

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITO DA DERROTA SOCIAL SOBRE A PROGRESSÃO DO
GLIOMA C6 INOCULADO NO CÉREBRO DE RATOS**

MARCOS ANTONIO DOS ANJOS

Florianópolis

2002

**"EFEITO DA DERROTA SOCIAL NA PROGRESSÃO DO GLIOMA G6
INOCULADO NO CEREBRO DE RATOS"**

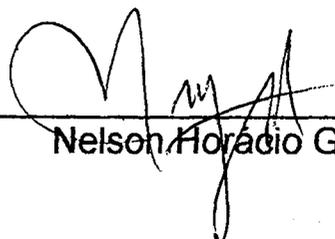
MARCOS ANTONIO DOS ANJOS

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

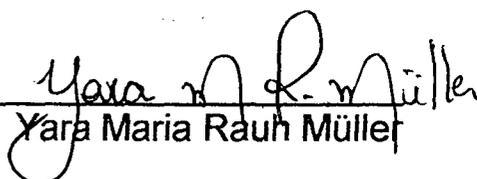
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

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

Orientador


Nelson Horácio Gabilan

Coordenadora do Curso


Yara Maria Rauh Müller

Banca Examinadora


Nelson Horácio Gabilan (Presidente)


Gareth Cuttle


Sônia Gonçalves Carobrez

EFEITO DA DERROTA SOCIAL SOBRE A PROGRESSÃO DO GLIOMA C6 INOCULADO NO CÉREBRO DE RATOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito Parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Neurociências

Orientadores: Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva

Prof. Dr. Nelson H. Gabilan

Co-Orientador: Prof. Dr. Odival César Gasparotto

Florianópolis

2002

Dedico este trabalho com amor à minha esposa Ana, aos meus filhos Camila, Gabriel, Rafael e Leticia, que apesar da minha ausência sempre estiveram presentes. Aos meus pais e irmãos, familiares e também aos amigos que não me faltaram em nenhum momento. A todos que ajudaram na realização deste grande sonho

A minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Márcio Alvarez da Silva, orientador e amigo, que abrindo as portas de seu laboratório, deu-me a possibilidade de aprender, demonstrando ser um exemplo de homem e pesquisador.

Ao professor Dr. Odival César Gasparotto, pela amizade, convivência e por sua grande ajuda na realização deste trabalho. Por me mostrar os primeiros passos na pesquisa sobre o estresse.

Ao professor Dr. Nelson H. Gabilan, pela orientação e configuração final deste trabalho.

À professora Dra. Sônia Carobrez por sua ajuda nos dados relacionados a imunologia.

A todos os professores das disciplinas do Mestrado em Neurociências, pelas orientações, sugestões e crescimento profissional na execução deste mestrado.

Aos professores Petrônio Guimbala, Jair Venâncio, Júlio Schruber, Danielle, Lúcia, Mônica e Rose, da Associação Catarinense de Ensino, por terem apoiado o meu crescimento profissional.

Aos amigos e colegas de laboratório Aloísio, Bruno, Carlos, Cidônia, Cláudia, Ezequiel, Fabíola, Giordano, Laudete, Marco e Ricardo, que tornaram a minha curta passagem pelo mestrado extremamente enriquecedora. Pelo auxílio na execução dos experimentos, pela amizade, carinho, companheirismo, e também pelas inúmeras conversas descontraídas que tanto bem nos faz em tempos como este.

Ao amigo Bruno Lobão que me auxiliou a desvendar os primeiros segredos que cercam a execução do mestrado em Neurociências.

Aos amigos e colegas do Curso de Pós-Graduação que dividiram todas as dificuldades na realização deste mestrado.

Ao pastor Tito Lívio e Lenir Krutul do Instituto Educacional Luterano de Santa Catarina pelo apoio na execução deste mestrado.

Ao meu irmão Carlos Antonio dos Anjos, que pelo conhecimento na área de informática, foi praticamente obrigado a participar da execução deste trabalho.

Ao Nivaldo, secretário da Pós-Graduação em Neurociências e amigo, pelo apoio sempre indispensável nas questões burocráticas.

Aos técnicos do Departamento de Ciências Fisiológicas, Carlinhos e Nivaldo, pela ajuda em relação aos cuidados com os animais.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na execução deste trabalho, a minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Estresse	01
1.2. Estresse social	03
1.3. Estresse e sistema imunológico	04
1.4. Gliomas	05
1.5. Gliomas e imunossupressão	06
1.6. O modelo de glioma C6	08
2. OBJETIVOS	09
2.1. Objetivo Geral	09
2.2. Objetivos específicos	09
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Animais	10
3.2. Grupos experimentais	11
3.3. Estresse social – modelo “residente-intruso”	11
3.4. Cultura de células	12
3.5. Implantação intracerebral de células de glioma C6	13
3.6. Teste de campo aberto	14

3.7. Obtenção de sangue e soro dos animais-----	14
3.8. Avaliação dos níveis séricos de imunoglobulina G contra glioma C6 ----	15
3.9. Avaliação da progressão tumoral-----	16
3.9.1. Preparação histológica do cérebro de ratos-----	16
3.9.2. Determinação da área tumoral-----	17
3.10. Análise estatística -----	17
4. RESULTADOS -----	18
4.1. Progressão tumoral do glioma C6 -----	18
4.2. Sobrevivência-----	20
4.3. Avaliação motora-----	21
4.4. Níveis séricos de imunoglobulina G (IgG) contra glioma C6-----	24
4.5. Hemograma -----	26
5. DISCUSSÃO -----	28
5.1. Efeito da derrota social na progressão tumoral-----	28
5.2. Sobrevivência e atividade motora-----	31
5.3. Resposta imunológica (IgG) e hemograma -----	32
6. CONCLUSÕES -----	36
7. BIBLIOGRAFIA-----	37

RESUMO

Neste estudo foi avaliado o efeito da derrota social sobre a progressão tumoral de células de glioma C6 inoculadas no cérebro de ratos. Os animais foram divididos em 4 grupos: inoculados com salina (grupo S, controle), inoculados com glioma C6 (grupo I), inoculados com glioma e depois submetidos a dupla derrota social (grupo I/D) e derrotados e depois inoculados com glioma (grupo D/I). Após 15 dias da inoculação, os animais foram avaliados quanto à progressão tumoral, sobrevivência, atividade motora (teste de campo aberto) e parâmetros imunológicos (níveis séricos de IgG contra glioma C6 e contagem sanguínea de linfócitos, granulócitos e monócitos). A progressão tumoral nos grupos inoculado e depois derrotado (I/D) e derrotado e depois inoculado (D/I) aumentou 69% e 41%, respectivamente, em relação ao grupo inoculado (I); o grupo I/D apresentou uma progressão tumoral 19% maior do que o grupo D/I. A atividade motora dos animais dos grupos I/D e D/I foi reduzida em 52% e 26%, respectivamente. Os animais I/D e D/I sofreram uma redução da sobrevivência de 34% e de 16%, respectivamente, quando comparados ao grupo I. Os níveis séricos de IgG contra glioma C6 foram aumentados nos animais inoculados com glioma (grupos I, I/D e D/I); entretanto no grupo I/D este aumento foi menor. No grupo I/D também mostrou uma redução no número de linfócitos e de granulócitos. Em conclusão, os resultados indicaram que a derrota social em ratos aumentou a progressão tumoral de glioma e reduziu a sobrevivência e importantes parâmetros da resposta imune dos animais observadas no modelo experimental proposto.

ABSTRACT

In this study, we evaluated the effect of social defeat on the tumor progression in rats inoculated with glioma C6 cells. The animals were separated into 4 groups: inoculated with saline (S, control group), inoculated with glioma (I group), inoculated with glioma and afterwards submitted to double social defeat (I/D group), and defeated and afterwards inoculated with glioma (D/I group). After 15 days of inoculation, the animals were evaluated regarding the tumor progression, survival, motor activity (tested in an open field test) and immunological parameters (IgG serum levels against to glioma cells and blood cell count of lymphocytes, granulocytes and monocytes). The tumor progression in the inoculated and defeated (I/D group) and defeated and inoculated (D/I) animals increased 69% and 41%, as compared to the inoculated group (I), respectively. The I/D group displayed a tumor progression around 19% greater than the D/I group. The motor activity was reduced by 52% and 26% in the I/D and D/I group, respectively. The survival in the I/D and D/I animals underwent a reduction of 34% and 16%, when compared to the I group, respectively. The serum levels of IgG increased in all groups inoculated with glioma. Furthermore, the I/D group displayed the lowest IgG levels. The I/D group also showed a reduced lymphocytes and granulocytes counting. In conclusion, these results showed that social defeat in rats increased the glioma tumor progression and reduced their survival and the several immunological parameters.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse

Hans Selye foi o primeiro a descrever a resposta humana ao estresse crônico, na sua teoria de “síndrome de adaptação geral” onde o maior componente neuroendócrino desta resposta, é o eixo hipotálâmico-pituitária-adrenal (HPA) (Selye, 1956). A “síndrome de adaptação geral” consiste de 3 estágios: o primeiro estágio, “reação de alarme”, seria uma resposta imediata a uma situação de estimulação de um estressor agudo. Se a exposição ao estressor é prolongada, ocorre o “estágio de resistência”, que consiste na síntese e liberação de glicocorticóides e aumento de catecolaminas, que facilitariam processos fisiológicos cruciais para a sobrevivência. O “estágio de exaustão”, se caracteriza pelo declínio do “estágio de resistência” e aumento da vulnerabilidade para o estresse, causando respostas fisiopatológicas (Selye, 1956).

O circuito biológico mais estudado na resposta ao estresse em mamíferos, é o eixo límbico-hipotalâmico-pituitária-adrenal (LHPA) (Selye, 1956; McEwen *et al.*, 1974; Dal-Zoto *et al.*, 2002). A percepção de estresse físico ou emocional por um organismo gera eventos que no final resultam na secreção de catecolaminas e glicocorticóides pelo córtex da adrenal. Tanto a ativação, quanto o término da resposta adrenocortical ao estresse são importantes para a adaptação e sobrevivência. O estresse ativa vias pelas quais o cérebro traduz o estímulo externo e no final, integra a resposta a nível hipotalâmico. Essas vias parecem envolver aferências neuronais provenientes

de núcleos catecolaminérgicos, serotoninérgicos e possivelmente colinérgicos (López *et al.*, 1999). A ação altamente catabólica dos glicocorticóides atuando sinergicamente com as catecolaminas produzem lipólise, glicogenólise e catabolismo protéico, resultando no aumento plasmático de glicose. Estas ações garantem a sobrevivência do organismo durante o estresse, em parte pelo aumento da disponibilidade de substratos energéticos (Herman e Cullinan, 1997). A disponibilidade de substratos energéticos aumenta devido o aumento do fluxo sangüíneo, resultante da ação dos glicocorticóides e catecolaminas sobre o sistema cardiovascular (Francis *et al.*, 1999). A exposição prolongada a níveis aumentados dos hormônios envolvidos na reação ao estresse pode resultar em sérios riscos, como o de promover a supressão de processos anabólicos, atrofia muscular, diminuição da sensibilidade para insulina e risco de diabete induzida por esteróide, hipertensão arterial, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, doenças arteriais, impotência e prejuízo no crescimento e reparação tecidual, bem como imunossupressão (Francis *et al.*, 1999).

A resposta ao estresse é complexa envolvendo funções sensorias, motoras, autonômicas, cognitivas e emocionais. A resposta corporal ao estresse não envolve somente estruturas cerebrais, mas também outros sistemas, como o endócrino, autonômico e imunológico. A comunicação entre os circuitos cerebrais e os sistemas mais periféricos forma as bases de uma resposta adaptativa ou mal adaptativa de um organismo ao estímulo estressor (López *et al.*, 1999).

1.2. Estresse social

O estresse social crônico ou recorrente é um fato presente nos animais superiores. Interação agonística é um termo utilizado para caracterizar a dominação de um e a subordinação do outro (Barnett, 1975; Blanchard *et al.*, 1975; Brain *et al.*, 1980; Blanchard *et al.*, 1993; Blanchard *et al.*, 2001). Disputas territoriais, muitas vezes envolvem comportamentos agonísticos que podem resultar em exaustão, lesão e algumas vezes, até mesmo à morte.

O modelo “residente–intruso” é um modelo animal utilizado para o estudo de fatores sociais em psiconeuroimunologia. Este modelo usa a capacidade de animais “residentes” em estabelecer e defender um território contra um animal estranho (“intruso”) (Thurmond, 1975). O modelo possibilita o estudo não somente do comportamento defensivo e a experiência vencedora do “residente”, mas também o comportamento defensivo e derrotado dos “intrusos”. O comportamento do animal dominante é exibido na forma de ataque lateral, perseguições e mordidas (Blanchard e Blanchard, 1977). Animais que sofreram derrota social demonstram congelamento, agressividade reduzida associada com fuga da área controlada pelo dominante e a exploração na presença do vencedor, é caracterizada por uma postura cautelosa (Meerlo, 1997; Siegfried *et al.*, 1984).

Vários trabalhos têm demonstrado que, em condições de estresse social, pode ocorrer maior vulnerabilidade para o surgimento de doenças e aumento de metástase tumoral (Moynihan e Ader, 1996; Stefanski e Ben-Eliyahu, 1996; Stefanski, 2001). Schleifer (1999) observaram em pacientes, que a capacidade de controlar um estressor poderia diminuir a

imunossupressão e como consequência, resultar em menor progressão tumoral.

1.3. Estresse e sistema imunológico

O sistema imunológico é regulado pelos sistemas sensorial, simpático e parasimpático, citocinas e por hormônios circulantes. Entre esses hormônios, os glicocorticóides, estão entre os mais importantes reguladores da função imunológica (McEwen *et al.*, 1997; McCabe *et al.*, 2000).

O impacto do estressor sobre o funcionamento do sistema imunológico depende das suas características, como severidade, cronicidade, predictabilidade e controlabilidade (Anisman *et al.*, 1997). Vários estudos têm demonstrado que dependendo do tipo de estressor e do tempo de exposição, cepa, idade, sexo e história prévia do animal ao estressor pode fazer com que a resposta imunológica possa ser suprimida ou amplificada (D'Aquila *et al.*, 1994; Stefanski e Engler, 1998; Bauer *et al.*, 2000).

O sistema imune apresenta, agudamente, mecanismos para aumentar a proteção a infecções e acelerar a recuperação do organismo. Um mecanismo essencial para esses efeitos é a translocação ou "tráfego" de células sangüíneas entre o sangue e os tecidos linfóides (Hermann *et al.*, 1995; McEwen, 2000). O estresse agudo ou a administração aguda de glicocorticóide reduzem o número de linfócitos, monócitos e células NK ("matadoras naturais") no sangue, embora possam estar aumentados em outros tecidos (Dhabhar e McEwen, 1996).

A derrota social reduziu a resposta dos anticorpos em camundongos e ratos (Leonard e Miller, 1995). Animais dominantes mostraram um aumento na proliferação de linfócitos T, quando comparados aos animais derrotados (Leonard e Miller, 1995). Também foi observada uma redução na atividade dos linfócitos T e células NK em ratos derrotados (Stefanski e Engler, 1998; Stefanski e Engler, 1999; Stefanski, 2001). Ratos submetidos a dupla derrota social apresentaram diminuição significativa da massa corporal e aumento dos níveis plasmáticos de adrenalina, noradrenalina e corticosterona livre (Buwalda *et al.*, 2001).

O estresse crônico pode levar a uma menor circulação de linfócitos T, B e grandes linfócitos granulares, bem como a uma diminuição da atividade de células NK. Esta baixa regulação dos componentes do sistema imune pode aumentar a susceptibilidade a infecções (Herpes, HIV) e/ou favorecer processos de doenças existentes, como o câncer (Kielkolt-Glaser e Glaser, 1995). Ratos submetidos a dupla derrota social e posterior injeção de endotoxina bacteriana (LPS) mostraram aumento nos níveis plasmáticos de interleucina 1 beta (IL-1 β) e diminuição nos níveis de corticosterona (Carobrez *et al.*, 2002).

1.4. Gliomas

Os tumores cerebrais e de medula espinhal correspondem ao segundo tipo de câncer infantil mais freqüente (Hill *et al.*, 1988). Dentre os tumores cerebrais, os gliomas malignos e multiformes são os mais comuns, representando 29% dos casos diagnosticados. Os gliomas são altamente

invasivos, sendo na maioria das vezes fatais; os pacientes apresentam uma sobrevida média menor do que 1 ano (Schiffer *et al.*, 1997). Dos tipos de gliomas, os glioblastomas são metastáticos e difusos, com o aparecimento de tumores multifocais em cerca de 10% dos casos, não restrito ao SNC (Bernstein e Woodard, 1995).

Os gliomas podem ser removidos cirurgicamente, mas é comum a recorrência do tumor. Isto ocorre devido ao alto grau de invasividade e sua capacidade de penetração através da barreira hematoencefálica, o que frustra os protocolos terapêuticos (Sarris, 1993). Quando células do glioblastoma humano deixam o SNC elas podem crescer em outras partes do corpo como peritônio, fígado, pulmão e ossos desses pacientes, decorrentes da carreamento através do líquido cerebroespaquidiano ou mesmo pela circulação sistêmica (Berstein *et al.*, 1995). Nestes pacientes O glioma depois de instalado, secreta fatores que irão facilitar sua infiltração no parênquima sadio. Posteriormente, a angiogênese tumoral ocorre e é essencial para possibilitar a irrigação da região tumoral para a sua expansão. Esta angiogênese é estimulada por citocinas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que interagem com receptores específicos do organismo hospedeiro, induzindo a proliferação de células endoteliais. Mais tarde, parte do aporte sangüíneo é desviado do organismo sadio para as células tumorais (Plate e Mennel, 1995). Outras citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa, interferon alfa, angiogenina, fator transformador de crescimento (TGF β) e a interleucina 8, também participam da angiogênese (Gardsen e Gookin, 1999).

1.5. Gliomas e imunossupressão

Vários estudos realizados em humanos têm demonstrado que os glioblastomas produzem e secretam mediadores imunossupressivos que inibem a função imunológica e o grau de imunossupressão depende do tamanho do tumor (Holladay *et al.*, 1994; Moulignier *et al.*, 1994; Morford *et al.*, 1997). Células tumorais malignas têm a capacidade de inibir as funções dos linfócitos T, secretando fatores como, o fator de transformador de crescimento (TGF β) (Olofsson *et al.*, 1992; Tada e Tribolet, 1993; Sasaki *et al.*, 1995; Kiefer *et al.*, 1994; Dix *et al.*, 1999) e interleucina 10 (IL-10) (Hishii *et al.*, 1995; Huettner *et al.*, 1997). A formação de tumores cerebrais está associada ao aumento dos níveis de várias citocinas, dentre as quais, interleucina 1 beta (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral alfa (Dix *et al.*, 1999).

Perrin *et al.* (1999) demonstraram em gliomas humanos, que o linfócito T citotóxico é a célula mais encontrada, enquanto que o linfócito T auxiliar ("helper"), não está presente. Esta seria responsável pelo recrutamento de outros tipos de células de competência imune e pelo direcionamento da produção de anticorpos feita pelos linfócitos B. O fato do linfócito T auxiliar ter um menor papel neste processo poderia ser uma das razões pela quais o organismo usualmente não consegue evocar uma resposta imunológica suficiente para conter o avanço da progressão tumoral. A não ativação do subtipo T auxiliar poderia ser uma consequência, entre outros possíveis fatores, da secreção de citocinas pelo glioma para facilitar sua progressão (Perrin *et al.*, 1999).

As células NK são citotóxicas para as células tumorais e em pacientes portadores de gliomas estas células também são afetadas tanto pela redução da capacidade funcional como pelo baixo número dessas células circulantes no sangue (Elliot *et al.*, 1987; Giovarelli *et al.*, 1988; Ausiello *et al.*, 1991;).

A alteração imunológica induzida pelo glioma não é apenas local, havendo também um comprometimento sistêmico do organismo do paciente (Brooks *et al.*, 1972; Young e Kaplan, 1976; Mahaley *et al.*, 1977; Elliot *et al.*, 1984). Células T obtidas de pacientes com gliomas não promovem resposta ativadora do linfócito T auxiliar *in vitro* (Roszman *et al.*, 1987; Dix *et al.*, 1999).

Portanto, a baixa responsividade imune pode ser resultado de uma alteração da regulação do eixo HPA, decorrente do estresse social, o que facilitaria a fixação e progressão do glioma.

1.6. O modelo de glioma C6

O glioma C6 de rato provém de uma linhagem celular glial indiferenciada induzida pela substância N-nitrosometiluréia (Benda *et al.*, 1968) com características de astrócitos e de oligodendrócitos (Ruddon, 1997). O glioma C6 possui características semelhantes ao glioblastoma, encontrado em humanos (Parsa *et al.*, 2000). O glioma C6 depende também de várias citocinas para a sua progressão, que coordenam processos vitais para o estabelecimento, sobrevivência e migração tumoral (Trojan *et al.*, 1993).

Pacientes portadores de tumores são freqüentemente submetidos a situações de estresse social, o que certamente contribui para diminuir a sua sobrevida (Button *et al.*, 2000; Maunsell *et al.*, 2001; Spiegel, 2001).

No entanto, não há trabalhos publicados relacionando a progressão de gliomas em animais submetidos a um modelo temporal de estresse social. Para auxiliar a compreensão deste processo, neste trabalho foi estudado o desenvolvimento do glioma C6 *"in vivo"* em animais submetidos ao estresse social.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Neste estudo foi avaliado o efeito da derrota social sobre a progressão tumoral de glioma C6 inoculado no cérebro de ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a progressão tumoral em ratos submetidos a derrota social antes e após a inoculação de células de glioma;
2. Verificar a sobrevivência e a atividade motora dos animais;
3. Determinar os níveis séricos de imunoglobulina IgG contra células de glioma C6 e avaliar o hemograma dos animais

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Wistar machos adultos, provenientes do Biotério Central da UFSC foram utilizados de acordo com as normas do CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da UFSC. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, com água e ração sólida peletizada *ad libitum*. A sala de manutenção dos animais foi mantida entre 22 e 24°C, com um ciclo claro-escuro de 12 horas (luz das 06:30 às 18:30 horas).

Os animais submetidos a derrota ("intrusos") pesaram entre 250-300g. Os animais foram isolados em caixas durante uma semana, período no qual eram manuseados em 3 sessões de 20 minutos entre 17:30 e 19:00 horas, para a habituação com o experimentador. Após os experimentos de derrota, os animais retornaram para suas caixas e foram mantidos isolados.

Os animais vencedores ("residentes"), reprodutores com mais de 5 meses de idade, pesaram entre 350-450g. Os "residentes" foram previamente treinados para serem dominantes territoriais, com exposição a animais adultos jovens, até que apresentassem as características de vencedor, no período de 30 dias. Os animais utilizados neste trabalho foram aqueles com características de vencedor e que apresentaram tempo de latência de ataque ao "intruso", inferior ou igual a 3 minutos.

3.2. Grupos experimentais

Neste trabalho foram utilizados 4 grupos experimentais com n =13:

a) GRUPO SALINA (S) - animais inoculados intracerebralmente com uma solução salina fisiológica.

b) GRUPO INOCULADO (I): animais com inoculação intracerebral de células de glioma C6.

c) GRUPO INOCULADO E DERROTADO (I/D): animais inoculados com células do glioma C6 e depois submetidos a dupla derrota social.

d) GRUPO DERROTADO E INOCULADO (D/I): animais submetidos a dupla derrota social e posteriormente inoculados com células de glioma C6.

e) GRUPO DE SOBREVIVÊNCIA: após a inoculação de células, 5 animais de cada grupo experimental foram mantidos durante um período de 60 dias, no Biotério do Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética (BEG). A taxa de sobrevivência dos animais de cada grupo foi avaliada.

3.3. Estresse social – modelo “residente-intruso”

Neste trabalho os animais foram submetidos ao estresse social utilizando o modelo de residente-intruso, onde os animais "residentes" exibem

uma postura de dominância territorial e agridem os animais "intrusos" (Thurmond, 1975). Na caixa do "residente" foi colocado um animal "intruso", que após a interação agonística apresentou comportamento de derrota. A partir deste comportamento de animal derrotado, o confronto continuou por mais 20 minutos. Os experimentos foram realizados entre 17:30 e 19:00 horas. Terminado o primeiro confronto social, o "intruso" (derrotado) foi retornado para sua caixa e mantido isolado durante 5 dias, até um segundo confronto (dupla derrota), com um animal "residente" diferente (Carobrez *et al.*, 2002).

3.4. Cultura de células

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de glioma C6 de rato, doada pelo Dr. Vivaldo Moura-Neto, do Departamento de Anatomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Rio de Janeiro, RJ). Esta linhagem foi obtida a partir de um tumor cerebral induzido quimicamente e identificada como célula astrocítica indiferenciada (Benda *et al.* 1968). A linhagem C6 foi mantida estéril em garrafas de cultura de 25cm², contendo meio de cultura Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, New York, EUA), tamponado com 2g/l de HEPES, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Trentin, 1997). As células foram manipuladas sob capela de fluxo laminar (ambiente estéril) e mantidas em estufa com 95% de umidade, 5% CO₂ a 37°C. Após a confluência, as células foram retiradas com solução de tripsina (Gibco BRL, New York, EUA) tripsina 0,125%, EDTA 0,5mM, em tampão fosfato salino [PBS], pH 7,4) a temperatura ambiente, durante 1 minuto. A reação foi neutralizada pela adição de meio de cultura contendo 5% de SFB. Após três

lavagens com PBS, as células foram semeadas em uma densidade de 10^6 células em garrafas de cultura de 25 cm^2 (Trentin, 1997).

3.5. Implantação intracerebral de células de glioma C6 (*in vivo*)

Após 5 dias da "dupla derrota", os animais (grupo D/I) foram inoculados intracerebralmente com células de glioma C6, como descrito por Soares (2001). Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (HYPNOL-Cristália, Brasil, 50mg/kg de peso, via i.p.) e colocados num aparelho estereotático (David Kopf Instrumentos, EUA). Em seguida, foi feita uma incisão na pele da região superior da cabeça do animal no sentido crânio-caudal, sobre a linha mediana, e a gálea aponeurótica removida. O periósteo foi afastado da linha mediana, expondo os ossos do crânio. O crânio foi perfurado com uma broca odontológica usando a seguinte coordenada 4 mm para a esquerda do bregma (hemisfério cerebral esquerdo). O cérebro foi perfurado a uma profundidade de 4mm a partir da duramáter e com uma microseringa (Hamilton), $5\mu\text{l}$ de solução de meio de cultura contendo 10^5 células do glioma C6 foram inoculadas lentamente na área correspondente aos núcleos da base ($1\mu\text{l}/\text{minuto}$) (Tseng *et al.*, 1997; Parsa *et al.*, 2000), conforme indicação do atlas estereotático (Paxinos e Watson 1998). Após a inoculação, a agulha foi retirada lentamente e a pele suturada. Os animais do grupo I/D, foram previamente inoculados com células de glioma C6 e depois submetidos à "dupla derrota", como descrito anteriormente. Após 15 dias da inoculação de salina (grupo S) ou células de glioma (grupos I, I/D e D/I), os

animais foram testados na sua atividade motora, anestesiados para a coleta de sangue e depois sacrificados para a retirada dos encéfalos e avaliação da progressão tumoral.

3.6. Teste de campo aberto

Para a avaliação motora (mobilidade) dos animais foi utilizado o teste de campo aberto. Os animais de cada grupo experimental foram submetidos a duas sessões do teste de campo aberto: antes ("inicial") da aplicação do modelo experimental e após 15 dias da inoculação do glioma C6 ("final"). Neste teste, uma arena de exploração de madeira (95cm de lado e 31,5 cm de altura) é dividida em 9 quadrados idênticos, para facilitar a medida de locomoção. Os animais foram colocados no quadrado central e a atividade motora foi observada durante 5 minutos. Os parâmetros comportamentais observados foram:

- a) Número de cruzamentos: se refere ao número de quadrados explorados, considerando que o animal deveria ter pelo menos três patas no quadrado para ser considerada sua presença naquele local.
- b) Número de explorações verticais: posição de apoio sobre as patas traseiras.

3.7. Obtenção de sangue e soro dos animais

Quinze dias após a inoculação de salina ou de células de glioma C6, os

ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso, via i.p.). Para a análise do hemograma e obtenção de soro, foram retirados 12ml de sangue, através de punção cardíaca, sem anticoagulante. O sangue foi dividido em duas partes, a uma parte foi adicionado anticoagulante (heparina tripotássica) para análise do hemograma; a outra utilizada para preparação de soro. O tempo médio para a retirada das células sangüíneas foi de 12 minutos. O sangue foi conservado a 4°C, por no máximo 8 horas, até a análise do hemograma num aparelho de automação hematológica (Colter, modelo MD II), no Hospital de Guarnição (Florianópolis, SC). O sangue foi incubado a 37°C por 30 minutos e depois centrifugado a 2.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante (soro) foi separado e conservado a -20°C, para a avaliação dos níveis de imunoglobulina G.

3.8. Avaliação dos níveis séricos de imunoglobulina G contra glioma C6

Células de glioma C6, em meio de cultura DMEM (SFB), foram transferidas para uma placa de 96 poços (10^4 por poço). Para a adesão das células, a placa foi mantida por 12 horas a 4°C. O meio de cultura foi retirado, as células lavadas 5 vezes com PBS, e depois fixadas com paraformaldeído a 4%, por 10 minutos. As células foram novamente lavadas 5 vezes com PBS e o soro foi diluído em PBS em concentrações seriadas, sendo a primeira de 1:5 (20µl de soro para 80µl de PBS) até a diluição de 1:5120 em relação a todos os grupos (S, I, D/I e I/D). O soro de 5 animais de cada grupo foi diluído em triplicata. As células do glioma C6 foram incubadas com o soro por 1 hora à

37°C, e depois cada poço foi lavado 3 vezes com PBS. A seguir, a cada poço foi adicionado anticorpo anti-IgG de rato conjugado com peroxidase, na diluição de 1:200 por 1 hora a 37°C. A revelação foi realizada através de uma reação colorimétrica utilizando orto-fenil-diamino (kit ELISA -ABBOTT, 1 pastilha OPD, diluída em 5ml de diluente de OPD) por cerca de 20 minutos, a temperatura ambiente. A reação foi terminada com adição de 50µl de ácido sulfúrico 1N. A absorbância de cada poço (proporcional à presença de imunoglobulina G) da placa foi realizada numa leitora de ELISA (Biotech Instruments) a 490nm.

3.9. Avaliação da progressão tumoral

3.9.1. Preparação histológica do cérebro de ratos

Depois de 15 dias da inoculação intracerebral de células de glioma C6, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso, via i.p.) e decapitados. Os encéfalos foram retirados por incisão da calota craniana na altura da sagital, com posterior incisão da base do crânio. Os encéfalos foram mantidos em paraformaldeído a 4%, durante 24 horas. A seguir, as peças foram imersas em solução de sacarose a 20% em PBS (pH 7,4) durante 24 horas. Cortes prévios foram realizados num aparelho fatiador de tecidos (Mcliwain), para a delimitação da área tumoral no sítio de inoculação. Os cortes foram realizados a cerca de 2 mm antes e depois das bordas da região tumoral. Secções de 30 µm de espessura foram obtidas utilizando um micrótomo de congelamento (Leica CM 1324). Os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro, previamente gelatinizadas, para coloração

com hematoxilina-eosina (HE) e depois visualizadas em microscópio óptico.

3.9.2. Determinação da área tumoral

As lâminas coradas com HE foram escaneadas e os arquivos gravados no formato "bmp". Em seguida, as imagens foram convertidas para "jpeg" (um formato menor, sem perda de qualidade visual) para análise utilizando recursos do software "Auto-Cad". A imagem foi ampliada na tela do monitor e as bordas do tumor foram marcadas com o recurso "Spline". O objeto foi contornado, com a opção "inquiry", e em seguida, com o recurso "área", o valor da área tumoral (em mm²) foi determinado.

3.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de Tukey. A análise da sobrevivência foi avaliada pelo teste de Fischer. Para a análise dos níveis séricos de IgG foi utilizado o teste de Bonferroni. Para a significância dos dados foi considerado $p < 0,05$. Os dados foram analisados através do programa estatístico PRISM (Versão 3.0).

4. RESULTADOS

4.1. Progressão tumoral de glioma C6

Ratos foram inoculados intracerebralmente com células de glioma C6 e depois de 15 dias, sacrificados e obtidos cortes histológicos para avaliar a progressão tumoral. As Figuras 1 e 2 mostram imagens representando a região tumoral do cérebro de ratos inoculados com células de glioma C6.

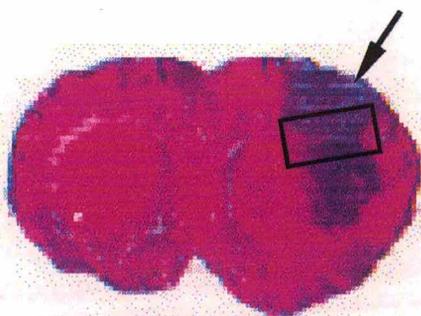


Figura 1. Secção frontal do cérebro de rato inoculado com glioma C6 (15º dia). Corte com $30\mu\text{m}$ de espessura, corado com hematoxilina e eosina (HE). A área escura (indicada pela seta) representa o local de inoculação e progressão tumoral.



Figura 2. Padrão morfológico da progressão tumoral e infiltração do glioma C6, delimitado pelo quadro indicado na Figura 1 (aumento de 200X).

A área tumoral no cérebro de ratos, como indicada na Figura 1, foi quantificada nos grupos inoculado (I), inoculado e derrotado (I/D) e derrotado e inoculado (D/I). Os diferentes tratamentos dos animais resultaram em alterações significativas na progressão tumoral nos grupos analisados, como mostra a Figura 3. Os grupos inoculado/derrotado (I/D) e derrotado/inoculado (D/I), apresentaram um aumento significativo da área de progressão tumoral de cerca de 69% ($p < 0,001$) e 41% ($p < 0,01$), respectivamente, quando comparado ao grupo apenas inoculado (I). Entre os grupos derrotados, também foi observada uma diferença significativa; o grupo I/D apresentou uma progressão tumoral de cerca de 19% maior que o grupo D/I ($p < 0,05$).

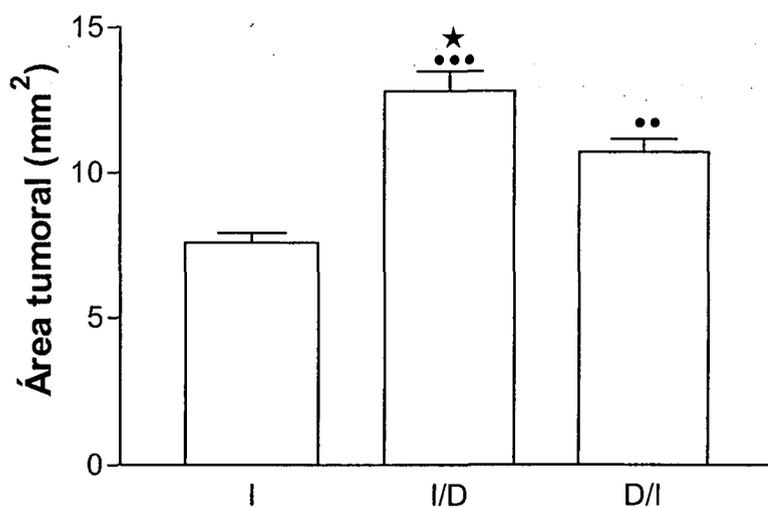


Figura 3. Progressão tumoral (mm²) de glioma C6 no cérebro de ratos e submetidos a dupla derrota social (n=13 por grupo). As colunas indicam as médias da área tumoral em mm² e as barras o erro padrão da média (EPM).

●● e ●●● indicam a significância dos grupos inoculado/derrotado (I/D) e derrotado/inoculado (D/I) em relação ao grupo inoculado (I), para $p < 0,01$ e $p < 0,001$ (Teste de Tukey), respectivamente.

★ indica significância entre os grupos I/D e D/I ($p < 0,05$).

4.2. Sobrevivência

Cinco animais de cada grupo experimental foram mantidos em observação por até 60 dias, para determinar a sobrevivência. Os animais inoculados e/ou submetidos a derrota social mostraram diferenças significativas na avaliação da sobrevivência (Figura 4). Todos os animais controle (S) sobreviveram um período bem maior do que os 60 dias avaliados. No entanto, animais inoculados com células de glioma C6 (grupo I) apresentaram uma redução bastante acentuada no tempo médio de sobrevivência, que foi de 41,4 dias. O grupo D/I teve uma redução significativa da sobrevivência (34,8 dias), cerca de 16% menor, quando comparado ao grupo I ($p < 0,01$). A menor sobrevivência foi observada no grupo I/D, com uma média de apenas 27,4 dias, ou seja, uma diminuição de 34%, se comparado ao grupo I ($p < 0,001$). As diferenças também foram significativas na sobrevivência entre os dois grupos derrotados, D/I e I/D ($p < 0,01$).

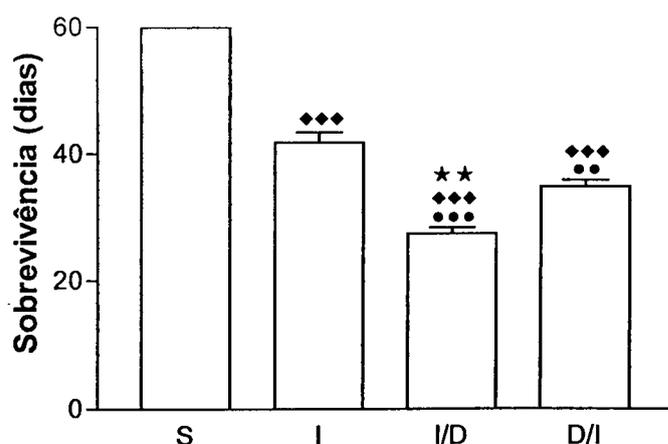


Figura 4. Sobrevivência de ratos inoculados com glioma C6 e submetidos a derrota social (n = 5 por grupo). As colunas indicam as médias (em dias) e as barras o EPM.

◆◆◆ indica a significância ($p < 0,001$, Teste de Fischer) em relação ao grupo salina (S).

●● e ●●● indicam a significância em relação ao grupo I, para $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

★★ indica significância entre os grupos I/D e D/I ($p < 0,01$).

4.3. Avaliação motora

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar os efeitos dos tratamentos na atividade motora (mobilidade e ação exploratória). Os resultados mostraram diferenças significativas na atividade motora (número de cruzamentos) nos grupos inoculados e/ou derrotados, quando comparados antes (inicial) e depois (final) dos tratamentos (Figura 5). Todos os animais inoculados e/ou derrotados mostraram uma redução da atividade motora, comparado ao grupo controle (S). O grupo inoculado com solução salina (S) não apresentou diferenças entre a avaliação inicial e final. A inoculação de células de glioma C6 (grupo I) foi suficiente para reduzir significativamente a atividade motora ($p < 0,05$). O resultado mais acentuado foi observado no grupo I/D, mostrando que a inoculação de glioma C6, seguida de dupla derrota, reduziu em 52% ($p < 0,001$), a atividade motora dos animais. A atividade motora dos animais derrotados e inoculados (grupo D/I), foi reduzida em cerca de 26% ($p < 0,05$); mas não foi diferente dos animais apenas inoculados (grupo I). Ao contrário, pode ser observada uma redução significativa da atividade motora no grupo I/D, quando comparados ao grupo I ($p < 0,01$). Os grupos derrotados, I/D e D/I, também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,001$).

O teste de campo aberto também permitiu avaliar a atividade motora pelo número de explorações verticais (Figura 6). A inoculação com salina (grupo S) ou com células de glioma (grupo I) não afetou a atividade de exploração vertical dos animais. Entretanto, nos animais derrotados pode ser observada uma redução significativa da atividade exploratória no grupo I/D em

42% ($p < 0,001$) e em 18%, no grupo D/I ($p < 0,05$). A comparação entre os grupos I/D e D/I, também apresentou uma diferença significativa ($p < 0,001$).

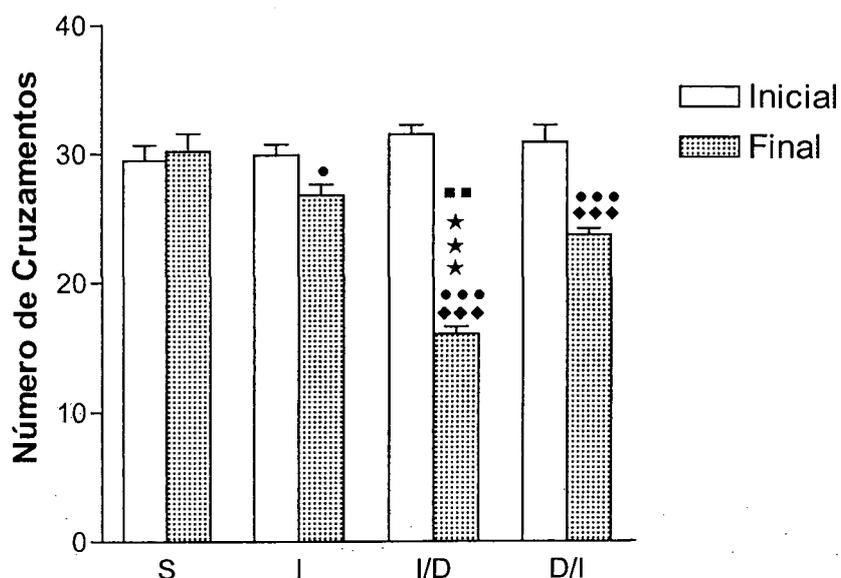


Figura 5. Atividade motora em ratos inoculados com glioma C6 e submetidos a derrota social ($n = 12$ por grupo). Os dados expressam o número de cruzamentos no teste de campo aberto, antes (inicial) e depois (final) dos tratamentos. As colunas indicam as médias e as barras o EPM.

- e ••• indicam a significância ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) no mesmo grupo (Teste de Tukey).
- ◆◆◆ indica a significância ($p < 0,001$) em relação ao grupo salina (S).
- indica a significância entre os grupos I/D e I ($p < 0,01$).
- ★★★ indica a significância ($p < 0,001$) entre os grupos I/D e D/I.

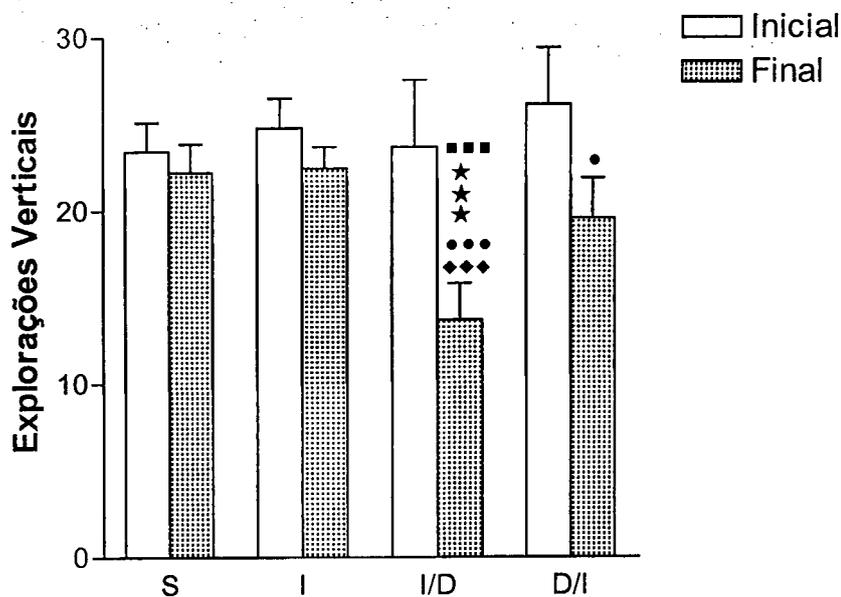


Figura 6. Atividade motora (explorações verticais no teste de campo aberto) em ratos inoculados com glioma C6 e submetidos a derrota social (n=12 por grupo). As colunas indicam as médias e as barras o EPM.

• e ••• indicam a significância no mesmo grupo, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (Teste de Tukey).

◆◆◆ indica a significância em relação ao grupo S ($p < 0,001$).

■■■ indica a significância entre os grupos I/D e I ($p < 0,001$).

★★★ indica a significância entre os grupos I/D e D/I ($p < 0,001$).

4.4. Níveis séricos de imunoglobulina G (IgG) contra glioma C6

Neste experimento foi avaliada a resposta imunológica (presença de imunoglobulina G) de animais dos diferentes grupos experimentais contra as células de glioma C6, inoculadas no cérebro de ratos. Os níveis de imunoglobulina G (IgG) no soro dos animais inoculados (I), derrotados e inoculados (D/I) e inoculados e derrotados (I/D) foram significativamente maiores do que no grupo salina (S), nas diluições de 1:5 até 1:40 ($p < 0,01$) (Figura 7). Os níveis de IgG nos grupos I e D/I foram maiores do que no grupo salina (S) até a diluição de 1:80 ($p < 0,01$). Ao contrário, no grupo I/D, os níveis de IgG foram maiores do que no grupo salina, apenas até a diluição de 1:40 ($p < 0,01$). Também pode ser observado que o grupo inoculado e depois derrotado (I/D), apresenta níveis de IgG significativamente menores que os grupos inoculado (I) e derrotado e inoculado (D/I) nas diluições de 1:5 até 1:40 $p < 0,01$.

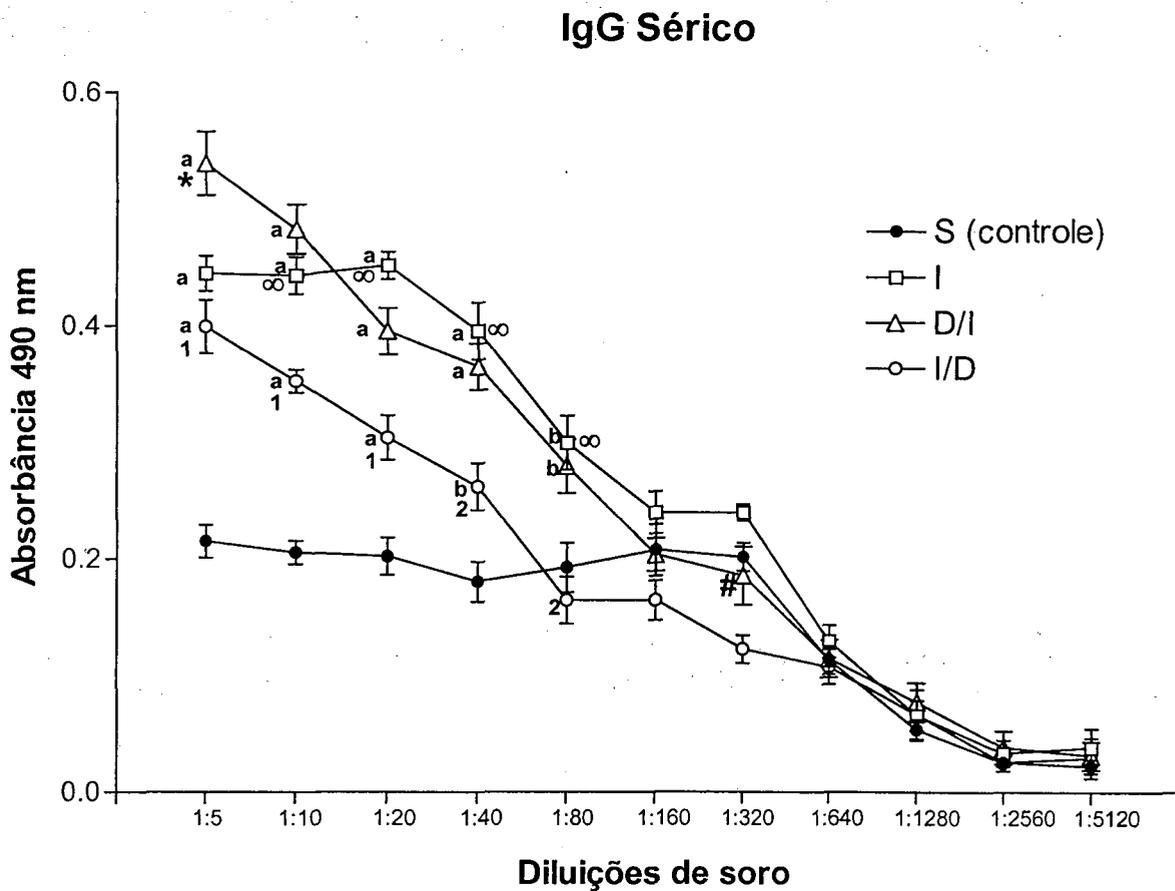


Figura 7. Níveis séricos de imunoglobulina G (IgG) contra glioma C6 em ratos inoculados e submetidos a derrota social (n = 5 por grupo). Os pontos indicam as médias e as barras o EPM.

a ($p < 0,001$) e b ($p < 0,01$) indicam significância (Teste de Bonferroni) em relação ao grupo salina (S).

1 ($p < 0,001$) e 2 ($p < 0,01$) indicam significância entre os grupos I/D e D/I.

* ($p < 0,01$) e # ($p < 0,05$) indicam significância entre os grupos I e D/I.

∞ ($p < 0,001$) e ε ($p < 0,01$) indicam significância entre os grupos I e I/D.

4.5. Hemograma

A contagem de células sanguíneas da série branca, linfócitos, granulócitos e monócitos é um dos vários parâmetros de resposta imunológica de animais. A contagem de linfócitos foi reduzida significativamente, apenas no grupo inoculado e derrotado (I/D), quando comparado ao grupo salina (S) ($p < 0,05$) e ao grupo derrotado e inoculado (D/I) ($p < 0,05$) (Figura 8). Não foram observadas diferenças entre os grupos D/I, I e controle (S). A Figura 9A mostra que o grupo I/D também apresentou uma redução significativa no número de granulócitos, comparado ao grupo salina ($p < 0,01$). Uma redução na contagem de monócitos foi observada apenas nos animais inoculados (I), quando comparados aos animais controle (S) ($p < 0,05$) (Figura 9B).

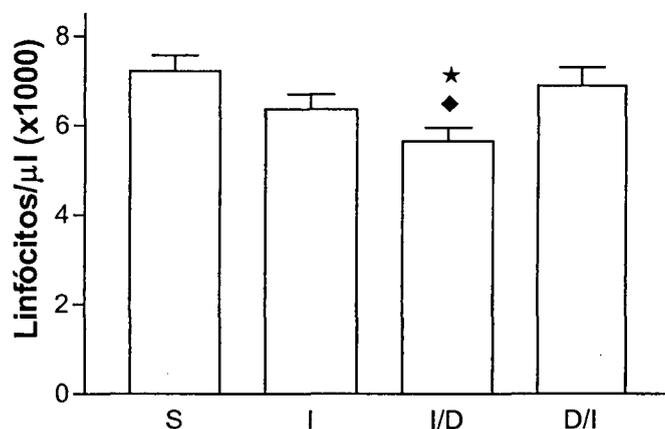


Figura 8. Contagem de linfócitos (por μ l) no sangue de ratos inoculados com glioma C6 e submetidos a derrota social ($n=13$ por grupo). As colunas indicam as médias e as barras o EPM.

- ◆ indica a significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo salina (Teste de Tukey).
- ★ indica a significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo D/I.

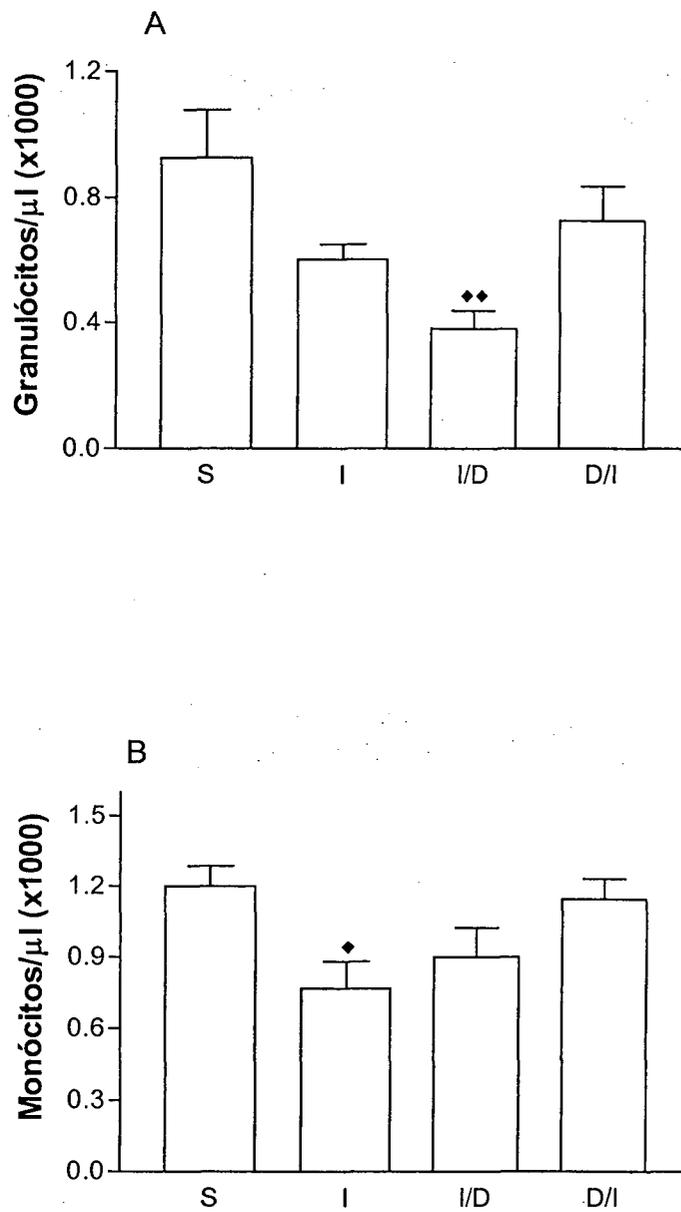


Figura 9. Contagem de granulócitos (A) e monócitos (B) no sangue de ratos inoculados com glioma C6 e submetidos a derrota social (n=13 por grupo). As colunas indicam a média do número de células (por μ l) e as barras o EPM.

♦ e ♦♦ indicam a significância ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) em relação ao grupo salina (S) (Teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito da derrota social na progressão tumoral

O modelo de residente-intruso tem sido utilizado dentre outras finalidades para induzir derrota social ao animal "intruso", provocando neste uma situação de estresse, que afeta a resposta imunológica (Bohus *et al.*, 1993; Tuchscherer *et al.*, 1998; Stefanski, 2001). Neste trabalho foi avaliado o efeito da derrota social na progressão tumoral de ratos inoculados intracerebralmente com células de glioma C6. Para verificar se a derrota social poderia influenciar na progressão tumoral, foram realizados 4 tratamentos: animais inoculados com salina (grupo S, controle), animais inoculados com células de glioma C6 (grupo I, progressão tumoral, sem derrota social), animais inoculados com glioma e depois submetidos a derrota social (grupo I/D) e animais derrotados e depois inoculados (grupo D/I). A progressão tumoral no grupo inoculado (I) foi menor do que nos grupos derrotado/inoculado (D/I) e inoculado/derrotado (I/D). Estes resultados mostraram que a derrota social favoreceu ainda mais a progressão tumoral do que em ratos somente inoculados com as células de glioma. Estudos anteriores demonstraram que a derrota social aumentou a progressão tumoral em ratos (Stefanski e Ben-Eliyahu, 1996; Stefanski, 2001) e em humanos (Hislop *et al.*, 1987; Cassileth *et al.*, 1988; Eli *et al.*, 1992). A progressão do glioma no grupo I se dá primariamente pela capacidade deste tipo de tumor em inibir parcialmente as funções do sistema imune (Plate e Mennel, 1995). Estudos sugerem que o glioma C6 secreta citocinas que podem favorecer sua progressão, como TGF β

e VEGF (Plate *et al.*, 1994; Van Meir, 1995). Em humanos foi demonstrado que os glioblastomas produzem e secretam mediadores imunossupressivos que inibem a função imunológica sendo que o grau de imunossupressão depende principalmente do tamanho do tumor (Morford *et al.*, 1997). Estudos têm demonstrado que a secreção de TGF β pelo glioma provoca a diminuição da expressão de marcadores de superfície em monócitos, diminuição de secreção de citocinas, e diminuição da responsividade de linfócitos T (Black *et al.*, 1992; Olofsson *et al.*, 1992). Hughes *et al.* (1995) demonstraram que a desativação funcional de monócitos pode causar imunossupressão. Os monócitos e macrófagos têm um papel chave na regulação do sistema imune e tanto TGF β e IL-10 são importantes desativadores destas células. Os resultados dos trabalhos citados acima confirmam a capacidade de fixação e progressão tumoral no grupo I.

A progressão tumoral nos animais derrotados e depois inoculados (D/I) foi menor do que nos animais inoculados e derrotados (grupo I/D). Este resultado sugere que a derrota social antes da inoculação das células resultaria numa resposta imunológica mais eficiente em relação a progressão tumoral. Coover *et al.* (1973) mostraram que ratos submetidos a um estresse repetitivo, apresentaram altos níveis de corticosterona na primeira sessão e um decréscimo nas seguintes. Recentemente, Carobrez *et al.* (2002) demonstraram que ratos submetidos a dupla derrota social e subsequentemente injetados com uma dose subletal de LPS apresentaram níveis plasmáticos de interleucina 1 beta (IL-1 β) aumentados e diminuição nos níveis de corticosterona. Esses resultados sugerem que a resposta imune mais eficiente no grupo D/I seria devido a dupla derrota, que diminuiria os níveis de

corticosterona, e conseqüentemente ocorrendo o favorecimento de algumas respostas imunológicas nos dias subseqüentes. Assim, quando o animal do grupo D/I foi inoculado com glioma C6, a resposta imune estaria mais favorecida, devido a derrota prévia. Os dados de Carobrez *et al.* (2002), indicariam que uma diminuição dos níveis plasmáticos de corticosterona pode ter sido a causa desta menor progressão tumoral, nos animais previamente derrotados. Apesar disso, com a instalação do glioma, este poderia estar secretando citocinas que estimulariam a progressão tumoral e inibição do sistema imunológico. Os resultados no grupo D/I sugerem que o tempo decorrido após a derrota social pode gerar modificações na ativação do eixo HPA, gerando diferentes conseqüências imunológicas entre os grupos e finalmente resultando na menor progressão tumoral no grupo D/I. Este resultado seria decorrente de uma provável reorganização nos centros superiores de mediação de estresse que poderiam induzir modificações na resposta do eixo HPA resultando em melhor resposta imune após a inoculação. Quan *et al.* (2001) sugerem que ocorreriam mudanças nos receptores para corticosterona no SNC e no sistema imunológico. Este fato poderia gerar diferenças no comportamento como também no curso da progressão tumoral. O procedimento de inoculação, realizado em todos os grupos, também poderia gerar respostas inflamatórias locais, pela lesão na dura-máter e conseqüentemente liberação de citocinas pró-inflamatórias. Assim, o procedimento cirúrgico para a implantação do glioma C6 ou inoculação de salina, provoca lesão na duramáter e cérebro, e conseqüentemente dispara eventos de inflamação neurogênica (Ebersberger *et al.*, 1999; Esposito *et al.*, 2001).

O desenvolvimento tumoral encontrado no grupo I/D, com aumento significativo em relação ao grupo I e ao grupo D/I poderia ser o resultado da presença de maiores concentrações de citocinas tumorais. Após a primeira derrota social (aguda), a mobilização do sistema imune estaria suprimida uma vez que os níveis de corticosterona estariam altos (Coover *et al.*, 1973; Carobrez *et al.*, 2002) e estariam inibindo a resposta imune para o glioma C6. Após a segunda derrota, a diminuição nos níveis de corticosterona e aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas, levaria a uma melhora da resposta imunológica, mas o glioma instalado há 10 dias, estaria secretando fatores que neutralizariam esta resposta, favorecendo a progressão tumoral. Koolhaas *et al.* (1997) demonstraram que a dinâmica temporal do estresse é um dos principais fatores que diferenciam as conseqüências do estresse e, portanto, a aplicação antes e depois da inoculação intracerebral do glioma C6 traz conseqüências que refletem na diferença de progressão tumoral entre os dois grupos derrotados.

5.2. Sobrevivência e atividade motora

Estudos anteriores têm demonstrado que o glioma C6 apresenta características bastante agressivas, resultando numa sobrevida curta (Tseng *et al.*, 1997; Soares, 2001). Os dados de sobrevivência refletem os resultados do desenvolvimento da progressão tumoral. Os animais inoculados e depois derrotados (grupo I/D), derrotados e inoculados (grupo D/I) e inoculados (grupo I) apresentaram a maior progressão tumoral e a menor sobrevida,

respectivamente. Morford *et al.* (1997) demonstraram, em humanos, que quanto maior o tumor, mais fatores imunossupressores são produzidos e, portanto, menor a sobrevida média dos pacientes.

Os animais inoculados e/ou submetidos a derrota social tiveram redução de mobilidade. A redução de atividade motora também foi mais acentuada no grupo inoculado e depois derrotado (grupo I/D), o mesmo que apresentou a maior progressão tumoral e a menor sobrevida média. Assim, é possível que a progressão tumoral tenha comprometido primariamente as funções motoras dos animais. Deve ser ressaltada, que a inoculação do glioma foi realizada na região do caudado e putâmem, envolvidas em atividades motoras (Brodal, 2000). Por outro lado, a derrota social pode ter contribuído também para uma diminuição da atividade exploratória dos animais derrotados (Siegfried *et al.*, 1984). A avaliação motora dos animais derrotados e depois inoculados (grupo D/I) foi avaliada 20 dias após a segunda derrota; no grupo inoculado e derrotado (I/D) o teste foi realizado após 5 dias. Esta diferença no período decorrido após a derrota, poderia afetar de modo diferente a atividade motora.

5.3. Resposta imunológica (IgG) e hemograma

Parâmetros imunológicos (níveis de imunoglobulinas G e contagem de linfócitos, granulócitos e monócitos) foram avaliados em animais inoculados e/ou submetidos a derrota social. A resposta imunológica (níveis séricos de IgG contra as células de glioma C6) foram também menores nos animais inoculados e depois derrotados (grupo I/D), os mesmos que apresentaram

maior progressão tumoral. Os linfócitos T citotóxicos têm a função de eliminar células tumorais e células infectadas por vírus, enquanto os linfócitos T auxiliar (Th_1) ativam linfócitos T citotóxicos (Tc) os linfócitos Th_2 funcionam auxiliando a função de linfócitos B e conseqüentemente a produção de imunoglobulinas (Aschner, 1998). A IL-6 é a principal citocina envolvida na diferenciação de linfócitos B e a síntese de imunoglobulina (Aschner, 1998). Pisa *et al.* (1992) demonstraram que os gliomas produzem e secretam IL-10 e que esta citocina tem efeito inibitório sobre a síntese de IL-6. Este resultado sugere que a redução na resposta ao imunógeno no grupo que I/D seja resultado da maior produção de IL-10 pelas células tumorais, uma vez que a progressão tumoral neste grupo foi maior. A produção de TGF- β pelo glioma pode ter induzido a redução no número e na atividade dos linfócitos T auxiliar e conseqüente diminuindo a síntese e liberação de IL-6 o que comprometeu a produção de imunoglobulinas (Hishii *et al.*, 1995). Estudos têm demonstrado que linfócitos sangüíneos periféricos, obtidos de pacientes com gliomas malignos respondem fracamente a mitógenos e antígenos (Roszman *et al.*, 1987; Urbani *et al.*, 1995).

Em seu estudo, Stefanski e Engler (1998) observaram que em animais derrotados, mas não portadores de tumores ocorre um aumento no número de granulócitos, diminuição do número de linfócitos T. Assim, como conseqüência da redução em número e das características funcionais de linfócitos T auxiliar poderia levar a uma diminuição da produção de IL-6 e conseqüentemente gerar a diminuição nos níveis de IgG sérico pelos linfócitos B. Shakar e Ben-Eliyah (1998) demonstram que os glicocorticóides e as catecolaminas podem afetar a adesão e o padrão de circulação de células imunes, promovendo diminuição da

resposta de proliferação de linfócitos T e B e ainda diminuição da atividade citotóxica das células NK o que ocorre na derrota social. Cabe salientar, que no grupo I/D foi observada a maior progressão tumoral que indicaria que a derrota social aplicada após a inoculação do glioma C6 resultaria em menor resposta ao imunógeno de C6.

O número de linfócitos totais no grupo I/D apresentou uma significativa redução quando comparado ao grupo salina e derrotado e depois inoculado (D/I). Stefanki (2001) também observou uma redução no número e na atividade dos linfócitos T e B circulantes e aumento na proliferação de células tumorais no pulmão. Em humanos portadores de gliomas cerebrais também se observou uma redução destes mesmos parâmetros imunológicos (Dix *et al.*, 1999). A diferença no número de linfócitos totais, entre os grupos I/D e D/I, poderia estar relacionada com o tempo decorrido depois da dupla derrota social.

O grupo I/D também apresentou redução na contagem de granulócitos em relação ao grupo salina. Stefanski e Engler (1998) mostraram que animais submetidos a uma derrota social de 2 horas apresentaram granulocitose. No grupo I/D (animais submetidos uma segunda derrota social), a secreção de fatores imunossupressores pelo glioma C6 e a mobilização de células do sistema imune para outros tecidos poderia levar a uma diminuição nos níveis plasmáticos de granulócitos.

Os monócitos são importantes para a regulação dos linfócitos T, funcionando como células apresentadoras de antígenos e secretando citocinas que modulam a resposta imunológica. Monócitos obtidos de pacientes com glioma apresentaram redução na sua capacidade de apresentação de antígenos. Além disso, os gliomas foram capazes de exercer um efeito redutor

no número de monócitos circulantes (Woiciechowsky *et al.*, 1998). Os resultados indicaram uma redução no número de monócitos circulantes nos animais inoculados e/ou derrotados. No entanto, apenas no grupo inoculado a redução foi significativa, sugerindo que a dupla derrota social poderia ter afetado este resultado.

Em conjunto, estas alterações nos parâmetros imunológicos poderiam explicar a maior progressão tumoral dos animais do grupo I/D.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo foi avaliado o efeito da derrota social sobre a progressão tumoral de glioma C6 inoculado no cérebro de ratos.

1. A progressão tumoral nos grupos inoculado e depois derrotado (I/D) e derrotado e depois inoculado (D/I) aumentou 69% e 41%, respectivamente, em relação ao grupo inoculado (I);
2. A atividade motora dos animais dos grupos I/D e D/I foi reduzida em 52% e 26%, respectivamente.
3. Os animais I/D e D/I sofreram uma redução da sobrevivência de 34% e de 16%, respectivamente, quando comparados ao grupo I.
4. Os níveis séricos de IgG contra glioma C6 aumentaram em todos os grupos, entretanto no grupo I/D este aumento foi menor. O grupo I/D também apresentou redução no número de linfócitos e de granulócitos.
5. A derrota social em ratos aumentou a progressão tumoral de glioma C6 e reduziu a sobrevivência e a resposta imunológica dos animais.

6. BIBLIOGRAFIA

- ANISMAN, H.; LU, Z.W.; SONG, C.; KENT, P.; McINTYRE, D.C. E MERALY, Z. **Influence of psychogenic and neurogenic stressor on endocrine and immune activity: differential effects in fast and slow seizing rat strains.** Behav. Immunity 11: 63-74, 1997.
- ASCHNER, M. **Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS.** Neurotoxicology 19: 269-282, 1998.
- AUSIELLO, C.M.; PALMA, C.; MALCCI, A.; SPAGNOLI, G. E AMICI, C. **Cytotoxicity and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells of glioma patients.** Eur. J. Cancer 27: 646-650, 1991.
- BARNETT, S.A. **The rat: a study in behavior.** Chicago Univ. Press, Chicago, 1975.
- BAUER, M.E.; VEDHARA, K.; PERKS, P.; WILCOCK, G.K.; LIGHTMAN, S.L. E SHANKS, N. **Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids.** J. Neuroimmunol. 103: 84-92, 2000.
- BENDA, P.; LIGHTBODY J.; SATO, G.; LEVINE, L. E SWEET, W. **Differentiated rat glial cell strain in tissue culture.** Science 161: 370-371, 1968.

BERNSTEIN, J.J. E WOODARD, C.A. **Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels.** *Neurosurgery* 36: 124-132, 1995.

BOHUS, B.; KOOLHAAS, J.M.; HEIJNEN, C.J.; E de BOER, S.F. **Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping abilities.** *Neuropsychobiology* 28: 95-99, 1993.

BLACK, K.L.; CHEN, K.; BECKER, D.P. E MERRIL, J.E. **Inflammatory leukocytes associated with increased immunosuppression by glioblastoma.** *J. Neuroimmunol.* 77: 120-126, 1992.

BLANCHARD, R.J. E BLANCHARD, D.C. **Aggressive behavior in the rat.** *Behav. Biol.* 21: 197-224, 1977.

BLANCHARD, R.J.; FUKUNAGA, K.; BLANCHARD, D.C. E KELLEY, M.J. **Conspecific aggression in the laboratory rat.** *J. Comp. Physiol.* 89: 1204-1209, 1975.

BLANCHARD, R.J.; MCKITTRICK, C.R. E BLANCHARD, D.C. **Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems.** *Physiol. Behav.* 73: 261-271, 2001.

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

BRAIN, P.F.; BENTON, D.; HOWELL, P.A. E JONES, S.E. **Resident rats' aggression toward intruders.** Anim. Learn. Behav. 8: 331-335, 1980.

BRODAL, A. **Anatomia neurológica e suas correlações clínicas.** Editora Roca, 2000.

BROOKS, W.H.; NETSKI, M.G.; NORMANSELL, D.E. E HORWITZ, D.A. **Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors. Characterization of humoral immunosuppressive factor.** J. Exp. Med. 13: 1631-1647, 1972.

BUTTON, P.N.; COATES, A.S. E DUNN, S.M. **Psychosocial predictors of survival metastatic breast cancer.** Ann. Oncol. 11: 469-474, 2000.

BUWALDA, B.; FELSZEGHY, K.; HORVÁTH, K.M.; NYASKAS, C.; de BOER, S.F.; BOHUS, B. E KOOLHAAS, J.M. **Temporal and spatial dynamics of corticosteroid receptor down-regulation in rat brain following social defeat.** Physiol. Behav. 72: 349-354, 2001.

CAROBREZ, S.G.; GASPAROTTO, O.C.; BUWALDA, B. E BOHUS, B. **Long-term consequences of social stress on corticosterone and IL-1 β levels in endotoxin-challenged rats.** Physiol. Behav. 76: 99-105, 2002.

CASSILETH, B.R.; WALSH, W.P. E LUSK, E.J. **Psychosocial correlates of cancer survival: a subsequent report 3 to 8 years after cancer diagnosis.** J. Clin. Oncol. 6: 1753-1759, 1988.

COOVER, G.D.; URSIN, H. AND LEVINE, S. **Plasma-corticosterone levels during active-avoidance learning in rats.** J. Comp. Psychol. 82: 170-174, 1973.

DAL-ZOTO, S.; MARTÍ, O. E ARMARIO, A. **Is repeated exposure to immobilization needed to induce adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? Influence of adrenal factors.** Behav. Brain Res. 129: 187-197, 2002.

D'AQUILA, P.S.; BRAIN, P. E WILLNER, P. **Effects of chronic mild stress on performance in behavioral tests relevant to anxiety and depression.** Physiol. Behav. 56: 861-867, 1994.

DHABHAR, F.S. E McEWEN, B.S. **Stress-induced enhanced of antigen-specific cell-mediated immunity.** J. Immunol. 156: 2608-2615, 1996.

DIX, A.R.; BROOKS, W.H.; ROSZMAN, T.L. E MORFORD, L.A. **Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors.** J. Neuroimmunol. 100: 216-232, 1999.

EBERSBERGER, A.; AVERBECK, B.; MESSLINGER, K. E REEH, P.W. **Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E₂ from rat dura-mater encephalic following electrical and chemical stimulation *in vitro*.** Neuroscience 89: 901-907, 1999.

ELL, K.; NISHIMOTO, R.; MEDIANSKY, L.; MANTELL, J. E HAMOVITCH, M. **Social relations, social support and survival among patients with cancer.** J. Psychosom. Res. 36: 531-541, 1992.

ELLIOT, L.H.; BROOKS, W.H. E ROSZMAN, T.L. **Cytokinetic basis for the impaired activation of lymphocytes from patients with primary intracranial tumors.** J. Immunol. 132: 1208- 1215, 1984.

ELLIOT, L.H.; BROOKS, W.H. E ROSZMAN, T.L. **Role of interleukin-2 and IL-2 receptor expression in the proliferative deficit observed in mitogen-stimulated lymphocytes from patients with glioma.** J. Natl. Cancer Inst. 78: 919-922, 1987.

ESPOSITO, P.; GHEORGHE, D.; KANDERE, K.; PANG, X.; CONNOLLY, R.; JACOBSON, S. E THEOHARIDES, T.C. **Acute stress increases permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells.** Brain Res. 888: 117-127, 2001.

FRANCIS, D.D.; CALDJI, C.; CHAMPAGNE, F.; PLOTSKY, P.M. E MEANEY, M.J.

The role of corticotropin-releasing factor norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. Biol. Psychiatry 46: 1153-1166, 1999.

GARDSSEN, B. E GOOKIN, A. **On the role of immunological factors as**

mediators between psychological factors and cancer progression. Psychiatry Res. 85: 51-61, 1999.

GIOVARELLI, M.; SANTONI, A.; JEMMA, C.; MUSSO, T.; GIUFRIDA, A.M.;

CAVALLO, G.; LANDOLFO, S. E FORNI, G. **Obligatory role of INF-gamma in induction of lymphokine-activated and T-lymphocyte killer activity, but not in boosting of natural cytotoxicity.** J. Immunol. 141: 2831-2836, 1988.

HERMAN, J.P. E CULLINAN, W.E. **Neurocircuitry of stress, central control of**

the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. Trends Neurosci. 20: 78-84, 1997.

HERMANN, G.; BECK, F.M. E SHERIDAN, J.F. **Stress-induced glucocorticoid**

response modulates mononuclear cell trafficking during an experimental influenza viral infection. J. Neuroimmunol. 56: 179-186, 1995.

HILL, J.R.; KURYAMA, N.; KURIAM H. E ISRAEL, M.A. **Molecular genetics of**

brain tumors. Arch. Neurol. 56: 439-441, 1988.

HISHII, M.; NITTA, T.; ISHIDA, H.; EBATO, M.; KUROSU, A.; YAGITA, H.; SATO, K. E OKUMURA, K. **Human glioma-derived interleukin-10 inhibits antitumor immune responses in vitro.** *Neurosurgery* 37: 1160-1166, 1995.

HISLOP, T.G.; WAXLER, N.E.; COLDMAN, A.J.; ELWOOD, J.M. E KAN, L. **The prognostic significance of psychosocial factors in women with breast cancer.** *J. Chronic Dis.* 40: 729-735, 1987.

HOLLADAY, F.P.; CHOUDHURI, R.; HEITZ, T. E WOOD, G.W. **Generation of cytotoxic immune response during the progression of rat glioma.** *Neurosurgery* 80: 90-96, 1994.

HUETTNER, C.; CZUB, S.; KERDAU, S.; ROGGENDORF, W. E TONN, J.C. **Interleukin 10 is expressed in human gliomas *in vivo* and increases glioma cell proliferation and motility *in vitro*.** *Anticancer Res.* 17: 3217-3224, 1997.

HUGHES, A.D.; SCHIFFRIN, E.J. E HUGGETT, A.C. **Expression of MHC antigens by intestinal epithelial cells. Effect of transforming growth factor-beta 2 (TGF-beta 2).** *Clin. Exp. Immunol.* 99: 240-244, 1995.

KIELCOLT-GLASER, J.K. E GLASER, R. **Psychoneuroimmunology and health consequences: data and shared mechanisms.** *Psychosom. Med.* 57: 269-274, 1995.

KIEFER, R.; SUPLER, M.L.; TOYLKA, K.V. E STREIT, W.J. **In situ detection of transforming growth factor-beta mRNA in experimental rat glioma and reactive glial cells.** Neuroscience 166: 2161-2164, 1994.

KOOLHAAS, J.M.; MEERLO, P.; DE BOER, S.F.; STRUBBE, J.H. E BOHUS, B. **The temporal dynamics of stress response.** Neurosci. Biobehav. Rev. 223: 775-782, 1997.

LEONARD, B.E. E MILLER, K. **Stress, the immune system and psychiatry.** John Wiley & Sons. New York, 1995

LÓPEZ, J.F.; AKIL, H. E WATSON, S.J. **Role of biological and psychological factors in early development and their impact on adult life: neural circuits mediating stress.** Biol. Psychiatry 46: 1461-1471, 1999.

MAHALEY, M.S.; GENTRY, R.E. E BIGMER, D.D. **Immunobiology of primary intracranial tumors.** J. Neurosurg. 47: 35-43, 1977.

MAUNSELL, E.; BRISSON, J.; MONDOR, M.; VERREALT, R. E DESCHCNES, L. **Stressfull life events and survival after breast cancer.** Psychosom. Med. 63: 306-315, 2001.

MEERLO, P.; OVERKAMP G.J.; KOOLHAAS, J.M.; **Behavioral and Physiological consequences of a single social defeat in Roman high-and low-avoidance rats.** Psychoneuroendocrinology. 22 (3)155-168, 1997.

McCABE, P.M.; SHERIDAN, J.F.; WEISS, J.M.; KAPLAN, J.P.; NATELSON, B.H. E PARE, W.P. **Animal models of disease.** *Physiol. Behav.* 68: 501-507, 2000.

McEWEN, B.S. **The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance.** *Brain Res.* 886: 172-189, 2000.

McEWEN, B.S.; BIRON, C.A.; BRUNSON, K.W.; BULLOCK, K.; CHAMBERS, W.H.; DHABHAR, F.S.; GOLDFARB, R.H.; KITSON, R.P.; MILLER, A.H.; SPENCER, R.L. E WEISS, J.M. **Neural-endocrine immune interactions: the role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease.** *Brain Res.* 23: 79-133, 1997.

McEWEN, B.S.; WALLACK, G. E MAGNUS, C. **Corticosterone binding to hippocampus: immediate and delayed influences of the absence of adrenal secretion.** *Brain Res.* 70: 321-334, 1974.

MORFORD, L.A.; ELLIOT, L.H.; CARLSON, S.L.; BROOKS, W.H. E ROSZMAN, T.L. **T-cell receptor-mediated signaling is defective in T cells obtained from patients with primary intracranial tumors.** *J. Immunol.* 159: 4415-4425, 1997.

MOULIGNIER, A.; MIKOL, J.; PIALOUX, G.; ELIASZEWICZ, M.; THUREL, C. E THIEBAUT, J.B. **Cerebral gliai tumors and human immunodeficiency virus-1 infection. More than a coincidental association.** *Cancer* 74: 686-92, 1994.

MOYNIHAN, J.A. E ADER, R. **Psychoneuroimmunology: animal models of disease.** *Psychosom. Med.* 58: 546-558, 1996.

OLOFSSON, A.; MIYAZONO, K.; KANZAKI, T.; COLOSETTI, P.; ENGSTROM, U. E HELDIN, C.H. **Transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 secreted by a human glioblastoma cell line. Identification of small and different forms of large latent complexes.** *J. Biol. Chem.* 267: 19482-19488, 1992.

PARSA, A.T.; CHAKRABARTI, I.; HURLEY, P.T.; CHI, J.H.; HALL, J.S.; KAISER, M.G. E BRUCE, J.N. **Limitations of the C6/Wistar rat intracerebral glioma model: implications for evaluating immunotherapy.** *Neurosurgery* 47: 993-1000, 2000.

PAXINOS G. E WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** Spiral Bound, 1998.

PERRIN, G.; SCHNURIGER, V.; QUIQUEREZ, A.L.; SAAS, P.; PANNETIER, C.; de TRIBOLET N.; TIERCY, J.M.; AUBRY, J.P.; DIETRICH, P.Y. E WALKER, P.R. **Astrocytoma infiltrating lymphocytes include major T cell clonal expansions confined to the CD8 subset.** *Intl. Immunol.* 11: 81337-81350, 1999.

PISA, P.; HALAPI, E.; PISA, E.K.; GERDIN, E.; HISING, C.; BUCHT, A.; GERDIN, B. E KIESSLING, R. **Selective expression of interleukin 10, interferon gamma and granulocyte-macrophage colony stimulating factors in ovarian cancer biopsies.** Proc. Natl. Sci. Acad. USA. 89: 7708-7712, 1992.

PLATE, K.H.; BREIER, G.; WEICH, H.A.; MENNEL, H.D.; E RISAU, W. **Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF protein and possible *in vivo* regulatory mechanisms.** Int. Cancer. 59: 520-529, 1994.

PLATE, K.H. E MENNEL, H.D. **Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors.** Exp. Toxicol. Pathol. 47: 89-94, 1995.

QUAN, N.; AVITSUR, R.; STARK, J.L.; HE, L.; SHAH, M.; CALIGIURI, M.; PADGETT, D.A.; MARUCHA, P.T. E SHERIDAN, J.F. **Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock.** J. Neuroimmunol. 115: 36-45, 2001.

ROSZMAN, T.L.; BROOKS, W.H. E ELLIOTT, L.H. **Inhibition of lymphocyte responsiveness by glial tumor cell-derived suppressive factor.** J. Neurosurg. 67: 874-879, 1987.

RUDDON, R.W. **Cancer biology.** Oxford University Press. Terceira edição. 520p, 1997.

SARRIS, S. **Multidisciplinary approach to malignant gliomas.** Med. Health 79: 210-213, 1993.

SASAKI, A.; NAGAMURA, H.; SATOH, E.; NAGASAKA, M.; ISOE, S.; NAKANO, S. E NUKUI, H. **Secretion of transforming growth factor-beta 1 and beta 2 by malignant glioma cells.** Neurol. Med. Chir. 35: 423-430, 1995.

SCHIFFER, D.; CAVALLA, P.; DUTTO, A. E BORSOTTI, L. **Cell proliferation and invasion in malignant gliomas.** Anticancer Res. 17: 61-70, 1997.

SCHLEIFER, S.J. **Psychoneuroimmunology: introductory comments on its physics and metaphysics.** Psychiatry Res. 85: 3-6, 1999.

SELYE, H. **The stress of life.** Mcgraw-Hill. New York.. 1956. 516p.

SHAKHAR, G. E BEN-ELIYAHU, S. **In vivo β -adrenergic stimulation suppresses natural killer activity and compromises resistance to tumor metastasis in rats.** J. Immunol. 160: 3251-3258, 1998.

SIEGFRIED, B.; FRISCHKECHT, H.R. E WASER, P.G. **Defeat learned submissiveness and analgesia in mice: effect of genotype.** Behav. Neural Biol. 42: 91-97, 1984.

SPIEGEL, D. **Mind matters. Coping and cancer progression.** J. Psychosom. Res. 4:252-265, 2001.

SOARES, B.L. **Efeito dos glicosaminoglicanos (GAGs) sobre a progressão do Glioma C6—abordagens *in vitro* e *in vivo*.** Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Neurociências, CCB. Universidade Federal de Santa Catarina. 109p. 2001.

STEFANSKI, V. **Social stress in laboratory rats: behavior, immune function, and tumor metastasis.** *Physiol. Behav.* 73: 385-391, 2001.

STEFANSKI, V. E BEN-ELIYAHU, S. **Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and beta-adrenergic mechanisms.** *Physiol. Behav.* 60: 277-282, 1996.

STEFANSKI, V. E ENGLER, H. **Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats.** *Physiol. Behav.* 64: 733-741, 1998.

STEFANSKI, V. E ENGLER, H. **Social stress, dominance and blood cellular immunity.** *J. Neuroimmunol.* 94: 144-52, 1999.

TADA, M. E de TRIBOLET, N. **Recent advances in immunobiology of brain tumors.** *J. Neurooncol.* 17: 261-271, 1993.

THURMOND, J.B. **Technique for producing and measuring territorial aggression using laboratory mice.** *Physiol. Behav.* 14: 879-881, 1975.

TRENTIN, A.G. **Diferenciação e proliferação astrocitária: o hormônio da tireóide induz a síntese e secreção de fatores de crescimento.** Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica – Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 120p. 1997.

TROJAN, J.; JOHNSON, T.R.; RUDIN, S.D.; ILAN, J.; TYKOCINSKI, M.L. E ILAN J. **Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA.** Science 259: 94-96, 1993.

TSENG, S.H.; HWANG, L.H. E LIN, S.M. **Induction of antitumor immunity by intracerebrally implanted rat C6 glioma cells genetically engineered to secrete cytokines.** J. Immunother. 20: 334-342, 1997.

TUCHSCHERER, M.; PUPPE, B.; TUCHSCHERER, A. E KANITZ, A. **Effects of social status after mixing on immune, metabolic, and endocrine responses in pigs.** Physiol. Behav. 64: 353-360, 1998.

URBANI, F.; MALECI, A.; La SALA, A.; LANDE, R. E AUSIELLO, C.M. **Defective expression of interferon-gamma, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in activated peripheral blood lymphocytes from glioma patients.** J. Interferon Cytokine Res. 15: 421-429, 1995.

VAN MEIR, E.G. **Cytokines and tumors of the central nervous system.** *Glia* 15: 264-288, 1995.

WOICIECHOWSKI, C.; ASADULAH, K.; NESTLER, D.; SCHONING, B.; GLOCKNER, F.; DOCKE, W.D. E VOLK, H.D. **Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: effect of tumor extirpation.** *J. Neuroimmunol.* 84: 164-171, 1998.

YOUNG, H.F. E KAPLAN, A.M. **Cellular immune deficiency in patients with glioblastoma.** *Surg. Forum* 27: 476-478, 1976.