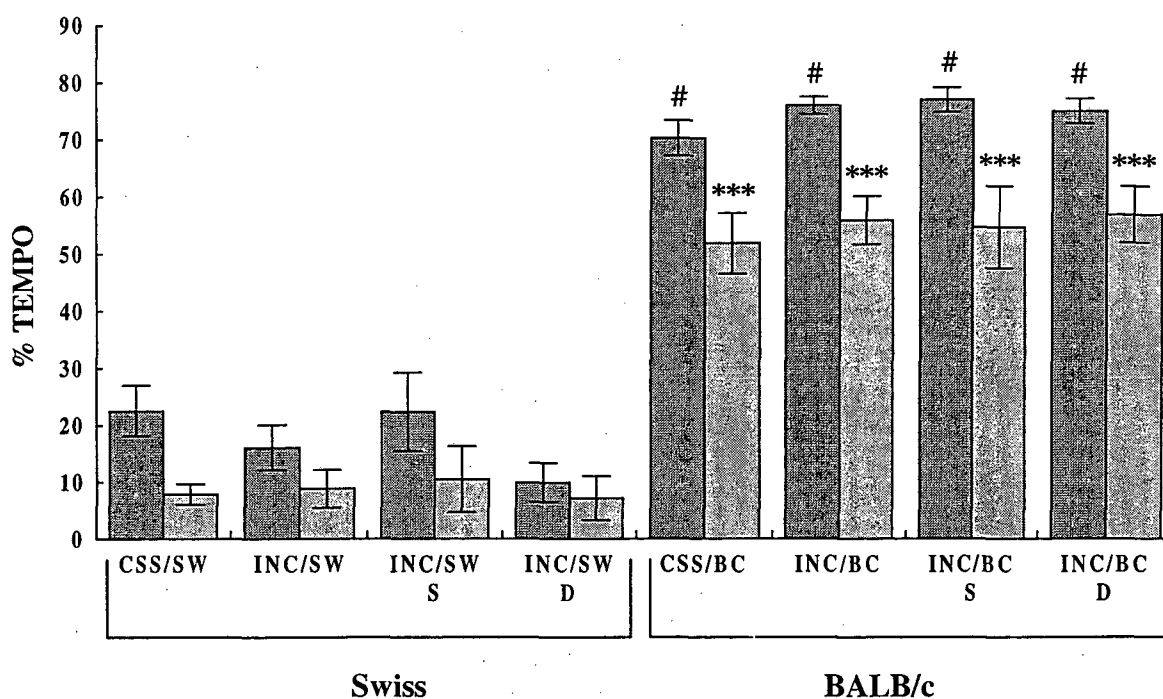


Figura 13 - Percentuais do tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (TA%1 e TA%2), obtidos pela atividade exploratória das linhagens Swiss e BALB/c. Comparação entre as duas linhagens (Média \pm EPM). Os sinais (#) indicam diferenças referentes ao TA%1, entre os grupos da linhagem BALB/c e respectivos grupos da linhagem Swiss ($p < 0,001$). Os sinais (***) indicam diferenças referentes ao TA%2, entre os grupos da linhagem BALB/c e respectivos grupos da linhagem Swiss ($p < 0,001$).

NÚMERO DE ENTRADAS NOS BRAÇOS ABERTOS LINHAGENS SWISS E BALB/c

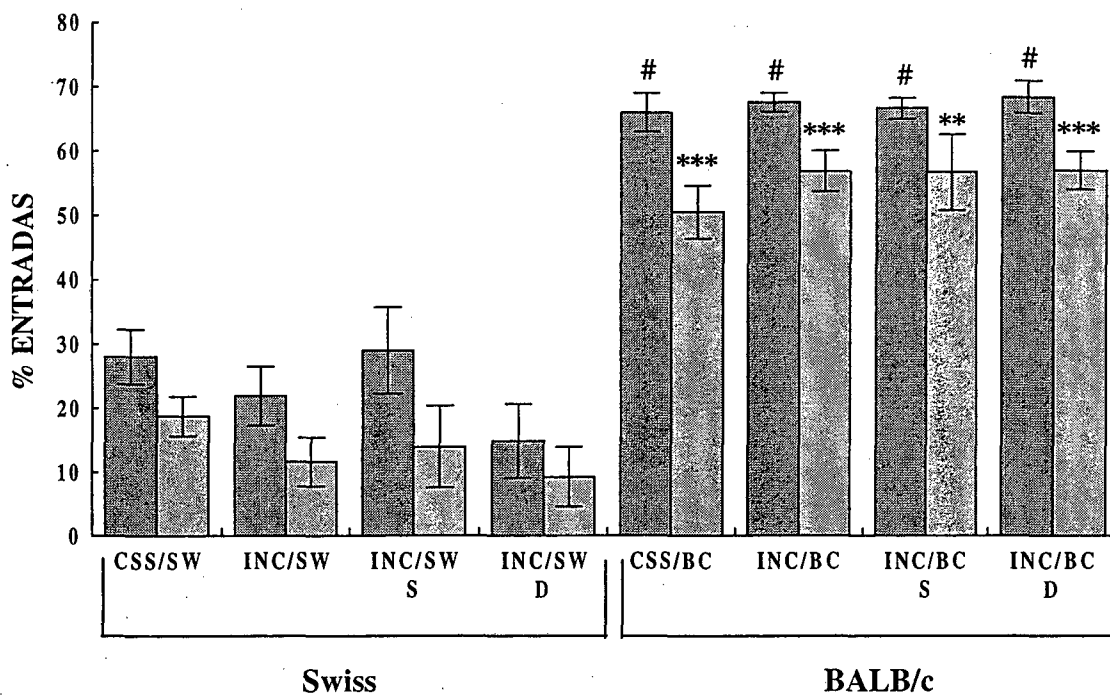


Figura 14 - Percentuais do número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (EA%1 e EA%2) obtidos pela atividade exploratória das linhagens Swiss e BALB/c. Comparação entre as duas linhagens (Média ± EPM). Os sinais (#) indicam diferenças referente ao EA%1, entre os grupos da linhagem BALB/c e respectivos grupos da linhagem Swiss ($p < 0,001$). Os sinais (*) indicam diferenças referente ao EA%2, entre os grupos da linhagem BALB/c e respectivos grupos da linhagem Swiss. ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Linhagem Swiss

5.1.1 – Títulos de Anticorpos Anti-HC nas Respostas Imune Primária e Secundária

Segundo a literatura as alterações nos diversos tipos de resposta imunológica têm variado frente a uma diversidade de fatores intrínsecos às situações experimentais. Hardy *et al.* (1990) verificaram que ratos dominantes, após lutas intensas por 14 dias, apresentaram uma resposta linfoproliferativa e uma produção de IL-2 induzidas por mitógenos maior do que a dos animais submissos, porém dentro dos mesmos níveis das respostas dos controles. Por outro lado, quando foi estabelecida a dominância com uma interação menos agressiva, os animais dominantes apresentaram uma resposta maior, ultrapassando inclusive os níveis dos grupos controles. Os autores sugerem a existência de diferenças basais na função imune entre submissos e dominantes, sendo que o nível de agressão pode ser um fator importante, interferindo inclusive na resposta imunológica do dominante. Na mesma linha de raciocínio, pode-se argumentar que na produção de anticorpos da resposta imune primária os animais que interagiram por 14 dias (INC/SW) estavam sendo submetidos a uma relação de confrontos, de cuja situação ainda não tinham um referencial, ou seja, uma situação desconhecida para enfrentar. As alterações fisiológicas ao estresse provocado pela situação nova e aversiva interferiram de maneira mais acentuada na resposta dos animais submissos e provocaram uma redução menos drástica nos dominantes, quando comparados com os controles. Na resposta

imune secundária, os animais dominantes parecem já ter um controle maior da situação e o estresse parece interferir, porém desencadeando uma resposta compensatória, comparada aos controles e submissos.

Em nosso experimento não utilizamos uma avaliação mais detalhada das manifestações comportamentais que pudessem detectar características individuais dentro de cada grupo e, possivelmente, subdividi-los em mais subgrupos, inclusive os animais do grupo controle. No entanto, com relação às atitudes comportamentais, a literatura também descreve diferenças individuais entre os animais que formam o grupo dos derrotados (submissos) e os vencedores (dominantes) de um confronto, claramente subdividindo esses grupos quanto às respostas imunológicas. Fleshner *et al.* (1989) verificaram posturas comportamentais diferentes em ratos machos intrusos/submissos, podendo assim subdividi-los em dois grupos. Nos animais submissos que exibiram mais o comportamento de submissão, os autores verificaram uma redução significativa dos títulos de anticorpos IgG anti-KLH, quando comparado à resposta dos animais mais reativos, embora a resposta tenha sido reduzida nos dois subgrupos de submissos em relação aos controles. Stefanski (1998) subdividiu um grupo de ratos submissos de acordo com as características comportamentais frente aos dominantes. Um subgrupo manifestou comportamento mais ativo, com menor grau de posturas defensivas e o outro manifestou um grau maior de posturas defensivas, refletindo um comportamento mais passivo. Os subgrupos foram denominados pelo autor de subdominantes e submissos, respectivamente. O subgrupo submisso apresentou maior redução da proliferação de células T, *in vitro*, na presença do mitógeno ConA. No sétimo dia de confrontos os submissos apresentaram aumento do número total de leucócitos, quando comparados aos controles e aos subdominantes, redução da percentagem de linfócitos sobre o total de leucócitos, aumento do número de granulócitos, aumento do percentual de granulócitos sobre o número de leucócitos

e aumento do número de linfócitos B no sangue. Não houve diferença na quantidade de linfócitos T auxiliares (CD4) e citotóxicos (CD8). Apresentaram redução da percentagem de células CD4 e CD8 sobre o número de linfócitos e aumento na percentagem de linfócitos B sobre o número total de linfócitos. Baseado em outras evidências experimentais, o autor discute que as variações imunológicas entre os subgrupos podem refletir um prejuízo na habilidade dos subtipos de linfócitos para migrar aos órgãos linfóides específicos quando são requeridos, estabelecendo assim, um prejuízo nos submissos no momento do encontro do patógeno com células específicas tais como CD4, CD8 e células B. Os animais subdominantes apresentaram redução no número total de linfócitos, em relação aos controles e submissos. Em nossos resultados, consideramos que as diferenças ocorridas entre os grupos INC/SW e CSS/SW não podem ser desvinculadas das respostas dos subgrupos submissos e dominantes, pois esses subgrupos compõem o grupo INC/SW e, com suas características comportamentais e fisiológicas diferentes, dissimulam um resultado conjunto. Quanto à resposta imune primária que ocorreu depois de 7 dias da imunização e dos confrontos diários, podemos comparar aos resultados obtidos por Fleshner *et al.*(1989), uma semana após a imunização com KLH. Podemos comparar com os resultados de Stefanski (1998), após 7 dias de confrontos, quando ele verificou redução da percentagem de células T CD4 e CD8 nos submissos, em relação aos controles. É possível ainda que exista diferenças entre cada subgrupo do nosso experimento, sendo que entre os submissos talvez haja diferenças comportamentais, as quais poderiam direcionar características específicas nos padrões da resposta imunológica, assim também, entre os animais que compuseram o subgrupo dos dominantes.

Com relação aos animais do protocolo de 21 dias de interação agonística não houve diferença estatística entre os grupos. Constatamos, entretanto, um aumento significativo dos

títulos de anticorpos da resposta imune primária, em relação aos animais do protocolo de 14 dias de interação. Na resposta imune secundária não houve diferença significativa entre os animais de 21 dias e os animais de 14 dias de interação. Os resultados apresentados pelos animais do grupo INL/SW e do CMS/SW-21, tanto na resposta imune primária quanto na secundária, juntamente com os resultados da resposta imune secundária do grupo INC/SW e CMS/SW-14 parecem indicar que um período mais longo de estímulos estressantes induz ações fisiológicas diferentes, cujos mecanismos não parecem promover apenas uma adaptação do organismo, mas uma ativação que pode exceder as respostas normais.

Segundo Zalcman *et al.* (1988), o período de administração do antígeno em relação à aplicação de um estressor é um fator que interfere na resposta imunológica. Assim, camundongos que foram estressados com eletrochoques nas patas 72 horas após a estimulação antigênica com hemácia de carneiro apresentaram uma redução das células formadoras de placa (PFC) e dos títulos de anticorpos anti-HC. Quando os camundongos foram recolocados em um local de sessões prévias de estresse ao qual eles foram submetidos duas semanas antes, também apresentaram redução da PFC e dos títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro, mas somente quando a simulação do estressor foi aplicada 72 horas após a imunização. Imediatamente após a imunização, a aplicação de um estressor ou uma situação simuladora do estressor foram capazes de provocar um aumento da resposta imune (Zalcman *et al.*, 1989). Zalcman & Anisman (1993) submeteram camundongos da linhagem CD-1 a uma sessão crônica por 13 dias de eletrochoques inescapáveis nas patas, aplicando um antígeno 48 horas após o término da sessão e, 72 horas após o inóculo do antígeno, os camundongos foram submetidos mais uma vez ao eletrochoque. Com este protocolo foi verificado um aumento dos títulos de anticorpos anti-HC e das células formadoras de placas no baço. Em nossos grupos submetidos à interação agonística por 14 dias houve uma redução

da resposta imune primária, observada no sétimo dia de interação. A relação temporal do estímulo antigênico com o estímulo estressor em nosso experimento não é idêntica à relação apresentada pelos autores acima, no entanto, parece existir um momento crucial para a ativação do sistema imunológico, sobre o qual as alterações fisiológicas induzidas pelo estresse estão influenciando, no sentido de provocar uma redução da resposta imune. Nos animais submetidos ao protocolo de interação curta, o estímulo estressante é aplicado no mesmo dia da inoculação do antígeno, mas é seguido por seis dias. Portanto, no período de 72 horas de estimulação antigênica, o organismo está sendo influenciado ativamente pelo estresse. Por outro lado, o protocolo de eletrochoques por 13 dias conduzido Zalcman & Anisman (1993), assemelha-se ao protocolo dos animais que foram submetidos a 21 dias de interação agonística, no qual houve uma ativação mais prolongada dos sistemas fisiológicos pelo estresse antes do estímulo antigênico, sugerindo mais uma vez a interferência de mecanismos, no sentido de provocar não apenas uma adaptação, como também uma aumento da resposta imune. A sugestão feita pelos autores é que pode estar existindo uma adaptação ou dessensibilização das células do sistema imune aos hormônios liberados durante o estresse crônico. É discutida também a possibilidade de diferentes sistemas de neurotransmissão estarem influenciando diferencialmente os mecanismos imunológicos. Foi verificado por Sandi *et al.* (1992) que na resposta proliferativa *in vitro*, os linfócitos não tiveram alteração da sensibilidade aos hormônios do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal após estímulos crônicos de estressores. Shanks (1990) verificou que a adaptação ao estresse crônico não está relacionada à redução dos níveis hormonais do eixo HPA. Assim, estes mecanismos diferenciados talvez possam estar interferindo no aumento da resposta imune nos grupos que sofreram interação agonística por 21 dias.

Sob outro ângulo, deve ser considerado que o estímulo estressante pode ser um fator preponderante na ativação dos sistemas orgânicos. O estímulo psicossocial provocado pela interação agonística deve desencadear respostas neurofisiológicas um pouco diferentes, já que, pelo menos para os animais dominantes ou subdominantes a interação social não se configura em um estressor incontrolável, como é o caso do eletrochoque inescapável utilizado nos experimentos conduzidos por Zalcman & Anisman. O estímulo estressante utilizado em nosso experimento possibilitou a distinção de características comportamentais que interferem distintamente nas respostas fisiológicas. Raab *et al.* (1986) verificaram que ratos submissos apresentam níveis plasmáticos de corticosteróides significativamente maiores que os níveis de animais dominantes ou controles. Possivelmente, além do aumento nas concentrações de corticosteróides, os componentes do sistema imune de animais submissos também apresentem mecanismos mais sensíveis a esses hormônios, os quais podem estar influenciando nas alterações verificadas tanto na resposta imune primária quanto na secundária dos animais submissos do grupo INC/SW.

Nos grupos experimentais que presenciaram a interação agonística por 14 e 21 dias, CMS/SW-14 e CMS/SW-21, respectivamente, as respostas sugerem uma tendência da resposta imunológica na mesma direção dos respectivos grupos que interagiram. No grupo CMS/SW-14, comparado ao grupo controle, verifica-se uma redução da resposta imune primária, mas a diferença está à margem do nível estatisticamente significativo. Comparando com o grupo INC/SW, cujo protocolo da administração do antígeno foi o mesmo, verificamos que a resposta imune primária do grupo INC/SW-14 está quase no mesmo nível daquele grupo. Devemos ressaltar que as alterações psicológicas determinadas pela situação de interação agonística e que possibilitam destacar entre dominantes e submissos não são as mesmas que estão presentes nos animais que apenas foram influenciados pelos fatores

associados com o ambiente ao qual foram submetidos, como o cheiro e a vocalização dos animais interagentes. Se tivéssemos utilizado algum parâmetro para distinguir características individuais, talvez pudéssemos extrair um subgrupo a partir do grupo CMS/SW-14, com uma redução mais marcante na resposta imune, como no caso dos submissos do grupo INC/SW. Na resposta imune secundária, mesmo que o gráfico da média geométrica da população no grupo CMS/SW-14 sugira um aumento em relação aos demais grupos, esta diferença não é estatisticamente significativa. Cabe informar que o número de animais neste grupo ficou um pouco reduzido e houve também uma variação maior das respostas individuais, o que levou a uma distorção da média a partir do contingente da população. O tamanho da amostra talvez seja o fator preponderante, já que uma amostra maior possivelmente permitiria uma média que mostrasse melhor a realidade populacional. Mesmo considerando um pequeno desvio da amostra, a estatística mostra que a resposta imune secundária deste grupo está dentro dos níveis dos demais grupos que interagiram por 14 dias, os quais não diferiram do grupo controle.

No grupo CMS/SW-21, a resposta imune primária e secundária está dentro dos limites do grupo INL/SW, cujos sinais emitidos durante a interação agonística, serviram como estímulo estressor para este grupo.

Para os grupos experimentais CTMS-14 e CTMS-21 os sinais emitidos pelos animais interagentes, como odores e sons, parecem ter servido como estímulo estressante, induzindo-os ao estresse psicossocial. A literatura descreve que estressores moderados como estes, induzem alterações nas respostas imunológicas. Segundo Zalcman *et al.* (1991), animais submetidos aos odores emitidos pelos animais estressados por iluminação moderada dentro do alojamento apresentaram uma redução das células formadoras de placas no baço e dos títulos

de anticorpos anti-hemácia de carneiro. A exposição de animais aos odores emitidos por camundongos submetidos ao estresse através de eletrochoques nas patas diminuiu a produção de IL-2 estimulada pela ConA, reduziu a resposta das células NK e aumentou os títulos de anticorpos IgM e IgG anti-KLH (Cocke *et al.*, 1993). Cabe destacar que a inoculação do antígeno KLH no experimento conduzido por esses autores foi conduzida 24 horas antes do estímulo estressante, uma relação temporal que se aproxima daquela apresentada nos experimentos conduzidos por Zalcman *et al.* (1991), onde imediatamente após a inoculação do antígeno o estímulo estressante foi capaz de provocar um aumento da resposta imune humoral.

5.1.2 – Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado

Os índices extraídos da atividade exploratória nos braços abertos do labirinto em cruz elevado foram baixos, quando comparados com outras linhagens de camundongos descritas na literatura. Trullas & Skolnick (1993) testaram 16 linhagens de camundongos e detectaram entre elas uma variação de 90% a 2% no percentual do tempo de permanência nos braços abertos, e 80% a 5% no percentual de entradas nos braços abertos. A linhagem Swiss não foi testada pelos autores acima, mas pode ser caracterizada como uma linhagem reativa, de intermediária a alta, de acordo com a classificação em relação ao nível de exploração dos braços abertos apresentado pelas 16 linhagens do experimento conduzido pelos autores acima.

Quanto aos grupos experimentais da linhagem Swiss testados em nosso experimento, os testes não detectaram diferenças significativas. É importante notar que houve um nível

relevante de variação entre os indivíduos de cada grupo, o qual pode ser observado pelo erro padrão da média. Cabe, portanto, enfatizar que existem diferenças comportamentais entre os indivíduos da mesma linhagem, cujas características, se fossem computadas poderiam destacar subgrupos dentro de cada grupo experimental observado. Ferrari *et al.* (1998) avaliaram na linhagem Swiss, seis grupos diferentes, observando a situação social a qual foram submetidos e o comportamento apresentado pelos indivíduos. Testando-os no labirinto em cruz elevado, os autores detectaram algumas diferenças entre os grupos, quais sejam: animais dominantes apresentaram um grau de ansiedade maior que os controles e bem maior que os submissos, apresentando também um aumento significativo com relação aos animais que apenas reagem aos ataques, mas não atacavam espontaneamente. Em nosso experimento verificamos que a atividade exploratória dos submissos no primeiro teste, tanto do grupo INC/SW quanto INL/SW, foram maiores, ou seja, exploraram mais os braços abertos que os seus pares dominantes, embora as diferenças entre eles não tenham sido consideradas significativas pelos testes estatísticos. Portanto, uma análise que pudesse inferir as características comportamentais antes do primeiro teste no labirinto possivelmente teria evidenciado elementos para destacar subgrupos mais agressivos entre os animais dominantes e mais passivos entre os submissos, cujas diferenças também pudessem influenciar a atividade exploratória no labirinto, a exemplo do que foi verificado pelos autores acima.

Diversos autores têm observado alterações significativas no segundo teste em relação ao primeiro no labirinto em cruz elevado, em linhagens variadas de ratos e camundongos. Uma redução significativa do percentual do tempo e de entradas nos braços abertos tem sido observada nos testes subseqüentes ao primeiro (Treit *et al.*, 1993; Holmes & Rodgers, 1998). Essas alterações não são precedidas de variações ambientais que possam efetivamente alterar o comportamento ou a atividade fisiológica dos animais. Portanto, estão sendo atribuídas

principalmente à experiência obtida no primeiro teste, sugerindo assim, a adoção de um comportamento desenvolvido a partir da memória do animal em relação a situação anterior (Holmes & Rodgers, 1998).

É importante destacar que o primeiro teste no labirinto em cruz elevado no presente trabalho foi realizado antes de iniciar os testes de interação agonística. Portanto, a atividade exploratória não teve influência de outro elemento que pudesse interferir no comportamento, além do estímulo aversivo do próprio labirinto. No entanto, o isolamento dos animais é um fator relevante na determinação do comportamento agressivo. Hilakivi-Clarke & Lister (1992) verificaram que o isolamento por sete dias antes do agrupamento foi mais incisivo em detectar camundongos alfas dentro de um grupo, do que quando os animais eram agrupados sem passar por um período de isolamento. Em todos os grupos que passaram por um período de isolamento de sete dias, foi detectado um camundongo alfa, enquanto que em oito grupos de animais que não passaram pelo período anterior de isolamento, somente um alfa foi observado em um dos grupos. Todavia, o comportamento exploratório no labirinto em cruz elevado não foi diferente entre alfas e submissos, antes ou depois do agrupamento dos animais e também não foram diferentes as atividades exploratórias em outros tipos de testes comportamentais realizados antes do agrupamento. Assim, os autores sugerem que as características que distinguem animais dominantes de submissos não são aparentes por alguma manifestação comportamental antes da interação agonística. Não obstante, em nosso experimento, cujos animais ficaram isolados por um período de 30 dias, os dominantes tiveram uma redução mais acentuada do comportamento exploratório nos braços abertos do labirinto em relação aos submissos, embora sem significância estatística. Talvez, o tempo de isolamento seja um fator importante na determinação das características comportamentais entre dominantes e submissos. Rodgers & Cole (1993) verificaram que o isolamento por duas semanas reduziu

modestamente a expressão da ansiedade em camundongos da linhagem DBA/2. O nível de ansiedade não foi correlacionado com a agressão, pois o isolamento provocou um aumento no comportamento agressivo dos animais. O isolamento por 24 horas aumentou o nível de ansiedade em camundongos da linhagem Swiss-Webster, contudo conforme já citado acima, camundongos com posturas marcantes de submissão apresentaram uma redução na ansiedade em relação aos animais dominantes (Ferrari *et al.*, 1998).

Em nosso experimento verificamos no segundo teste uma redução significativa no percentual de tempo e de entradas nos braços abertos, no grupo CSS/SW e no percentual de tempo nos braços abertos nos animais submissos de grupo INL/SW. Quanto aos demais grupos experimentais, a redução da atividade exploratória no segundo teste não foi significativa. Os resultados sugerem que o estresse psicossocial provocado pela interação agonística, não obstante ter provocado um aumento do nível de ansiedade nesses animais, parece estar interferindo no processamento da memória dos mesmos. Quanto aos animais submissos do grupo INL/SW, não temos subsídio para inferir se a redução do percentual do tempo de permanência nos braços abertos é devida a uma recuperação da memória ou se o estresse provocou uma alteração no comportamento, diferenciada dos demais grupos. Avgustinovich *et al.* (1997), detectaram uma redução da atividade exploratória dos animais submissos no labirinto, mas somente no número de entradas nos braços abertos e no número total de entradas. Essas reduções foram acentuadas com o aumento do tempo de interação agonística, de 10 para 20 dias. Considerando evidências de outros pesquisadores, os autores acima sugerem que um tempo maior de interação agonística pode ter desenvolvido um comportamento nos submissos, mais relacionado a um estado depressivo do que tipicamente de ansiedade. Na linha de raciocínio desses autores, podemos sugerir que, independentemente de uma possível perda de memória nos animais submissos de INL/SW, a alteração

comportamental pode estar direcionada ao desenvolvimento de um estado psicológico diferente daquele apresentado no primeiro teste de ansiedade.

5.1.3 – Ansiedade e Resposta Imune

A correlação entre a resposta obtida no labirinto em cruz elevado e a resposta imune humoral nos animais do grupo controle (CSS/SW) mostra que quanto maior o nível de ansiedade no primeiro teste, maior a resposta imune humoral secundária. Embora essa correlação não tenha sido significativa nos animais dominantes de 14 dias (INC/SW-D), existe uma tendência na mesma direção do grupo controle.

A linhagem Swiss é uma linhagem bastante agressiva e apresenta um grau de ansiedade bastante alto, quando comparada a outras linhagens. Embora não considerado significativo pelos testes estatísticos, o grau de ansiedade do grupo dominante é maior em relação aos outros grupos. Segundo Devoino *et al.* (1993), os animais dominantes de uma linhagem mais agressiva tiveram um aumento na quantidade de células formadoras de rosetas e de células formadoras de placas em resposta à hemácia de carneiro, quando comparados aos animais do grupo controle; enquanto que os animais submissos não apresentaram alteração da resposta imune. Em uma linhagem menos agressiva, os animais dominantes não apresentaram alteração da resposta, enquanto que os submissos tiveram uma redução da resposta imune, quando comparados aos controles. Os autores discutem sobre a possibilidade de uma alteração nos sistemas de neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica, sugerindo uma maior

ativação dopaminérgica nos animais dominantes da linhagem mais agressiva e uma maior ativação serotoninérgica nos animais submissos da linhagem menos agressiva.

O sistema dopaminérgico tem apresentado efeitos e variações comportamentais relacionados à agressão e ansiedade, diferenciados e as vezes opostos entre os trabalhos mostrados na literatura. A ativação dos diferentes receptores parece provocar respostas comportamentais variadas que vão desde uma inespecificidade no comportamento exploratório até alterações na atividade locomotora, posturas de atenção e vigília em relação a uma situação ambiental e alteração no nível de ansiedade de ratos e camundongos. Rodgers *et al.* (1994) testando agonistas e antagonistas para os receptores D1 e D2 observaram juntamente com efeitos inespecíficos detectados por agonistas e antagonistas para os dois receptores, um efeito ansiolítico, induzido pelo Sulpiride, um antagonista para o receptor D2.

Nos experimentos conduzidos por Tidey & Miczek (1996), ratos derrotados socialmente apresentaram um aumento nas concentrações de dopamina no núcleo acumbens e no córtex pré-frontal, durante e depois da ameaça de derrota social. Os níveis aumentados de dopamina no núcleo acumbens se manifestaram durante os períodos de vigilância e orientação do intruso em direção ao residente. Os autores sugerem a possibilidade de uma ativação dopaminérgica correlacionada a um aumento da atenção ou ativação de processos cognitivos para lidar com o estressor.

A ativação dopaminérgica do núcleo acumbens também foi associada com o aumento da atividade locomotora, mas a administração de algumas drogas ansiogênicas aumentou a concentração de dopamina no núcleo acumbens sem alterar a atividade locomotora (McCullough and Slamone, 1992).

São fatores importantes que interferem na regulação da agressão animal pelo sistema dopaminérgico, a espécie, linhagem, a situação e as doses experimentais. A agressão parece ser facilitada com baixas doses e inibida com altas doses de catecolaminas (Kudryavtseva, 1997). Nikulina & Klimek (1993) verificaram que a agressividade induzida em camundongos pela clonidina era potencializada por agonistas ou reduzida por antagonistas dopaminérgicos, sugerindo que a ação da clonidina era mediada por receptores dopaminérgicos. Os resultados variaram de acordo com a linhagem do camundongo.

Nistico *et al.* (1994), verificou que o SKF 38393, um agonista seletivo do receptor D1 da dopamina, microinfundido na amígdala central, aumentou a resposta proliferativa de esplenócitos, estimulada pela ConA. A administração do SCH 23390, um antagonista específico para o receptor D1, reduziu significativamente os efeitos do SKF 38393, sugerindo que os neurônios dopaminérgicos da amígdala modulam a atividade do sistema imunológico. Os efeitos foram dependentes da dose e não se manifestaram quando a resposta proliferativa foi induzida por outro mitógeno, a LPS, e também não alterou a atividade das células NK.

A destruição eletrolítica de áreas cerebrais que contém corpos celulares dopaminérgicos e regiões terminais do sistema límbico, como os núcleos caudado e acumbens, resultaram na redução de anticorpos anti-HC em ratos, sugerindo que essas áreas estejam envolvidas no mecanismo de neuroimunomodulação (Devoino *et al.* (1997).

Nossos experimentos mostram que os animais dominantes do grupo INC (INC/SW-D) tiveram um aumento da resposta imune humoral secundária. Reportando-nos à descrição da literatura, os resultados apresentados pelo grupo INC/SW-D parecem estar relacionados a uma ativação do sistema dopaminérgico, pois a resposta obtida no primeiro teste do labirinto em cruz elevado, apesar de não diferir significativamente dos demais grupos, revela uma

tendência a um aumento dos níveis de ansiedade nesses animais. Outro fator importante é o fato de que os animais dominantes da linhagem Swiss apresentaram um comportamento altamente agressivo nos testes de interação agonística.

A correlação entre o nível de ansiedade e a resposta imune humoral apresentada pelos animais dominantes do grupo INC e pelo grupo controle (CSS) parece indicar que o sistema dopaminérgico está relacionado com um aumento da resposta imunológica, em conformidade com a sugestão feita por outros autores (Devoino *et al.*, 1993; Nistico *et al.*, 1994; Devoino *et al.*, 1997). Portanto, podemos suspeitar fortemente que na linhagem Swiss, o sistema dopaminérgico é ativado nos animais mais agressivos, culminando em um aumento na resposta imunológica. O tempo relacionado entre a ativação do neurotransmissor e a alteração da resposta imune humoral parece indicar que a dopamina esteja atuando em outras vias que atuam sobre as células imunológicas, desencadeando uma alteração mais tardia, cujo período coincide com o aumento da resposta imune secundária nos animais dominantes de interação curta.

O padrão da resposta imune primária e secundária verificado nos grupos de 21 dias (CMS/SW-21, INL/SW-D e S), parece indicar que esteja ocorrendo uma adaptação fisiológica nesses animais após um período prolongado de estresse psicossocial.

Os animais submissos do grupo da linhagem Swiss que interagiu por 14 dias apresentaram uma correlação positiva entre a resposta imune humoral e os índices do labirinto em cruz elevado. Apesar de o teste estatístico mostrar significância apenas na correlação entre os títulos da resposta imune secundária e o tempo de permanência nos braços abertos no primeiro teste, os demais índices de correlação foram bastante expressivos, indicando uma tendência a uma correlação positiva entre todos os testes dos dois experimentos. Esta

correlação positiva indica que os animais submissos menos ansiosos apresentaram maiores títulos de anticorpos.

Segundo a literatura, animais derrotados socialmente apresentam uma maior atividade serotoninérgica central que os animais dominantes. A investigação sobre o sistema serotoninérgico tem mostrado alterações variadas, as quais parecem depender da dose do neurotransmissor, do receptor e da região cerebral onde o receptor é ativado ou bloqueado. Em ratos derrotados socialmente foi verificado aumento dos níveis plasmáticos de corticosteróides e aumento da atividade serotoninérgica em várias áreas límbicas do sistema nervoso central (Blanchard *et al.*, 1993). Os corticosteróides e o estresse aumentam o metabolismo da serotonina entre o núcleo da rafe e o hipocampo (De Kloet *et al.*, 1982) e reduzem os receptores do tipo 5-HT_{1A} no hipocampo (Mendenson & McEwen, 1992 *apud* Korte *et al.*, 1995). A injeção sistêmica de baixas doses de 8-OH-DPAT, um agonista para o receptor 5-HT_{1A}, reduziu os níveis plasmáticos de corticosterona em ratos derrotados socialmente, quando comparado aos animais controles (Korte *et al.*, 1995). Em camundongos, a agressão aumentada pelo álcool foi reduzida por dois agonistas do receptor 5-HT_{1A}, o 8-OH-DPAT e o flexinosan, os quais também reduziram a agressão não induzida pelo álcool (Miczek *et al.*, 1998). A administração do 8-OH-DPAT no núcleo dorsal da rafe de ratos provocou um efeito ansiolítico somente no segundo teste do labirinto em cruz elevado, enquanto que o tertatolol, um antagonista do receptor 5-HT_{1A}, antagonizou os efeitos do agonista, provocando um efeito ansiogênico. No hipocampo ventral, o 8-OH-DPAT provocou um efeito ansiogênico e não foi antagonizado pelo tertatolol, o qual, sozinho, provocou um efeito ansiolítico que não foi antagonizado pelo 8-OH-DPAT. No núcleo medial da rafe, o 8-OH-DPAT provocou um efeito ansiolítico no primeiro teste do labirinto em cruz elevado (File & Gonzalez, 1996). Em ratos selecionados geneticamente pelo comportamento de alta ou

baixa agressividade na reação de defesa contra humanos, foram verificadas diferenças nas densidades dos receptores 5-HT_{1A} no córtex frontal, hipotálamo e amígdala. Os ratos selecionados para baixa agressividade apresentaram uma densidade maior dos receptores 5-HT_{1A} nessas regiões límbicas (Popova *et al.*, 1998).

Em um modelo teórico para as ações cerebrais da serotonina discutido por Graeff *et al.* (1996), foi sugerido vias centrais e receptores diferenciados, os quais são ativados ou bloqueados conforme a situação comportamental. Verificou-se que os corpos celulares serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe enviam axônios à amígdala. A serotonina liberada na amígdala ativa os receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} e 5-HT₃, facilitando os comportamentos de escape ativo ou esquiva diante de uma ameaça potencial. Os corpos celulares do núcleo dorsal da rafe também enviam axônios à substância cinzenta periaquedutal, inibindo comportamentos mais primitivos, como a fuga e a luta inatas, eliciadas por perigo próximo, dor aguda ou asfixia, as quais podem ser relacionadas a desordens de pânico. Os corpos celulares serotoninérgicos no núcleo medial da rafe enviam axônios ao hipocampo. Neste local, através dos receptores 5-HT_{1A}, a serotonina reduz os eventos aversivos, possibilitando uma resistência ao estresse crônico.

As pesquisas especulam sobre quais as regiões serotoninérgicas são ativadas em situações experimentais que envolvem alteração do comportamento e/ou administração de agonistas e antagonistas dos receptores serotoninérgicos, pois os núcleos da rafe contém auto-receptores somatodendríticos, cujos agonistas e antagonistas podem promover, respectivamente, a inibição ou a liberação da serotonina para os neurônios pós-sinápticos localizados em diversas regiões límbicas, incluindo o hipocampo e a amígdala. Assim, uma ativação dos receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos por agonistas parece reduzir a liberação de

serotonina para os neurônios pós-sinápticos, cujo efeito parece ser revertido por antagonistas desses receptores .

A lesão eletrolítica do núcleo medial da rafe provocou uma redução da proliferação das células do baço de ratos estressados, induzida pela ConA (Graeff *et al.*, 1996). Um bloqueio na neurotransmissão serotoninérgica do núcleo medial da rafe ao hipocampo leva a um aumento da ativação serotoninérgica a partir das células pós-sinápticas hipocampais. Portanto, a redução da resposta proliferativa das células do baço sugerem um efeito inibidor da serotonina hipocampal, induzido pelo aumento da atividade serotoninérgica hipocampal.

A estimulação antigênica em animais é descrita como sendo um fator que altera a atividade serotoninérgica central. Gardier *et al.* (1994) observaram uma redução nos níveis de serotonina no córtex frontal e no hipotálamo, coincidindo com o pico da resposta imune humoral à hemácia de carneiro e ao antígeno KLH, no quarto dia da imunização. A serotonina e o seu precursor, o triptofano, administrados subcutaneamente 30 minutos antes da imunização com hemácia de carneiro em camundongos da linhagem CBA, foram capazes de reduzir os níveis de IgM e IgG na resposta imune humoral primária e aumentar as concentrações plasmáticas de corticosterona (Jackson *et al.*, 1985). No mesmo experimento, a administração de uma droga que limita a síntese de serotonina a partir do triptofano, a paraclorofenilamina (PCPA) suprimiu os efeitos da serotonina e do triptofano, mas não reduziu os níveis de corticosteróides. Portanto, os autores sugerem que a supressão da resposta imune observada nesse experimento foi mediada diretamente pela serotonina, não envolvendo obrigatoriamente os mecanismos centrais da serotonina.

Os resultados apresentados na literatura, tanto da atividade comportamental quanto na atividade imunológica sugerem fortemente que a atividade da serotonina central está

relacionada com ativação do comportamento, cujas respostas parecem depender da situação à qual o indivíduo é submetido, mas também indica que a base genética é um dos fatores mais relevantes na determinação das alterações neurofisiológicas que acompanham processamento da resposta comportamental.

Os animais submissos do grupo de interação curta da linhagem Swiss apresentaram uma redução da resposta imune humoral primária, mas somente em relação aos animais controles, pois os dominantes tiveram uma resposta imune primária reduzida, embora a diferença estatística em relação aos controles não tenha sido significativa. A resposta imune secundária dos animais submissos não atingiu os níveis dos animais controles, porém a diferença entre eles não foi significativa, indicando que o efeito do estresse sobre a resposta imune secundária nos submissos foi mais moderado. Entretanto, os animais dominantes tiveram um aumento da resposta imune secundária que ultrapassou os níveis dos animais controles e diferiu significativamente dos submissos. Parece então, que as diferenças entre dominantes e submissos são mais atribuídas à resposta compensatória dos animais dominantes, do que a uma resposta suprimida dos submissos. Assim, reportando-nos às funções sugeridas para a serotonina, podemos suspeitar que houve uma alteração na atividade desse neurotransmissor nos animais submissos, porém a atividade dopaminérgica parece ter sido envolvida com mais ênfase nos dominantes do que a atividade serotoninérgica nos submissos. Os animais submissos do protocolo de 21 dias de interação não apresentaram alteração da resposta imune e também não houve uma correlação entre os níveis de ansiedade e a resposta imune humoral, assim também em todos os grupos desse protocolo. A resposta imune primária dos animais de interação longa contribuiu com a possibilidade do sistema serotoninérgico estar sendo acionado por um curto período, predominando posteriormente a atividade do sistema dopaminérgico na linhagem Swiss.

5.2 – Linhagem BALB/c

5.2.1 – Títulos de Anticorpos Anti-HC nas Respostas Imune Primária e Secundária

Karp *et al.* (1993) observaram que animais da linhagem BALB/c alojados individualmente por um período de 14 dias não mostraram diferença na resposta imune primária de anticorpos, medida em diferentes períodos após a imunização com KLH, quando comparados aos animais alojados em grupo. No entanto, na resposta imune secundária os animais alojados individualmente apresentaram títulos de anticorpos IgM significativamente maiores que os animais alojados em grupos de 4 animais por caixa. Os títulos de anticorpos IgG não foram diferentes entre os grupos experimentais e foram bem maiores que os títulos de IgM, apresentando também uma tendência a um aumento de IgG após um período maior de imunização secundária nos animais alojados individualmente. Assim, os resultados dos autores acima e a modesta redução dos títulos de anticorpos secundários apresentada pelos animais que sofreram o estresse de interação agonística parecem indicar que o sistema imune da linhagem BALB/c responde lentamente e de forma moderada a esses eventos estressantes. No grupo INC/BC o confronto entre as duplas foi estabelecido sob pouca agressividade, uma característica dessa linhagem. Portanto, o estresse e as conseqüentes alterações fisiológicas desencadeados a partir destas condições, possivelmente podem estar relacionados às pequenas interações que ocorrem com os animais alojados em grupos.

Sob outro ângulo, também podemos confrontar os nossos resultados com os de autores que utilizaram outras linhagens, mas distinguiram entre os comportamentos mais ativos e

mais passivos, subdividindo os animais submissos (Fleshner *et al.*, 1989; Stefanski *et al.*, 1998). Observando atentamente a resposta imune secundária na linhagem BALB/c, verificamos que, embora não significativa, há uma redução nos animais que sofreram interação, sendo mais acentuada a redução nos animais submissos, enquanto que os animais dominantes apresentaram um aumento da resposta em relação ao número total de animais que interagiram. Podemos especular, portanto, que se tivéssemos subdividido os grupos dominantes e os submissos de acordo com as características individuais dentro de cada um desses grupos, talvez tivéssemos detectado uma acentuação das diferenças entre os grupos.

5.2.2 – Atividade Exploratória no Labirinto em Cruz Elevado

O nível de exploração dos braços abertos apresentado pelos animais da linhagem BALB/c indicam um grau de ansiedade bastante reduzido, quando comparado a outras linhagens de camundongos, descritas na literatura que aborda a ansiedade através do labirinto em cruz elevado. Entre as 16 linhagens testadas no trabalho de Trullas & Skolnick (1993), as linhagens BALB/cj e BALB/cByj apresentaram os maiores percentuais de tempo e de entradas nos braços abertos, sendo classificadas respectivamente, como não reativa e reativa de intermediário a baixo. No primeiro teste do labirinto, a linhagem BALB/c testada em nosso experimento apresentou um comportamento semelhante ao da linhagem BALB/cByj testada no experimento dos autores acima.

No segundo teste de ansiedade, todos os grupos experimentais apresentaram uma redução significativa dos percentuais de tempo e de entradas nos braços abertos. De acordo

com a literatura, esta redução no segundo teste parece relacionar-se a uma sensibilização dos animais desenvolvida a partir do primeiro teste, indicativo de uma ativação da memória (Holmes & Rodgers, 1998).

Considerando que as diferenças entre o primeiro e o segundo testes são proporcionais às diferenças observadas em outros experimentos descritos na literatura, parece-nos mais sensato raciocinar na direção de que o estresse psicossocial não está interferindo prioritariamente nas alterações dos níveis de ansiedade desta linhagem. Por outro lado, também podemos suspeitar de uma sobreposição de efeitos. O efeito comportamental induzido por uma situação pode ter mascarado o efeito comportamental da outra. Uma vez que possivelmente os efeitos comportamentais manifestaram-se na mesma direção, impossibilitando-nos de fazermos uma distinção das duas situações.

Não podemos deixar de destacar a pouca agressividade apresentada pela linhagem nos testes de interação agonística, o que também pode ser um fato relevante, no sentido de não ter interferido tão intensamente nos efeitos provocados por um estímulo aversivo de uma situação diferente que é o caso do labirinto em cruz elevado.

5.2.3 – Ansiedade e Resposta Imune

Os índices obtidos no teste de correlação entre os níveis de ansiedade e a resposta imune humoral não sugerem uma interação entre o comportamento do animal e a resposta imunológica nessa linhagem. É importante lembrar que os animais da linhagem BALB/c apresentaram um nível reduzido de agressão, comparado aos animais da linhagem Swiss. A

média da atividade exploratória nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e a reduzida variação comportamental entre os animais da linhagem BALB/c sugerem uma homogeneidade na população que transcende ao complexo de histocompatibilidade principal.

5.3 – Comparação entre as Características Observadas na Linhagem Swiss e na Linhagem BALB/c

5.3.1 – Características Comportamentais

Constatamos entre as duas linhagens estudadas, diferenças bastante significativas com relação às características comportamentais, as quais nos levam a suspeitar de variações genéticas relevantes para estas características.

Na linhagem Swiss foi observado um nível de agressividade bem maior que na linhagem BALB/c. Como já mencionado anteriormente, não utilizamos medidas objetivas para quantificar o grau absoluto de agressividade a partir das atitudes comportamentais. Todavia, podemos afirmar, a partir das observações nas sessões de interação agonística que a diferença é significativa entre as linhagens.

Por outro lado, o comportamento de baixa agressividade na linhagem BALB/c não pareceu relacionar-se com comportamento de passividade da dupla. Mesmo apresentando pouca agressividade, ainda foi possível distinguir os dominantes e os submissos da dupla. Paralelamente, a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado revelou um nível de

exploração bastante alto, o qual diferiu significativamente, não só da linhagem Swiss testada em nosso experimento, quanto de outras linhagens testadas em outros experimentos (Trullas & Skolnick, 1993; Conti *et al.*, 1994; Rodgers *et al.*, 1993). O nível de ansiedade da linhagem BALB/c, conforme detectado pela resposta exploratória no labirinto em cruz elevado foi significativamente menor que o nível de ansiedade da linhagem Swiss.

5.3.2 – Resposta Imunológica

Na resposta imune primária, os títulos de anticorpos anti-HC foram significativamente maiores no grupo controle da linhagem Swiss (CSS/SW) que no grupo controle da linhagem BALB/c (CSS/BC). Na resposta imune secundária, verificamos que os títulos de anticorpos anti-HC nos animais dominantes da linhagem Swiss foi significativamente maior que nos animais dominantes e submissos da linhagem BALB/c, enquanto que os animais submissos da linhagem Swiss não apresentam diferença com relação aos animais da linhagem BALB/c.

A diferença na resposta imunológica entre as linhagens, a princípio não parece refletir uma alteração exclusivamente a partir das diferenças nas reações comportamentais ao estímulo estressante, já que ocorre entre os grupos controles na resposta imune primária. Na resposta imune secundária, o que se verifica é um aumento da resposta dos animais dominantes da linhagem Swiss, enquanto que os grupos da linhagem BALB/c não apresentam diferenças nas alterações da resposta imune secundária em relação à primária entre os grupos da linhagem. As variações na resposta imunológica verificadas entre as duas linhagens parecem ser inicialmente atribuídas a diferenças genéticas básicas no próprio sistema imune.

Secundariamente, não podemos desconsiderar alguma alteração no mecanismo fisiológico, intrínseca às características comportamentais dos animais dominantes da linhagem Swiss, as quais variaram, possivelmente como resultado da situação de confrontos a que foram submetidos.

Se considerarmos a tendência da resposta secundária na linhagem BALB/c e compararmos com a resposta obtida por Karp *et al.* (1993), podemos pensar em um padrão de resposta na direção dos resultados obtidos na resposta imune secundária da linhagem Swiss, porém mais tardio. Então, na linhagem Swiss podemos sugerir que as diferenças entre dominantes e submissos são mais nítidas e o organismo responde mais rapidamente, enquanto que os componentes orgânicos que estabelecem diferenças entre dominantes e submissos na linhagem BALB/c respondem mais lentamente aos estímulos estressantes.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, R., FELTEN, D., and COHEN, N. Interactions Between the Brain and the Immune System. **Annual Reviews Pharmacol. Toxicol.**, 30 : 561-602, 1990.

AVGUSTINOVICH, D. F., GORBACH, O. V. and KUDRYAVTSEVA, N. N. Comparative Analysis of Anxiety-Like Behavior in Partition and Plus-Maze Tests After Agonistic Interactions in Mice. **Physiology & Behavior**, 61 : 37-43, 1997.

BLANCHARD, D. C. and BLANCHARD, R. J. Behavioral Correlates of Chronic Dominance-Subordination Relationships of Male Rats in a Seminatural Situation. **Neuroscience & Biobehavioral**, 14 : 455-462, 1990.

BLANCHARD, D. C., SAKAI, R. R., McEWEN, B., WEISS, S. M. and BLANCHARD, R. J. Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. **Behavioural Brain Research**, 58 : 113-121, 1993.

BRENNER, G. J. and MOYNIHAN, J. A. Stressor-Induced Alterations in Immune Response and Viral Clearance Following Infection with Herpes Simplex Virus-Type 1 in BALB/c and C57BI/6 Mice. **Brain, Behavior and Immunity**, 11 : 9-23, 1997.

COCKE, R., MOYNIHAN, J. A., COHEN, N., GROTA, L. J. and ADER, R. Exposure to Conspecific Alarm Chemosignals Alters Immune Responses in BALB/c Mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, 7 : 36-46, 1993.

CONTI, L. H., COSTELLO, D. G., MARTIN, L. A., WHITE, M. F. and ABREU, M. E. Mouse Strain Differences in the Behavioral Effects of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) and the CRF Antagonist α -Helical CRF₉₋₄₁. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 48. N°2 : 497-503, 1994.

CULLINAN, W. E., HERMAN, J. P., HELMREICH, D. L. and WATSON, Jr., S. J. A Neuroanatomy of Stress. In: FRIEDMAN, M. J., CHARNEY, D. S., DEUTCH, A. Y. **Neurobiological and Clinical Consequences of Stress : From Normal Adaptation to Post-Traumatic Stress Disorder**. Lippincott - Raven Publishers, USA, 1995. P. 3-25.

DE KLOET, E. R., KOVACS, G. L., SZABO, G., TELEGDY, G., BOHUS, B. and VERSTEEG, D. H. G. Decreased Serotonin Turnover in the Dorsal Hippocampus of Rat Brain Shortly After Adrenalectomy: Selective Normalization After Corticosterone Substitution. **Brain Research**, 239 : 659-663, 1982.

DEVOINO, L. V., ALPERINA, E. L., KUDRYAVTSEVA, N. N. and POPOVA, N. K. Immune Responses in male mice with aggressive and submissive behavior patterns: Strain differences. **Brain, Behavior and Immunity**, 7 : 91-96, 1993.

DEVOINO, L. V., ALPERINA, E. L., GALKINA, O. and ILYUTCHENOK, R. Involvement of Brain Dopaminergic Structures in Neuroimmunomodulation. **Int. J. Neurosci.**, 91 : 213-228, 1997.

DORIAN, B., GARFINKEL, P., BROWN, G., SHORE, A., GLADMAN, D. & KEYSTONE, E. Aberrations in Lymphocyte Subpopulations and Function During Psychological Stress. **Clin. Exp. Immunol.**, 50 : 132-138, 1982.

FELDMAN, S., CONFORTI, N., ITZIK, A. and WEIDENFELD, J. The Role of Limbic Structures in the Modulation of ACTH Responses Following Adrenalectomy. **Annals New York Academy of Sciences**, 771 : 73-81, 1995.

FELTEN, S., FELTEN, D. L. Neural-immune interactions. **Progress in Brain Research**, 100 : 157-162, 1994.

FERRARI, P. F., PALANZA, P. and RODGERS, R. J. Interindividual Variability in Swiss Male Mice: Relationship between Social Factors, Aggression, and Anxiety. **Physiology & Behavior**, 63 (5) : 821-827, 1998.

FILE, S. E. and GONZALEZ, L. E. Anxiolytic Effects in the Plus-Maze of 5-HT_{1A}-Receptor Ligands in Dorsal Raphé and Ventral Hippocampus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 54 (1) : 123-128, 1996.

FLESHNER, M., LAUDENSLAGER, M. L., SIMONS, L. and MAIER, S. F. Reduced Serum Antibodies Associated With Social Defeat in Rats. **Physiology & Behavior**, 45 : 1183-1187, 1989.

FOKKEMA, D., KOOLHAAS, J. M. and VAN DER GUGTEN, J. Individual Characteristics of Behavior, Blood Pressure, and Adrenal Hormones in Colony Rats. **Physiology & Behavior**, 57 (5) : 857-862, 1995.

GARDIER, A. M., KACHANER, S., SHAGHANGHI, E. K., BLOT, C., BOHUON, C., JACQUOT, C., PALLARDY, M. J. Effects of a Primary Immune Response to T-Cell Dependent Antigen on Serotonin Metabolism in Frontal Cortex: in vivo Microdialysis Study in Freely Moving Fischer 344 Rat. **Brain Research**, 645 : 150-156, 1994.

GLASER, R., KIECOLT-GLASER, J. K., SPEICHER, C. E., & HOLLIDAY, J. E. Stress, loneliness, and Changes in herpes virus latency. **Jornal of Behavioral Medicine**, 8 : 249-260, 1985.

GLASER, R., KIECOLT-GLASER, J. K., STOUT, J. C., TARR, K. L., SPEICHER, C. E. and HOLLIDAY, J. E. Stress-Related Impairments in Cellular Immunity. **Psychiatry Research**, 16 : 233-239, 1985.

GRAEFF, F. G., GUIMARÃES, F. S, DE ANDRADE, T. G. C. S. and DEAKIN, J. F. W. Role of 5-HT in Stress, Anxiety, and Depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 54 (1) : 129-141, 1996.

HARDY, C-A, QUAY, J., LIVNAT, S. and ADER, R. Altered T-Lymphocyte Response Following Aggressive Encounters in Mice. **Physiology & Behavior**, 47 : 1245-1251, 1990.

HELING, K. J., SZKLO, M. and COMSTOCK, G. W. Factors Associated with Mortality after Widowhood. **American Journal Public Health**, 71, n°8 : 802-809, 1981.

HENINGER, G. R. Neuroimmunology of Stress. In: FRIEDMAN, M. J., CHARNEY, D. S., DEUTCH, A. Y. **Neurobiological and Clinical Consequences of Stress : From Normal Adaptation to Post-Traumatic Stress Disorder**. Lippincott - Raven Publishers, USA, 1995. P. 381-401.

HILAKIVI-CLARKE, L. A. and LISTER, R. G. Are There Preexisting Behavioral Characteristics That Predict the Dominant Status of Male NIH Swiss Mice (*Mus musculus*)? **Journal of Comparative Psychology**, 106 (2) : 184-189, 1992.

HOLMES, A and RODGERS, R. J. Responses of Swiss-Webster Mice to Repeated Plus-Maze Experience: Further Evidence for a Qualitative Shift in Emotional State? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 60 (2) : 473-488, 1998.

HUDSON, L., & HAY, F. C. **Practical Immunology**. Third Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989.

IRWIN, M., PATTERSON, T., SMITH, T. L., CALDWELL, C., BROWN, S. A., GILLIN, C., GRANT, I. Reduction of Immune Function in Life Stress and Depression. **Biol. Psychiatry**, 27 : 22-30, 1990.

JACKSON, J. C., CROSS, R. J., WALKER, R. F., MARKESBERY, W. R., BROOKS, W. H. & ROSZMAN, T. L. Influence of Serotonin on the Immune Response. **Immunology**, 54 : 505-512, 1985.

KARP, J. D., MOYNIHAN, J. A. and ADER, R. Effects of Differential Housing on the Primary and Secondary Antibody Responses of Male C57Bl/6 and BALB/c Mice. **Brain, Behavior and Immunity**, 7 : 326-333, 1993.

_____. Psychosocial Influences on Immune Responses to HSV-1 Infection in BALB/c Mice. **Brain Behavior and Immunity**, 11 : 47-62, 1997.

KIECOLT-GLASER, J. K., KENNEDY, S., MALKOFF, S., FISHER, L., SPEICHER, C. E. and GLASER, R. Marital Discord and Immunity in Males. **Psychosomatic Medicine**, 50 : 213-229, 1988.

KIRSCHBAUM, C., PRÜSSNER, J. C., STONE, A.A., FEDERENKO, I., GAAB, J., LINTZ, D., SCHOMMER, N. and HELLHAMMER, D. H. Persistent High Cortisol Responses to Repeated Psychological Stress in a Subpopulation of Healthy Men. **Psychosomatic Medicine**, 57 : 468-474, 1995.

KOOLHAAS, J. M., MEERLO, P., DE BOER, S. F., STRUBBE, J. H. and BOHUS, B. The Temporal Dynamics of the Stress Response. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 223 : 1-8, 1997.

KORTE, S. M., BUWALDA, B., MEIJER, O., DE KLOET, E. R. and BOHUS, B. Socially Defeated Male Rats Display a Blunted Adrenocortical Response to a Low Dose of 8-OH-DPAT. **European Journal of Pharmacology**, 272 : 45-50, 1995.

KUDRYAVTSEVA, N. N. Neurophysiological Consequences of Repeated Experience of Aggression in Daily Agonistic Confrontations. **Monograph; Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk**, 42p, 1997.

LISTER, R. G. The use of a Plus-Maze to Measure Anxiety in the Mouse. **Psychopharmacology**, 92 : 180-185, 1987.

McCULLOUGH, L. D. and SLAMONE, J. D. Anxiogenic Drugs Beta-CCE and FG-7142 Increase Extracellular Dopamine Levels in Nucleus Accumbens. **Psychopharmacology**, 109 : 379-382, 1992.

MAIER S. F., WATKINS, L. R., and FLESHNER, M. Psychoneuroimmunology : The Interface Between Behavior, Brain, and Immunity. **American Psychologist**, 49, n. 12 : 1004-1017, 1994.

MEERLO, P., OVERKAMP, G. J. F., DAAN, S., VAN DEN HOOFDAKKER, R. H. and KOOLHAAS, J. M. Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. **Stress**, 1 : 21-32, 1996.

MICZEK, K. A., HUSSAIN, S. and FACCIDOMO, S. Alcohol-Heightened Aggression in Mice: Attenuation by 5-HT_{1A} Receptor Agonists. **Psychopharmacology**, 139 : 160-168, 1998.

MOR, V., McHORNEY, C. and SHERWOOD, S. Secondary Morbidity Among he Recently Bereaved. **American Journal of Psychiatry**, 143 : 158-163, 1986.

NIKULINA, E. M. and KLIMEK, V. Strain Differences in Clonidine-Induced Aggressiveness in Mice and its Interaction With the Dopamine System. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 44 : 821-825, 1993.

NISTICO, G., CAROLEO, M. C., ARBITRIO, M., and PULVIRENTI, L. Dopamine D₁ Receptors in the Amygdala Enhance the Immune Response in the Rat. **Annals New York Academy of Sciences**, 741 : 316-323, 1994.

O'LEARY, ANN. Stress, Emotion, and Human Immune Function. **Psychological Bulletin**, 108 (3) : 363-382, 1990.

PICH, E. M., HEINRICHS, S. C., RIVIER, C., MICZEK, K. A., FISHER, D. A. and KOOB, G. F. Blockade of Pituitary-Adrenal Axis Activation Induced by Peripheral Immunoneutralization of Corticotropin-Releasing Factor Does Not Affect The Behavioral Response to Social Defeat Stress in Rats. **Psychoneuroendocrinology**, 18, (7) : 495-507, 1993.

POPOVA, N. K., AVGUSTINOVICH, D. F., KOLPAKOV, V. G. and PLYUSNINA, I. Z. Specific [3H]8-OH-DPAT Binding in Brain Regions of Rats Genetically Predisposed to Various Defense Behavior Strategies. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 59 (4) : 793-797, 1998.

RAAB, R., DANTZER, R., MICHAUD, B., MORMEDE, P., TAGHZOUTI, K., SIMON, H. and LE MOAL, M. Behavioral, Physiological and Immunological Consequences of Social Status and Aggression in Chronically Coexisting Resident-Intruder Dyads of Male Rats. **Physiology & Behavior**, 36 : 223-228, 1986.

RODGERS, R. J. and COLE, J. C. Influence of Social Isolation, Gender, Strain, and Prior Novelty on Plus-Maze Behaviour in Mice. **Physiology & Behavior**, 54 : 729-736, 1993.

RODGERS, R. J. and COLE, J. C. Anxiety Enhancement in the Murine Elevated Plus Maze by Immediate Prior Exposure to Social Stressors. **Physiology & Behavior**, 53 : 383-388, 1993.

RODGERS, R. J., NIKULINA, E. M. and COLE, J. C. Dopamine D₁ and D₂ Receptor Ligands Modulate the Behaviour of Mice in the Elevated Plus-Maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 49 n. 4 : 985-995, 1994.

RODGERS, R. J., CAO, B. J., DALVI, A. and HOLMES, A. Animal models of anxiety : an ethological perspective. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, 30 : 289-304, 1997.

SANDI, C., CAMBRONERO, J. C., BORRELL, J. and GUAZA, C. Effects of HPA hormones on Adapted Lymphocyte Responsiveness to Repeated Stress. **Brain Research Bull.**, 28 : 581-585, 1992.

SHANKS, N., ZALCMAN, S., and ANISMAN, H. Strain-specific catecholamine variations induced by stressors: Relation to behavioral change. **Society for Neuroscience Abstracts**, 14 : 969, 1988.

SHANKS, N., GRIFFITHS, J., ZALCMAN, S., ZACHARKO, R. M. and ANISMAN, H. Mouse Strain Differences in Plasma Corticosterone Following Uncontrollable Footshock. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, 36 : 515-519, 1990.

SHANKS, N., RENTON, C., ZALCMAN, S. and ANISMAN, H. Influence of Change From Grouped to Individual Housing on a T-Cell-Dependent Immune Response in Mice: Antagonism by Diazepam. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 47(3) : 497-502, 1994.

STEFANSKI, V. Social Stress in Loser Rats: Opposite Immunological Effects in Submissive and Subdominant Males. **Physiology & Behavior**, 63 (4) : 605-613, 1998.

STRATAKIS, C. A. and CHROUSOS, G. P. Neuroendocrinology and Pathophysiology of the Stress System. **Annals New York Academy of Sciences**, 771 : 1-18, 1995.

TIDEY, J. W. and MICZEK, K. A. Social Defeat Stress Selectively Alters Mesocorticolombic Dopamine Release: an in vivo Microdialysis Study. **Brain Research**, 721 : 140-149, 1996.

TREIT, D., MENARD, J. and ROYAN, D. Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 44 : 463-469, 1993.

TRULLAS, R. and SKOLNICK, P. Differences in Fear Motivated Behaviors Among Inbred Mouse Strains. **Psychopharmacology**, 111 : 323-331, 1993.

XIA, L., MATERA, C., FERIN, M., and WARDLAW, S. L. Interleukin-1 Stimulates the Central Release of Corticotropin-Releasing Hormone in the Primate. **Neuroendocrinology**, 63 : 79-84, 1996.

ZALCMAN, S., MINKIEWICZ-JANDA, A., RICHTER, M. and ANISMAN, H. Critical Periods Associated with Stressor Effects on Antibody Titers and on the Plaque-Forming Cell Response to Sheep Red Blood Cells. **Brain, Behavior and Immunity**, 2 : 254-266, 1988.

ZALCMAN, S., RICHTER, M. and ANISMAN, H. Alterations of Immune Functioning Following Exposure to Stressor-Related Cues. **Brain, Behavior, and Immunity**, 3 : 99-109, 1989.

ZALCMAN, S., HENDERSON, N., RICHTER, M. and ANISMAN, H. Age-Related Enhancement and Suppression of a T-Cell-Dependent Antibody Response Following Stressor Exposure. **Behavioral Neuroscience**, 105, n. 5 : 669-676, 1991.

ZALCMAN, S., KERR, L. and ANISMAN, H. Immunosuppression Elicited by Stressors and Stressor-Related Odors. **Brain, Behavior, and Immunity**, 5 : 262-273, 1991.

ZALCMAN, S. and ANISMAN, H. Acute and Chronic Stressor Effects on the Antibody Response to Sheep Red Blood Cells. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 4: 445-452, 1993.