

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

RAQUEL MARIA TEIXEIRA

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TAQUICINÉRGICO NK₁
NA MODULAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E
NA DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS PRODUZIDOS POR
ESTRESSE.**

Florianópolis-SC

2003.

RAQUEL MARIA TEIXEIRA

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TAQUICINÉRGICO NK₁
NA MODULAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E
NA DISTRIBUIÇÃO DE LEUCÓCITOS PRODUZIDOS POR
ESTRESSE.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Farmacologia do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do título de Doutor
em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dra Thereza C. M de Lima Nogueira.

Florianópolis, 2003.

***Aos meus pais, Walgenor e Lesi,
pelo incentivo, pela formação
e constante apoio.***

AGRADECIMENTOS

À Professora **Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira**, pela dedicação e orientação na realização deste trabalho.

Ao Prof. **Dr. Jamil Assreuy Filho**, pela dedicação, atenção e por disponibilizar a infra – estrutura de seu laboratório, fundamental para a realização da cultura de células.

Ao Prof. **Dr. João Batista Calixto**, pelas sugestões, doação de FK888, da IL-1 β , da realização do ensaio de ELISA para a IL-1 β e por disponibilizar parte de sua estrutura para a cultura de células.

Ao Professor **Dr. Márcio Alvarez**, **Dra. Andréa Trentin** e seus alunos (Claudia, Marcos, Marco, Ricardo) pela acolhida carinhosa e atenção dispensada quando do início dos experimentos com cultura celular, além da doação inicial das células C6.

A Profa. **Dra. Maria Teresa R. Lima-Landman**, ao Prof. **Dr. Antonio J. Lapa** e à mestrandia **Luciana Takahashi Carvalho Ribeiro** (EPM/UNIFESP), por disponibilizarem o *NO-meter* e realizarem as dosagens em seus laboratórios.

Ao **Dr. Aleksander Zamprono** (UFPR) pelo fornecimento do LPS.

À Prof^a **Dra. Glória Emília P. de Souza** (USP-RP) pelo fornecimento do IL-1 ra.

À Prof^a **Dra. Roseli Coimbra Farges**, pela doação de aminoglutetimida.

Ao **Laboratório de Hematologia do Hospital Universitário** da Universidade Federal de Santa Catarina, as farmacêuticas-bioquímicas: Suely

Steinwandter, Nicéia Mara Almeida de Souza, Samira Cardoso Ferreira, Marlene Medeiros Luz e técnicas Tânia e Marlene G. Vieira por permitirem a realização dos exames hematológicos em seu laboratório.

Ao Setor de **imunologia do LAC-HU** e a farmacêutica-bioquímica Márcia T. Volpato Siqueira, pela realização das dosagens de imunoglobulinas.

Ao **Laboratório Médico Santa Luzia** (Dr. Paulo Antonio Aragão Zunino), pela realização de parte dos exames hematológicos.

Aos professores do **Departamento de Análises Clínicas**, pelo suporte dado durante o período de afastamento para a realização deste trabalho.

Aos amigos que estiveram ou estão presentes no **Laboratório de Neurofarmacologia**, em especial ao **Filipe S. Duarte**, pela atenção e companheirismo, ao **Marco A. Lorenzo** pela ajuda na determinação do ciclo estral dos camundongos fêmeas.

Aos amigos do **Laboratório de Farmacologia do Óxido Nítrico**, em especial à **Maria Claudia Santos Silva**, **Renata A. Costa** e à **Adriane S. Madeira**, pela ajuda técnica, a **Márcia Terluk** pelas trocas de idéias.

Ao **Dr. Adair Roberto Soares dos Santos** pela ajuda técnica, as **Dra. Daniela A. Cabrini** e **Maria Martha Campos**, pela troca de informações.

À **Rosana Maria Ostroski**, pelo fornecimento das drogas do laboratório do Dr João B. Calixto.

Aos colegas da Pós-graduação, pela constante troca de informações e amizade.

Ao **Juliano Ferreira** pela ajuda na dosagem por ELISA da IL-1 β .

A todos os **funcionários** da **Coordenadoria Especial de Farmacologia**, pela ajuda prestada.

Aos funcionários do Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia em especial ao **Pedro Paulo de Souza**.

Ao **Sandro**, pelo apoio e incentivo.

Aos meus filhos, **Frederico** e **Marcelle** pelo carinho e compreensão.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho.

***“O coração alegre é bom remédio
mas o espírito abatido faz secar os ossos”***

(Provérbios 17:22).

***“Portanto, não vos inquieteis com o dia de amanhã;
pois o amanhã trará os seus cuidados;
basta ao dia o seu próprio mal”***

(Mateus 6:34).

RESUMO

O presente estudo investigou a relação entre as taquicininas, em especial a substância P e situações de estresse, avaliando respostas comportamentais e imunológicas em camundongos. Nele estudamos se existiam diferenças sexuais no efeito ansiogênico e na distribuição dos leucócitos produzidos pela SP, em camundongos. Após a padronização do estresse de natação como o modelo experimental que mimetiza as alterações comportamentais e imunológicas produzidas pela SP, verificamos o envolvimento do eixo hipotálamo-pituitária adrenal e seus neurotransmissores, assim como do receptor NK₁ e da IL-1 β nos efeitos comportamentais e imunológicos do estresse de natação.

Nossos resultados mostraram que as fêmeas são mais sensíveis à administração central de SP, apresentando efeitos do tipo ansiogênicos mais evidentes que os dos machos, além de linfopenia, leucopenia. Além disso, entre as diversas condições de estresse comparadas neste estudo, o estresse de natação por 6 min à temperatura ambiente mostrou alterações comportamentais e sanguíneas similares em qualidade e intensidade às produzidas pela SP. A adrenalectomia não impediu estas alterações, embora os pré-tratamentos farmacológicos sugiram uma participação dos glicocorticóides e dos β -adrenoceptores, mas não dos receptores opióides do tipo μ , na modulação dos efeitos estudados, em animais submetidos ao estresse de natação e também naqueles tratados com SP centralmente. Ambos os grupos também têm seus

efeitos comportamentais e sangüíneos inibidos pelo pré-tratamento com um antagonista do receptor taquicinérgico NK₁ (FK-888) e do antagonista de receptor da interleucina IL-1 β (IL-1ra), indicando que uma via comum provável entre as alterações comportamentais e fisiológicas produzidas pela SP e pelo estresse seria via liberação de citocinas e, talvez, secundariamente de NO. Para testarmos tal hipótese, usamos cultura de células gliais e observamos que a formação de NO foi ativada por SP mais LPS, sendo inibida tanto pelo FK-888, como pelo L-NAME, o que nos sugere a possibilidade do NO, seja um modulador das respostas comportamentais e sangüíneas produzidas pelo estresse de natação e pela SP, além de reforçar a idéia de que a SP é um mediador do estresse, que pode estar sendo negligenciado, mas poderia ser usado como uma abordagem alternativa em psicopatologias envolvendo situações de estresse, como a ansiedade e a depressão.

De uma maneira geral, estes achados, são discutidos em termos da interação entre o sistema nervoso central e o sistema imune e o envolvimento das neurocininas, assim como a participação de citocinas pró-inflamatórias nestes processos.

O entendimento do envolvimento da substância P (SP) oferece uma nova e radical abordagem para o controle da depressão, ansiedade e estresse, pois, entre outras evidências experimentais, o receptor da SP está altamente expresso em áreas do cérebro implicadas com estes comportamentos. Além disso, a ansiedade produz mudanças imunes através de mecanismos hipotalâmico-pituitária-adrenocortical e simpático-adrenomedular, bem como por meio de vários

neurotransmissores, como a SP. Assim, o uso no futuro de antagonistas da SP, os quais estão atualmente sob investigações, bem como, as manipulações das citocinas, podem vir a se constituir em alternativas interessantes para reduzir as alterações imunes, e comportamentais, associadas com a ansiedade.

ABSTRACT

The present study aimed to determine the relationship between the behavioral changes, as evaluated in the elevated plus-maze test (EPM), and the alterations of blood leukocyte distribution induced by different types of stressors in mice, as an index of the putative relationship between the CNS and the immune system. Our study showed that the central injection of substance P (SP) into the lateral ventricle promotes differential behavioral effects in the elevated plus-maze test (EPM) and changes in blood leukocyte distribution, in male and female mice. After standardization of the swimming stress as an experimental model that mimicked the behavioral and immunological changes produced by SP, we investigated the involvement of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and their neurotransmitters, as well as that of the NK₁ receptor and IL-1 β , in the behavioral and immunological outcomes of swimming stress.

Our data show that female mice were more sensitive than males to the behavioral and immunological effects of centrally injected SP which produced a more evident anxiogenic-like profile in the females, in addition to lymphopenia and leucopenia. Furthermore, among the different model of stress employed in this study, the swimming stress, performed over 6 min at room temperature, revealed behavioral and blood alterations similar to those produced by SP.

Adrenalectomy did not prevent the above alterations, notwithstanding pharmacological pretreatment, suggesting the participation of glucocorticoids and β -adrenoceptors, but not μ -opioid receptors, in the modulation of the effects seen

in animals submitted to swimming stress and, also, in those given central injections of SP.

On the other hand, the behavioral and blood effects in both groups were inhibited by pretreatment with a selective antagonist, FK888, of the tachykinin NK₁ receptor and IL-1 receptor antagonist, IL-1 ra, suggesting the existence of a common pathway for the behavioral and physiological alterations produced by SP and swimming stress, involving cytokines and, secondarily, NO. To test this hypothesis C6 rat glioma cells were pretreated with a selective antagonist, FK888, of the tachykinin NK₁ receptor and a non-selective inhibitor of NO production, L-NAME; both of these treatments reversed the effect of SP on NO production.

Our findings are discussed in terms of the interaction between the CNS and the immune system and the involvement of the tachykininergic and cytokinergic system in the underlying mechanisms and their modulation.

Modulation of substance P (SP) activity offers a radical new approach to the management of depression, anxiety and stress since substance P receptors are highly expressed in areas of the brain that are implicated in these behaviors.

Anxiety produces immunological changes through sympathetic adrenal medullar and hypothalamic pituitary adrenal cortical mechanisms, as well as through the release of various neurotransmitters, such as the neuropeptide SP. Thus, the future use of SP antagonists, which are currently under investigation, as well as cytokine manipulation, holds promise for further measures to reduce immune, and behavioral, alterations associated with anxiety states.

LISTA DE ESQUEMAS, TABELAS E FIGURAS.

ESQUEMAS	PÁGINA
1-Efeitos do estresse no eixo HPA	28
2-Representação esquemática da proopiomelanocortina	35
3-Interação sistema nervoso – sistema imune	46
4-Efeitos do eixo HPA na função imune	50
5-Diferenças entre o modelo e a situação modelada	7
6-Biossíntese de óxido nítrico	202
7-Interação bidirecional entre sistema imune e snc	209

TABELAS

1-Fases da síndrome do estresse	25
2-Principais efeitos do sistema nervoso autônomo	36
3-Família das citocinas	44
4-Efeitos dos glicocorticóides nas células imune	56
5-Características principais dos receptores de neurocininas	61

FIGURAS - Resultados *in vivo*

1-Influência do sexo no efeito da SP no LCE	87
2-Influência do sexo no efeito da SP nos parâmetros etológicos	88
3-Influência do sexo no efeito da SP nos leucócitos	89
4-Efeito do estresse de natação por 3 min no LCE	94
5-Efeito do estresse de natação por 3 min no LCE (luz vermelha)	95
6-Efeito do estresse de natação por 3 min nos parâmetros etológ.	96

7-Efeito do estresse de natação por 3 min nos leucócitos	97
8-Efeito do estresse de natação por 6 min no LCE	100
9-Efeito do estresse de natação por 6 min nos parâmetros etológ.-	101
10-Efeito do estresse de natação por 3 min e 6 min nos leucócitos	102
11-Efeito do estresse de imobilização 4° C/ 30 min no LCE	105
12-Efeito do estresse de imobilização 4° C/ 30 min nos parâmetros etológicos	106
13-Efeito do estresse de imobilização 4° C/ 30 min nos leucócitos	107
14-Efeito da ADX no LCE	111
15-Efeito da ADX nos parâmetros etológicos	112
16-Efeito da ADX nos leucócitos	113
17-Efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida, propranolol e naloxona no estresse de natação por 6 min e no efeito da SP na freqüência de entradas nos braços abertos do LCE	116
18-Efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida, propranolol e naloxona no estresse de natação por 6 min e no efeito da SP no tempo de entradas nos braços abertos do LCE	117
19-Efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida, propranolol e naloxona no estresse de natação por 6 min e no efeito da SP no número de entradas nos braços fechados do LCE	118
20-Efeito do pré – tratamento com aminoglutetimida, propranolol e naloxona no estresse de natação por 6 min e no efeito da SP no	121

número de Leucócitos totais	
21-Efeito do pré – tratamento com aminoglutetimida, propranolol e naloxona no estresse de natação por 6 min e no efeito da SP no número de linfócitos	122
22-Efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida, propranolol e naloxona no estresse de natação por 6 min e no efeito da SP no número de neutrófilos	123
23-Efeito do pré – tratamento do FK no estresse de 6 min no LCE	
24-Efeito do pré – tratamento do FK888 no estresse de 6 min nos parâmetros etológicos	127
25-Efeito do pré – tratamento do FK888 no estresse de 6 min nos leucócitos	128
26-Efeito do pré – tratamento do FK888 no efeito da SP no LCE	
27-Efeito do pré – tratamento do FK888 no efeito da SP nos parâmetros etológicos	132
28-Efeito do pré – tratamento do FK no efeito da SP nos leucócitos	133
29- Decurso Temporal do LPS 10 µg/kg na temperatura e no LCE	136
30-Decurso Temporal do LPS 10 µg/kg nos parâmetros etológicos	137
31-Efeito do LPS 10 µg/kg nos leucócitos	138
32-Decurso Temporal do LPS 50 µg/kg na temperatura e no LCE	141
33-Efeito do LPS 50 µg/kg nos parâmetros etológicos	142
34-Efeito do LPS 50 µg/kg nos leucócitos	143
35-Efeito do pré-tratamento com IL-1 ra no efeito da IL-1 β no LCE	147

36-Efeito do pré-tratamento com IL-1 ra no efeito da IL-1 β nos parâmetros etológicos	148
	149
37-Efeito do IL-1 ra no efeito da IL-1 β nos leucócitos	
38-Efeito do pré-tratamento com IL-1 ra no efeito do estresse de natação por 6 min no LCE	153
39-Efeito do pré-tratamento com IL-1 ra no efeito do estresse de natação por 6 min nos parâmetros etológicos	154
40-Efeito do pré-tratamento com IL-1 ra no efeito do estresse de natação por 6 min nos leucócitos	155
	156
41-Efeito do pré-tratamento com IL-1 ra no efeito da SP no LCE	
42-Efeito do pré-tratamento com IL-1 ra no efeito da SP nos parâmetros etológicos	157
	158
43-Efeito do pré-tratamento com IL-1 ra no efeito da SP nos leucócitos	
44-Elisa para a IL-1β de soro de camundongos estressados por 6 min ou injetados com SP 10 pmol i.c.v.	160

FIGURAS - Resultados *in vitro*

45-Influência da substância P 10 pmol i.c.v. e do sexo na produção de NO por macrófagos peritoneais	163
46-Efeito do LPS, da SP, do L-NAME do FK888 na produção de NO em células de glioma de rato (C6) após a incubação de 24 h	164
47-Efeito do LPS, da SP, do L-NAME do FK888 na produção de NO em células de glioma de rato (C6) após a incubação de 48 h	165

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico.
ADH	Hormônio antidiurético.
ADX	Adrenalectomia.
α- MSH	Alfa – melanócito.
ANOVA	Análise de variância.
APC	Células apresentadoras de antígeno.
AVP	Arginina vasopressina.
β - LPH	Beta – lipotrofina.
Ca²⁺	Íons cálcio
C6	Linhagem de células de glioma de rato.
CCK	Colecistocinina.
CDs	Grupos de Diferenciação (Cluster Differentiation).
CD4	Linfócitos T auxiliar.
CD8	Linfócitos T citotóxicos.
CGRP	Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina.
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais - UFSC.
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina.
EAE	Encefalomielite experimental alérgica.
EDTA	Ácido tetracético de etilenodiamino.

EPM	Erro padrão da média.
FSH	Hormônio estimulante do folículo
GH	Hormônio do crescimento
HPA	Eixo hipotálamo – pituitária – adrenal.
i.c.v.	Intracerebroventricular.
i.p.	Intraperitoneal.
IFN-γ	Interferon – gama.
IgA	Imunoglobulina A.
IgM	Imunoglobulina M.
IFN-α, β, γ	Interferon alfa, beta e gama.
IL 1 - 18	Interleucina 1 -. 18
IL-1 ra	Antagonista de receptor da IL-1.
LCE	Labirinto em cruz elevado.
LH	Hormônio luteinizante.
L - NAME	L -nitroarginina - metil éster.
LPS	Lipopolissacarídeos.
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal (Major Histocompatibility Complex).
NaCL	Cloreto de sódio.
NK	Células <i>natural killer</i> (matadoras naturais).
NK₁	Receptor taquicinérgico do tipo 1.
NK₂	Receptor taquicinérgico do tipo 2.
NK₃	Receptor taquicinérgico do tipo 3.

NKA	Neurocinina A.
NKB	Neurocinina B.
NO	Óxido nítrico.
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida.
cNOS	Enzima óxido nítrico sintase constitutiva.
NPY	Neuropeptídeo Y
PBS	Solução de tampão fosfatada.
PLC	Fosfolipase C.
PRL	Prolactina.
PVN	Núcleo paraventricular hipotalâmico.
SHAM-ADX	Falso – operado (falso-adrenalectomizado).
SNA ou SNV	Sistema Nervoso Autônomo ou Sistema neurovegetativo.
SNC	Sistema Nervoso Central.
SP	Substância P.
STX	Estresse.
TCR	Receptores de células T.
T-H	Linfócitos T auxiliar.
T-C	Linfócitos T citotóxicos.
TKs	Taquicininas.
TNF-α, β	Fator de necrose tumoral alfa e Fator de necrose tumoral β .
TSH	Tirotrófina
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	22
Conceito de estresse	24
Mecanismos básicos da resposta ao estresse	30
Sistema opióide	34
Sistema nervoso autônomo	35
Sistema nervoso central	38
Sistema imune	39
Inter – relação entre Sistema Nervoso e Sistema Imune	44
Estresse e função imune	51
Taquicinininas estresse e imunidade	56
OBJETIVOS	65
Geral	65
<i>Avaliação in vivo</i>	65
<i>Avaliação ex-vivo e in vitro</i>	65

MATERIAL E MÉTODOS	67
Considerações éticas	67
Animais	67
Drogas e Soluções	68
Via intraperitoneal	68
Via intracerebroventricular	69
Administração das drogas	71
Procedimentos gerais	72
Estresse de natação forçado	73
Estresse de imobilização no frio	73
Adrenalectomia	74
Labirinto em cruz elevado	74
Temperatura	76
Contagem diferencial da célula branca	76
Dosagem de citocina IL-1 β	77
Avaliação <i>ex-vivo</i>	78
Produção de radical livre (NO) por macrófagos residentes	78
Determinação do óxido nítrico	79
Avaliação <i>in vitro</i>	80
Reagentes, drogas e tratamentos	80
Linhagem celular	81
Determinação do óxido nítrico	82
Análise estatística	83

RESULTADOS	84
<i>Avaliação in vivo</i>	84
4.1.1.Diferenças sexuais no efeito da SP	84
4.1.2 A. Correlação entre mudanças comportamentais e leucócitos; no estresse de 3 min	90
4.1.2.B. Estresse de natação por 6 min.	98
4.1.2.C. Estresse de imobilização 4° C/ 30 min.	103
4.1.3.A. Envolvimento do eixo HPA.	108
4.1.3.B. Papel dos glicocorticóides, opióides e receptores β – adrenérgicos no estresse de natação e nos efeitos da SP.	114
4.1.4. Envolvimento das taucinininas na resposta ansiogênica do estresse de natação e da SP.	124
4.1.5.Modelo experimental do Comportamento doentio (Sickness Behavior).	134
4.1.6.Papel do IL-1 ra no estresse de natação e nos efeitos da SP.	144
4.1.7.Elisa para a determinação da IL-1 β no estresse de natação e nos efeitos da SP	159
<i>Avaliação in vitro</i>	161
DISCUSSÃO	166
CONCLUSÕES	204
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	210

1. INTRODUÇÃO

Estudos funcionais e neuroanatômicos recentes sugerem que a substância P (SP) é um importante neurotransmissor do estresse. Este neuropeptídeo, assim como seu receptor preferencial NK₁, é expresso em todas as vias centrais processadoras das reações fisiológicas e comportamentais ao estresse, como a matéria cinzenta periaquedutal, o hipotálamo, a amígdala e o hipocampo (SARIA, 1999; RIBEIRO-da-SILVA e HÖKFELT, 2000). Em ratos, estudos neuroquímicos demonstraram um aumento nos níveis hipocampais e septais de SP após a aplicação de choques inevitáveis nas patas (BANNON et al., 1986; SIEGEL et al., 1984). Outros estudos relataram uma redução no conteúdo de SP após o estresse de imobilização (TAKAMAYA et al., 1986). Em função destes e de outros estudos, sugere-se que as condições de estresse parecem modular a atividade das vias que contêm SP (BRODIN et al., 1987, 1994; HARBUZ e JESSOP, 2001; SHIRAYAMA et al., 1996), o que leva à hipótese de que o bloqueio farmacológico dos receptores NK₁ pode ser um dos mecanismos para aliviar os processos mal-adaptativos induzidos por estresse.

A este respeito, os distúrbios de ansiedade e de depressão, cujo desenvolvimento está intimamente relacionado a situações de estresse, estão entre as doenças mais ameaçadoras da vida moderna, representando importantes problemas de saúde pública (BRAWMAN-MINTZER e LYDIARD, 1997; WONG e LICINIO, 2001). Apesar dos inúmeros estudos pré-clínicos e clínicos nesta área,

pouco se sabe acerca dos mecanismos biológicos e celulares básicos destas psicopatologias (WONG e LICINIO, 2001). No entanto, estudos recentes têm mostrado o potencial uso de antagonistas do receptor NK₁ na clínica e em modelos experimentais de ansiedade e depressão (BOYCE et al., 2001; CHEETA et al., 2001; CUTLER et al., 1994; FILE, 1997, 2000; KRAMER et al., 1998; NIKOLAUS et al., 1999; VASSOUT et al., 2000). Destes, vários estudos sobre o envolvimento da SP e outras taquicininas na modulação da ansiedade são de nosso laboratório (BARETTA et al., 2001, GAVIOLI et al., 1999, 2002; RIBEIRO et al., 1999; RIBEIRO & DE LIMA, 1998, 2002; TEIXEIRA et al., 1996), sendo que uma atividade excessiva da SP parece relacionar-se a um aumento nos níveis de ansiedade clínica e experimental. Além disso, a injeção central de agonistas da SP leva a reações comportamentais e cardiovasculares de defesa, que em nada diferem daquelas observadas em situações de estresse (AGUIAR e BRANDÃO, 1994, 1996; CULMAN e UNGER, 1995; ELLIOT, 1988; HALL et al., 1987; KRASE et al., 1994; UNGER et al., 1988). O estresse, por sua vez, promove mudanças fisiológicas e comportamentais que podem estar na base de várias doenças, envolvendo alterações comportamentais e de imunidade. Como a SP parece modular tanto o comportamento quanto o sistema imune (BERSTEIN, 1991; EGLEZOS et al., 1991; RAFFA, 1998), no presente estudo procuramos verificar as semelhanças e, se possível, as relações causa-efeito, no comportamento e no sistema imunológico, comparando animais injetados centralmente com SP ou submetidos a situações de estresse, tentando ampliar o entendimento da SP como um mediador do estresse, o que é relevante em termos da possibilidade do uso de seus antagonistas específicos em diversas patologias.

ESTRESSE

O conceito de estresse é freqüentemente usado no sentido das ciências físicas, para descrever uma carga numa estrutura física tal como numa ponte. Ele também foi usado, no século XIV, no sentido de sofrimento ou adversidade. O que chamamos de “estresse psicológico” é possivelmente o estado emocional negativo resultante daquilo que as pessoas percebem que lhes ocasiona pressão emocional, e que excede, portanto, suas habilidades para enfrentá-lo (COHEN e WILLIAMSON, 1991).

No início do século XX, Walter Cannon desenvolveu a teoria da motivação emergencial que se tornou conhecida pela “síndrome da luta ou fuga”. Esta síndrome é caracterizada pela ação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) que prepara o corpo para ações emergenciais, que desvia energia para os órgãos internos, para os músculos, ocasionando a liberação de adrenalina e noradrenalina deixando o organismo pronto para ação (SARAFINO, 1998).

Quase ao mesmo tempo, o termo estresse e “síndrome do estresse” ou “síndrome de adaptação geral” (*general adaptation syndrome – GAS*) foi adotado por HANS SELYE, (1936, 1956) no qual ele descrevia uma série de mudanças patofisiológicas apresentadas em ratos expostos a diferentes estímulos físicos, químicos ou emocionais (Tabela 1), mas esse “rótulo” nunca ganhou popularidade ou aceitação universal. No entanto, já nos primórdios de seus estudos, Selye e

outros pesquisadores como MORA et al., (1926) relataram os desvios na imunidade como um componente significativo da resposta ao estresse ou GAS. Junto com o aumento na atividade endócrina e as ulcerações no trato gastrointestinal, Selye observou que pacientes humanos e animais estressados mostravam alterações imunes similares após diferentes traumas e doenças: Os tecidos linfóides tendiam a reduzir em tamanho e apresentavam alterações estruturais, isto é, havia involução tímica; O perfil da série branca sangüínea (leucócitos) na circulação mudava, isto é, havia neutrofilia, linfopenia e eosinopenia. Como essas mudanças pareciam ser tão comuns e ocorrerem após estímulos tão diversos, ele concluiu que essas alterações fisiológicas eram *não específicas*, uma resposta global do corpo a qualquer desafio, físico ou psicológico.

Tabela 1. Fases da “síndrome do estresse” (HANS SELYE, 1936).

Fases	Efeitos neuroendócrinos
Reação de alarme	Ativação do Sistema Nervoso Central e das glândulas adrenais
Fase de resistência	Ativação do eixo HPA
Mudanças teciduais	Hipertrofia adrenal, ulcerações gastrintestinais, atrofia do timo e de outros órgãos linfóides.
Fase de exaustão	Pode culminar com a morte

Adaptada de KELLY (1999).

A reação de alerta, a primeira do processo de estresse, inicia-se quando a pessoa se confronta inicialmente com um estressor. É nesse momento que o organismo se prepara para o que CANNON (1929) designou de “luta ou fuga”,

com a conseqüente quebra da homeostase. A principal ação do estresse é justamente a quebra do equilíbrio interno que ocorre em decorrência da ação exacerbada do sistema nervoso simpático e da desaceleração do sistema nervoso parassimpático (BERCZI e NAGY, 1994). A aceleração do organismo, através da ação aumentada de determinadas funções, é, muitas vezes, de grande valia para a preservação da vida, uma vez que leva o organismo a um estado de alerta, a fim de que possa lidar com situações em que tenha que atuar com urgência. Esta reação, em momentos de necessidade, constitui-se em defesa do corpo. O problema ocorre, quando a prontidão fisiológica não é necessária ou quando é excessiva (BERCZI e NAGY, 1994).

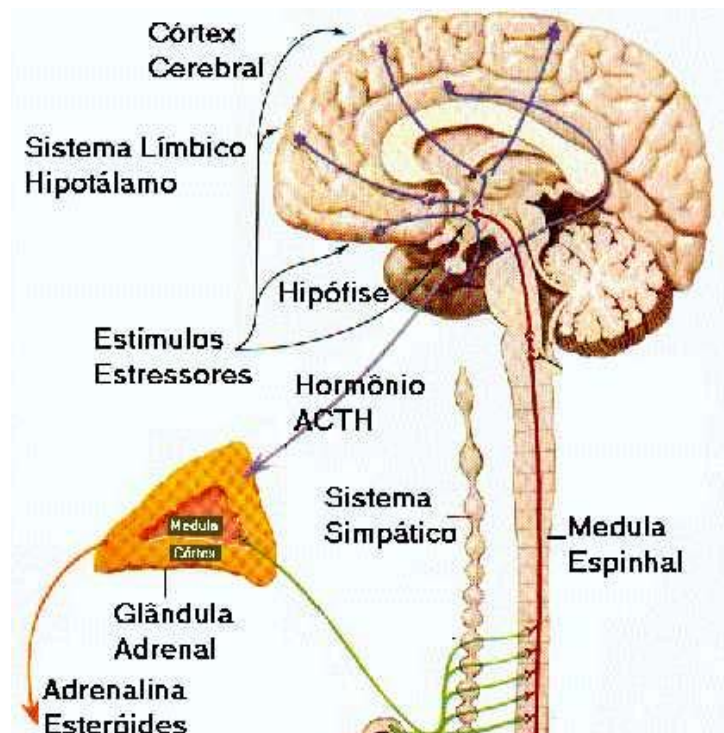
Quando o estressor é de curta duração a adrenalina é eliminada e a restauração da homeostase ocorre. Desta maneira, a pessoa sai da fase de alerta sem complicações para o seu bem-estar (DUBROVSKY, 2000).

Quando o estressor é de longa duração, ou sua intensidade é demasiada para a resistência da pessoa, o organismo tenta restabelecer a homeostase de um modo reparador e entra na fase de resistência ao estresse. A energia adaptativa de reserva é utilizada na tentativa de reequilíbrio. Se essa reserva é suficiente, a pessoa recupera-se e sai do processo do estresse. Se, por outro lado, o estressor exigir mais esforço de adaptação do que é possível para aquele indivíduo, então o organismo se enfraquece e torna-se vulnerável a doenças. Nessa fase, se o estressor for eliminado o organismo se restabelece e o processo do estresse termina (LIPP, 2001).

Se a resistência da pessoa não for suficiente para lidar com a fonte de estresse, ou se outros estressores ocorrerem concomitante, o processo do

estresse evoluirá para a fase de exaustão. Haverá um aumento das estruturas linfáticas, a exaustão psicológica pode ocorrer em forma de depressão e a exaustão física manifestar-se-á, com o conseqüente aparecimento de doenças (LIPP, 2001). Num artigo de 1946, Selye já predizia que as doenças podiam ser o resultado de uma falta de adaptação ao estímulo estressor e descrevia a resposta do estresse em termos de: a) mudanças nos níveis de glicose sangüínea e eletrólitos; b) elevação na contagem dos leucócitos sangüíneos; c) hipertrofia adrenocortical, e, d) involução do timo (BERCZI e NAGY, 1994).

O surgimento, no final da década de 40, do conceito que o eixo hipotálamo-pituitária (Esquema 1) exercia um papel crítico em controlar a atividade secretória das glândulas endócrinas (HARRIS, 1948), levou Selye a propor um papel fundamental para os hormônios da pituitária na etiologia da resposta ao estresse, considerando seu efeito devido em parte à liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual aumentava o tamanho adrenocortical e levava à produção do hormônio cortisol levando a mudanças metabólicas (carboidratos, eletrólitos), atrofia do timo, etc., mas também à inibição da secreção das gonadotrofinas, prolactina e hormônio do crescimento, sendo estas características reconhecidas atualmente como “resposta de fase aguda”, com suas alterações na função imune, metabólica e neuroendócrina (BERCZI e NAGY, 1994).



Esquema 1. Efeitos do estresse no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal: cascata de hormônios e mediadores químicos envolvidos.
Adaptado de CHROUSOS, 1995.

Selye demonstrou que a administração de cortisona ou ACTH suprimia a reação inflamatória produzida pela injeção de albumina em ratos, enquanto os mineralocorticóides tinham ações opostas. Esta observação demonstrou que estes glicocorticóides (cortisona e cortisol) exibiam poderosa atividade antiinflamatória numa variedade de modelos animais e, por fim, que estes debelavam as respostas inflamatórias em pacientes com artrite reumatóide, febre reumática e inflamações alérgicas (BERCZI e NAGY, 1994). Em 1955, ele fixou uma base para a relação entre o estresse e a inflamação, reforçando suas idéias iniciais, nas quais uma falta de adaptação do estímulo estressor poderia ser o fator chave na patogênese de doenças inflamatórias, reconhecendo

também que perturbações no balanço dos hormônios adaptativos, tais como as que ocorrem no estresse, poderiam levar a alterações metabólicas, mudando a responsividade e, por último, a função normal dos órgãos alvos e podendo levar a doenças em muitos órgãos tais como fígado, rins e o sistema nervoso. Este último contribuiria em especial para os possíveis efeitos psiquiátricos dos hormônios esteroidais (BERCZI, 1997).

Concepções psicológicas modernas do estresse enfatizam as discrepâncias entre as exigências de um indivíduo e os recursos para enfrentá-las, bem como focalizam os processos psicológicos que levam um evento a ser considerado como estressante. Sendo assim, quando as demandas excedem os recursos, o resultado pode ser o estresse e suas conseqüências podem ser avaliadas em vários sistemas orgânicos (SARAFINO, 1998).

A resposta adaptativa ao estresse parece depender da qualidade (física ou emocional), intensidade e duração (agudo ou crônico) do estímulo, assim como da constituição e do estado do organismo. Um estressor pode ser visto como qualquer perturbação que rompa a homeostase. Assim, estressores físicos incluem alterações do meio interno (anoxia, hipoglicemia, etc...), externo (frio e calor) e múltiplos estressores (estímulos nocivos, esforço físico, como exercícios ou lesões). Os estressores psicológicos, por sua vez, são estímulos que afetam as emoções e resultam em medo, ansiedade ou frustração, e estão entre os mais potentes ativadores do eixo HPA. Os estressores podem ainda ser mistos ou agir em combinação (SARAFINO, 1998).

A resposta adaptativa ao estresse inclui processos comportamentais e fisiológicos que o organismo usa consistentemente na tentativa de reestabelecer a homeostase em face de uma imensa gama de estressores. Em geral, a resposta adaptativa ao estresse envolve um redirecionamento de ambos, comportamento e energia, como já citado anteriormente. A adaptação comportamental é vista como a facilitação das vias neurais adaptativas, concomitante à inibição das não-adaptativas, que permitem ao organismo lidar com mais sucesso aos estímulos estressantes. Estas respostas comportamentais incluem limiares cognitivos e sensoriais alterados, alerta aumentado, aumento seletivo da memória, analgesia induzida por estresse e supressão do comportamento alimentar e do reprodutivo. A adaptação periférica é vista como um armazenamento de energia necessário para se sobrepor aos estressores e envolve tanto um deslocamento dos substratos energéticos dos sítios de armazenamento para a corrente sangüínea, como alterações cardiovasculares adequadas. Simultaneamente, processos anabólicos, como a digestão, o crescimento, a reprodução e a função imune, são inibidos (para revisão ver JOHNSON et al., 1992).

MECANISMOS BÁSICOS DA RESPOSTA AO ESTRESSE

Eixo hipotálamo – pituitária – adrenal.

A função do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) tem sido objeto de inúmeras pesquisas básicas e clínicas que tentam entender porque os glicocorticóides são essenciais à vida.

A glândula pituitária ou hipófise é responsável pela produção de inúmeros hormônios, os quais exercem, direta ou indiretamente, efeitos regulatórios poderosos em uma ampla variedade de funções do corpo incluindo crescimento, desenvolvimento, metabolismo, balanço osmótico, função reprodutiva, comportamento e processos de defesa do hospedeiro, tendo sido denominada por muitos anos como a “glândula mestre”. Com os estudos de HARRIS (1955) compreendeu-se que a atividade secretória da glândula pituitária é orquestrada pelo hipotálamo, fornecendo uma via final comum no sistema nervoso central (SNC). A via comum, crítica para a função da pituitária, envolve duas classes de células secretórias: células ou neurônios parvocelulares e magnocelulares. As células parvocelulares estão envolvidas com a regulação da função da pituitária anterior. Os neurônios magnocelulares, por sua vez, estendem-se para a glândula pituitária posterior, secretando seus produtos na circulação sistêmica (JEZOVA et al., 1999). A neurohipófise é responsável primariamente pela secreção de dois neurohormônios: vasopressina (ou hormônio antidiurético, ADH), o qual zela pela manutenção do balanço osmótico e a regulação da pressão sangüínea, particularmente em condições de hemorragia; e a ocitocina, que regula a contractilidade uterina e a liberação de leite (BUCKINGHAM et al., 1997).

A glândula pituitária é uma estrutura pequena bilobada (adenohipófise e neurohipófise) que fica na sela túrcica, imediatamente abaixo da área da eminência média do hipotálamo, conectando-se a este pela haste pituitária

(BUCKINGHAM et al., 1997). A adenohipófise está localizada na “*pars distalis*” e secreta pelo menos sete hormônios: hormônio do crescimento (GH, crescimento normal e desenvolvimento), tirotrófina (TSH, controle da função da tireóide), corticotrofina (ACTH, regulação da função adrenocortical), β - lipotrofina (β - LPH) e β -endorfina (funções parcialmente desconhecidas, mas que podem incluir a regulação da secreção do bicarbonato duodenal), prolactina (PRL, regulação da lactação) e as gonadotrofinas (hormônio luteinizante, LH, e hormônio estimulante do folículo, FSH; regulação da função gonadal). A “*pars intermedia*” produz o hormônio estimulante do α - melanócito (α - MSH, responsável pela camuflagem, pigmentação e regulação da adrenal fetal) e β -endorfina. A maioria, destes hormônios exerce efeitos diretos na função das células imunes e muitos são sintetizados dentro do próprio sistema imune (BUCKINGHAM et al., 1997).

O HPA é responsável pela produção dos glicocorticóides (corticosterona ou cortisol ou ambos, dependendo da espécie animal) pelo córtex adrenal, como já citado. Em circunstâncias normais, a atividade do eixo está restrita a um limite estreito, com a secreção dos glicocorticóides ocorrendo somente de acordo com um bem estabelecido ritmo circadiano. Os níveis de glicocorticóides sanguíneos são normalmente máximos no final da fase de sono (i. e., pela manhã nas espécies diurnas, p.e., homens, e pela tarde em animais noturnos, p.e., ratos) e o nível mais baixo ocorre algumas horas depois de acordar (JESSOP et al., 1997).

Entretanto, o eixo HPA é prontamente ativado por estímulos estressantes cognitivos e não cognitivos e uma quantidade substancial de glicocorticóides é, conseqüentemente, liberada dentro da circulação sistêmica, desempenhando um

papel vital na manutenção da homeostasia e protegendo, portanto, o organismo do estresse (MUNCK et al., 1984; BUCKINGHAM et al., 1996). Os glicocorticóides possuem um espectro de outras propriedades, possuindo efeitos complexos em vários sistemas. No SNC eles agem nos neurônios e na glia, exercendo efeitos organizacionais pré - e pós-natal e, na vida adulta, contribuem para a plasticidade neuronal e estão implicados em processos de degeneração neural. Outros efeitos centrais dos glicocorticóides incluem mudanças complexas do humor e comportamento, estimulação do apetite, efeito antipirético e modulação da função neuroendócrina (DUNN e SWIERGIEL, 1999).

O aumento da secreção dos glicocorticóides que ocorre no estresse é disparado primariamente por estímulos que convergem sobre o hipotálamo, precipitando a liberação do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e arginina - vasopressina (AVP) dentro da circulação porta-hipofisária (OWENS e NEMEROFF, 1991). Estes peptídeos agem sinergicamente nos corticotrófos aumentando a secreção episódica do ACTH, com o aumento da amplitude do CRH, embora não da frequência dos pulsos e aumento de AVP em ambos os parâmetros. O CRH também estimula a biossíntese do ACTH promovendo mitogênese corticotrófica (BUCKINGHAM et al., 1996).

A resposta ao estresse está, portanto associada com aumentos nos níveis de glicocorticóides. As respostas adrenocorticais aos estímulos recebidos (i.e. estresse e fatores circadianos) são mantidas dentro de limites apropriados por uma série de mecanismos pelos quais os glicocorticóides regulam negativamente sua própria secreção (BUCKINGHAM, 1996; BUCKINGHAM et al., 1992).

A secreção dos glicocorticóides do córtex adrenal, por sua vez, está sob o controle do ACTH, que é liberado pelo lobo anterior da glândula pituitária. A secreção do ACTH é regulada pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e outros secretagogos do hipotálamo.

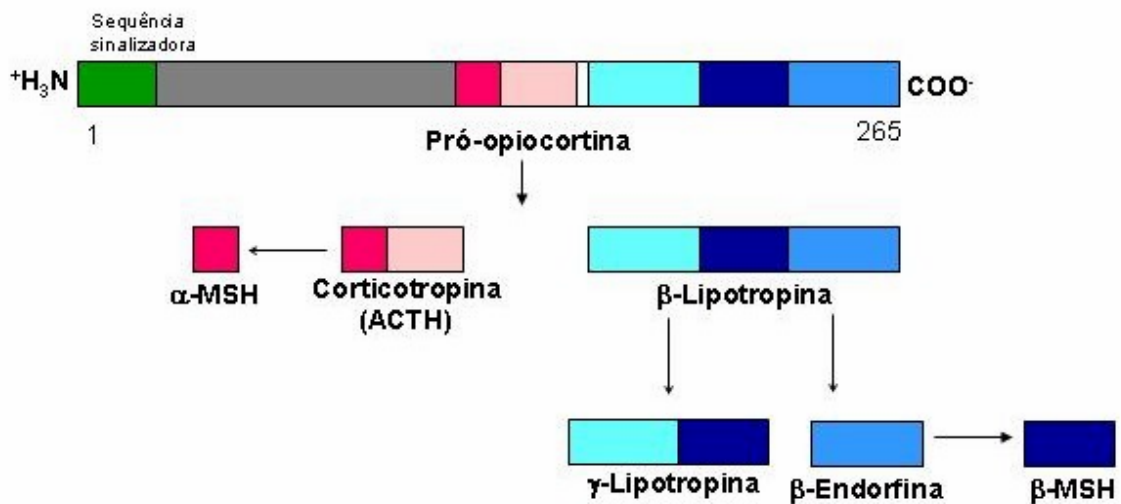
Os glicocorticóides promovem diferentes efeitos, que incluem efeitos na função cardiovascular, no metabolismo, na função muscular, no comportamento e no sistema imune (para revisão ver JOHNSON et al., 1992).

Sistema opióide

A proopiomelanocortina (POMC) é o pró-hormônio do ACTH e é sintetizada no cérebro (núcleo arqueado do hipotálamo, zona incerta, septo lateral, núcleo accumbens, tálamo periventricular, substância cinzenta periaquedutal, locus coeruleus, núcleo do trato solitário, formação reticular, estria terminal e amígdala medial), glândula pituitária, trato gastrintestinal e órgãos reprodutivos sendo clivada em diferentes peptídeos biologicamente ativos. Na pituitária anterior, a POMC é quebrado em ACTH, um fragmento de 39 amino-ácidos, e β -lipotropina, com 92 amino-ácidos. A β -lipotropina é então quebrada em fragmentos ativos menores, como a β -endorfina (Esquema 2).

Vários estressores produzem diversas respostas comportamentais, como analgesia, catalepsia e supressão motora, que são sensíveis aos antagonistas de

receptores opióides. Estas respostas comportamentais observadas no estresse são acompanhadas de alterações nos conteúdos de peptídeos opióides, nos RNA mensageiros que codificam seus precursores e no *binding* de opióides em diferentes áreas cerebrais. Os peptídeos opióides endógenos, como a β -endorfina, são liberados após submissão de animais a diversas condições de estresse e medeiam várias mudanças comportamentais, como a analgesia (para revisão ver YAMADA e NABESHIMA, 1995).



Esquema 2. Representação esquemática da proopiomelanocortina (POMC), a molécula precursora do ACTH, hormônio β -lipotrópico(β -LPH), e endorfina. α -MSH, β -MSH, e hormônio estimulante do β -melanócito respectivamente. Adaptado de JOHNSON et.al., 1992.

Sistema Nervoso Autônomo ou Sistema neurovegetativo (SNV).

CANNON (1929) foi o primeiro a notar que uma variedade de estressores resultava num aumento da atividade do Sistema Nervoso Autônomo Simpático e da glândula adrenal. Durante o estresse, a adrenalina e a noradrenalina são liberadas na circulação geral e a atividade das enzimas que regulam a biossíntese de catecolaminas é estimulada. Atualmente, é aceito que estes sistemas são críticos para a resposta fisiológica integrada dos organismos a uma imensa variedade de estressores. A regulação central desta resposta envolve componentes do SNC no córtex cerebral, sistema límbico, hipotálamo e tronco cerebral (para revisão ver JOHNSON et al., 1992).

O sistema nervoso autônomo (SNA) é dividido em três componentes principais (Tabela 2): o parassimpático (SNAPS), com conexões sacral e cranial; o simpático (SNAS), com conexões nervosas centrais em segmentos lombares e torácicos da coluna vertebral; e o sistema nervoso entérico (BULLOCH, 1985).

Tabela 2. Principais efeitos do sistema nervoso autônomo.

Órgão	Tipo de Receptor	Simpático	Parassimpático
Coração			
Nodo S A	β_1	Frequência \uparrow	Frequência \downarrow
Músculo atrial	β_1	Força \uparrow	Força \downarrow
Nodo AV	β_1	Automaticidade \uparrow	Velocidade de condução \downarrow
Músculo ventricular	β_1	Automaticidade \uparrow Força \uparrow	Bloqueio AV nenhum efeito
Vasos sanguíneos			
Arteriolas			
Coronária	α	Constricção	
Músculo	β_2	Dilatação	nenhum efeito
Viscera	α	Constricção	nenhum efeito
Pele	α	Constricção	nenhum efeito
Cérebro	α	Constricção	nenhum efeito

Tecido erétil	α	Constricção	Dilatação
Glândula salivar	α	Constricção	Dilatação
Veias	α	Constricção	nenhum efeito
	β_2	Dilatação	nenhum efeito
Vísceras			
Brônquios		Nenhuma inervação simpática, mas dilatado pela adrenalina circulante	Constricção
Músculo liso	β_2	nenhum efeito	Secreção
Glândulas Trato GI			
Músculo liso	α_2, β_2	Motilidade ↓	Motilidade ↑
Esfíncteres	α_2, β_2	Constricção	Dilatação
Glândulas		Nenhum efeito	Secreção
Útero grávido	α	Contração	Variável
Útero não grávido	β_2	Relaxamento	
Órgãos sexuais masculinos	α	Ejaculação	Ereção
Olho			
Pupila	α	Dilatação	Constricção
Músculo ciliar	β	Relaxamento (discreto)	Contração
Pele			
Glândulas sudoríparas	α	Secreção colinérgicos principalmente	nenhum efeito
Pilomotor	α	Piloereção	nenhum efeito
Glândulas salivares	α, β	Secreção	Secreção
Glândulas lacrimais		nenhum efeito	Secreção
Rim	β_2	Secreção de renina	nenhum efeito
Fígado	α, β_2	Glicogenólise	nenhum efeito
		Gliconeogênese	nenhum efeito

Adaptado de RANG & DALE (1993).

Trabalhos experimentais recentes indicam que uma influência direta e significativa na função e desenvolvimento do sistema imune é mediada por inervações do SNA de tecidos linfóides envolvidos principalmente na produção e função de linfócitos, bem como por meio de hormônios secretados pelo sistema endócrino, independente e interdependentemente, das células da pituitária, das adrenais, das gônadas, da tireóide e dos tecidos imunes. Na verdade cada órgão do sistema imune recebe inervação do SNA (McEWEN et al., 1997).

Muitos neurotransmissores e seus receptores do sistema entérico, sensorial, parassimpático e simpático têm sido detectados e mapeados dentro dos tecidos e órgãos do sistema imune. Eles incluem: substância P (SP), peptídeo vasoativo intestinal (VIP), somatostatina, acetilcolina (ACH), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), endorfinas, encefalinas, neuropeptídeo Y (NPY),

colecistocinina (CCK), noradrenalina, dopamina (BESEDOVSKY e DEL REY, 1996; BESEDOVSKY e SORKIN, 1977).

Os neurotransmissores e hormônios do SNA e seus componentes são liberados como resultado de estímulos da resposta imune e eles atuam em receptores que são regulados ou expressos em resposta a outros sinais químicos, tais como um hormônio circulante (McEWEN et al., 1997).

Os glicocorticóides modulam a expressão do SNAPS (p.e., receptores muscarínicos da acetilcolina) em tímócitos maduros (MASLINSKI, 1989) e receptores adrenérgicos em monócitos/macrófagos (RADOJCIC et al., 1991). Além disso, tem sido demonstrado que a ativação da acetilcolinesterase pode ser influenciada pelos glicocorticóides (BULLOCK e LUCITO, 1988). Os glicocorticóides também modulam a atividade simpática que, por sua vez, tem um poderoso efeito na função imune. Outros estudos demonstraram que a ativação da liberação de catecolaminas é negativamente regulada ou inibida por glicocorticóides (KVETNANSKY et al., 1993). A supressão da resposta imune celular, comumente causada pelo estresse com ativação do SNAS e liberação de glicocorticóides, é revertida por bloqueio farmacológico dos receptores adrenérgicos (CUNNICK et al., 1988; 1990).

A diminuição dos efeitos do estresse por bloqueio simpático é maior quando os linfócitos esplênicos são examinados em oposição aos linfócitos periféricos sangüíneos, indicando que o SNAS tem um importante papel modulando os efeitos induzidos nos linfócitos esplênicos mais que nos linfócitos periféricos sangüíneos (KUSNECOV et al., 1992).

CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE.

Sistema Nervoso Central (SNC).

O cérebro é o principal controlador da interpretação do que é estressante e que respostas comportamentais e fisiológicas têm de ser produzidas em resposta ao estresse. O cérebro é também o principal alvo do estresse, junto com os sistemas imune, cardiovascular e metabólico, além de outros sistemas do organismo. Comportamentalmente, a resposta ao estresse pode consistir em reações de “fuga ou luta” ou comportamentos potencialmente relacionados à manutenção do estado saudável, como ingestão de comida, consumo de álcool, fumar e outras formas de abuso de drogas. Outro tipo de reação a situações potencialmente estressantes é um estado aumentado de vigilância, acompanhado, ao menos na espécie humana, de um aumento da ansiedade e da preocupação, particularmente quando a ameaça não é bem definida, é imaginária ou quando não há uma resposta comportamental alternativa bem clara que finalize a ameaça, sendo que as respostas comportamentais ao estresse e os estados de ansiedade são capazes de exacerbar e potencializar a produção de mediadores fisiológicos do estresse (para revisão ver McEWEN, 2000).

Há vários estudos ainda propondo que diversas psicopatologias, como a depressão endógena, a anorexia nervosa e o distúrbio de pânico, se devem a anormalidades na regulação das respostas generalizadas de estresse, resultando

em uma hipersecreção de CRH e/ou catecolaminas (para revisão ver JOHNSON et al., 1992), hormônios críticos nas alterações comportamentais e fisiológicas subsequentes ao estresse.

Sistema Imune (SI).

Os principais efetores da resposta de estresse exercem efeitos múltiplos e complexos no sistema imune. Em contrapartida, os muitos componentes do sistema imune exercem efeitos nos componentes centrais e periféricos da resposta generalizada ao estresse. As interações são suficientemente complexas, assim como dose - e contexto-dependentes, de tal forma que não se pode fazer uma generalização dos efeitos do estresse no sistema imune. Tem sido demonstrado que o estresse agudo promove respostas imunes dependentes do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (DHABHAR e McEWEN, 1999), enquanto não se conhecem os mecanismos pelos quais o estresse crônico exerce seus efeitos (SHI et al., 2003).

O sistema imune é uma parte importante do nosso corpo que nos defende contra doenças infecciosas, ou seja, infecções ocasionadas pela ação dos microorganismos ou parasitas dentro do organismo (ABBAS et al. 1997).

O sistema imune dos mamíferos possui dois componentes principais. Um componente é não específico, também denominado natural, nativo ou imunidade inata e engloba mecanismos de defesa, os quais estão presentes no organismo

antes da exposição ao antígeno estranho e incluem barreiras fisiológicas, moléculas circulantes (complemento e proteínas de fase aguda) e células fagocíticas, capazes de atuar contra uma ampla variedade de agentes. O outro componente é altamente específico, também denominado adaptativo ou reações imunes adquiridas e que são executadas pelos linfócitos, os quais são as únicas células capazes de reconhecer o antígeno estranho e discriminar diferentes organismos invasores (ASPINALL, 1997).

Existem duas classes principais de linfócitos, denominadas células B e T. Estas células são morfologicamente similares, possuindo 8-10 µm de diâmetro com um grande núcleo circundado por um citoplasma fino em forma de rim. As células “matadoras naturais” (*natural killer* - NK) são também linfócitos, porém, grandes e granulares (ABBAS et al., 1997).

As células B secretam anticorpos que reconhecem e se ligam a antígenos específicos, os quais são, então, neutralizados. Este processo é chamado de *imunidade humoral* e é o principal mecanismo de defesa contra microorganismos extracelulares e suas toxinas. Os linfócitos B produzem anticorpos, ou imunoglobulinas (gama-globulinas com propriedades imunes: IgA, IgM, IgG, IgD e IgE), as quais possuem estruturas básicas comuns e características físico-químicas distintas (JANEWAY et al., 2000).

Os linfócitos T servem para eliminar o patógeno invasor por reconhecimento e ligação direta (via receptores da superfície da célula) dos antígenos na superfície denominadas de “células apresentadoras de antígenos”. Este processo, denominado de *imunidade mediada por células* é dirigido para microorganismos intracelulares, tais como vírus e certas bactérias que proliferam

dentro das células hospedeiras. As células T também podem reconhecer antígenos tumorais em potencial como não próprias (JANEWAY et al., 2000).

Os linfócitos T reconhecem seus antígenos pelo receptor da superfície da célula, denominado de receptor de células T (*T-cell receptors* - TCR). As células T detectam somente seqüências de peptídeos pequenas, as quais podem ser apresentadas na superfície de outras células (células apresentadoras de antígenos: APC) em associação com as moléculas do MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal - *Major Histocompatibility Complex*) antes de eles serem reconhecidos pelos TCR, sendo o reconhecimento restrito ao MHC (ABBAS et al., 1997). As células T são divididas em duas subpopulações de acordo com moléculas que compõem sua superfície: linfócito T-auxiliar (*T-Helper*) e linfócito T-citotóxico (T-C). Esta subdivisão só foi possível com o desenvolvimento de técnicas utilizando anticorpos monoclonais que permitem a identificação de moléculas protéicas conhecidas como CDs (*cluster differentiation*). Estas proteínas podem ser usadas para auxiliarem na cooperação celular, bem como para separá-las em classes. Os linfócitos T-auxiliares possuem a glicoproteína CD4 na superfície celular, sendo também chamados de linfócitos CD4+. Já os linfócitos T-citotóxicos ou CD8+ são identificados pela glicoproteína CD8 na membrana celular. Ambas as subpopulações exercem as funções de secreção de citocinas, citotoxicidade e supressão em diferentes proporções. As células T têm a capacidade de controlar e modular o desenvolvimento da resposta imune, através da secreção de substâncias (citocinas) que agem nos linfócitos T e outras células, como linfócitos B e macrófagos (JANEWAY et al., 2000).

As citocinas ainda recrutam e ativam leucócitos, propiciando uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa. Os linfócitos T-auxiliares são os principais responsáveis por esta função, entretanto, os linfócitos T-citotóxicos também secretam citocinas (ABBAS et al., 1997). As citocinas, por sua vez, são proteínas ou glicoproteínas originalmente identificadas como produto das células imunes, funcionando como mensageiros químicos entre as células do sistema imune. Elas são sintetizadas por uma ampla variedade de diferentes tipos celulares no organismo, tendo uma variedade de ações em muitos órgãos (Tabela 3). As citocinas incluem as interleucinas, os interferons, fatores de necrose tumorais, e uma variedade de fatores estimulantes do crescimento (TURNBULL e RIVIER, 1999).

Os efeitos imunológicos mais bem estudados e entendidos são aqueles conseqüentes à ativação do eixo HPA e mediados por glicocorticóides, que geralmente são imunossupressores e antiinflamatórios. Estes efeitos incluem a inibição do tráfico de leucócitos, podendo suprimir a imunidade mediada por células e aumentar a imunidade humoral (ELENKOV e CHROUSOS, 1999), estas alterações são mediadas por diferentes efeitos dos hormônios do estresse, os glicocorticóides e as catecolaminas, nas células T auxiliares 1 (Th1 que secretam primariamente IFN- γ , IL-2 e TNF- β)/ Th2 (Th2 que secretam primariamente IL-4, IL-10 e IL-13, e promovem a imunidade humoral; ELENKOV e CHROUSOS, 1999), reduzindo ou aumentando a produção destas citocinas e interferindo com seus efeitos funcionais, tais como a indução de linfopenia, a involução tímica e a redução do baço e dos nódulos linfáticos (McEWEN, 2000). As situações de

estresse agudo levam a uma translocação ou tráfico de células imunes entre o sangue e diferentes tecidos imunes primários, secundários e terciários. Assim, aumentos nos níveis de hormônios do estresse, como glicocorticóides e catecolaminas, regem o movimento de vários tipos de células do sistema imune. Os linfócitos, monócitos e células NK são alterados em número no sangue e nos tecidos, como na pele, como resultado da exposição ao estresse agudo ou da administração aguda de glicocorticóides (McEWEN, 2000).

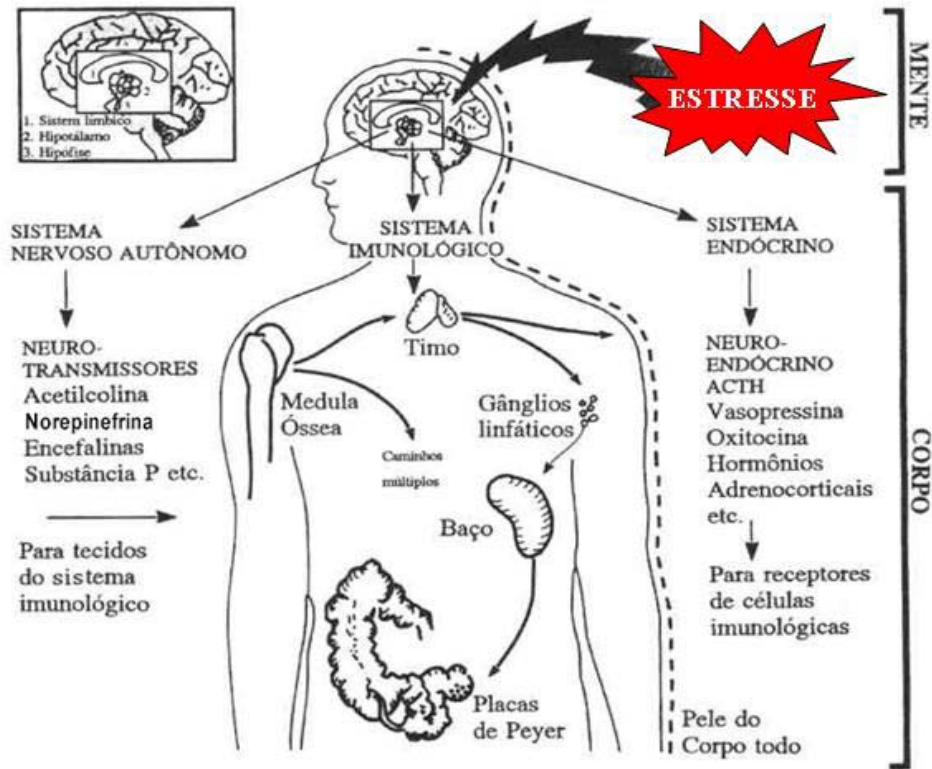
Tabela 3. Família das citocinas:

Família	Membros	Principais ações
Interleucinas	IL-1 a IL-18	IL com ações pró-inflamatórias(e.g., IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-9), efeitos anti-inflamatórios (e.g., IL-1 ra, IL-4, IL-10, IL-13) Muitas IL também induzem à respostas de fase aguda (febre)
Fatores de necrose tumoral	TNF- α , TNF- β	Citotoxicidade tumoral, ampla variedade de atividades imunológicas, indução de muitas outras citocinas, imunoestimulante, mediador proximal da resposta inflamatória
Interferons	IFN- α , β , γ	Inibe a replicação viral, regulação da especificidade da resposta imune
Quimiocinas	IL-8/cinc/gro/NAP-1, MIP-1 α , - β , RANTES	Quimiotaxia, ativação de células de sítios inflamatórios
Hematopoiéticas (neuropoietinas)	IL-6, CNTF, LIF, OM, IL-11, CT-1	Todas utilizam subunidades de receptores de gp130 para sinalização, várias ações em células B e outras ações imunorregulatórias; promove a sobrevivência de neurônios
Fatores estimulantes de colônia	G-CSF, M-CSF, GM-CSF, SCF, IL-3, IL-5	Promoção de crescimento e diferenciação de células progenitoras multipotenciais na medula óssea; aumenta o número, ou aumenta a atividade granulócitos, macrófagos e eosinófilos
Neurotrofinas	NGF, BDNF, GDNF, NT-3, NT-6	Crescimento e diferenciação neuronal
Fatores de crescimento	IGF-1, IGF-II, EGF, a FGF ,b FGF , PDGF, TGF- α , TGF- β , activina	Crescimento celular e diferenciação

aFGF: fator de crescimento ácido do fibroblasto; **BDNF**: fator neurotrófico derivado do cérebro; **bFGF**: fator de crescimento básico do fibroblasto; **cinc**: citocinas indutoras de neutrófilos quimioatranes; **CNTF**: fator neurotrófico ciliar; **CT-1**: cardiotropina-1; **EGF**: fator de crescimento epidermal; **G-CSF**: fator estimulante de colônia de granulócito; **GDNF**: fator neurotrófico derivado da glia; **GM-CSF**., fator estimulante de colônias de macrófago-granulócito; **gro**: oncogene relacionado ao crescimento; **IGF**: fator de crescimento tipo insulina; **IL**: interleucina; **IL-1ra**: antagonista de receptor de IL-1; **IFN**: interferon; **LIF**: fator inibitório da leucemia; **M-CSF**: fator estimulante de colônia de macrófagos; **MIF**: proteína inflamatória de macrófago; **NAP**: proteína ativadora de neutrófilos; **NGF**: fator de crescimento do nervo; **NT**: neurotrofina; **TGF**: fator de crescimento de transformação; **OM**: oncostatina M; **PDGF**: fator de crescimento derivado de plaquetas; **RANTES**: regulado e secretado por ativação normal; **SCF**: fator da célula mãe; **TGF**: fator de crescimento de transformação; **TNF**: fator de necrose tumoral. **Adaptado de TURNBULL e RIVIER (1999).**

Inter-relação entre Sistema Nervoso e Sistema Imune.

A interação entre os sistemas nervoso e imune (Esquema 3) provê a base fisiológica para a medicina psicossomática. Já em 200 A. C., Galeno escreveu que as mulheres “melancólicas” eram mais susceptíveis ao câncer de mama que as mulheres “sangüíneas”. Desde então, inúmeras evidências têm convencido os médicos da importância de fatores psicológicos no prognóstico das doenças. Esta crença é agora sustentada por evidências substanciais de que o sistema nervoso pode realmente modular a função imune. Entretanto, as ações não são unidirecionais. O sistema imune pode também exercer forte influência sobre o sistema nervoso, o que não é nenhuma novidade para quem se sente doente. Anomalias da função imune podem causar doenças do sistema nervoso, que podem se manifestar como um transtorno psiquiátrico. Está claro também que uma defesa efetiva contra infecções requer uma coordenação complexa de atividades dos sistemas nervoso e imune e que anormalidades na inter-relação entre os dois sistemas podem causar doenças (para revisão ver DUNN, 1995). Na verdade, as interações entre os sistemas nervoso e imune têm sido objeto de inúmeras revisões críticas (BLALOCK, 1985; BLALOCK, 1994; JOHNSON et al., 1982; 1984) e vários livros tais como os de ADER et al., 2001; SCHEDLOWSKI e TEWES, 1999; BUCKINGHAM et al., 1997; LEONARD e MILLER, 1995.



Esquema 3. Interação sistema nervoso-sistema imune.
Adaptado de: MELLO FILHO, 1998.

Compreender os fatores endógenos que regulam a função imune tem sido um desafio para os imunologistas há muitos anos. Reconhecer as interações entre os sistemas neuroendócrino, autônomo e imune (Esquema 3) trouxe um desenvolvimento excitante e fez com que cientistas pesquisadores e clínicos trabalhassem juntos (TURNBULL e RIVIER, 1999).

A regulação do sistema imune pela glândula adrenal foi observada no início do século XIX por THOMAS ADDISON (1885) que observou que um paciente com insuficiência adrenal tinha um excesso de linfócitos circulantes e, em concordância com estas observações, a remoção da glândula adrenal de ratos produzia uma hipertrofia do timo (JAFFE, 1924). Talvez os mais conhecidos trabalhos experimentais sejam os de Hans Selye, já descritos anteriormente, nos quais ele encontrou aumento das glândulas adrenais e involução do timo como características comuns das respostas de animais ao estresse, não importando a natureza do estressor (SELYE, 1936).

A descoberta do princípio ativo do córtex adrenal, a cortisona, por KENDALL e REICHSTEIN no final da década de 40, e a demonstração de sua habilidade em suprimir a inflamação (HENCH et al., 1949) deram suporte à hipótese de que a secreção do glicocorticóide adrenal desempenha um papel significativo na regulação dos processos imunológicos (Tabela 4). Os trabalhos desenvolvidos por inúmeros pesquisadores mostram que a elevação da concentração plasmática dos glicocorticóides é observada depois de determinados tipos de estímulos estressantes, mostrando que os glicocorticóides produzem imunossupressão e possuem uma importância mais farmacológica do que fisiológica (McEWEN et al., 1997). Estes achados foram consequência do amplo uso das terapias baseadas nos glicocorticóides para as doenças inflamatórias e auto-imunes. Só no final da década de 70 é que ficou estabelecido o papel fisiológico dos glicocorticóides em prevenir a superatividade e preservar a especificidade das reações imunes (BESEDOVSKY et al., 1979; DEL REY et al.,

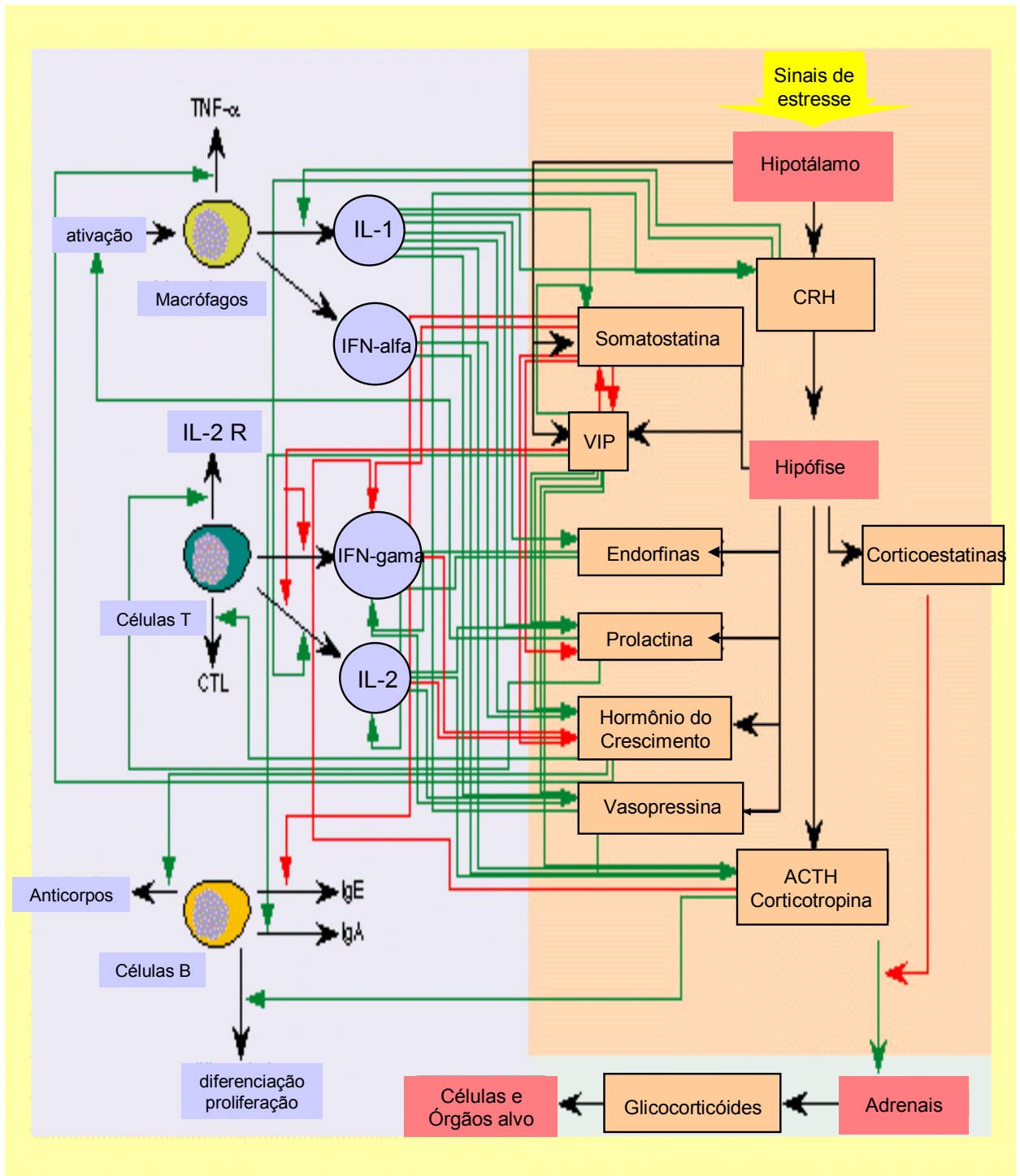
1984). MUNCK et al., (1984) reforçaram este conceito, propondo que glicocorticóides endógenos agiam de modo a limitar as respostas inflamatórias ou imunes, sem efeito deletério para o hospedeiro de uma hiper-atividade do sistema imune (p.e., doenças auto-imunes).

O conceito de “comunicação bi-direcional” entre o sistema endócrino e o imune consolidou-se com os trabalhos de BLALOCK e colaboradores (BLALOCK, 1985,1989; WEIGENT e BLALOCK, 1987, 1997), onde estes autores descreviam as bases moleculares para esta comunicação bi-direcional, mostrando vias comuns de ação dos imunorreguladores (p.e., interferon) e hormônios (noradrenalina; BLALOCK, 1985). Estes pesquisadores foram os primeiros a descobrir que vários hormônios clássicos não são secretados apenas pelas glândulas endócrinas (p.e., pituitária), mas também pelas células do sistema imune (p.e., linfócitos), além de estabelecer sua influência em processos imunológicos (BLALOCK, 1985, 1994; JOHNSON et al., 1982, 1984).

Na metade dos anos 80 tornou-se evidente que as citocinas imunoregulatórias formavam um elo entre os sistemas neuroendócrino e imune (BESEDOVSKY et al., 1986; WOLOSKI et al., 1985) e que as citocinas poderiam ser um fator de liberação de corticotrofinas extra-hipotálamicas (Esquema 4), liberadas pelo dano tecidual (GLASER, 1999). Seguiram-se vários trabalhos, fornecendo fortes evidências para uma regulação de citocinas, principalmente a IL-1, nas respostas do SNC para as mudanças periféricas na atividade imune, caracterizadas por “respostas de fase aguda” da doença, tais como febre, perda do apetite, alterações na concentração de cátions plasmáticos, síntese de

proteínas específicas do fígado (conhecidas como proteínas de fase aguda) e mudanças na secreção endócrina (AUBERT, 1999; AVITSUR e YIRMIYA, 1999).

Com os estudos desenvolvidos por Besedovsky e Blalock ficou evidente que a IL-1 tem um potente efeito na secreção da maioria dos hormônios submetidos ao controle neuroendócrino. Além disso, estudos mais recentes têm mostrado que as alterações na secreção neuroendócrina são produzidas não só pela IL-1, mas também por muitas outras citocinas imunorregulatórias (TURNBULL e RIVIER, 1999).



Esquema 4. Efeitos do hipotálamo-pituitária na função imune e regulação cruzada das citocinas. Flechas pretas: liberação, Flechas verdes: estimulação ou aumento da expressão ou liberação, Flechas vermelhas: inibição.

Adaptado de COPE, Horst Ibelgaufits (1999).

Estresse e função imune.

Os organismos sobrevivem graças à manutenção da *homeostasia*, que se constitui num equilíbrio complexo, dinâmico e harmonioso. Este equilíbrio é constantemente desafiado por fatores perturbadores ou estressores. Para sobreviver, os organismos têm que ativamente reagir apresentando uma resposta adaptativa ou de estresse, que leva à preservação ou restabelecimento de um estado de equilíbrio. No entanto, estressores são qualitativa e quantitativamente diferentes em sua natureza. Podem ser de origem interna ou externa e serem causados por eventos psicológicos (p.e., sentimentos de medo) ou fisiológicos (p.e., hipoglicemia induzida por exercício).

Na literatura contemporânea as respostas ao estresse são discutidas no contexto de se o estressor é físico ou psicológico em sua origem. Na vida moderna diária, esses componentes são os aspectos mais difíceis de separar, pois sentimentos de ansiedade podem levar à resposta fisiológica (tensão muscular) e à atividade física que, por sua vez, é geralmente dependente de eventos psicológicos.

Os primeiros estudos ainda na década de 30 evidenciaram um efeito do estresse emocional no sistema imune, mostrando alterações marcantes no número de linfócitos em indivíduos submetidos a exames (FARRIS, 1938). O aumento no número de células estava claramente associado com o estado emocional alterado, pois todos os indivíduos relataram sentimentos de ansiedade, nervosismo, excitabilidade e medo. Esse achado foi corroborado por vários

estudos posteriores como, por exemplo, com pára-quedistas (SCHEDELOWSKI et al., 1993).

Na verdade, o sistema nervoso e o sistema imune têm várias características comuns: ambos detectam e respondem a alterações do ambiente de maneira altamente específica, ambos possuem mecanismos de memória e consistem em organizações complexas de células com aparência similar, mas com diferentes funções. O que os distingue em especial é sua organização anatômica. Comparado ao sistema nervoso, o sistema imune distingue-se por sua mobilidade (JANEWAY et. al., 2000). Por muito tempo os dois sistemas foram considerados como agindo independentemente; nos últimos anos, entretanto, há várias evidências de que o sistema nervoso e o sistema imune influenciam um ao outro (BLALOCK, 1994). Além disso, ambos os sistemas são conectados morfológicamente, pois a maioria dos órgãos linfóides recebe inervação simpática e vagal e há componentes imunológicos em vários níveis do sistema nervoso central (STRAUB et al., 1998).

As situações de estresse são a principal fonte de informação dessa interação sistema nervoso - sistema imune. Entretanto, a dificuldade nessa área começa com a própria definição de estresse, que tem sido muito usada em diferentes contextos, de tal forma que uma outra palavra talvez pudesse definir melhor as reações do organismo aos estímulos negativos e traumáticos.

Essa caracterização estava de acordo com as observações do início do século 19 e mesmo da Grécia antiga e da Idade Média sobre *humores corporais* e sua relação com o bem estar e a doença. Numa perspectiva científica, contudo, temos que referir o fisiologista francês CLAUDE BERNARD (1879), que descreveu

como o organismo é desafiado por muitos fatores ambientais, mas possui processos regulatórios que garantem a manutenção do meio interno (*milieu intérieur*). Esta idéia foi desenvolvida no século 20 pelo cientista americano WALTER CANNON (1929), que forjou o termo *homeostasia*, já mencionado anteriormente, para caracterizar a manutenção de parâmetros fisiológicos normais e detalhar os ajustes mediados pelo sistema nervoso autônomo durante o alerta e as situações de estresse. Durante a fase de ativação, que Selye descreveu como os componentes comportamentais básicos da *reação de fuga ou luta*, a fisiologia do organismo é dominada pelas ações do SNAS, o que até o momento continua sendo objeto de investigação, especialmente no que diz respeito às mudanças no sistema imune.

É importante ressaltar que o estresse também tem reações cognitivas e emocionais, além das fisiológicas, e esta dicotomia *mente / corpo* leva a uma certa confusão na literatura porque o estresse é algumas vezes definido e/ou quantificado pelos seus antecedentes ou conseqüências emocionais e cognitivas: ansiedade, disforia, hostilidade, pessimismo ou atenção e performance reduzidas (SCHEDLOWSKI e TEWES, 1999). Assim, no presente trabalho, o termo estresse será reservado para as respostas fisiológicas.

As interações entre situações de estresse e alterações imunológicas têm sido bem documentadas e implicadas em várias doenças humanas. No entanto, a ética não permite a experimentação em seres humanos e os modelos animais *in vivo* e *in vitro* são de grande valia para entender essa interação entre o sistema nervoso e o sistema imune, sendo importante a medida de várias variáveis imunológicas ao mesmo tempo para conseguir uma melhor entendimento do

estado imunológico de cada indivíduo. Há uma vasta literatura acerca dos efeitos do estresse na função imune de roedores. Vários modelos de estresse são comumente usados para estudar essa influência e, simplificando, podemos dividir esses modelos em três categorias: estresse físico, estresse social e estresse psicológico, embora não haja uma distinção completa entre eles. Desafios ambientais às pressões evolucionárias para seleção são estressores que podem ser psicológicos (medo, ansiedade), físicos (ferimentos, infecções) ou fisiológicos (privação de comida e água). Uma das funções primárias do cérebro é perceber, avisar do perigo e capacitar o organismo para lidar com as conseqüências. Essa função é cumprida através da liberação de neurotransmissores e hormônios da resposta ao estresse. No entanto, é importante ressaltar as limitações de uma generalização entre espécies no que diz respeito aos estudos acerca de situações de estresse e suas conseqüências. Assim, achados em roedores não são necessariamente aplicáveis a humanos (DEMETRIKOPOULOS et al., 1998).

As condições de estresse podem produzir seus efeitos na função imune de diversas maneiras. A resposta clássica de estresse, como descrita por Selye, consiste na liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) do hipotálamo, hormônio adeno-corticotrófico (ACTH) da pituitária anterior, e glicocorticóides do córtex adrenal, como já citado. Alguns autores têm sugerido que a imunomodulação induzida pelo estresse é simplesmente uma maneira elaborada de medir os bem documentados efeitos dos glicocorticóides no sistema imune. No entanto, como citado anteriormente, contribuições igualmente importantes são feitas pelo sistema nervoso simpático e pelo sistema opióide, entre outros. Na verdade, várias adaptações hormonais ocorrem em resposta a

sinais estressantes do ambiente processado pelo sistema nervoso, que modificam a função de áreas cerebrais específicas (HOLSBOER, 2001).

O papel do hipotálamo na função imune tem sido examinado melhor pela investigação do papel do CRH na mesma. O CRH reduz a proliferação de linfócitos, a atividade citotóxica de células NK e a produção de anticorpos (ver IRWIN et al., 1992). A pituitária, por sua vez tem um papel complexo na imunomodulação induzida por estresse, com mecanismos supressivos e compensatórios nas medidas imunológicas (KELLER et al., 1988). O papel das adrenais foi demonstrado pela adrenalectomia que bloqueou a linfopenia induzida por estresse, um efeito mediado pela corticosterona atuando em receptores esteróides do tipo II na adrenal, embora outros fatores também sejam importantes (ver McEWEN et al., 1997), mostrando que nem todas as mudanças induzidas por estresse na imunidade podem ser reduzidas a um simples efeito da corticosterona nas células imunológicas.

Tabela 4. Efeitos dos glicocorticóides nas células imune.

Aumento	Espécie/Célula
Receptores de insulina	linfócitos humanos
Receptores β - adrenérgicos	linfócitos humanos
Alta afinidade para receptores VIP	linfócitos humanos
Estimulação da IgE pela IL-4	linfócitos humanos
IgG, IgA, IgM	linfócitos humanos
Níveis de IgA no soro	linfócitos humanos
Diminuição	
Da produção de IL-1, 2, 6, 8, 12	Várias espécies
TNF, fator de estimulação de colônias granulócitos	Várias espécies

MHC-1 ou MHC-2 ou ambos	
Receptor Fc em granulócitos	Granulócitos humanos
Biossíntese de eicosanóides	macrófagos
mRNA pró-encefalina	células B de rato

Adaptado de McEWEN et al. (1997).

Taquicininas, estresse e imunidade.

A substância P (SP) foi o primeiro neuropeptídeo a ser descoberto, tendo sido identificado por von EULER e GADDUM (1931) no cérebro e no intestino de cavalos. A origem dessa denominação, substância P, vem das palavras “preparação” ou “pó”, pois von Euler dizia ter usado uma preparação padrão na forma de pó seco, convenientemente abreviada por “P” (OTSUKA e YOSHIOKA, 1993).

A caracterização da SP, a partir do hipotálamo de bovinos, evidenciou que esse peptídeo pertence à família das taquicininas, que possui a mesma seqüência de aminoácidos no carbono (C) terminal: **Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂**, onde “X” é, ou um resíduo aromático (Phe, Tyr) ou um resíduo alifático hidrofóbico (Val, Ile; ERSPAMER, 1981). Sob a denominação comum de taquicininas (TKs) está agrupada uma série de peptídeos com prováveis funções de neurotransmissão/neuromodulação central. Esta denominação decorre do fato desses peptídeos induzirem uma despolarização rápida do músculo liso em contraste com a

bradicinina, peptídeo já conhecido na época, que realiza a mesma ação lentamente (BERTACCINI, 1976).

Há cerca de 20 anos atrás, o único membro da família das TKs reconhecidamente presente no SNC de mamíferos era a SP. Entretanto, em 1983, quatro grupos de pesquisadores independentes (KANGAWA et al., 1983; KIMURA et al., 1983; MAGGIO et al., 1983; SCHIMADA et al., 1987) relataram a existência de duas outras TKs no SNC de mamíferos: a neurocinina A (NKA, substância K, neuromedina α ou neurocinina alfa) e a neurocinina B (NKB, neuromedina K). Além disso, TATEMOTO et al. (1985) isolaram outra TK, a neurocinina K (neuropeptídeo K) e depois uma quinta TK, a neurocinina γ (neuropeptídeo γ), foi identificada por Kage et al. (1988). Mais recentemente, a hemocinina-1 (HK-1) foi reconhecida como uma nova neurocinina (ZHANG et al., 2000).

As respostas biológicas das principais taquicininas em mamíferos são mediadas por alguns tipos de receptores farmacologicamente definidos, três dos quais foram clonados: NK₁, NK₂ e NK₃ (REGOLI et al., 1989; NAKANISHI, 1991; SEABROOK, 1995). As taquicininas endógenas (SP, NKA, NKB, HK-1) ligam-se preferencialmente, mas não exclusivamente, aos receptores NK₁, NK₂ e NK₃, respectivamente (REGOLI et al., 1988, HELKE et al., 1990, IVERSEN et al., 1990). A SP é o agonista preferencial para o receptor do tipo NK₁, enquanto que a NKA, o NP γ e a NKA (3-10) demonstram alta afinidade para o NK₂ e a NKB para o receptor NK₃ (REGOLI et al., 1988; HELKE et al., 1990). A HK-1, por sua vez, revela um alto grau de homologia com a SP e sugere-se que possa agir como um ligante endógeno dos receptores NK₁ (KURTZ et al., 2002). Os três tipos de

receptores (Tabela 5) são constituídos de pequenas proteínas com 350 a 500 resíduos de aminoácidos e pertencem à superfamília de receptores semelhantes aos da rodopsina, com sete domínios hidrofóbicos transmembrana, conectados pelas alças intra - e extracelulares. Esses receptores mostram forte semelhança com os receptores adrenérgicos e muscarínicos, além de numerosos outros receptores acoplados às proteínas G (REGOLI et al., 1994). A distribuição dos três diferentes tipos de receptores tem sido investigada empregando-se técnicas farmacológicas autorradiográficas, de radioligantes e, mais recentemente, também de biologia molecular (REGOLI et al., 1989; NAKANISHI, 1991; SEABROOK, 1995).

Os receptores NK₁ são codificados pelo gene *spr* e apresentam a seguinte ordem de afinidade pelas NKs naturais: SP > NKA > NKB. Esses receptores foram isolados no cérebro e glândulas salivares de rato (YOKOTA et al., 1989; HERSHEY e KRAUSE, 1990), em linfoblastos IM-9 (GERARD et al., 1991; TAKEDA et al., 1991), pulmão humano (GERARD et al., 1991; HOPKINS et al., 1991) e no genoma de camundongo (SUNDELIN et al., 1992). Os receptores NK₁ estão localizados principalmente no bulbo olfatório, corpo estriado, hipocampo, loco cerúleo, na região cinzenta periaquedutal do SNC. Estes receptores pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, cuja ativação leva à estimulação da via dos fosfoinosítídeos e elevação do cálcio intracelular (NAKANISHI, 1991; GUARD e WATSON, 1991). LEW et al., (1990) sugeriram uma heterogeneidade de receptores NK₁, propondo a existência de subtipos NK_{1A} e NK_{1B}. A esse respeito, SAKURADA et al. (1991) confirmaram, por estudos funcionais, a existência desses subtipos na medula de camundongos, enquanto

PETITET et al., (1992) propuseram também a existência desses subtipos no íleo de cobaia.

Os receptores NK₂, por sua vez, são codificados pelo gene *skr*, e apresentam a seguinte ordem de afinidade: NKA > NKB >> SP. Esses receptores foram isolados de estômago de bovinos (384 aminoácidos; MASU et al., 1987), estômago de ratos (390 aminoácidos; SASAI e NAKANISHI, 1989), traquéia humana (398 aminoácidos; GERARD et al., 1990; GRAHAM et al., 1991), jejuno humano (398 aminoácidos; KRIS et al., 1991) e genoma de camundongos (384 aminoácidos; SUNDELIN et al., 1992). Apesar de inúmeras controvérsias sobre a existência dos receptores NK₂ para taquicininas no SNC, vários estudos comportamentais sugerem sua presença em inúmeras regiões do cérebro, incluindo a substância negra (HAGAN et al., 1993), o corpo estriado (PONCELET et al., 1993), o núcleo mediano da rafe (MASON e ELLIOT, 1992) e o hipocampo (HAGAN et al., 1993). Outras regiões que apresentam receptores do tipo NK₂ são o córtex pré-frontal, o septo e a área tegmental ventral (OTSUKA e YOSHIOKA, 1993). Esse subtipo de receptor taquicinérgico também pertence à superfamília de receptores acoplados à proteína G e com produção de fosfoinosítídeos. Alguns estudos funcionais classificam esses receptores em subtipos NK₂A e NK₂B (DION et al., 1990; BRUNELLESCHI, 1992; MAGGI et al., 1992).

Já os receptores NK₃, codificados pelo gene *nkr*, têm afinidade por NKB > NKA > SP. Os receptores NK₃ foram isolados do cérebro de rato e possuem 452 aminoácidos (SHIGEMOTO et al., 1990). Sua localização no SNC é a seguinte: córtex, hipocampo, núcleo interpeduncular, além das lâminas I e II da medula espinhal (OTSUKA e YOSHIOKA, 1993). Esses receptores são também ligados à

produção de fosfoinosítídeos, via estimulação da fosfolipase C (PLC), por uma proteína G acoplada ao receptor. No entanto, esses são os receptores menos estudados (OTSUKA e YOSHIOKA, 1993) e, até recentemente, não se dispunha de agonistas ou antagonistas com alta seletividade para os receptores NK₃.

Outros estudos recentes demonstram a existência de receptores para as taquicininas também em linhagens de células gliais de ratos, em culturas de astrócitos de camundongos e ratos, em linhagens de células de astrocitoma de humanos e em cicatrizes gliais do nervo óptico transectado do coelho (PERRONE et al., 1986).

Tabela 5 - Características farmacológicas principais dos receptores de neurocininas.

RECEPTORES	NK ₁	NK ₂	NK ₃
Ordem de potência dos agonistas	SP > NKA > NKB	NKA > NKB >> SP	NKB > NKA > SP
Agonistas seletivos	SP metil-éster [Sar ⁹]SP sulfona [Pro ⁹]SP	[βAla ⁸]NKA(4-10) [Nle ¹⁰]NKA (4-10) GR 64349	Senktide [MePhe]NKB [Pro ⁷]NKB
Antagonistas seletivos	FK 888 SR 140333 RP 67580	SR 48968 L659877ciclo [Gln-Trp-Phe-Gly-Leu-Met]	SR 142801 [Trp ⁷ , [βAla ⁸]NKA(4-10)
Segundos mensageiros	IP ₃ /DG AMP _c	IP ₃ /DG AMP _c	IP ₃ /DG AMP _c
Gene	<i>spr</i>	<i>skr</i>	<i>nkr</i>

Adaptado de **REGOLI et al., 1994.**

OEHME et al. (1980) observaram a influência modulatória dos neuropeptídeos na resposta fisiológica ao estresse. A administração central de SP ou de outros agonistas seletivos do receptor neurocinérgico do tipo NK₁ promove uma exacerbação da atividade locomotora, da atenção e dos comportamentos de

autolimpeza (SAKURADA et al., 1989; BRENT et al., 1994), além de um aumento na pressão arterial, na frequência e no débito cardíacos, atividades comportamentais e fisiológicas típicas da reação de defesa, em ratos conscientes (UNGER et al., 1988; TSCHÖPE et al., 1992; CULMAN e UNGER, 1995).

Outros estudos demonstraram que a SP, agonista natural e preferencial dos receptores NK₁, está diretamente envolvida na modulação das reações de estresse e defesa no sistema límbico, em ratos (BRODIN et al., 1994) e gatos (SHAIKH et al., 1993), e na ansiedade experimental em camundongos (TEIXEIRA et al. 1996; De LIMA et al., 1997) e ratos (GAVIOLI et al., 1999 e 2002). FEHDER et al. (1997), após verificarem um aumento dos níveis sanguíneos de SP em resposta à ansiedade psicológica em humanos, propuseram que a SP serviria como um mediador nas reações imunológicas produzidas pelo estresse. Há ainda relatos de que a SP induziria a produção de citocinas, como a IL-1 β , nas células linfóides periféricas, assim como nas células neurogliais, envolvendo a ativação de receptores neurocinérgicos (EUTAMENE et al., 1995; DEROCQ et al., 1996).

Mudanças regionais no SNC dos níveis de SP em resposta ao estresse têm sido examinadas por vários autores. NAKAMURA et al. (1990) mediram os níveis de SP em várias regiões do cérebro de rato após a vibração total do corpo (20hz, 4G por 90min), usando ensaio imunoenzimático. A imunoreatividade da SP estava diminuída no córtex frontal e aumentada no núcleo *accumbens* e amígdala, sem modificação significativa no corpo estriado. ROSÉN et al., (1992) relataram que, de maneira similar, o manuseio de ratos durante imobilização de curta duração ou a injeção subcutânea de salina foram estímulos suficientes para induzir um aumento

nos níveis de SP na região periaquedutal cinzenta e uma redução no núcleo *accumbens*.

Por outro lado, há também uma literatura considerável descrevendo a interação da SP ou outras neurocininas no sistema imune, evidenciando as propriedades imunomodulatórias das taquicinininas, particularmente da SP. A proliferação de células T e B, a secreção de imunoglobulinas, a quimiotaxia celular e a proliferação de linfócitos são influenciadas pela SP ou outras taquicinininas (RAFFA, 1998), os linfócitos expressam receptores NK₁ que tem uma alta afinidade pela SP, porém, a SP aparentemente pode ser ativada por células B e monócitos via um receptor não neurocinérgico (PAYAN et al., 1984).

A SP está em fibras nervosas que inervam vários órgãos imunes ou tecidos, incluindo o timo, baço e linfonodos (WEIHE et al., 1989) e a liberação da SP dos terminais dos nervos sensoriais a coloca numa posição crítica nas respostas imunes mediadas por células e na hipersensibilidade imediata. Além disso, os receptores das taquicinininas têm sido identificados nestes tecidos (WIEDERMANN et al., 1986) e caracterizados em células leucocitárias, linfocitárias ou mononucleares, com técnicas de radioligantes ou por imunohistoquímica (McGILLS et al., 1987). A HK-1, por sua vez, parece desempenhar importante função na sobrevivência e na proliferação dos linfócitos-B, agindo como um fator autócrino do crescimento destas células hematopoéticas (KURTZ et al., 2002).

A SP se liga a receptores de superfície de células específicas em linfócitos humanos circulantes (Payan et al., 1984), em células T e B no baço de camundongos e placas de Peyers (STANISZ et al., 1987), nos leucócitos polimorfonucleares de coelho (MARASCO et al., 1981), nos monócitos humanos

(RUFF et al., 1985) e nos macrófagos de cobaia (HARTUNG et al., 1986). Pelos estudos *in vitro* e *in vivo* de EGGLEZOS et al. (1991) e de BERSTEIN (1991) ficou evidenciado um papel funcional desses receptores: as taquicininas estimulam a proliferação de células T humanas ou de camundongos, aumentando a ação de mitógenos, liberando citocinas (interferon gama, fator de necrose tumoral, e interleucinas) de células mononucleares e macrófagos, aumentando a produção e secreção de IgA e IgM e afetando a quimiotaxia e fagocitose celular. Posteriormente, foi demonstrado *in vivo* que as taquicininas têm um efeito na recirculação de linfócitos em linfonodos de carneiro, na reversão da involução do timo induzido pelo estresse e na produção de imunoglobulinas, em ratos e camundongos e muito destes efeitos são aparentemente mediados por receptores do tipo NK₂. KIMBALL et al. (1988) sugeriram que a SP ou outras neurocininas poderia desempenhar um papel na geração ou manutenção das condições inflamatórias, promovendo a produção de IL-1. Esta demonstração da atividade das neurocininas em células linfóides sugere que a estimulação neurogênica do mecanismo imunológico poderia também desempenhar um papel significativo nas neuropatias auto-imunes, tais como a esclerose múltipla (RAFFA, 1998).

Desta forma, os estudos anatômicos e funcionais sugerem que a SP é um importante transmissor do estresse. Este peptídeo e seu receptor preferencial NK₁ estão expressos ao longo das vias cerebrais processadoras do estresse, como na matéria cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e hipocampo. Adicionalmente, os estudos neuroquímicos, em ratos, mostraram um aumento nos conteúdos hipocampais e septais de SP após choques inevitáveis nas patas. No entanto, outros estudos relataram uma diminuição de SP após o estresse de

imobilização (para revisão ver VAN DER HART et al., 2002). Outros estudos também mostram resultados aparentemente contraditórios que sugerem de uma maneira geral, que o estresse pode ser modulado pela SP e como nossos estudos anteriores mostram o envolvimento da SP na modulação da ansiedade experimental, é provável que o bloqueio farmacológico do receptor NK₁ possa vir a ser uma abordagem terapêutica alternativa no alívio dos processos mal-adaptativos (comportamentais e fisiológicos) produzidos por situações de estresse, razão inicial pela qual propusemos o presente trabalho.

2. OBJETIVOS

Geral

Comparar os efeitos da substância P e de condições de estresse, avaliados no labirinto em cruz elevado e pelo perfil celular sanguíneo, na tentativa de entender o papel da SP e de seu receptor preferencial NK₁ na mediação do estresse experimental e suas conseqüências comportamentais e imunológicas.

Avaliação *in vivo*

Verificar os principais sistemas que participam na gênese e término dos efeitos comportamentais e na distribuição dos leucócitos promovidos pelo estresse de natação, com ênfase na participação da substância P e seu receptor NK₁ nesses processos.

Avaliação *ex-vivo* e *in vitro*

Verificar o papel da SP e o envolvimento do receptor NK₁ nos processos celulares básicos desencadeados pelo estresse com o uso de modelos *ex-vivo* e *in vitro*:

-Determinar o óxido nítrico produzido por macrófagos peritoneais de camundongos

-Determinar o óxido nítrico produzido por células de glioma de rato, C6.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AVALIAÇÃO IN VIVO

3.1.1. Considerações éticas

O presente trabalho envolveu procedimentos experimentais delineados de maneira tal que o sofrimento dos animais utilizados fosse minimizado. Procuramos usar um tamanho de amostra mínimo e adequado para as análises estatísticas e extrair o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos, de acordo com os procedimentos éticos estabelecidos na Assembléia Geral da SBNeC, Caxambu (1992). Os experimentos aqui realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (# 23080.001156/2001-50/UFSC).

3.1.2. Animais.

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas e machos adultos, pesando de 25 a 30 g, criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério da Coordenadoria Especial de Farmacologia do

CCB-UFSC. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, exceto durante a vigência dos experimentos. A temperatura ambiente, ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e o ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luz ligada das 06:00 às 18:00h) do Biotério eram controlados automaticamente. Foram realizados esfregaços vaginais nos camundongos fêmeas para determinar o ciclo estral e somente aquelas que estavam no dia do experimento na fase de diestro foram incluídos no estudo.

3.1.3. Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções:

A. Por via intraperitoneal (i.p.):

- **Lipopolissacarídeo LPS de *Escherichia coli* 0111: B4** (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA), gentilmente doada pelo Doutor Aleksander Zamprono (Farmacologia – UFPR). Doses de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
- **Aminoglutetimida [3-(4-aminofenil)-3-etil-2,6-piperidine-diona]** (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA), inibidor do citocromo P - 450 dependente das reações de hidroxilações, inibidor da síntese dos glicocorticóides (DOWDELL et al., 1999), gentilmente doada pela Dra. Roseli Coimbra Farges (Farmacologia – UFSC). Dose de 10 mg/kg, injetada intraperitonealmente 30 min antes dos animais serem submetidos ao estresse de natação ou a injeção

intracerebroventricular de SP 10 pmol, sendo que 1 h após retirava-se o sangue para a contagem dos leucócitos.

- **Naloxona, cloridrato de (Lot RM 87-032)**, antagonista opióide (PATEL et al., 2002). Dose de 3 mg/kg, injetada intraperitonealmente 30 min antes dos animais serem submetidos ao estresse de natação ou a injeção intracerebroventricular de SP 10 pmol, sendo que 1 h após retirava-se o sangue para a contagem dos leucócitos.
- **Propranolol, cloridrato de** (Lab. Wyeth, Divisão Ayerst do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), antagonista de receptores β -adrenérgicos (SANDERS e STRAUB, 2001). Dose de 10 mg/kg, injetada intraperitonealmente, 30 min antes dos animais serem submetidos ao estresse de natação ou a injeção intracerebroventricular de SP 10 pmol, sendo que 1 h após retirava-se o sangue para a contagem dos leucócitos.
- **Solução de cloreto de sódio a 0,9%** (Laborasa Indústria Farmacêutica Ltda, Brasil), solução controle, injetada intraperitonealmente, 30 min antes dos animais serem submetidos ao estresse de natação ou a injeção intracerebroventricular de SP 10 pmol, sendo que 1 h após retirava-se o sangue para a contagem dos leucócitos.

B. Para administração central (intracerebroventricular).

- **PBS** (“phosphate buffer solution” - solução de tampão fosfatada; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), usado como solução controle: NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM.
- **Substância P (SP = H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂)** (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), neurocinina endógena com ação preferencial nos receptores NK₁ (CHANG et al., 1971). A SP foi preparada como solução estoque (1mM) em PBS. Esta droga foi, posteriormente, diluída nas concentrações desejadas em PBS (pH 7,4), cuja dose ansiogênica ideal (10 pmol i.c.v.) foi determinada em experimentos prévios (TEIXEIRA et al., 1996).
- **FK888 {(4R)-4-hidroxi-1- [1-metil-1 H-indol-3 1] carbonil-propil]-L-N-benzil-N-metil-3-2-(2-naftil)-L-alaninamida}**, (Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japão), antagonista seletivo dos receptores NK₁ (FUJI et al.,1992). O FK 888 foi diluído em etanol na concentração de 1mM e estocado a -20°C em tubos Eppendorf siliconizados. Essa droga foi posteriormente diluída em PBS nas concentrações adequadas na hora do uso, cuja dose ansiolítica ideal (100 pmol i.c.v.) foi determinada em experimentos prévios (TEIXEIRA et al., 1996). A solução controle dos antagonistas neurocinérgicos foi preparada com 5% de etanol, para evitar qualquer interferência do solvente do FK888 na avaliação experimental.
- **Interleucina 1 β (citocina recombinante murina - IL-1 β ; lote BN091)** (R & D Systems INC., Minneapolis, EUA), gentilmente cedida pelo Dr. João Batista Calixto (Farmacologia – UFSC). A solução estoque foi preparada em PBS (1 –

10 mM) em tubos Eppendorf siliconizados, mantida a -18 ° C e diluída na concentração desejada no dia dos experimentos (Bluthé *et al.*, 1997).

- **Antagonista do receptor de Interleucina 1 recombinante humano (IL-1ra; lote B01D3)** (R & D Systems INC., Minneapolis, EUA), gentilmente cedida pela Dra. Glória Emília Petto de Souza (Farmacologia – USP-RP). A solução estoque foi preparada em PBS (1 – 10 mM) em tubos Eppendorf siliconizados, mantida a -18 ° C e diluída na concentração desejada no dia dos experimentos (Bluthé *et al.*, 1997).

3.1.4. Administração das drogas.

As injeções i.c.v. foram dadas sob anestesia superficial com éter, como descrito por HALEY e McCORNICK (1957) e modificado por LAURSEN e BELKNAP (1986). A SP foi injetada na dose de 10 pmol, o FK888 foi injetado na dose de 100 pmol, doses escolhidas em nossos estudos prévios (TEIXEIRA *et al.*, 1996), a IL-1 β recombinante humana foi injetada na dose de 900 pg/camundongo e o antagonista do receptor de IL-1, IL-1ra, na dose de 1,8 μ g/camundongo, doses escolhidas através da literatura (BLUTHÉ *et al.*, 1997). Todas as drogas foram administradas num volume de 2 μ l por 30 s e a cânula permaneceu no local por mais 3 s. Os animais controle foram tratados de modo similar com a solução controle, PBS. Após a recuperação do reflexo postural, os animais foram

observados no teste comportamental e 1h após foi retirado o sangue e foram realizadas as contagens da série leucocitária em contador automático. Os animais tratados com IL-1 β e IL-1ra foram observados no teste comportamental imediatamente após a injeção i.c.v. e seu sangue foi retirado para a contagem da série leucocitária 2 h após.

Ao fim das observações comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a localização correta da injeção i.c.v. foi verificada *a fresco* com auxílio de um bisturi e uma lupa. O cérebro de cada animal foi cortado no plano coronal e verificamos se a posição da cicatriz deixada pela agulha injetora coincidia com a localização de qualquer um dos ventrículos laterais. Os resultados obtidos com animais cuja localização da injeção estava incorreta e/ou ainda daqueles que apresentaram sinais de hemorragia foram descartados da análise estatística (menos de 5 % dos animais).

3.1.5. Procedimentos gerais e equipamentos.

Todos os experimentos foram realizados entre 8:00 e 13:00h, com exceção dos experimentos de decurso temporal com lipopolissacarídeo (LPS) que foram executados também no período inicial da tarde. Os animais eram deslocados do Biotério Setorial para o biotério do laboratório com, no mínimo 24 h de antecedência, período de tempo este que também era o da última manipulação desses animais, tais como troca da cama de serragem, marcação dos mesmos,

etc... No dia de cada experimento os animais foram habituados às condições experimentais em uma ante-sala no próprio laboratório por um período de, pelo menos, 1 h antes do início de cada experimento.

3.1.5.1. Estresse de natação forçada.

Os camundongos foram colocados num cilindro plástico (15 cm de diâmetro, 25 cm de altura) com água numa profundidade de 17 cm ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) por 3 ou 6 min (De LIMA et al., 1991; PORSOLT et al., 1977). Após este tempo eles foram avaliados no labirinto em cruz elevado em diferentes tempos e se retirou o sangue para as diferentes determinações em diversos tempos.

3.1.5.2. Estresse de imobilização no frio.

Os camundongos foram submetidos ao estresse de imobilização no frio, isto é, imobilizados em um tubo plástico perfurado (2,5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento) e colocados num refrigerador ventilado a 4°C por 30 min (De LIMA et al., 1991). Após este tempo, eles foram avaliados no LCE em diferentes tempos e seu sangue foi coletado para as diferentes determinações.

3.1.5.3. Adrenalectomia.

A retirada bilateral das adrenais foi realizada de acordo com técnicas cirúrgicas assépticas padrões, com os camundongos completamente anestesiados com éter. Os animais falso-operados (SHAM-ADX) passaram pelos mesmos procedimentos cirúrgicos que os animais adrenalectomizados (ADX), exceto que as glândulas adrenais não foram removidas. Após a cirurgia, os animais foram mantidos numa caixa para a recuperação, aquecida por uma lâmpada de 40 W, a fim de minorar a hipotermia conseqüente à anestesia geral. Posteriormente, os animais foram colocados em gaiolas no biotério do laboratório, com ração e solução fisiológica de NaCl 0,9% no bebedouro, onde permaneceram por 7 dias até serem utilizados.

3.1.5.4. Labirinto em cruz elevado.

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi baseado no modelo validado por LISTER (1990) e consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 15 cm), também opostos, de acrílico transparente (ANSELONI et.al., 1995). Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma e o chão são de acrílico preto, enquanto que as paredes laterais dos braços fechados são de acrílico transparente. O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão.

Para evitar a queda dos animais dos braços abertos, esses foram circundados por 0,25 cm de acrílico transparente. O labirinto usado nos experimentos estava localizado numa sala com luz vermelha (15 W). Após o teste de cada animal, o aparelho foi limpo com solução de etanol a 10%.

Imediatamente após as injeções das diversas drogas e a recuperação do reflexo postural, os animais foram colocados individualmente no LCE. Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 min (PELLOW et al., 1985). As medidas comportamentais registradas no LCE foram os parâmetros clássicos: frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados. A frequência total de entradas foi obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos a percentagem de entradas no braço aberto foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice foi multiplicado por 100. De maneira semelhante, foi calculada a percentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. Os parâmetros, conhecidos como etológicos, tais como: números de estiramentos, imersões de cabeça, levantamentos, autolimpeza, além do número de bolos fecais, também foram registrados neste modelo (RODGERS et al., 1997).

3.1.5.5. Temperatura retal.

A temperatura retal dos camundongos foi medida com um termômetro Lumiscope 2018 digital. A temperatura retal foi avaliada um dia antes dos experimentos com LPS e no dia dos experimentos foi determinada em diferentes tempos, de acordo com o protocolo.

3.1.5.6. Contagem diferencial da série branca sangüínea.

Após a administração central de SP ou a submissão dos animais às diferentes condições de estresse (imobilização no frio ou natação forçada 3 ou 6 min), lipopolissacarídeo (LPS), adrenalectomia (ADX), e a avaliação no LCE, os animais foram levemente anestesiados com éter para a coleta de sangue periférico, por punção retro-orbital (HARKNESS e WAGNER, 1995) com uma micropipeta de Pasteur. Sucintamente, se pressiona a conjuntiva lateralmente com a pipeta Pasteur até a parede posterior da órbita onde se pinça o seio venoso e, assim, o sangue flui e é coletado em Eppendorf com EDTA e posteriormente analisado por um método automatizado (*Coulter Counter*, Coulter Electronics, Hialeah, FL, EUA) no Laboratório de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, à exceção para os experimentos com as citocinas, IL-1 β , IL-1ra e a SP e FK888, os quais foram analisados no aparelho automático *Serono Baker System 9000* e *Hematology Analyser*, sendo que o leucograma foi feito manualmente em lâminas coradas com corante Giensa, no

Laboratório Médico Santa Luzia (Florianópolis, SC). Foram analisados leucócitos totais e diferenciais, neutrófilos e linfócitos. Os leucócitos foram avaliados através de equipamentos eletrônicos que contam, medem e identificam as células, utilizando diferentes métodos combinados como: citoquímica de fluxo com peroxidase, impedância de abertura e condutividade por radiofrequência e dispersão de raios laser. Estes equipamentos permitem, assim, a contagem global e a medida precisa do volume das células e a obtenção de índices e de histogramas de distribuição por volume.

3.1.5.7. Dosagem de citocinas

Foi usado o *kit* Quantikine M (MLB00; R&D Systems, INC., MN. EUA) para a quantificação de concentrações plasmáticas de IL-1 β . O sangue foi retirado como descrito acima por punção retro-orbital. Este ensaio emprega uma técnica de imunoensaio enzimático sanduíche quantitativa (DINARELLO, 1993). A microplaca é pré-revestida com um anticorpo policlonal purificado específico para a IL-1 β de camundongo. Padrões, controles e amostras são pipetados dentro dos poços e qualquer IL-1 β de camundongo, se presente, será ligada pelo anticorpo imobilizado. Após o processo de lavagem das placas (com pipetas multicanais) para a retirada das substâncias que não se ligaram, um anticorpo policlonal específico para a IL-1 β ligado à enzima é adicionado aos poços. Segue-se à

lavação para remover qualquer reagente enzima - anticorpo que não se ligou. Uma solução de substrato é então adicionada aos poços e a reação enzimática produz um produto azul que se torna amarelo quando a solução de parada é adicionada. A intensidade da cor desenvolvida é medida por espectrofotômetro é proporcional à quantidade de IL-1 β ligada na etapa inicial. Os valores das amostras são então interpolados nos valores de uma curva padrão para determinação de suas concentrações. Esta técnica foi realizada no laboratório do Dr. João Batista Calixto (Farmacologia – UFSC), com a ajuda do Dr. Adair Roberto Santos e do doutorando Juliano Ferreira.

3.2. AVALIAÇÃO EX-VIVO

3.2.1. Produção de radical livre (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos fêmeas e machos tratados com SP 10 pmol.

Após 1 h da injeção i.c.v. com SP 10 pmol, os animais fêmeas e machos foram sacrificados por deslocamento cervical, 10 ml de PBS foi injetado i.p. em cada animal e retirou-se o líquido peritoneal contendo macrófagos. Este líquido foi colocado para centrifugar por 1500 rpm/10 min e, após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com 2 ml de DMEM para cada animal (1 ml sem ativação foi colocado no poço da placa de 24 poços,

um total de 10^6 células por poço, e 1 ml para posterior ativação com LPS+IFN γ), sendo mantido na estufa de CO $_2$ até o dia seguinte. Após 24 h, retiramos a placa da estufa de CO $_2$ e nos grupos com ativação colocamos 1 μ g/ml de LPS + IFN γ (10%). A fonte de IFN- γ foi sobrenadante condicionado por células L-1210 (leucemia linfoblástica murina). Experimentos preliminares mostraram que 10% v/v deste meio condicionado equivale a aproximadamente 10 U/ml de IFN- γ e a placa voltou para a estufa por mais 48 h. Após este tempo, retiramos 100 μ l de cada poço e realizamos a reação de Griess para a pesquisa de nitrito.

Determinação de nitrito pela reação de Griess:

Os níveis de nitrito foram medidos pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN et al., 1982). Brevemente, 100 μ l do sobrenadante de macrófagos ativados ou não foram transferidos para a placa de 96 poços, onde foi adicionado o mesmo volume do reagente de Griess. Esse reagente foi preparado na hora do ensaio e consiste na mistura de volumes iguais de reagente A (sulfanilamida 1% dissolvida em H $_3$ PO $_4$ 10%) e reagente B (alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% dissolvida em água de Milli-Q). Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em leitor de placas a 540 nm. Curvas-padrão de nitrito de sódio foram feitas (0 a 100 μ M) simultaneamente e, finalmente, após interpolação por regressão linear, os valores foram expressos como concentração (μ M) de nitrito.

3.3.AVALIAÇÃO IN VITRO

3.3.1. Reagentes drogas e tratamentos.

- Meio de cultura **Eagle** modificado por **Dulbecco (DMEM)** e **soro bovino fetal** a 10%(SFB), adquiridos da GIBCO (São Paulo, Brasil).
- **Lipopolissacarídeo LPS de *Escherichia coli*** sorotipo 0111: B4 (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, EUA), gentilmente doado pelo Dr. Jamil Assreuy (Farmacologia – UFSC).
- **Substância P (SP = H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂)** (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), neurocinina endógena com ação preferencial nos receptores NK₁ (CHANG et al., 1971). A SP foi preparada como solução estoque (1mM) em PBS. Essa droga foi, posteriormente diluída nas concentrações desejados em PBS (pH=7.4).
- **FK888 {(4R)-4-hidroxi-1- [1-metil-1 H-indol-3 1] carbonil-propil]-L-N-benzil-N-metil-3-2-(2-naftil)-L-alaninamida}**, (Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japão), antagonista seletivo dos receptores NK₁ (FUJI et al.,1992). O FK 888 foi diluído em etanol na concentração de 1mM e estocados a -20°C em tubos de Eppendorf siliconizados. Esta droga foi, posteriormente, diluída em PBS, nas concentrações adequadas na hora do uso.

- **N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME)**, (Research Biochemical International, RBI, Natick, MA, EUA), inibidor reversível da enzima óxido nítrico sintase (CROSSIN, 1991; GRAY et al., 1991; BELSIVI et al., 1991), gentilmente doado pelo Dr. Jamil Assreuy (Farmacologia – UFSC), preparado em PBS nas concentrações adequadas na hora do uso.

3.3.2.Linhagem celular

As células da linhagem C6 de glioma de rato foram cedidas pelo laboratório do Dr. Márcio Alvarez da Silva e da Dra. Andréa Trentin (Biologia Celular – UFSC) e foram mantidas em garrafas plásticas de cultura contendo o meio DMEM, complementado com 10% de soro bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 mM HEPES, pH 7,4, em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO₂. Para a realização dos experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Trypan (0,5%) Um total de 10⁶ células por poço foi plaqueado em placas plásticas de 24 poços para os experimentos.

3.3.3. Determinação de óxido nítrico.

A análise eletroquímica foi realizada utilizando o aparelho *Nitric Oxide Meter Mark II* (NOMK) da WPI (World Precision Instruments, INC. Sarasota, FL, EUA) junto com o sensor ISO-NOP. O ISO-NO pode ser usado para a medida direta do óxido nítrico (NO) e a medida indireta de ambos nitratos (NO₂) e nitritos (NO₃). Seguindo a redução do nitrato para nitrito no reator, um volume conhecido da solução de reação no reator é tomado e adicionado a solução de ácido sulfúrico 0,1M/iodeto de potássio. Nesta solução, o nitrito é convertido imediatamente a nitrato, de acordo com a seguinte equação: $2\text{NO}_2 + 2\text{I}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{NO} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{I}_2$ e detectado pelo sensor, sendo que o íon iodeto não é forte o suficiente para reduzir o nitrato.

Estas dosagens foram feitas no laboratório da Dra. Maria Teresa Riggio Lima – Landman (Farmacologia – EPM/UNIFESP), pela mestrandia Luciana Takahashi Carvalho Ribeiro.

3.4. Análise Estatística.

Todos os dados foram analisados pelo software Graphpad INSTAT® versão 2.05 e Statistica for Windows Release 4.5, Stat Soft, Inc. 1993 e foram expressos como médias \pm erro-padrão da média (EPM) e cada valor reflete a média de 8-10 animais (estudos *in vivo* e *ex-vivo*) ou a média de 3-4 amostras por grupo (estudos *in vitro*). Os dados obtidos foram analisados usando-se a análise

de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, conforme indicado na legenda das figuras, seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas. No caso de 2 amostras foi utilizado o teste *t* de Student não-pareado bicaudal. Níveis de probabilidade inferiores a 5% ($P < 0,05$) foram considerados indicativos de significância.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO IN VIVO

4.1.1. Comparação dos efeitos da substância P (SP) no comportamento e na distribuição de leucócitos em camundongos machos e fêmeas.

Objetivos específicos

Investigar se existem diferenças na resposta comportamental, avaliada no labirinto em cruz elevado (LCE), e na distribuição de leucócitos produzidos pela substância P (SP) injetada intraventricularmente, entre camundongos machos e fêmeas.

Resultados

A figura 1 mostra que a administração i.c.v. da substância P 10 pmol, dose ansiogênica escolhida em estudos prévios (TEIXEIRA et al., 1996), produz uma diminuição significativa na percentagem do tempo despendida nos braços abertos

do LCE em ambos os sexos ($F_{(1,29)} = 4,4$; $P < 0,05$) nos animais tratados com SP ($F_{(1,29)} = 21,0$; $P < 0,05$; interação - $F_{(1,29)} = 0,5$ $P > 0,05$). (Além disso, o mesmo tratamento promoveu em ambos os sexos tratados com SP redução significativa na frequência de entradas nos braços abertos em relação aos grupos controle de fêmeas e de machos ($F_{(1,29)} = 12,43$; $P < 0,05$) não diferendo em relação ao sexo ($F_{(1,29)} = 2,9$; $P > 0,05$) ou a interação- $F_{(1,29)} = 0,05$; $P > 0,05$), sem alterar a atividade locomotora dos animais no aparelho, como se pode verificar pelo número de entradas nos braços fechados, que não foi alterado por qualquer tratamento ($F_{(1,29)} = 0,1$; $P > 0,05$), em ambos os sexos ($F_{(1,29)} = 1,0$; $P > 0,05$); interação- $F_{(1,29)} = 0,22$; $P > 0,05$). Os machos tratados com SP i.c.v. também apresentaram uma redução na frequência de entradas nos braços abertos do LCE, mas este efeito não alcançou significância estatística.

A influência do sexo no efeito da SP 10 pmol i.c.v. sobre os parâmetros etológicos avaliados em camundongos no LCE por 5 min pode ser observada na figura 2. A ANOVA revela diferenças sexuais nas imersões de cabeça, sendo que as fêmeas tratadas com SP ($F_{(1,29)} = 7,5$; $P < 0,05$), mostram uma diminuição mais acentuada deste parâmetro quando comparadas aos machos ($F_{(1,29)} = 7,3$; $P < 0,05$; para interação- $F_{(1,29)} = 0,53$; $P > 0,05$). No número de estiramentos somente as fêmeas tratadas com SP apresentaram um aumento significativo desta medida, em relação ao seu respectivo grupo controle ($F_{(1,28)} = 7,7$; $P < 0,05$), embora os machos que receberam SP também tenham mostrado um efeito similar ($F_{(1,28)} = 0,27$; $P > 0,05$; interação- $F_{(1,29)} = 0,80$; $P > 0,05$). Nos outros parâmetros, autolimpeza ($F_{(1,26)} = 2,4$), levantamento ($F_{(1,28)} = 0,78$) e bolos fecais ($F_{(1,27)} = 0,0$), não foram observadas diferenças significantes entre os sexos e tratamentos ($P >$

0,05), embora as fêmeas tratadas com SP tenham apresentado uma tendência a apresentar um número maior de comportamentos de autolimpeza.

Quanto à distribuição leucocitária, a figura 3 mostra uma diminuição significativa no número de leucócitos em fêmeas ($F_{(1,44)} = 8,9$; $P < 0,05$), 1 hora após a injeção i.c.v. de SP 10 pmol, ($F_{(1,44)} = 3,26$; $P = 0,07$); interação- $F_{(1,44)} = 0,63$ $P > 0,05$) sendo que o número neutrófilos não foi afetado pelo tratamento ($F_{(1,44)} = 0,73$; $P > 0,05$), em ambos os sexos ($F_{(1,44)} = 1,3$; $P > 0,05$); interação- $F_{(1,44)} = 0,6$; $P > 0,05$). Já o número de linfócitos foi reduzido significativamente só em fêmeas ($F_{(1,44)} = 7,8$; $P < 0,05$), tratadas e controle ($F_{(1,44)} = 2,4$; $P > 0,05$; interação- $F_{(1,44)} = 0,04$; $P > 0,05$).

Conclusões parciais

Nossos dados mostram que as fêmeas parecem ser mais sensíveis que os machos às alterações de comportamento e na distribuição de leucócitos promovidos pela SP injetada centralmente, razão pela qual, todos os outros experimentos aqui descritos foram realizados somente com fêmeas.

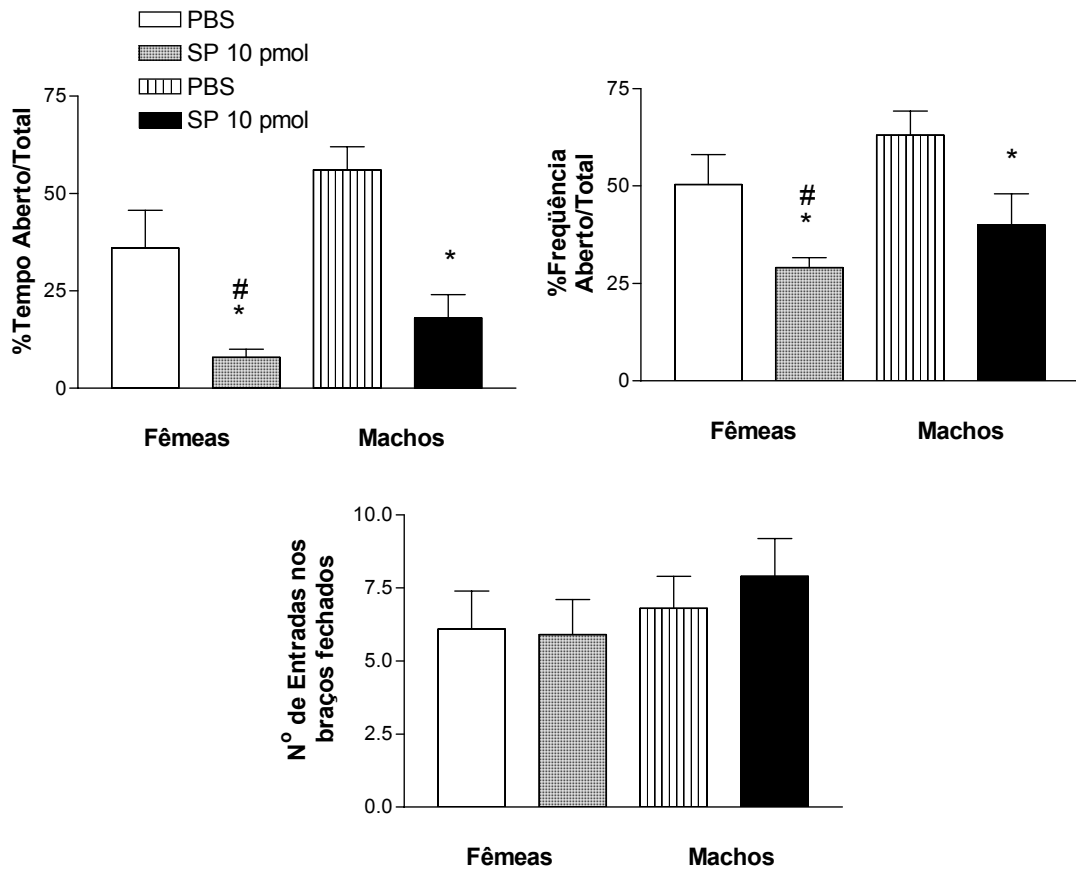


Figura 1. Influência do sexo no efeito da SP (10 pmol i.c.v.) no tempo de permanência nos braços abertos, na freqüência de entradas nos braços abertos e no n° de entradas nos braços fechados, avaliados em camundongos no LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$), em relação aos valores obtidos nos respectivos grupos controle e a grade (#), em relação ao grupo de machos controle (ANOVA bivariada, seguida do teste de Newman-Keuls). O n° de animais usados por tratamento foi de 8 a 10 por grupo experimental.

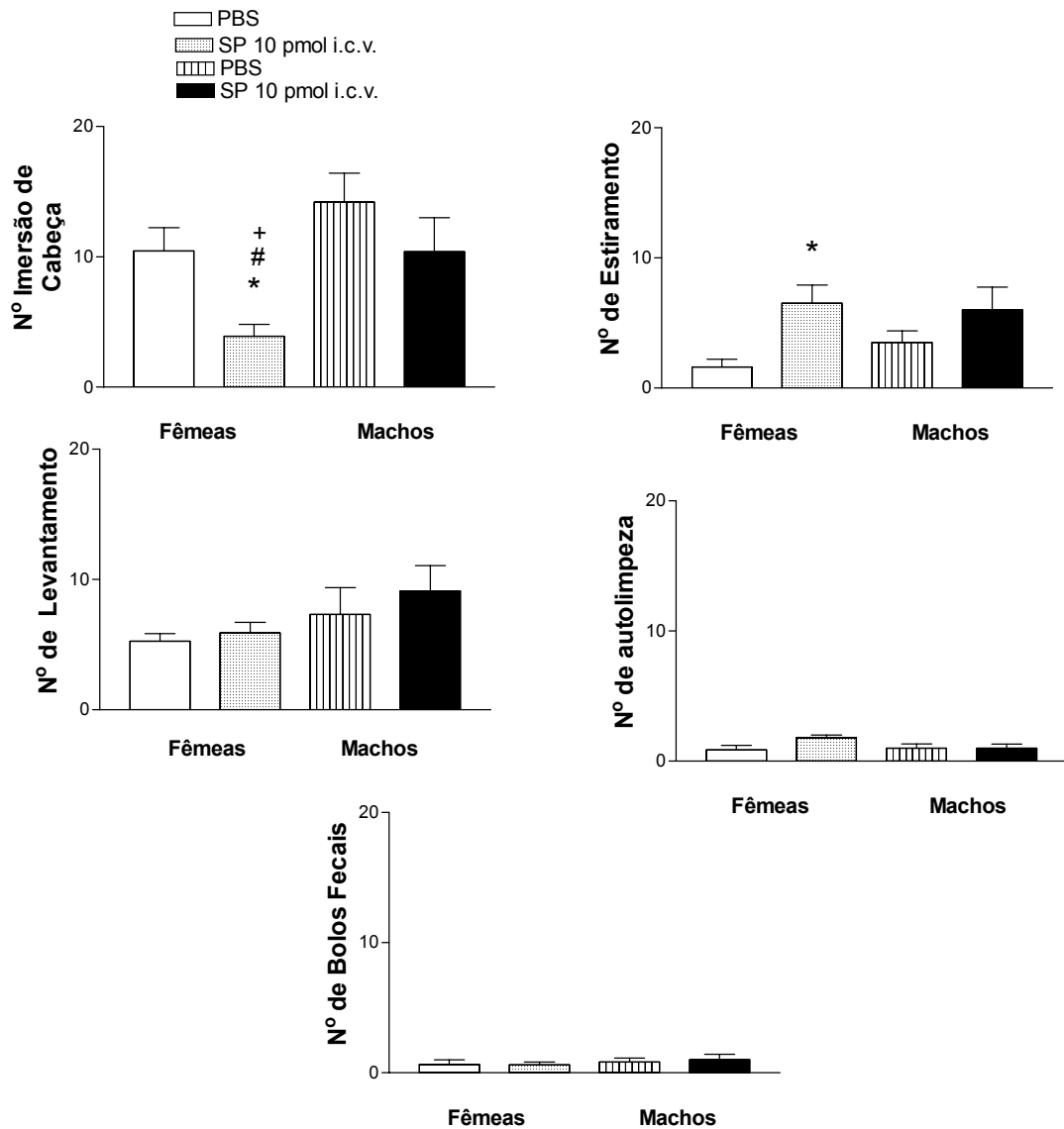


Figura 2. Influência do sexo nos efeitos da SP (10 pmol i.c.v.) nos parâmetros etológicos avaliados em camundongos no LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$), em relação aos valores obtidos nos respectivos grupos controle (C) e a grade (#), em relação ao grupo de macho controle e a cruz (+) em relação a SP dos machos (ANOVA bivariada, seguida do teste de Newman-Keuls). O n° de animais usados por tratamento foi de 8 a 10 por grupo experimental.

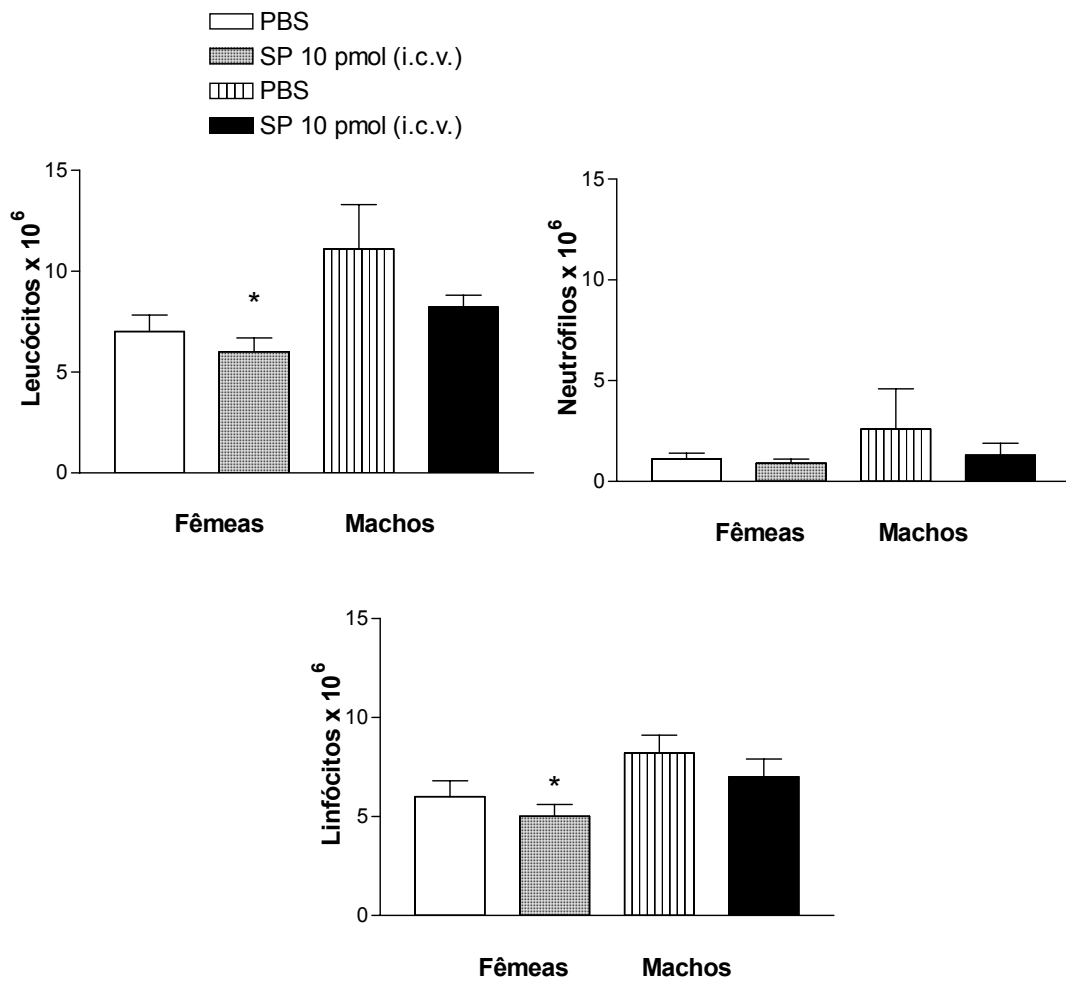


Figura 3 - Influência do sexo na distribuição diferencial de leucócitos, avaliada em camundongos 1 h após sua administração central de SP (10 pmol i.c.v.). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$), em relação aos valores obtidos nos respectivos grupos controle (C). (ANOVA bivariada, seguida do teste de Newman-Keuls). O n° de animais empregados por tratamento foi de 9 – 16 por grupo experimental.

4.1.2. Mudanças no comportamento e na distribuição de leucócitos em camundongos submetidos a diferentes tipos de estressores.

Objetivos específicos

Caracterizar as alterações comportamentais e imunológicas de animais submetidos a diferentes tipos de estresse para selecionar o estresse e os períodos de observação comportamental e para a coleta sanguínea a serem usados como comparação aos efeitos comportamentais e fisiológicos da SP.

Resultados

A) Estresse de natação de 3 min

Os efeitos do estresse de natação por 3 min, imediatamente e 1 h após a submissão ao estresse, no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE) em condições de luz branca (60 W), podem ser observados na figura 4. A ANOVA mostrou que há diferenças significantes ($F_{(2,27)} = 3,417$; $P < 0,05$) na frequência de entradas nos braços abertos, sendo que os animais estressados e testados imediatamente após no LCE apresentam uma

diminuição nesta medida. Em relação à percentagem do tempo de permanência nos braços abertos, esta medida não foi significativamente diferente entre os grupos experimentais e controle ($F_{(2,27)} = 2,429$; $P > 0,05$), mas o grupo submetido ao estresse de natação por 3 min e imediatamente depois observado no LCE mostrou uma drástica redução neste parâmetro, quando comparado ao grupo controle e o estressado testado após 1 h. Este grupo também mostrou uma redução no número de entradas nos braços fechados, em relação aos outros dois grupos ($F_{(2,27)} = 5,868$; $P < 0,05$). Assim, os animais submetidos ao estresse de natação por 3 min e imediatamente avaliados no LCE mostraram uma acentuada redução na movimentação no labirinto (entradas nos braços fechados) e na exploração dos braços abertos. Uma hora após a submissão ao estresse de natação por 3 min os animais não mais diferiam dos animais controle.

A influência do estresse de natação por 3 min no comportamento de camundongos avaliados no LCE, sob luz vermelha (15 W), está mostrada na figura 5. A frequência de entradas nos braços abertos não foi significativamente alterada pela submissão ao estresse de natação, embora os animais testados logo após a sessão de estresse tenham apresentado uma redução deste parâmetro, que não alcançou significância estatística ($t_{18} = 1,157$; $P > 0,05$). A percentagem do tempo de permanência nos braços abertos foi diminuída de modo significativo neste grupo, em relação ao grupo controle ($t_{18} = 2,123$; $P < 0,05$), o mesmo ocorrendo com o número de entradas nos braços fechados ($t_{18} = 5,628$; $P < 0,05$).

Nas mesmas condições de luminosidade, isto é, sob luz vermelha de 15 W, à semelhança dos experimentos feitos com a SP, a influência do estresse de natação por 3 min nos parâmetros etológicos avaliados no LCE em camundongos

estão apresentados na figura 6. O número de imersões de cabeça, o de estiramentos, a autolimpeza e os bolos fecais mostraram-se reduzidos no grupo estressado quando comparado ao grupo controle ($t_{18} = 3,685$, $t_{18} = 3,903$, $t_{18} = 6,373$, respectivamente; $P < 0,05$). O número de comportamentos de levantamento não foi, entretanto, alterado significativamente ($t_{18} = 2,095$; $P > 0,05$) pela submissão ao estresse de 3 min, na avaliação procedida no escuro imediatamente após a sessão de estresse, embora também tenha havido uma tendência à diminuição desta medida comportamental.

A influência do estresse de natação por 3 min na distribuição dos leucócitos foi avaliada logo em seguida ao estresse, imediatamente após, 1 h e 2 h após o labirinto em cruz elevado e está mostrada na figura 7. Não houve diferenças significantes no número de leucócitos ($F_{(4,34)} = 2,58$; $P = 0,054$), neutrófilos ($F_{(4,34)} = 2,263$; $P = 0,082$) e no número de linfócitos ($F_{(4,34)} = 2,417$; $P = 0,06$), porém o grupo submetido ao estresse de natação por 3 min cuja coleta foi feita 1 h após o estresse apresentou uma tendência a leucopenia, neutrofilia e linfopenia, à semelhança do observado após a injeção central de SP.

Conclusões parciais

O estresse de natação por 3 min promove alterações comportamentais nos animais avaliados no LCE que são evidentes imediatamente após a submissão ao estresse e já não estão presentes depois de 1 h. No entanto, 1 h após o estresse

verifica-se uma tendência a alterações da série branca sangüínea. Estas mudanças comportamentais e do perfil celular sangüíneo são similares àquelas produzidas pela administração intracerebroventricular de SP.

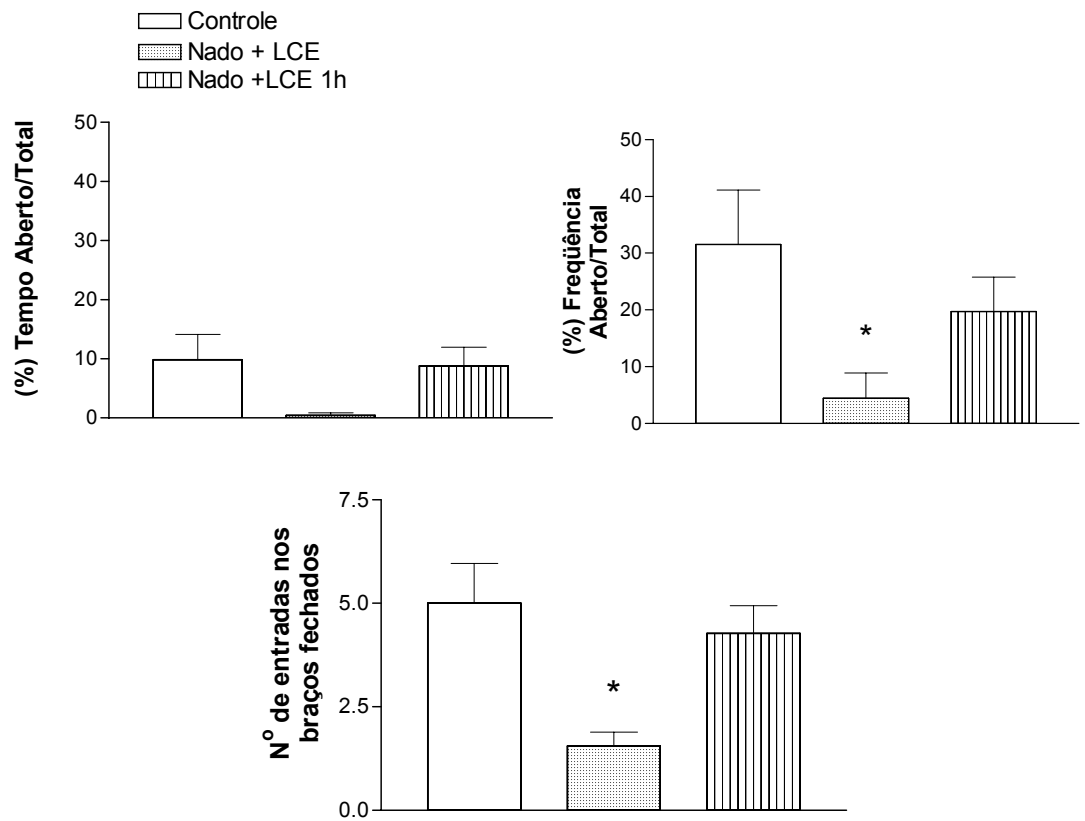


Figura 4. Efeito do estresse de natação por 3 min no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), sob luz branca (60 W). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida do teste Newman-Keuls). O número de animais usados em cada grupo foi de 9 a 10 por grupo experimental.

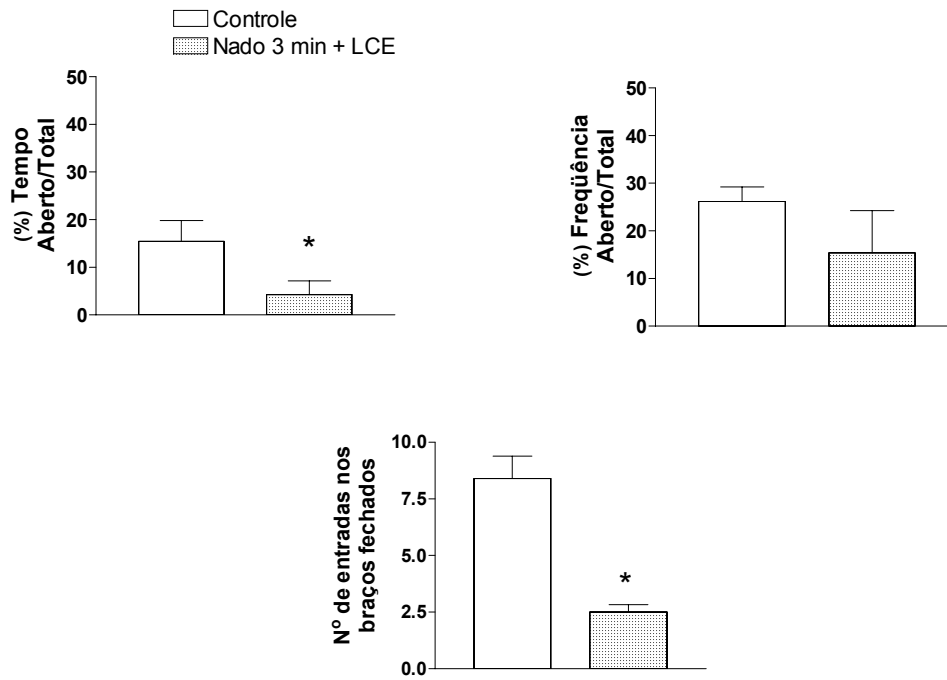


Figura 5. Efeito do estresse de natação por 3 min no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), sob luz vermelha (15 W). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida do teste Newman-Keuls). O número de animais usados em cada grupo foi de 9 a 10 por grupo experimental.

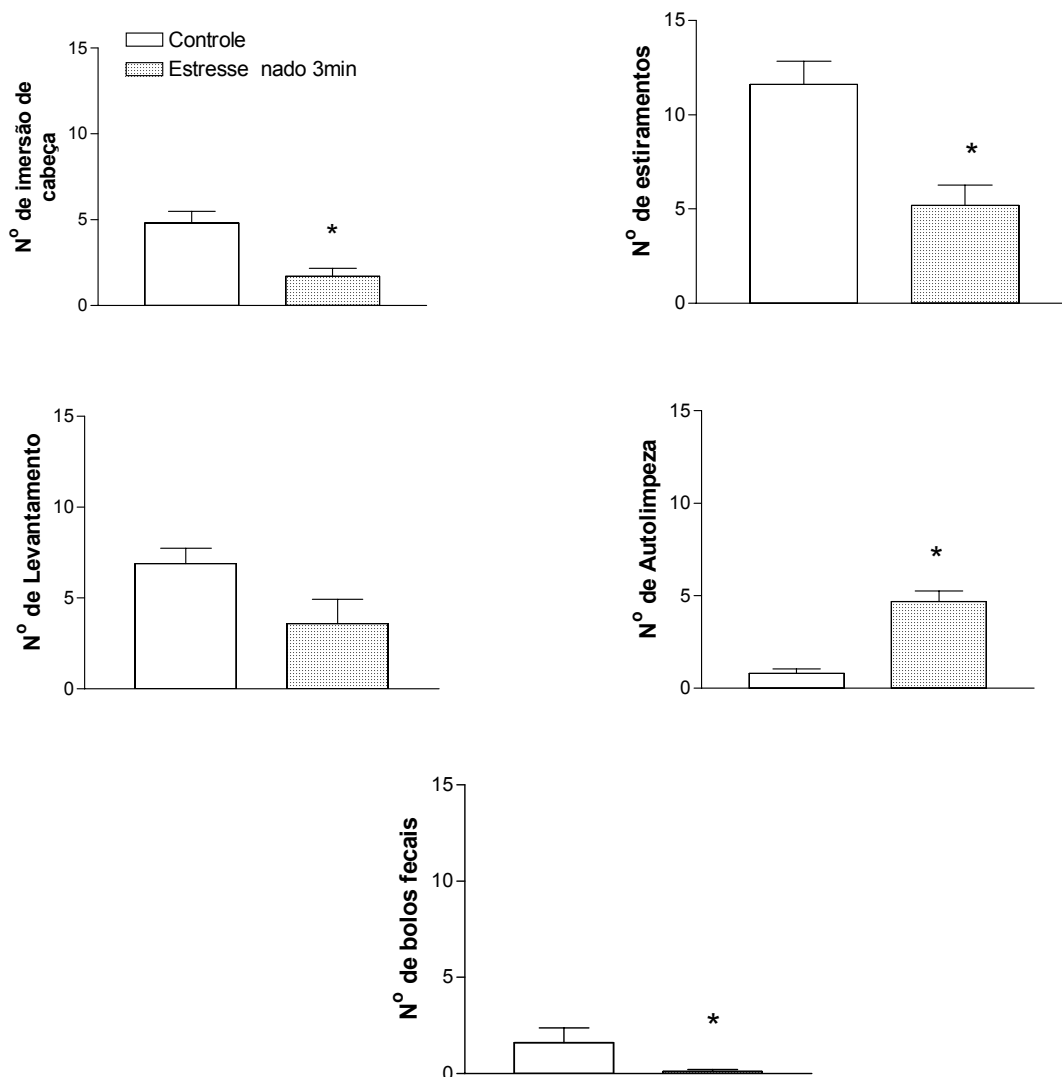


Figura 6. Efeito do estresse de natação por 3 min nos parâmetros etológicos avaliados em camundongos no labirinto em cruz elevado (LCE), sob luz vermelha (15 W). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida do teste Newman-Keuls). O número de animais usados em cada grupo foi de 9 a 10 por grupo experimental.

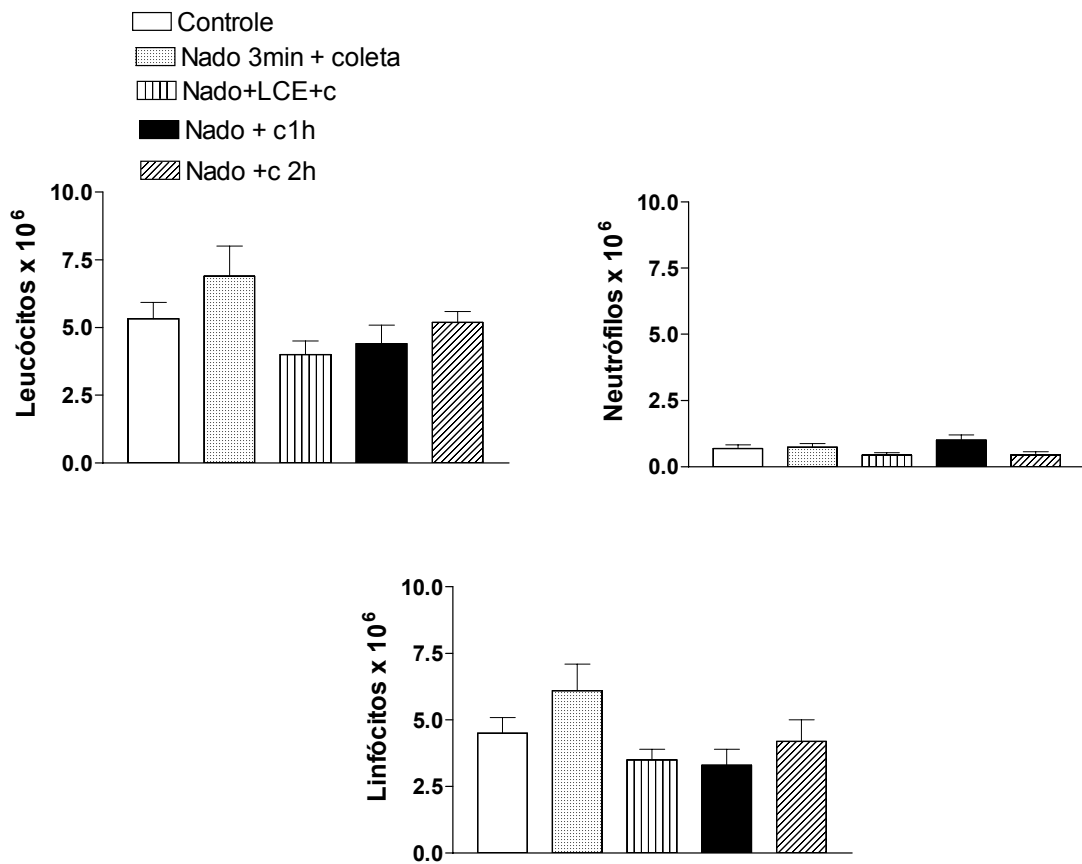


Figura 7. Efeito do estresse de natação por 3 min na distribuição diferencial dos leucócitos avaliada em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM (ANOVA univariada seguida do teste Newman-Keuls). O número de animais usados em cada grupo foi de 6 a 10 por grupo experimental.

B) Estresse de natação por 6 min.

Os efeitos do estresse de natação por 6 min no comportamento dos camundongos, avaliados no LCE imediatamente após o estresse, podem ser observados na figura 8. A frequência de entradas nos braços abertos não foi alterada de modo significativo pela submissão dos animais ao estresse de natação por 6 min ($t_{13} = 1,184$; $P > 0,05$), embora estes animais apresentem uma redução deste parâmetro. A percentagem do tempo de permanência nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados foram significativamente menores no grupo estressado ($t_{13} = 2,601$ e $t_{13} = 5,544$, respectivamente; $P < 0,05$), quando comparado ao controle.

Os efeitos do estresse de natação por 6 min nos parâmetros etológicos, avaliados em camundongos no LCE, são mostrados na figura 9. Todos os parâmetros foram significativamente ($P < 0,05$) alterados em comparação aos valores do controle, sendo que o número de imersões de cabeça ($t_{13} = 3,788$), o de estiramentos ($t_{13} = 3,643$), comportamentos de levantamento ($t_{13} = 3,668$) e bolos fecais ($t_{13} = 2,660$) foram reduzidos pela submissão ao estresse de natação por 6 min, enquanto que o comportamento de autolimpeza foi aumentado por esta condição de estresse ($t_{13} = 2,733$).

A influência do estresse de natação 3 min ou 6 min nos parâmetros sanguíneos (coleta feita 1 h após o estresse) pode ser observada na figura 10. O número de leucócitos não foi significativamente alterado pela submissão ao estresse ($F_{(2,25)} = 2,748$; $P = 0,08$), apesar de uma clara tendência a leucopenia no

grupo estressado por 6 min. Da mesma maneira o número de neutrófilos não foi mudado de forma significativa ($F_{(2,26)} = 1,154$; $P = 0,331$), mas apresentou-se aumentado em ambos os grupos, em comparação aos valores controle; enquanto o número de linfócitos foi significativamente menor ($F_{(2,26)} = 3,830$; $P < 0,05$) no grupo de estresse de natação por 6 min, em relação ao grupo controle

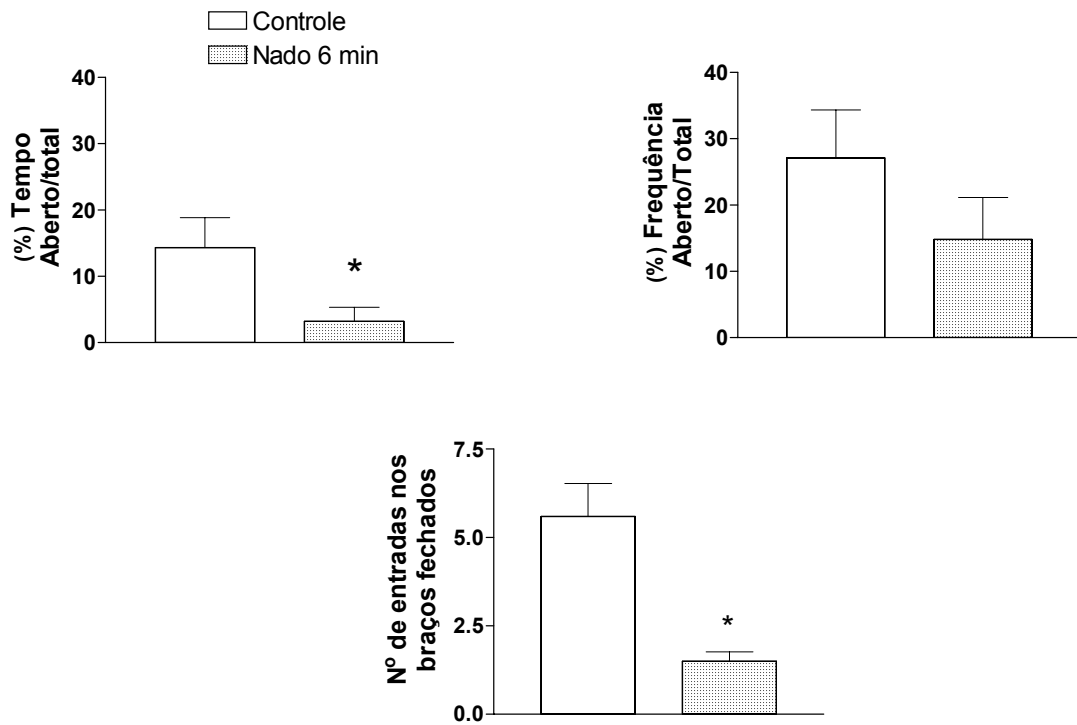


Figura 8. Efeito do estresse de natação por 6 min no comportamento dos camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE) por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste t de Student não-pareado bicaudal). O número de animais usados em cada grupo experimental foi de 9 a 10 por grupo experimental.

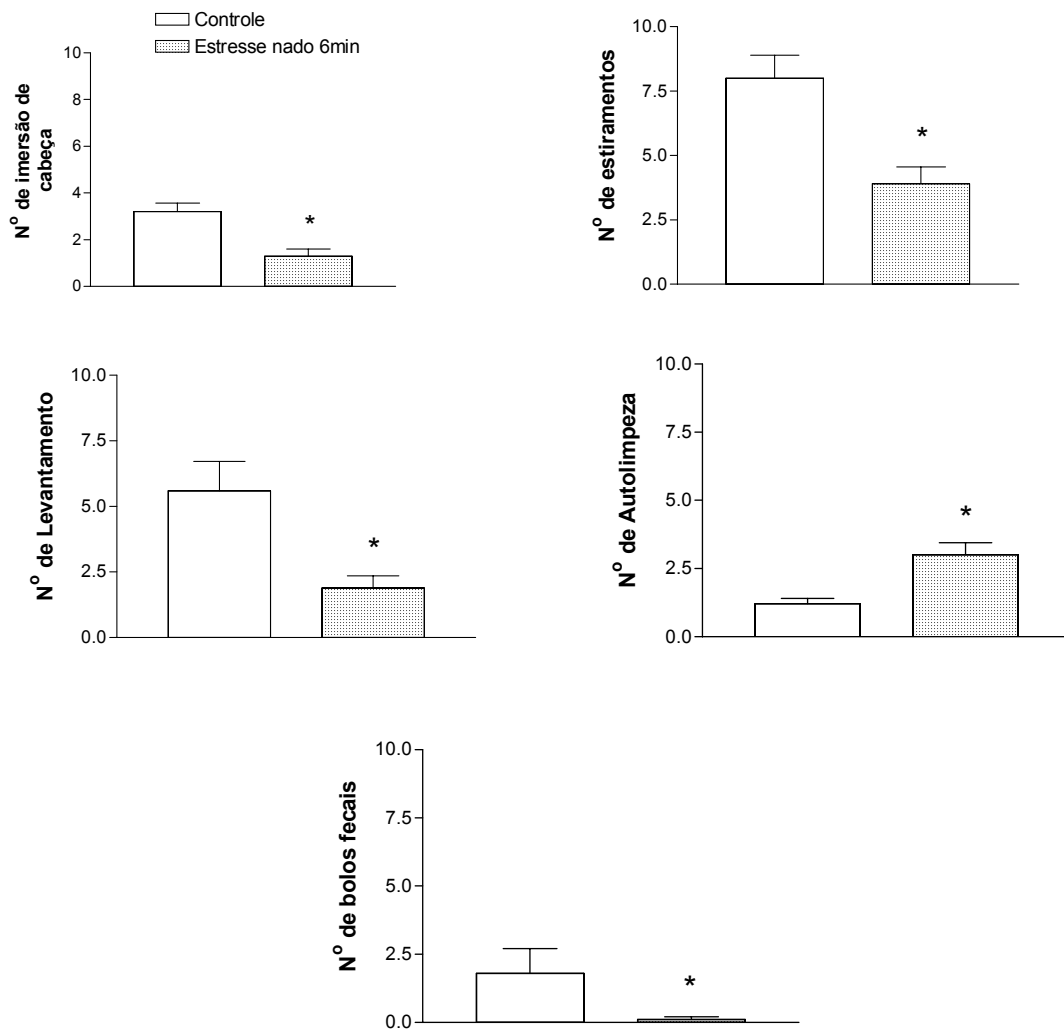


Figura 9. Efeito do estresse de natação por 6 min nos parâmetros etológicos avaliados em camundongos no labirinto em cruz elevado (LCE). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste t de Student não-pareado bicaudal). O número de animais usados em cada grupo experimental foi de 9 a 10 por grupo experimental.

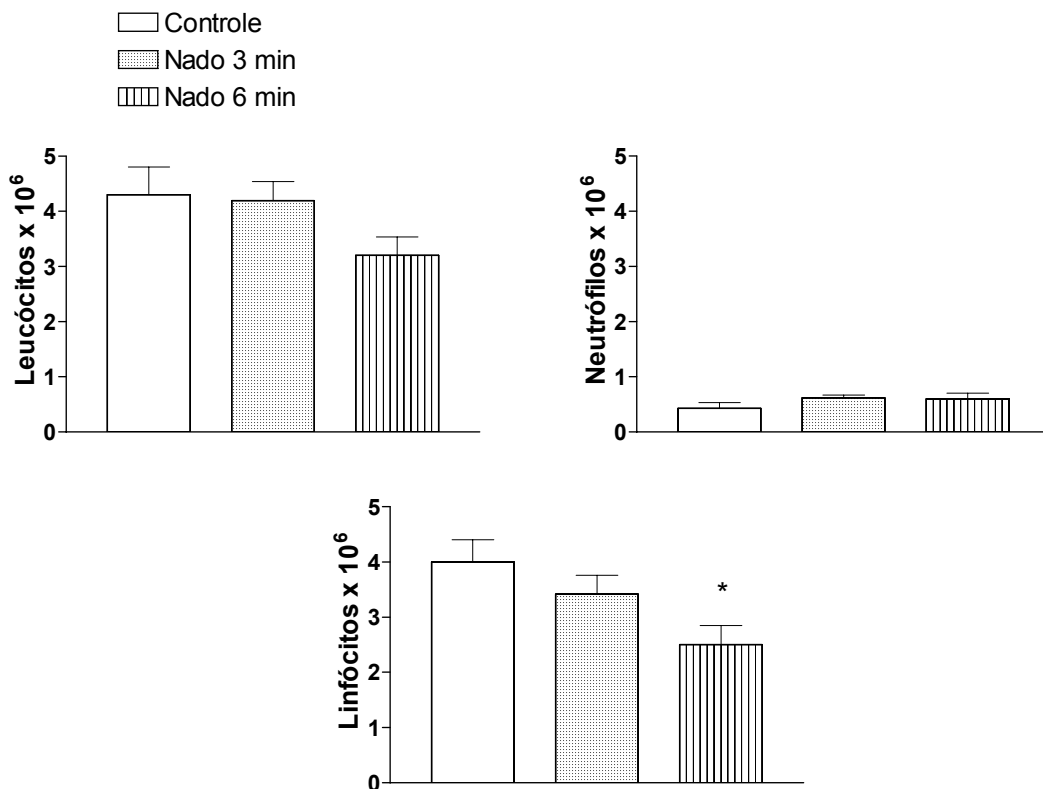


Figura 10 - Efeito do estresse de natação por 3 min ou 6 min na distribuição diferencial dos leucócitos avaliada em camundongos após 1 h do estresse. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida do teste Newman-Keuls). O número de animais usados em cada grupo experimental foi de 9 a 10 por grupo experimental.

C) Estresse de imobilização a 4°C por 30 min.

Na figura 11 observamos a influência do estresse de imobilização no frio (4°C por 30 min) no comportamento de camundongos, avaliado no labirinto em cruz elevado, imediatamente após a submissão ao estresse. A percentagem do tempo e a frequência de permanência nos braços abertos não foram significativamente alteradas pela submissão ao estresse de imobilização no frio ($t_{18} = 0,8384$ e $t_{18} = 1,070$, respectivamente; $P > 0,05$, respectivamente). O número de entradas nos braços fechados, no entanto, foi reduzido significativamente ($t_{18} = 2,631$; $P < 0,05$) pela submissão a esta condição de estresse.

A influência do estresse de imobilização a frio (4°C) por 30 min nos parâmetros etológicos avaliados no LCE por 5 min, imediatamente após o estresse, estão mostrados na figura 12. Com exceção da autolimpeza que foi aumentada significativamente pela submissão ao estresse de imobilização no frio ($t_{18} = 5,720$; $P < 0,05$), nenhum outro parâmetro como o número de imersões de cabeça ($t_{18} = 1,942$), de estiramentos ($t_{18} = 1,715$), comportamentos de levantamento ($t_{18} = 0,3801$) e bolos fecais ($t_{18} = 1,949$) foi alterado de modo significativo ($P > 0,05$), pela submissão a esta condição de estresse, embora tenha havido uma redução marcante na defecação dos animais estressados.

Na figura 13 podemos observar a distribuição diferencial de leucócitos no sangue coletado 1 h após o estresse de imobilização no frio por 30 min. As

contagens de leucócitos ($t_{17} = 0,5527$), neutrófilos ($t_{17} = 0,8979$) e linfócitos ($t_{17} = 1,177$) não foram mudadas significativamente ($P > 0,05$) pela submissão dos animais ao estresse de imobilização.

Conclusões parciais

O estresse de natação por 6 min foi mais efetivo em alterar o comportamento e os parâmetros da série branca sangüínea do que o estresse de natação por 3 min ou o de imobilização no frio. As alterações comportamentais e na distribuição dos leucócitos após a submissão aos diferentes estresses foram, em maior ou menor grau, similares àquelas produzidas pela injeção central de SP. Assim, para dar continuidade aos estudos, comparando os efeitos da administração central de SP, o estresse de natação por 6 min na luz vermelha (15 w) foi a condição experimental escolhida.

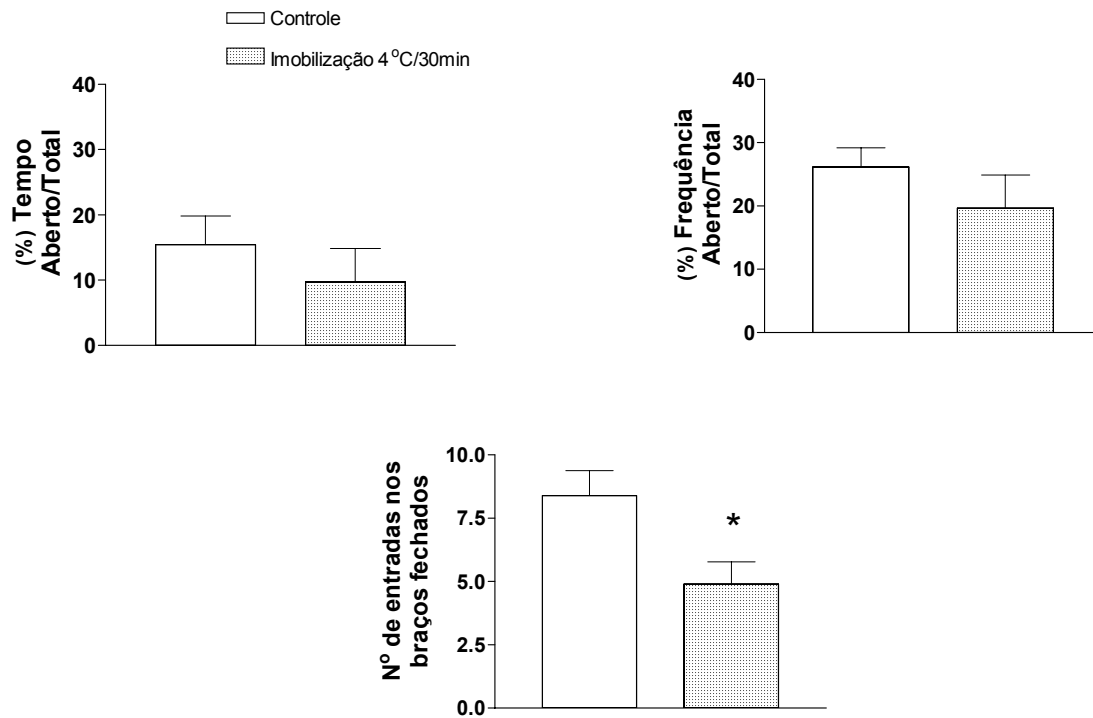


Figura 11- Efeito do estresse de imobilização a frio (4°C) por 30 min no comportamento de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE) em uma sessão de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste t de Student não-pareado bicaudal). O número de animais usados em cada grupo experimental foi de 10 por grupo experimental.

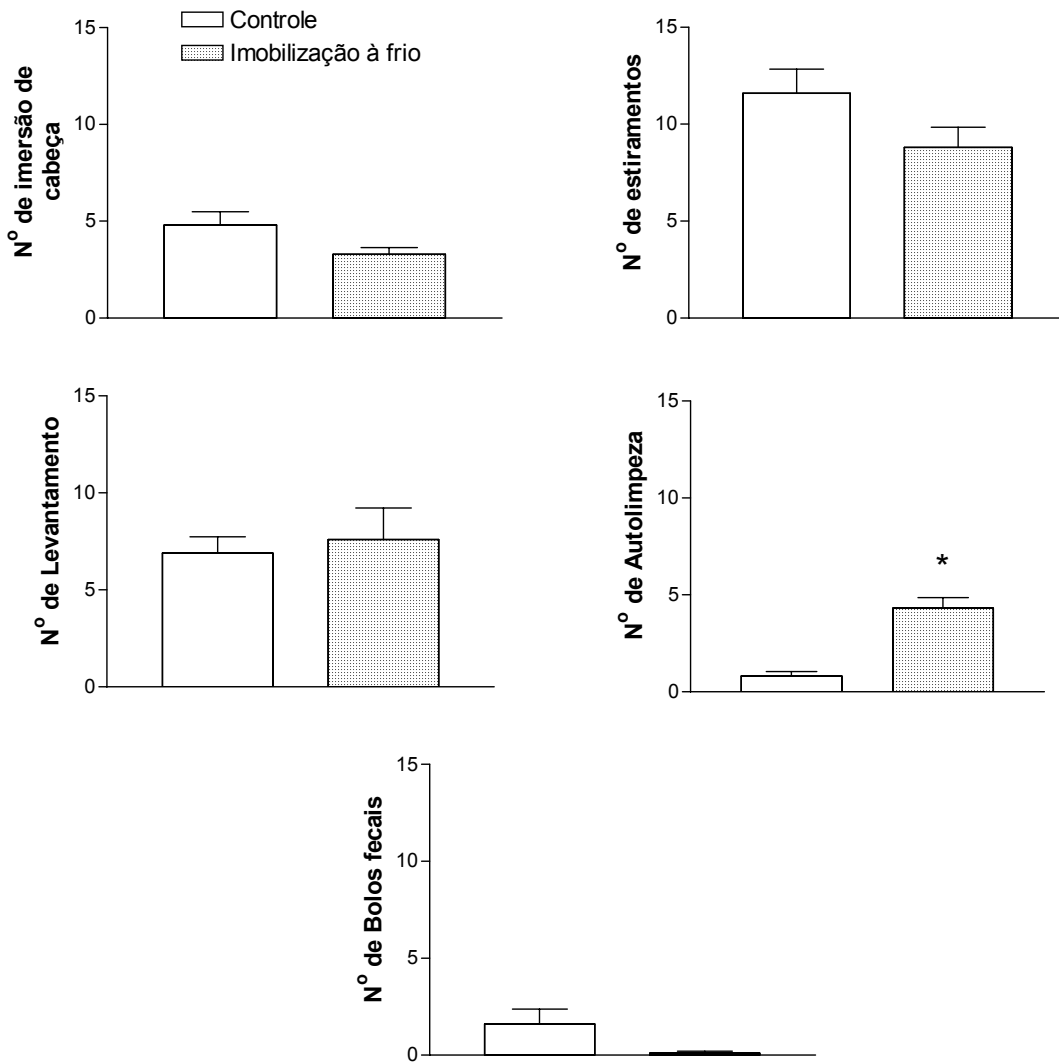


Figura 12- Influência do estresse de imobilização a frio (4°C) por 30 min nos parâmetros etológicos de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste t de Student não-pareado bicaudal). O número de animais usados em cada grupo experimental foi de 10 por grupo experimental.

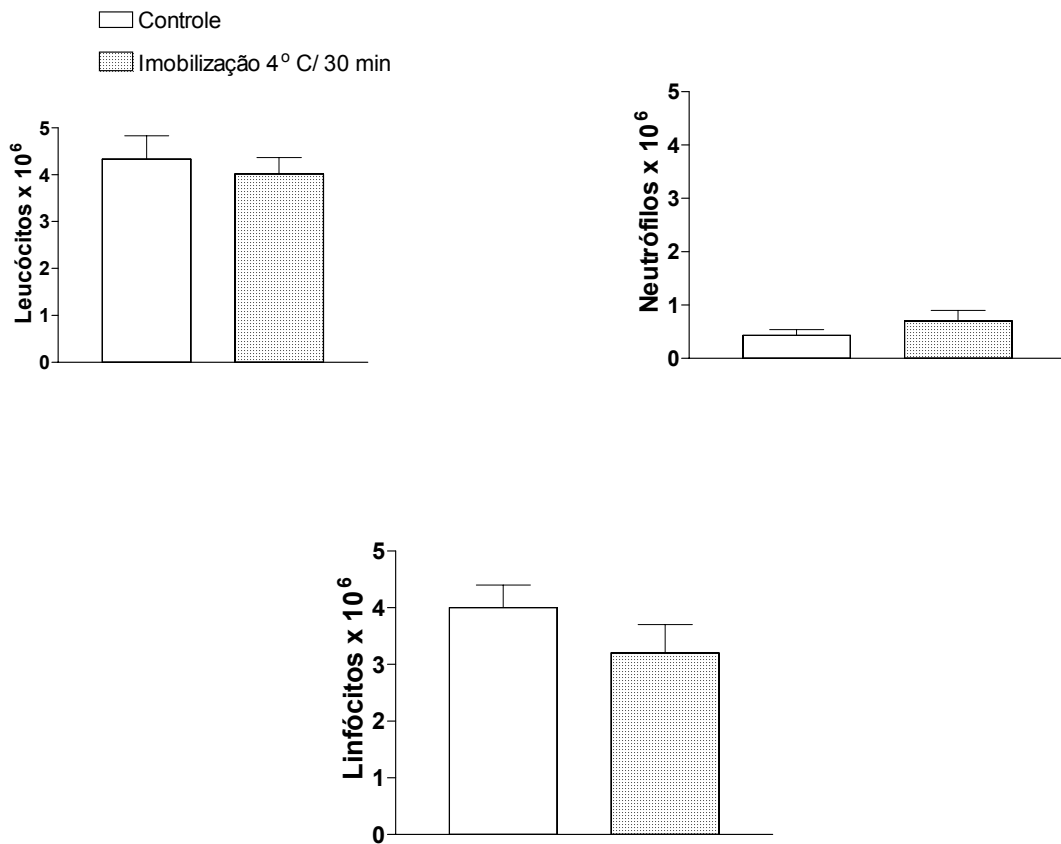


Figura 13 - Efeito do estresse de imobilização a frio (4°C) por 30 min na distribuição diferencial de leucócitos 1 h após o estresse de imobilização. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM (teste *t* de Student não-pareado bicaudal). O número de animais usados em cada grupo experimental foi de 9 a 10 por grupo experimental.

4.1.3. Participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) na mediação das respostas comportamentais e na distribuição dos leucócitos de camundongos produzidas pela SP ou pelo estresse de natação.

Objetivos específicos

Verificar a importância das glândulas adrenais e, adicionalmente, investigar a importância do eixo HPA utilizando substâncias farmacologicamente ativas nesse sistema na resposta comportamental e na distribuição de leucócitos produzida pelo estresse de natação 6 min e pela SP administrada centralmente.

Resultados

A) Participação das glândulas adrenais

Os efeitos da adrenalectomia no comportamento de camundongos submetidos ao estresse de natação, avaliados no LCE por 5 min, 7 dias após a cirurgia, podem ser observados na figura 14. Não houve alterações significativas ($P > 0,05$) nos parâmetros clássicos registrados no LCE, isto é, na frequência de

entradas nos braços abertos ($F_{(2,26)} = 2,424$), na percentagem do tempo nos braços abertos ($F_{(2,26)} = 0,1828$), nem tampouco no número de entradas nos braços fechados ($F_{(2,26)} = 3,132$).

Os efeitos da adrenalectomia nos parâmetros etológicos de camundongos avaliados no LCE por 5 min estão mostrados na figura 15. Não houve mudanças significativas ($P > 0,05$) nos números de imersões de cabeça ($F_{(2,26)} = 0,02595$), de estiramentos ($F_{(2,26)} = 0,5711$), de autolimpeza ($F_{(2,26)} = 1,857$) e na defecação ($F_{(2,26)} = 0,5219$), respectivamente. O número de comportamentos de levantamento foi reduzido pela adrenalectomia em animais submetidos ao estresse de natação ($F_{(2,26)} = 5,353$; $P < 0,05$).

A figura 16 mostra o efeito da adrenalectomia na distribuição de leucócitos em camundongos submetidos ao estresse de natação. O número de leucócitos ($F_{(2,22)} = 1,979$) e neutrófilos ($F_{(2,22)} = 0,5321$) não diferiu de maneira significativa do grupo controle ($P > 0,05$), mas o número de linfócitos foi menor no grupo *sham*, quando comparado ao grupo adrenalectomizado ($F_{(2,21)} = 4,652$; $P = 0,02$).

Conclusões Parciais

A adrenalectomia não promoveu alterações significativas no comportamento dos animais no LCE e na distribuição de leucócitos nos animais submetidos ao estresse de natação. A adrenalectomia, no entanto, reverteu a linfopenia observada no grupo falso-operado (*sham*), sugerindo a participação de

outros hormônios e/ou outros sistemas neurosecretórios, que não só hormônios adrenais, na modulação das alterações comportamentais e imunológicas induzidas pelo estresse de natação.

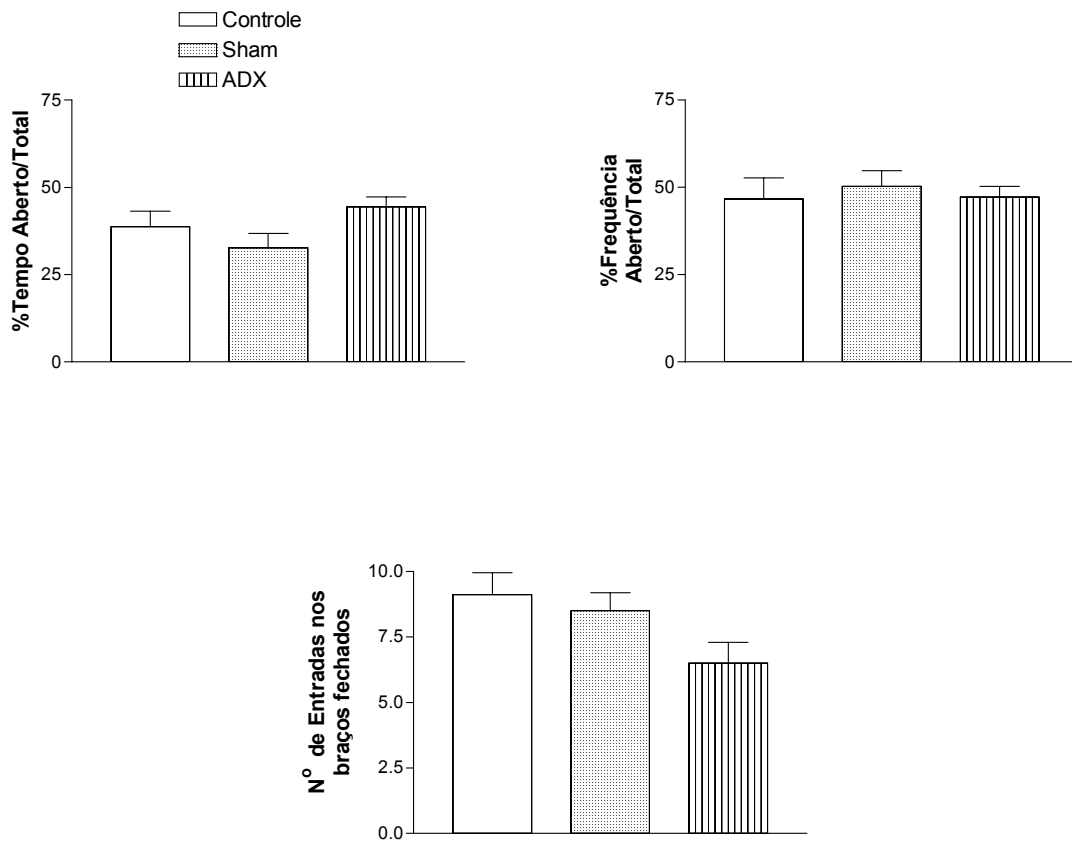


Figura 14- Efeitos da adrenalectomia no comportamento de camundongos submetidos ao estresse de natação, avaliados no labirinto em cruz elevado. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM (ANOVA univariada, seguida do teste de Newman-Keusl). O número de animais usados foi de 9 a 10 por grupo experimental.

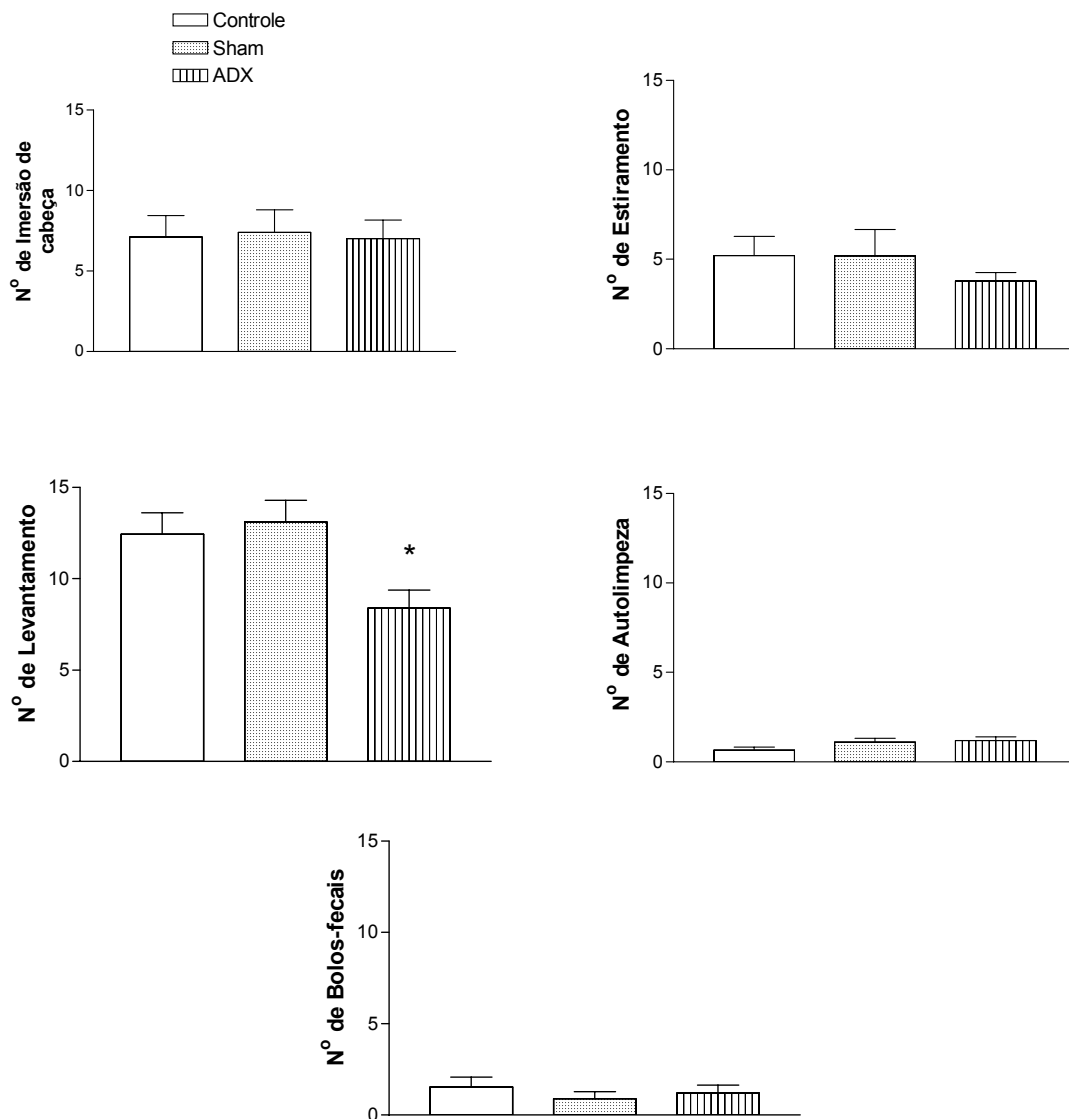


Figura 15 - Efeitos da adrenalectomia nos parâmetros etológicos de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), sete (7) dias após a cirurgia. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA univariada, seguida do teste Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 9 a 10 por grupo experimental.

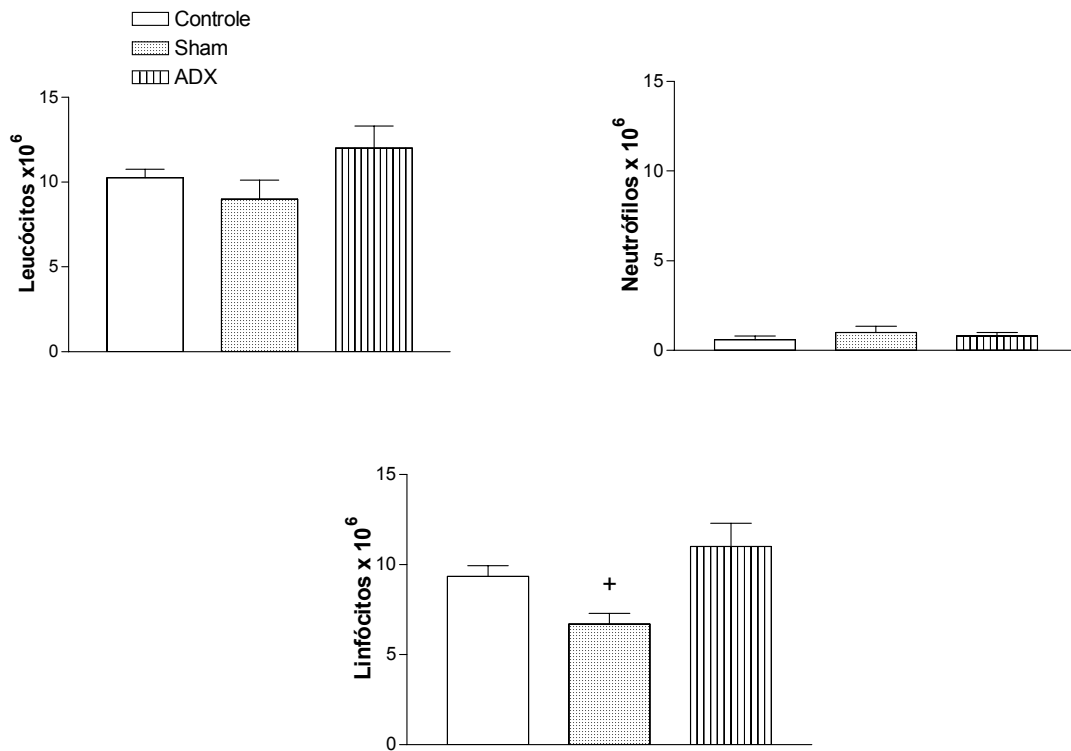


Figura 16 - Efeitos da adrenalectomia na distribuição diferencial dos leucócitos, sete (7) dias após a cirurgia, em camundongos submetidos ao estresse de natação. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. A cruz (+) denota diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação ao grupo adrenalectomizado (ADX; ANOVA univariada, seguida do teste Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 8 a 9 por grupo experimental.

B) Participação dos glicocorticóides, opióides e catecolaminas.

Na figura 17 observamos o efeito do pré-tratamento i.p. com a aminoglutetimida (10 mg/kg), o propranolol (10 mg/kg) e a naloxona (3 mg/kg) no efeito ansiogênico do estresse de natação (6 min) e da SP (10 pmol i.c.v.), na frequência de entradas nos braços abertos, avaliado em camundongos no labirinto em cruz elevado (LCE) por 5 min. Nos grupos controle apenas o pré-tratamento com o antagonista opióide, a naloxona, reduziu significativamente esta medida ($F_{(3,30)} = 6,069$; $P < 0,05$). No grupo submetido ao estresse de natação, o pré-tratamento com aminoglutetimida e propranolol reverteu a redução deste parâmetro promovida pelo estresse de natação ($F_{(3,24)} = 4,388$; $P < 0,05$), enquanto que a naloxona não o influenciou ($P > 0,05$). O mesmo ocorreu no grupo tratado com SP, onde o pré-tratamento com aminoglutetimida e propranolol reverteu o efeito do tipo ansiogênico produzido pela SP ($F_{(4,31)} = 5,196$; $P < 0,05$), enquanto a naloxona não o alterou ($P > 0,05$).

Na figura 18 observamos o efeito dos mesmos pré-tratamentos. A porcentagem do tempo nos braços abertos, avaliada em camundongos no LCE por 5 min, que foi reduzida significativamente nos grupos controle apenas pelo pré-tratamento com naloxona ($F_{(3,25)} = 5,757$; $P < 0,05$). No grupo submetido ao estresse de natação, o pré-tratamento com a aminoglutetimida e o propranolol tendeu a inibir o efeito do estresse, não alcançando, no entanto, significância estatística ($F_{(3,24)} = 1,609$; $P > 0,05$). No grupo tratado com SP, o pré-tratamento

com a aminoglutetimida e o propranolol, mas não com a naloxona, reverteu a redução deste parâmetro promovida pela taquicinina ($F_{(4,31)} = 5,767; P < 0,05$).

Na figura 19 observamos o efeito dos diferentes pré-tratamentos no efeito ansiogênico do estresse de natação e da SP sobre o número de entradas nos braços fechados do LCE. Os pré-tratamentos não promoveram mudanças significativas entre os grupos controle ($F_{(3,24)} = 1,616; P > 0,05$), submetidos ao estresse de natação ($F_{(3,24)} = 1,261; P > 0,05$) ou após a administração central de SP ($F_{(4,31)} = 3,266; P > 0,05$).

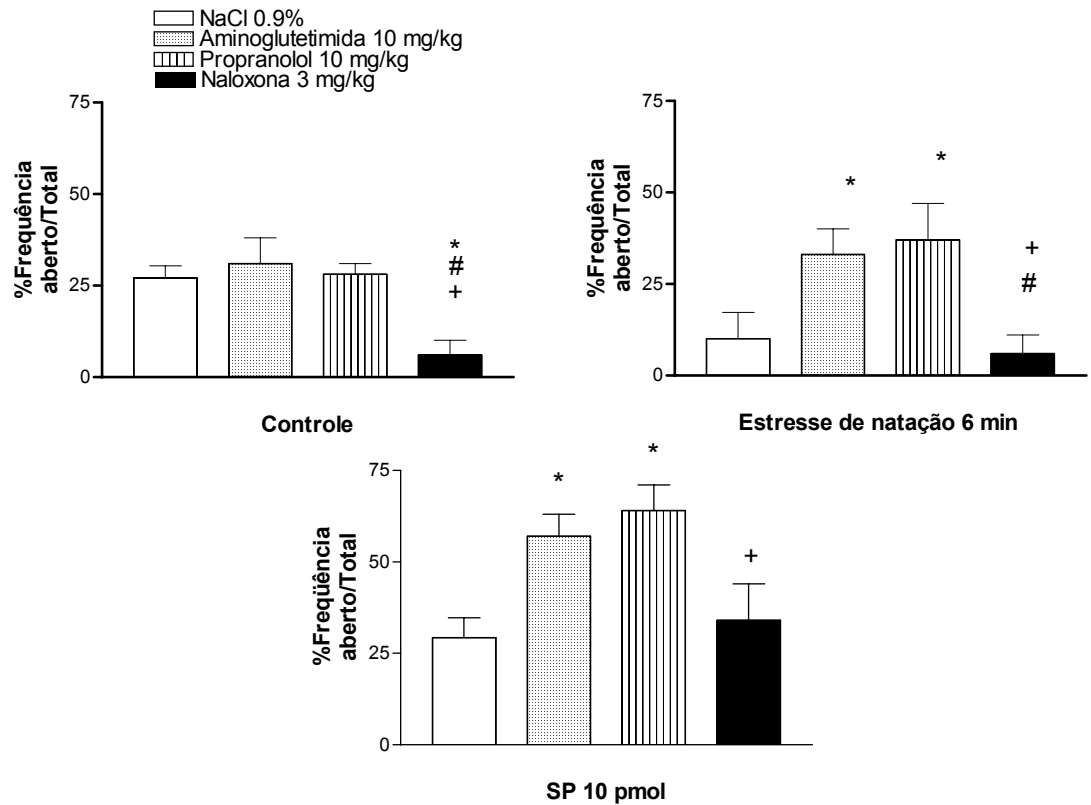


Figura 17 - Efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida (10 mg/kg), naloxona (3 mg/kg) e propranolol (10 mg/kg) no efeito ansiogênico do estresse de natação (6 min) e da SP (10 pmol i.c.v.) na frequência de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE), avaliado em camundongos por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação aos valores obtidos no grupo controle, a grade (#), em relação a aminoglutetimida e a cruz (+) em relação ao propranolol (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 por grupo experimental.

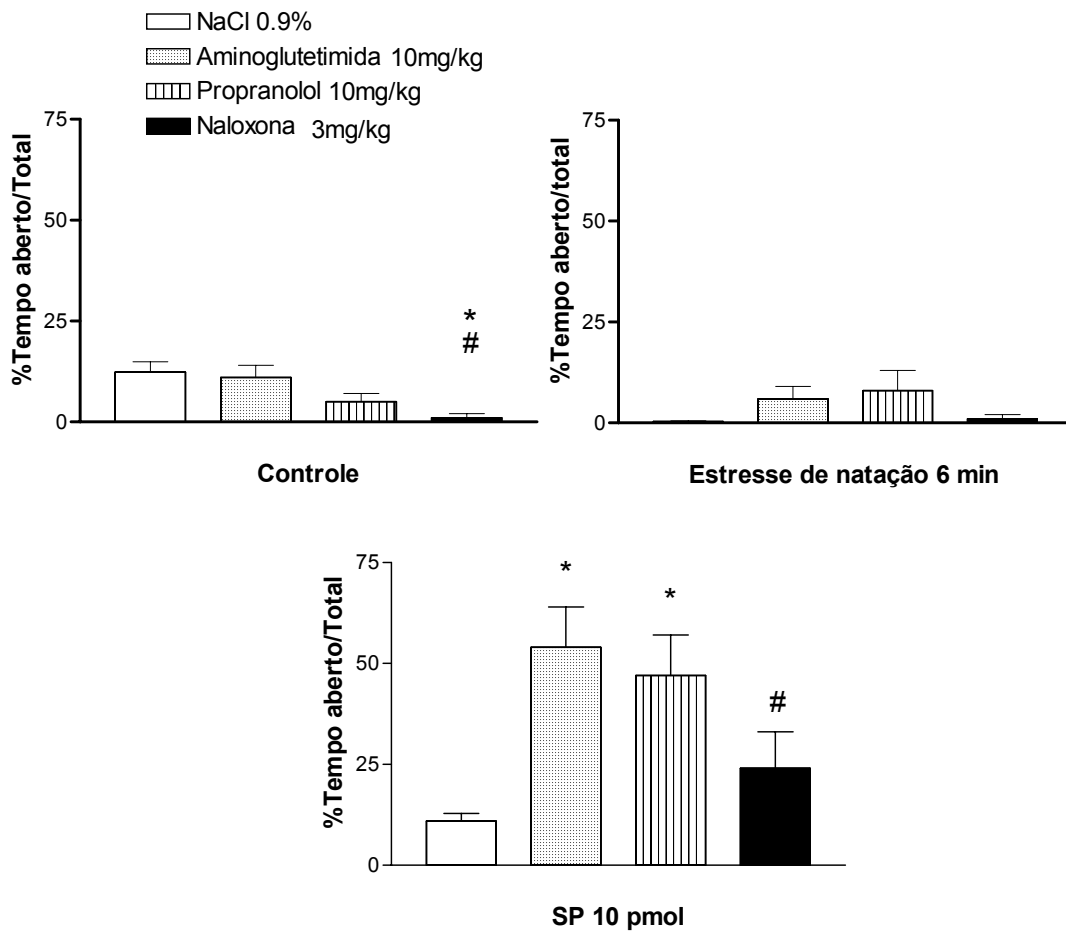


Figura 18 - Efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida (10 mg/kg), naloxona (3 mg/kg) e propranolol (10 mg/kg) no efeito ansiogênico do estresse de natação (6 min) e da SP (10 pmol i.c.v.) na percentagem do tempo de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE), avaliado em camundongos por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação aos valores obtidos no grupo controle e a grade (#), em relação a aminoglutetimida (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 por grupo experimental.

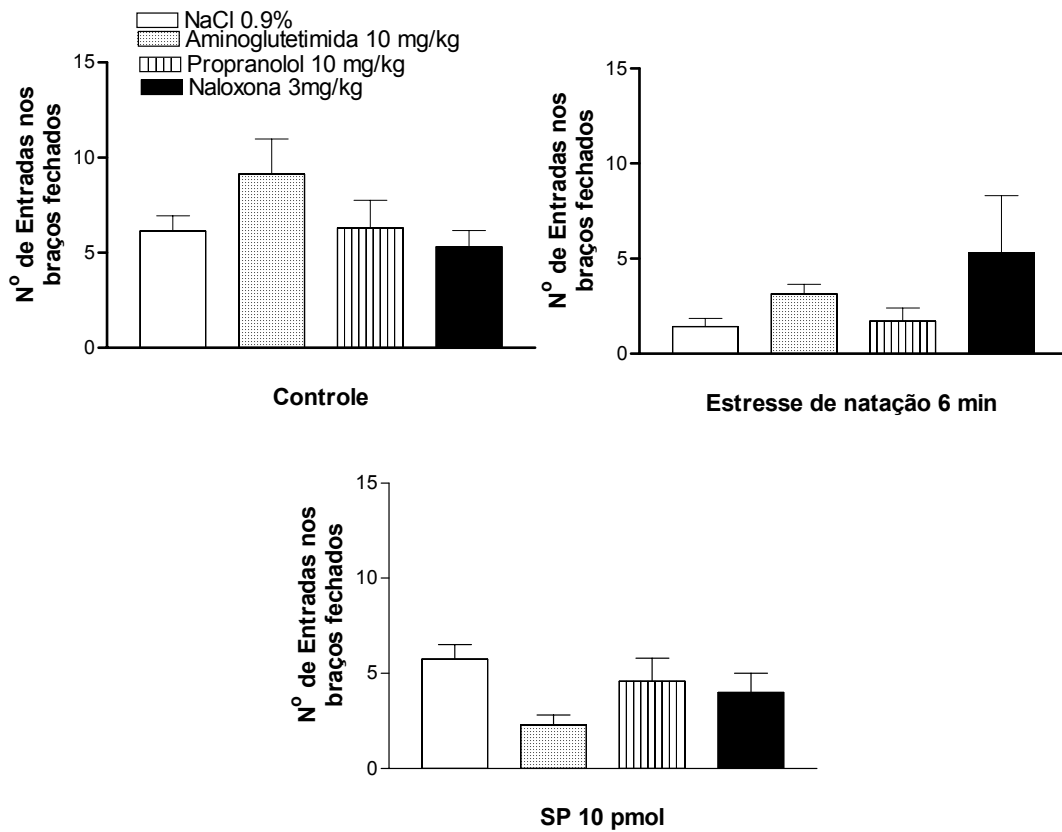


Figura 19 - Efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida (10 mg/kg), naloxona (3 mg/kg) e propranolol (10 mg/kg) no efeito ansiogênico do estresse de natação (6 min) e da SP (10 pmol i.c.v.) no número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (LCE), avaliado em camundongos por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 por grupo experimental.

Na figura 20 observamos a influência do pré-tratamento com a aminoglutetimida, a naloxona e o propranolol no efeito do estresse de natação e da SP sobre a distribuição de leucócitos em camundongos. Os pré-tratamentos não alteraram o número de leucócitos nos grupos controle ($F_{(3,24)} = 1,832$; $P > 0,05$) e naqueles tratados com SP ($F_{(3,27)} = 1,017$; $P > 0,05$). No entanto, no grupo submetido ao estresse de natação todos os pré-tratamentos reverteram a leucopenia produzida por esta condição experimental ($F_{(3,26)} = 15,778$; $P < 0,05$).

Um perfil similar foi observado no número de linfócitos dos animais dos grupos controle ($F_{(3,24)} = 0,4833$; $P > 0,05$), submetidos ao estresse de natação ($F_{(3,26)} = 10,916$; $P < 0,05$) e tratados com SP ($F_{(3,27)} = 1,275$; $P > 0,05$), após os diferentes pré-tratamentos. Assim, de modo semelhante ao que ocorreu com os leucócitos totais, a linfopenia promovida pela submissão ao estresse de natação foi significativamente revertida por todos os pré-tratamentos (aminoglutetimida, propranolol e naloxona), como pode ser visto na figura 21.

Na figura 22 observamos a influência dos pré-tratamentos no efeito do estresse de natação e da SP no número de neutrófilos. Os diferentes pré-tratamentos não produziram alterações significativas em quaisquer dos grupos controle ($F_{(3,24)} = 2,029$; $P > 0,05$), submetidos ao estresse de natação ($F_{(3,26)} = 2,399$; $P > 0,05$) e tratado com SP ($F_{(3,27)} = 1,017$; $P > 0,05$).

Conclusões parciais

Nossos resultados mostram que o sistema adrenérgico, através de seus receptores β -adrenérgicos, e os glicocorticóides, mas não o sistema opióide, parecem estar envolvidos na modulação da resposta comportamental à SP e ao estresse de natação. Esses mesmos sistemas, e também o opióide parecem ainda participar do efeito produzido pelo estresse de natação, mas não pela SP, nas mudanças observadas na distribuição diferencial da série branca sangüínea.

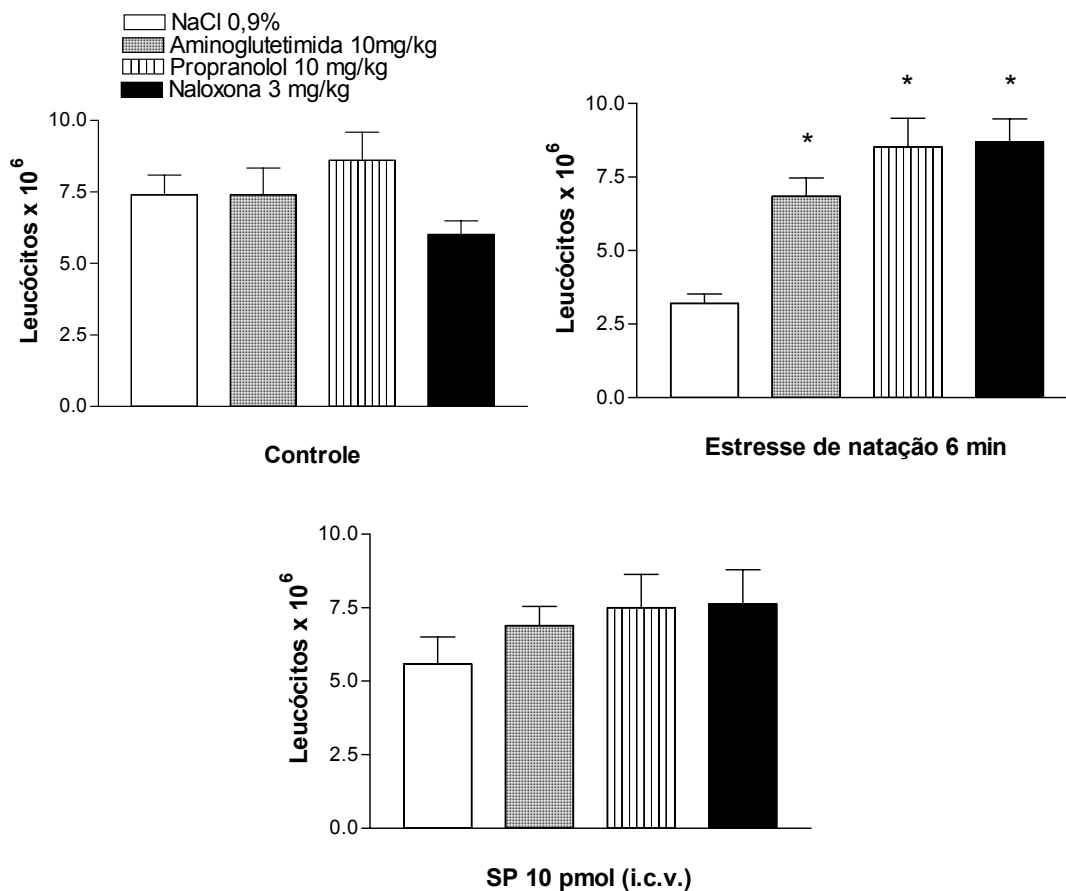


Figura 20 - Efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida (10 mg/kg), naloxona (3 mg/kg) e propranolol (10 mg/kg) no efeito do estresse de natação (6 min) e da SP (10 pmol i.c.v.), após 1 h, no número de leucócitos totais. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação aos valores obtidos no grupo controle (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 a 10 por grupo experimental.

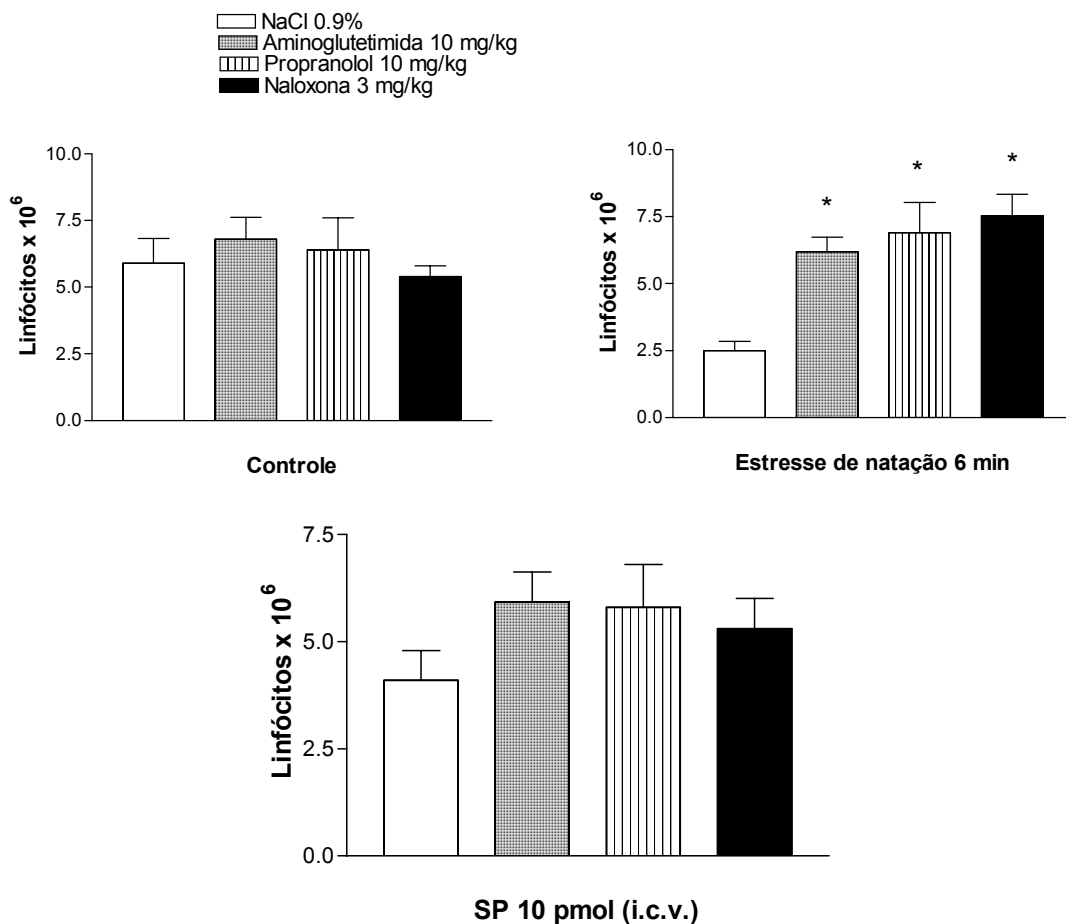


Figura 21 - Efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida (10 mg/kg), naloxona (3 mg/kg) e propranolol (10 mg/kg) no efeito do estresse de natação (6 min) e da SP (10 pmol i.c.v.), após 1 h, no número de linfócitos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação aos valores obtidos no grupo respectivo controle (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 a 10 por grupo experimental.

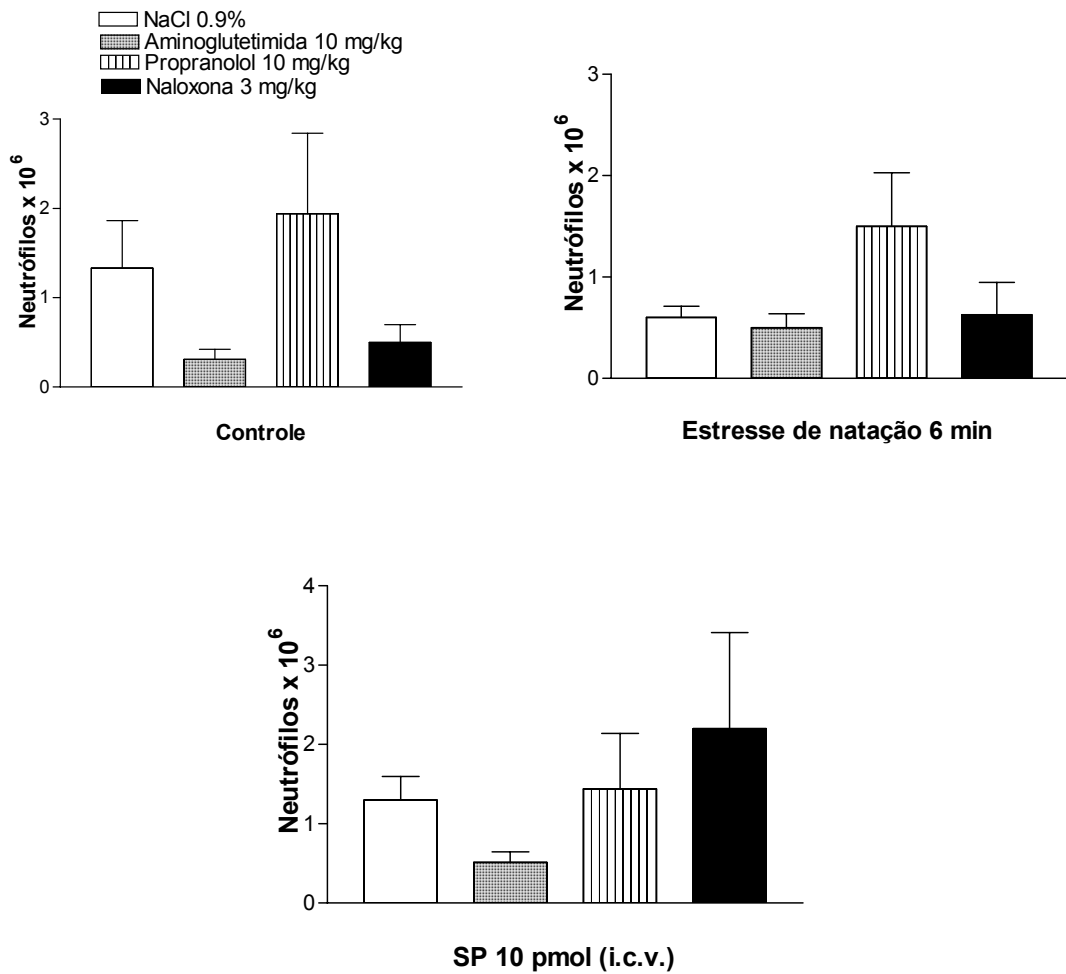


Figura 22 - Efeito do pré-tratamento com aminoglutetimida (10 mg/kg), naloxona (3 mg/kg) e propranolol (10 mg/kg) no efeito do estresse de natação (6 min) e da SP (10 pmol i.c.v.), após 1h, no número de neutrófilos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 a 10 por grupo experimental.

4.1.4. Participação das taquicininas na resposta comportamental e na distribuição de leucócitos promovidos pelo estresse de natação e pela SP.

Objetivos específicos

Verificar o envolvimento do receptor taquicinérgico NK₁ na resposta comportamental e na distribuição de leucócitos produzida pelo estresse de natação e pela administração central da SP.

Resultados

A figura 23 mostra o efeito do pré-tratamento com o antagonista NK₁ FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito ansiogênico do estresse de natação (6 min) avaliado em camundongos no labirinto em cruz elevado (LCE) por 5 min. Na percentagem do tempo despendido nos braços abertos, reduzida pelo estresse e aumentada pelo FK888, o pré-tratamento com o antagonista NK₁ reverteu o efeito ansiogênico do estresse de natação ($F_{(3,30)} = 12,635$; $P < 0,05$). O mesmo ocorreu na frequência de entradas nos braços abertos, reduzida pelo estresse, redução esta inibida pelo pré-tratamento com o antagonista taquicinérgico ($F_{(3,30)} = 10,031$; $P < 0,05$). Já a redução promovida pelo estresse de natação no número de entradas nos braços

fechados não foi alterada pelo pré-tratamento com o FK888 ($F_{(3,30)} = 10,142$; $P < 0,05$).

A figura 24 mostra o efeito do pré-tratamento com o antagonista NK₁ FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito ansiogênico do estresse de natação (6 min). No número de imersões de cabeça, reduzido pelo estresse e aumentado pelo FK 888, houve uma tendência do antagonista NK₁ em reverter o efeito do estresse ($F_{(3,31)} = 11,747$; $P < 0,05$). A redução do número de estiramentos ($F_{(3,31)} = 3,857$; $P < 0,05$), do comportamento de levantamento ($F_{(3,30)} = 6,059$; $P < 0,05$) e da defecação ($F_{(3,31)} = 6,088$; $P < 0,05$), promovidas pelo estresse de natação, não foi modificada pelo pré-tratamento com o antagonista taquicinérgico, mas foi significativamente menor quando comparado com os controles. O aumento nos comportamentos de autolimpeza, produzido pelo nado forçado, foi inibido pelo pré-tratamento com o FK 888 ($F_{(3,31)} = 7,808$; $P < 0,05$).

A figura 25 mostra o efeito do pré-tratamento com o antagonista NK₁ FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito do estresse de natação (6 min) na distribuição de leucócitos avaliada 1 h após o LCE. A leucopenia produzida pela natação foi revertida pelo antagonista NK₁ ($F_{(3,33)} = 3,986$; $P < 0,05$). Um perfil similar, mas não estatisticamente significativo, pode ser observado para os linfócitos ($F_{(3,33)} = 2,246$; $P > 0,05$). O número de neutrófilos, entretanto, só foi significativamente aumentado pelo estresse associado ao FK 888 ($F_{(3,33)} = 3,245$; $P < 0,05$).

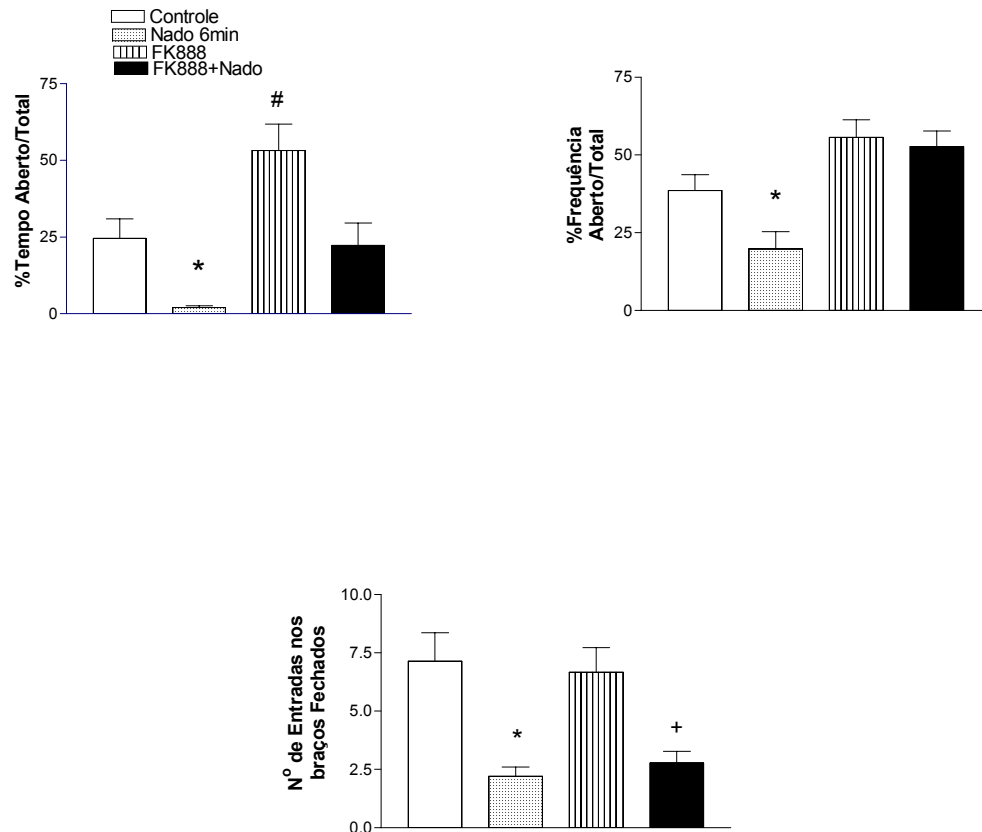


Figura 23 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista NK_1 FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito ansiogênico do estresse de natação (6 min) avaliado em camundongos no labirinto em cruz elevado por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação aos valores obtidos nos grupos controle, a grade (#), em relação ao estresse de natação e a cruz (+) em relação ao grupo tratado com FK (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 a 10 em cada grupo experimental.

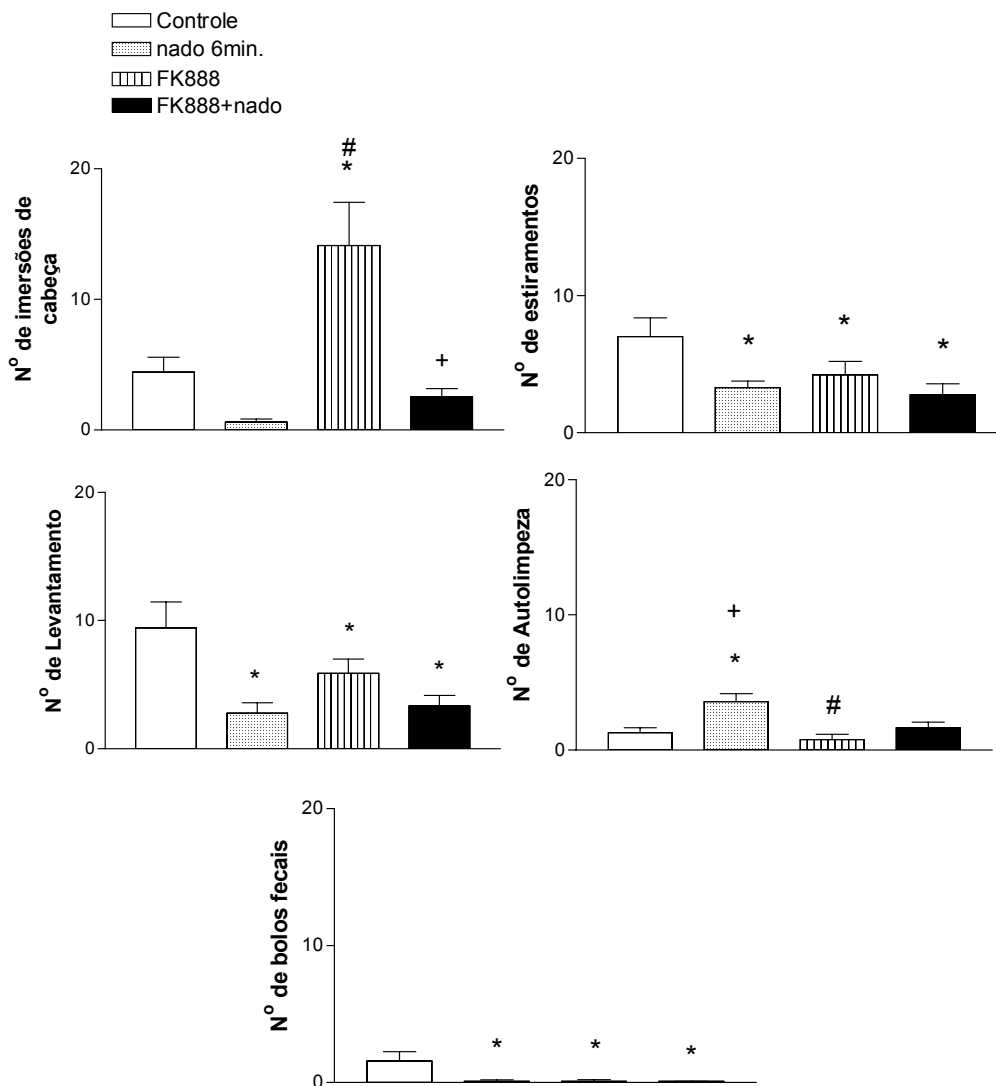


Figura 24 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista NK_1 FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito ansiogênico do estresse de natação (6 min) nos parâmetros etológicos avaliados em camundongos no labirinto em cruz elevado por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação aos valores obtidos nos grupos controle, a grade (#), em relação ao estresse de natação e a cruz (+) em relação ao grupo tratado com FK (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 a 10 em cada grupo experimental.

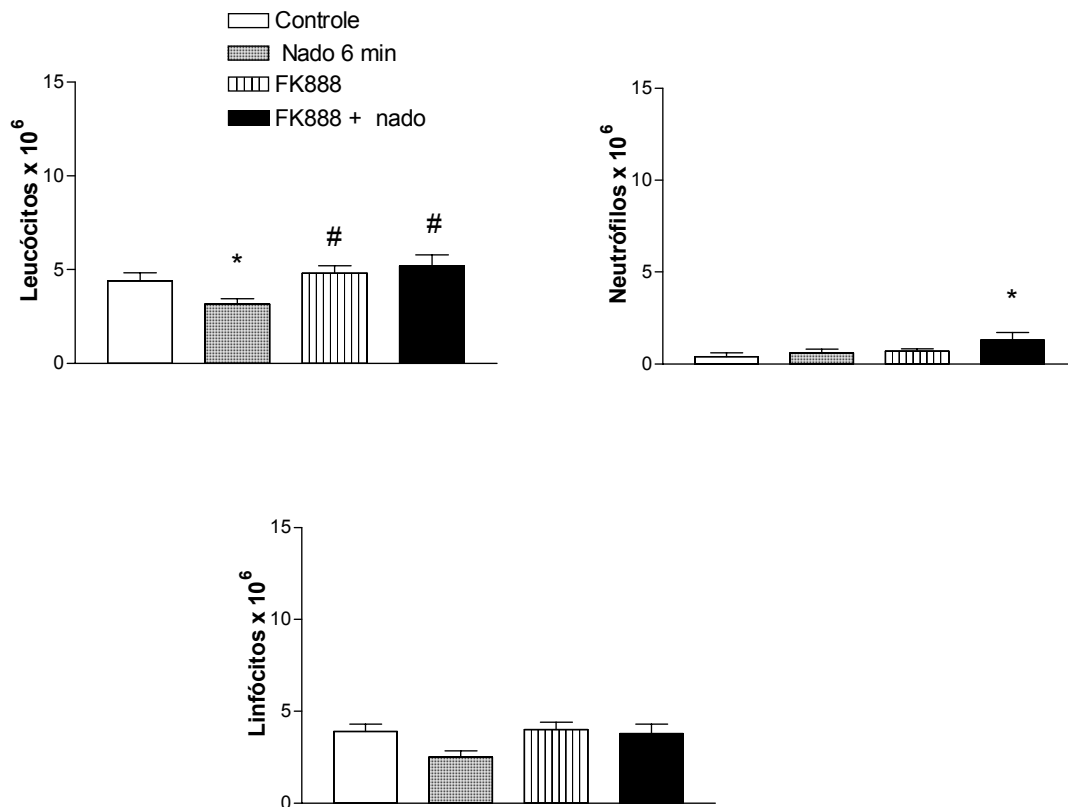


Figura 25 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista NK₁ FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito do estresse de natação (6 min) na distribuição de leucócitos avaliado em camundongos 1h após o LCE. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação aos valores obtidos nos grupos controle e a grade (#), em relação ao estresse de (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 9 a 10 em cada grupo experimental.

A figura 26 mostra o efeito do pré-tratamento com o antagonista NK₁ FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito ansiogênico da SP (10 pmol), avaliado no labirinto em cruz elevado (LCE) por 5 min, em camundongos. A diminuição da porcentagem do tempo despendido nos braços abertos promovida pela SP, em contraposição ao seu aumento pelo FK 888, foi inibida pelo pré-tratamento com o antagonista NK₁ ($F_{(3,34)} = 15,302$; $P < 0,05$), o mesmo ocorrendo na frequência de entradas nos braços abertos ($F_{(3,34)} = 7,037$; $P < 0,05$). O número de entradas nos braços fechados foi reduzido apenas pelo tratamento com o antagonista taquicinérgico FK 888 ($F_{(3,34)} = 6,585$; $P < 0,05$).

A figura 27 mostra o efeito do pré-tratamento com o antagonista NK₁ FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito ansiogênico da SP nos parâmetros etológicos avaliado no LCE, em camundongos. Apenas o tratamento com FK 888 levou a uma redução do número de estiramentos ($F_{(3,36)} = 5,172$; $P < 0,05$) e no comportamento de levantamento ($F_{(3,36)} = 9,570$; $P < 0,05$), que não é visível quando os animais são pré-tratados com SP. O número de imersões de cabeça ($F_{(3,36)} = 1,033$; $P > 0,05$) não foi diferente entre os grupos, assim como o comportamento de autolimpeza ($F_{(3,36)} = 1,327$; $P > 0,05$) e a defecação ($F_{(3,36)} = 1,840$; $P > 0,05$).

A figura 28 mostra o efeito do pré-tratamento com o antagonista NK₁ FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito da SP sobre a distribuição de leucócitos, avaliada 1 h após o LCE. O número de leucócitos não foi alterado por quaisquer dos diferentes tratamentos/ grupos ($F_{(3,33)} = 0,8499$; $P > 0,05$), assim como o de linfócitos ($F_{(3,33)} = 1,004$; $P > 0,05$) e o de neutrófilos ($F_{(3,33)} = 1,415$; $P > 0,05$).

Conclusões parciais

O estresse de natação promoveu alterações comportamentais e na distribuição de leucócitos que parecem envolver os receptores taquicinérgicos NK₁ em sua modulação. A SP, por sua vez, promoveu alterações comportamentais que foram similares ao estresse de natação e que também envolvem os receptores NK₁. Por outro lado, esses receptores não parecem estar envolvidos nos efeitos da SP sobre a distribuição de leucócitos (leucopenia, neutrofilia, linfopenia).

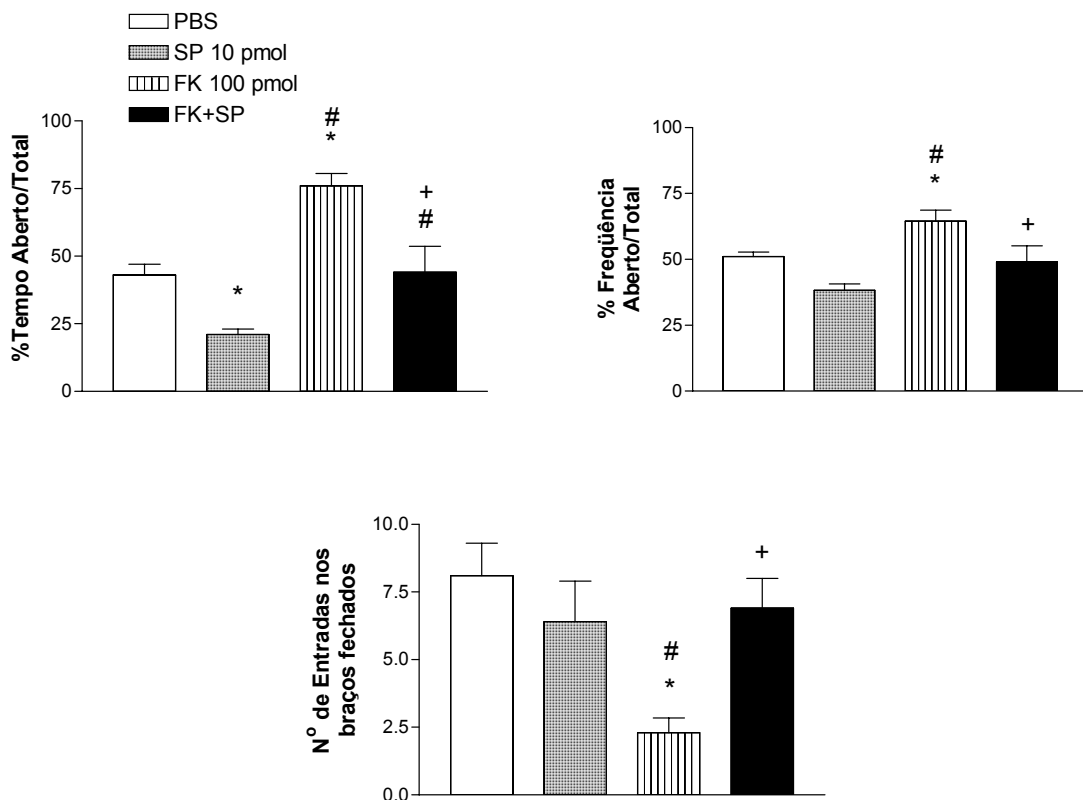


Figura 26 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista NK₁ FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito ansiogênico da SP (10 pmol), avaliado no labirinto em cruz elevado por 5 min, em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$), em relação aos valores obtidos nos grupos controle, a grade (#), em relação a SP 10 pmol i.c.v. e a cruz (+) em relação ao grupo tratado com FK (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 8 a 10 em cada grupo experimental.

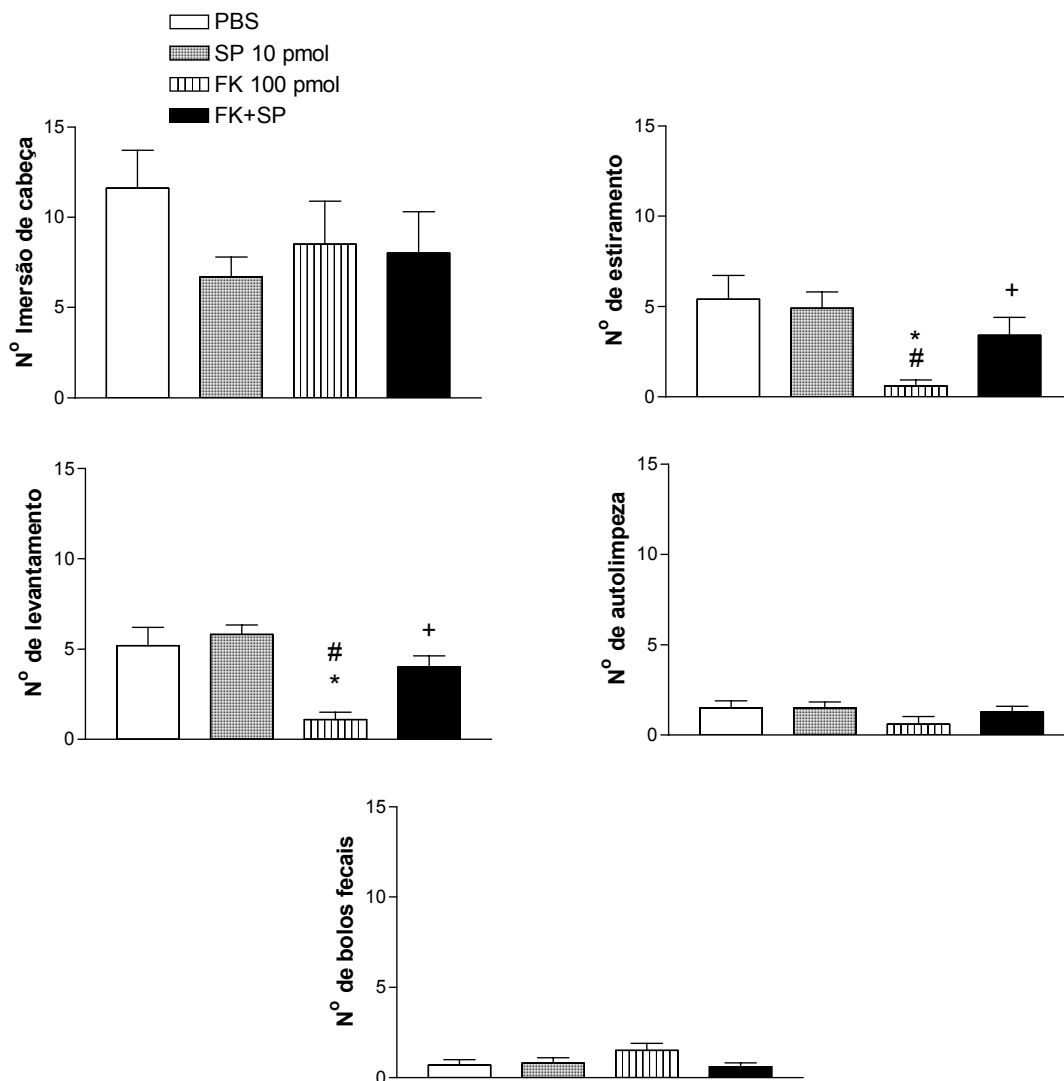


Figura 27 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista NK_1 FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito ansiogênico da SP (10 pmol) nos parâmetros etológicos avaliados no LCE por 5 min, em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significativas ($P < 0,05$), em relação aos valores obtidos nos grupos controle, a grade (#), em relação a SP 10 pmol i.c.v. e a cruz (+) em relação ao grupo tratado com FK (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 8 a 10 em cada grupo experimental.

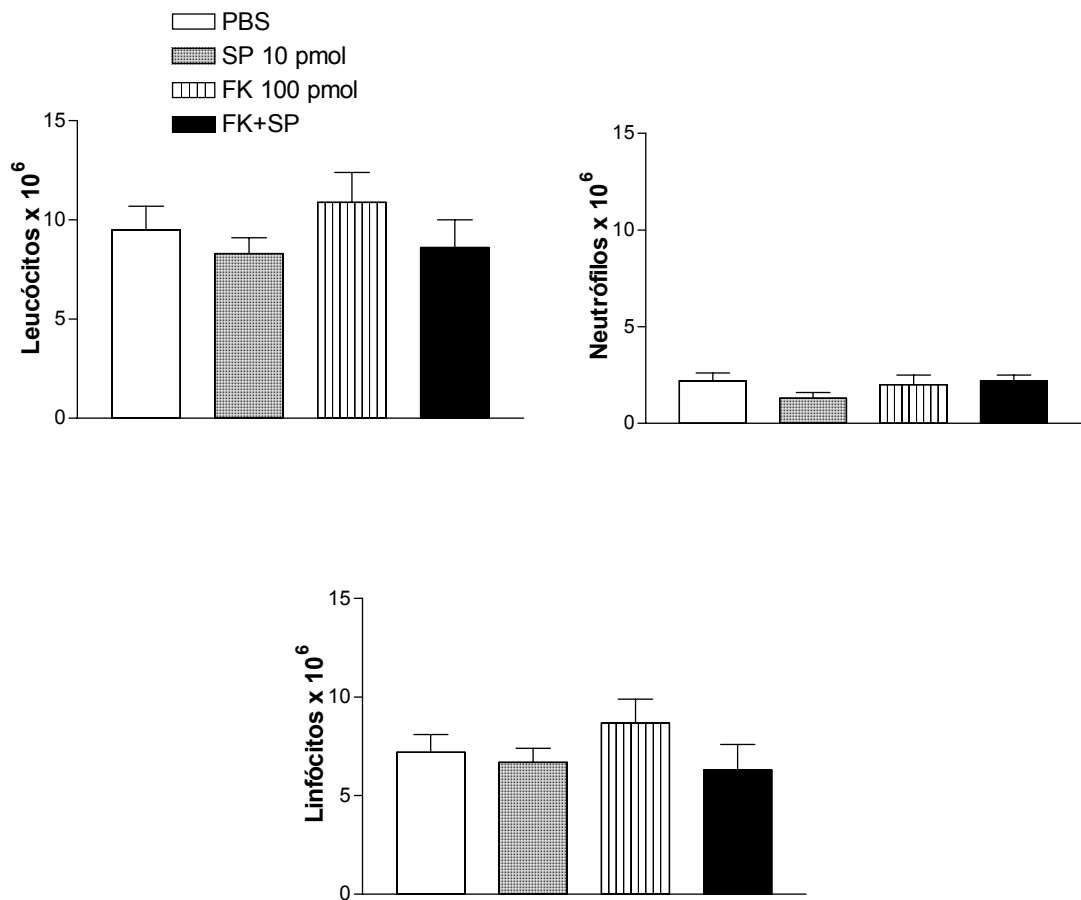


Figura 28 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista NK_1 FK888 (100 pmol i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol) na distribuição de leucócitos, avaliada 1 h após o LCE, em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 a 11 em cada grupo experimental.

4.1.5. Mudanças no comportamento e na distribuição de leucócitos em camundongos submetidos ao desafio imune por LPS (modelo experimental de *comportamento doentio*).

Objetivos específicos

Verificar se as alterações no comportamento e na distribuição de leucócitos após uma situação de desafio imune com LPS eram semelhantes às aquelas induzidas pelo estresse de natação 6 min e pela SP.

Resultados

A figura 29 mostra o decurso temporal (1, 2, 4, 6 h) do efeito do LPS 10 □g/kg i.p. na temperatura corporal e no comportamento de camundongos avaliados no LCE por 5 min. A temperatura apresentou apenas uma tendência a hipertermia no tempo de 6 h ($F_{(4,35)} = 2,453$; $P = 0,0640$). O desafio imune não causou diferenças significantes nos parâmetros comportamentais no LCE, como a frequência de entradas nos braços abertos ($F_{(4,44)} = 1,654$), a

porcentagem de tempo despendido nos braços abertos ($F_{(4,44)} = 0,4247$) e as entradas nos braços fechados ($F_{(4,44)} = 0,5121$), embora a frequência de entradas nos braços abertos tenha mostrado uma tendência a ser aumentada 2 h após o desafio imune.

Podemos observar a influência do LPS 10 μ g/kg i.p. nos parâmetros etológicos do LCE na figura 30. Verificamos que somente o número de estiramentos foi significativamente menor 1 e 2 h após o desafio imune ($F_{(4,44)} = 4,696$; $P < 0,05$), enquanto o comportamento de levantamento mostrou-se significativamente aumentado 6 h após o LPS ($F_{(4,44)} = 4,807$; $P < 0,05$). Os outros parâmetros etológicos (imersões de cabeça, autolimpeza e defecação) não diferiram dos valores do grupo controle.

Na figura 31 observamos o efeito do desafio imune com LPS 10 μ g/kg i.p. na distribuição dos leucócitos. Os leucócitos totais ($t_{17} = 4,966$) e os linfócitos ($t_{17} = 4,641$) mostraram-se significativamente diminuídos em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Os neutrófilos não sofreram alteração com este tratamento ($t_{17} = 0,6793$; $P > 0,05$).

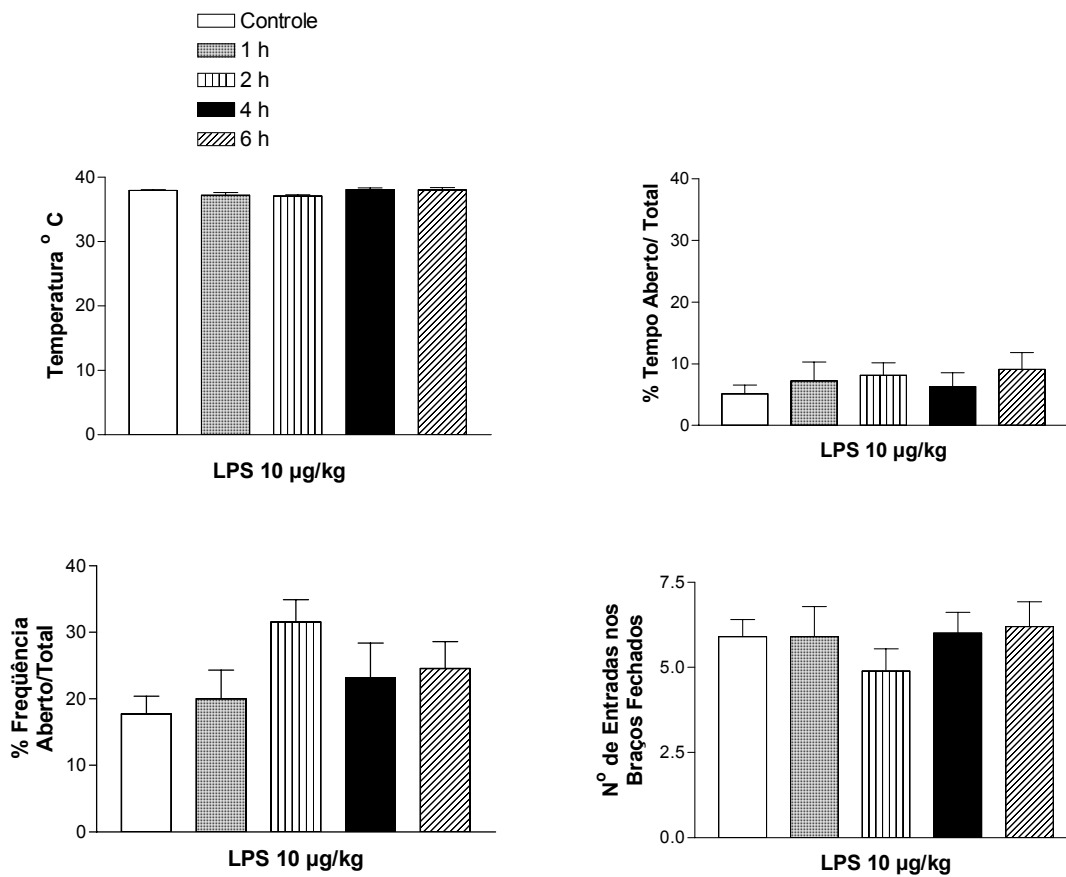


Figura 29 - Decurso temporal (1 - 6 h) da influência do desafio imune com LPS (10 µg/kg i.p.) na temperatura corporal e no comportamento de camundongos avaliados no LCE por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM (ANOVA univariada, seguida do teste de Newman-Keuls). O n° de animais empregados por tratamento foi de 8 a 10 por grupo experimental.

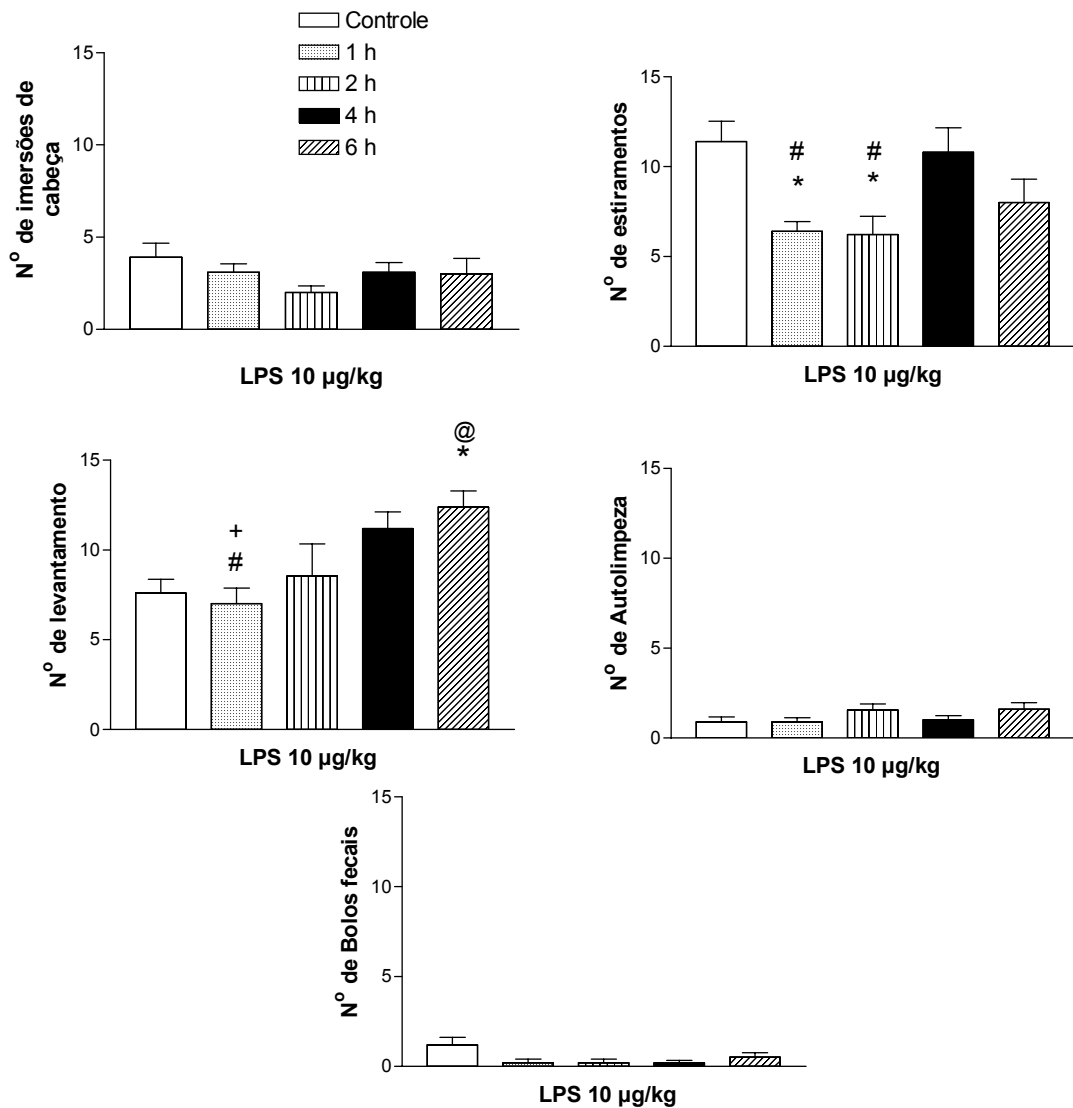


Figura 30 - Influência do desafio imune com LPS (10 µg/kg i.p.) nos parâmetros etológicos avaliados em camundongos no LCE por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos (*) denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação aos valores obtidos nos grupos controle; a arroba (@), em relação 2 h; a grade (#), em relação a 4 h e a cruz (+) em relação a 6 h (ANOVA univariada, seguida do teste de Newman-Keuls). O n° de animais empregados por tratamento foi de 8 a 10 por grupo experimental.

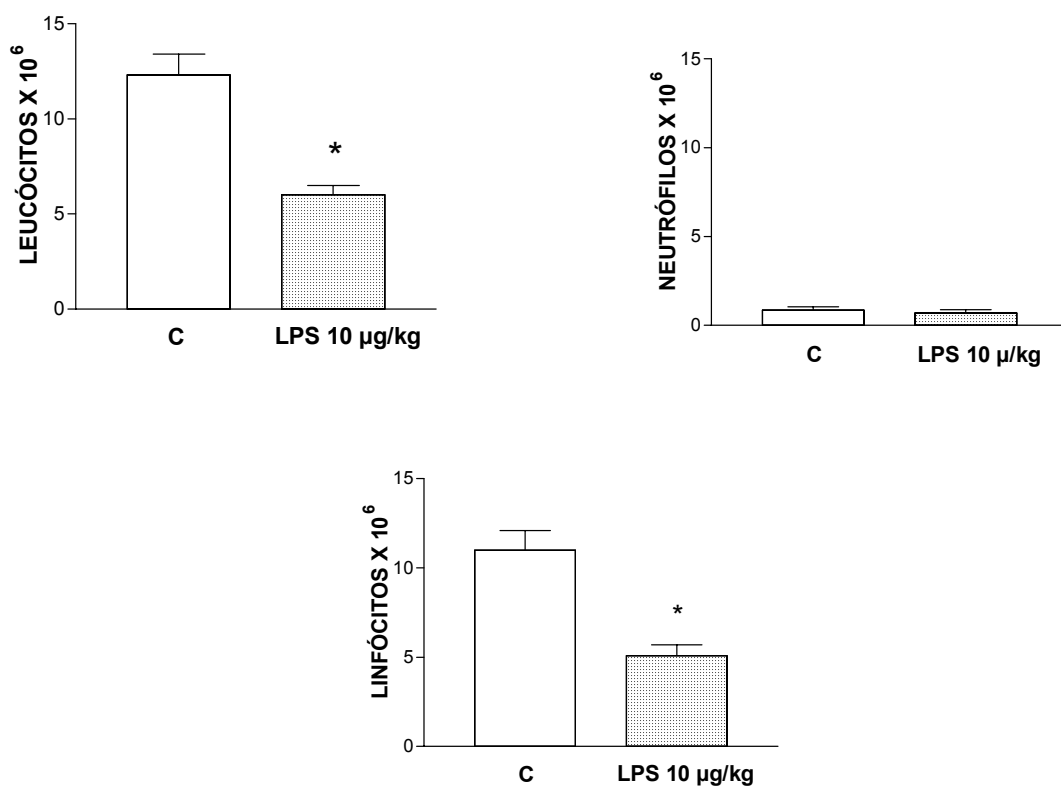


Figura 31 - Efeito do desafio imune com LPS (10 µg/kg i.p.) na distribuição dos leucócitos, 6 h após o tratamento. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças em relação ao grupo controle ($P < 0,05$; teste t de Student não pareado bicaudal). O número de animais usados foi de 10 em cada grupo experimental.

A figura 32 mostra o decurso temporal (0, 1, 2, 3, 5 h) da influência do desafio imune com 50 μ g/kg de LPS i.p. na temperatura corporal, assim como, 5 h após o LPS, sua influência no comportamento de camundongos avaliados no LCE, por 5 min. Houve uma diminuição da temperatura corporal, isto é, uma hipotermia, no tempo de 5 h após o desafio com 50 μ g/kg de LPS i.p. ($F_{(5,4,20)} = 2,965$; $P < 0,05$). Não houve diferenças significantes ($P > 0,05$) nos parâmetros clássicos registrados no LCE, como a frequência de entradas nos braços abertos ($t_7 = 0,642$), na porcentagem de tempo despendido nestes braços ($t_7 = 1,171$) e nas entradas nos braços fechados ($t_7 = 1,018$), conquanto todos os parâmetros tenham sido incrementados pelo desafio imune de maneira não estatisticamente significativa.

A figura 33 mostra a influência de 50 μ g/kg i.p. de LPS nos parâmetros etológicos avaliados em camundongos no LCE 5 h após o tratamento. O número de imersões de cabeça ($t_7 = 1,373$), o de estiramentos ($t_6 = 1,137$), o comportamento de levantamento ($t_7 = 0,5299$), o de autolimpeza ($t_7 = 0,1584$) e os bolos fecais não foram significantemente diferentes dos valores controle ($P < 0,05$), ainda que à exceção dos estiramentos que foram reduzidos e da defecação que não foi alterada pelo tratamento, todos as outras medidas apresentassem um aumento não significativo.

Na figura 34 observamos o efeito do LPS 50 μ g/kg i.p. na distribuição dos leucócitos 5 h após o tratamento. Os leucócitos totais ($t_{15} = 5,288$) e os linfócitos ($t_{15} = 5,274$) estão significantemente diminuídos em relação ao grupo controle ($P < 0,05$), os neutrófilos, por sua vez, não sofreram alteração

significativa com o tratamento ($t_{15} = 1,640$; $P > 0,05$), embora também apresentem uma redução na situação de desafio imune.

Conclusões parciais

Após o desafio imune com LPS, modelo aceito como de comportamento doentio (*sickness behavior*), apenas as alterações sangüíneas foram, em sua maioria, similares às induzidas pela administração central de substância P e pelo estresse de natação. Essa condição experimental parece promover mudanças comportamentais distintas àquelas produzidas pela SP e pelo estresse de natação, não servindo, assim, como uma condição de “estresse” para comparação com a SP.

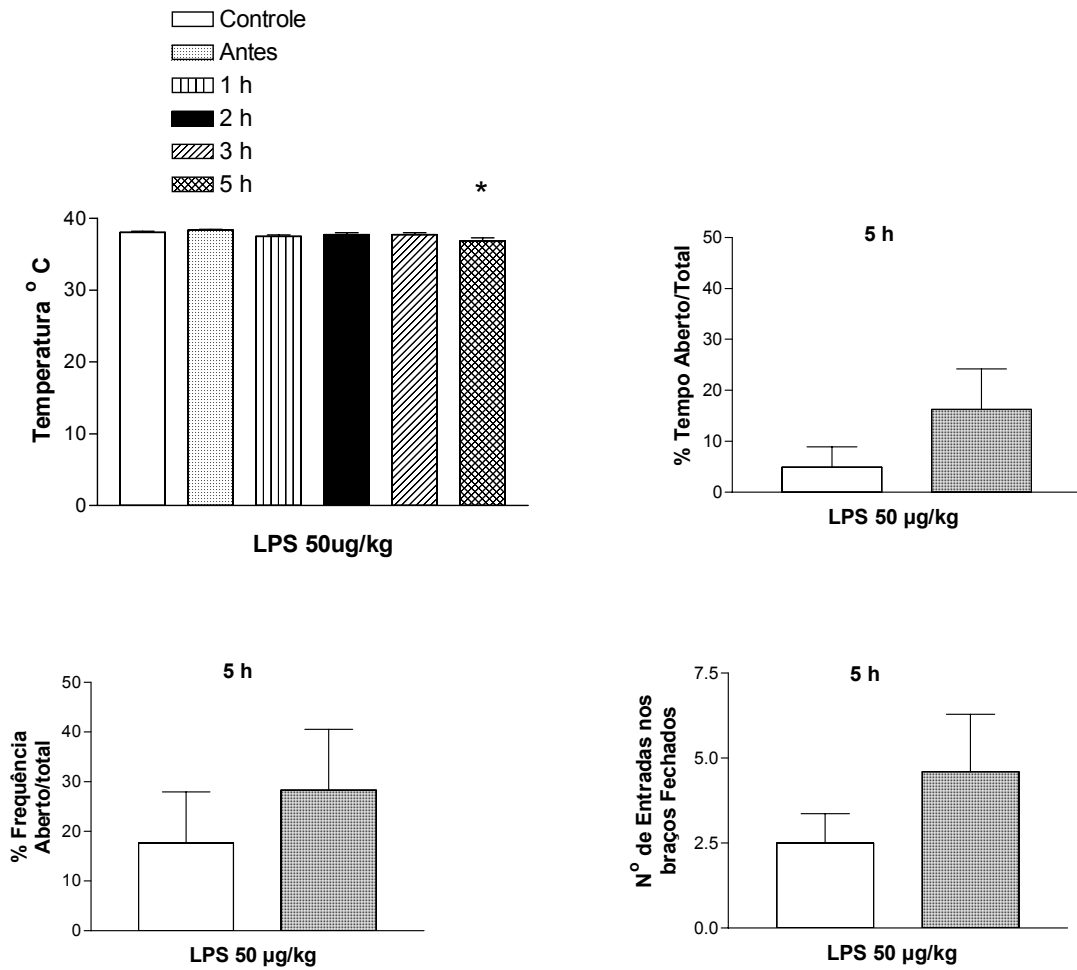


Figura 32 - Influência do LPS (50 µg/kg i.p.) na temperatura (0, 1, 2, 3, 5 h) e no comportamento dos camundongos avaliados no LCE por 5 min (5 h). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (ANOVA univariada, seguida do teste de Newman-Keuls, para os dados de temperatura corporal, e teste *t* de Student não-pareado bicaudal, para o comportamento no LCE). O n° de animais empregados por grupo por tratamento foi de 8 a 10 para a temperatura e de 5 para o comportamento.

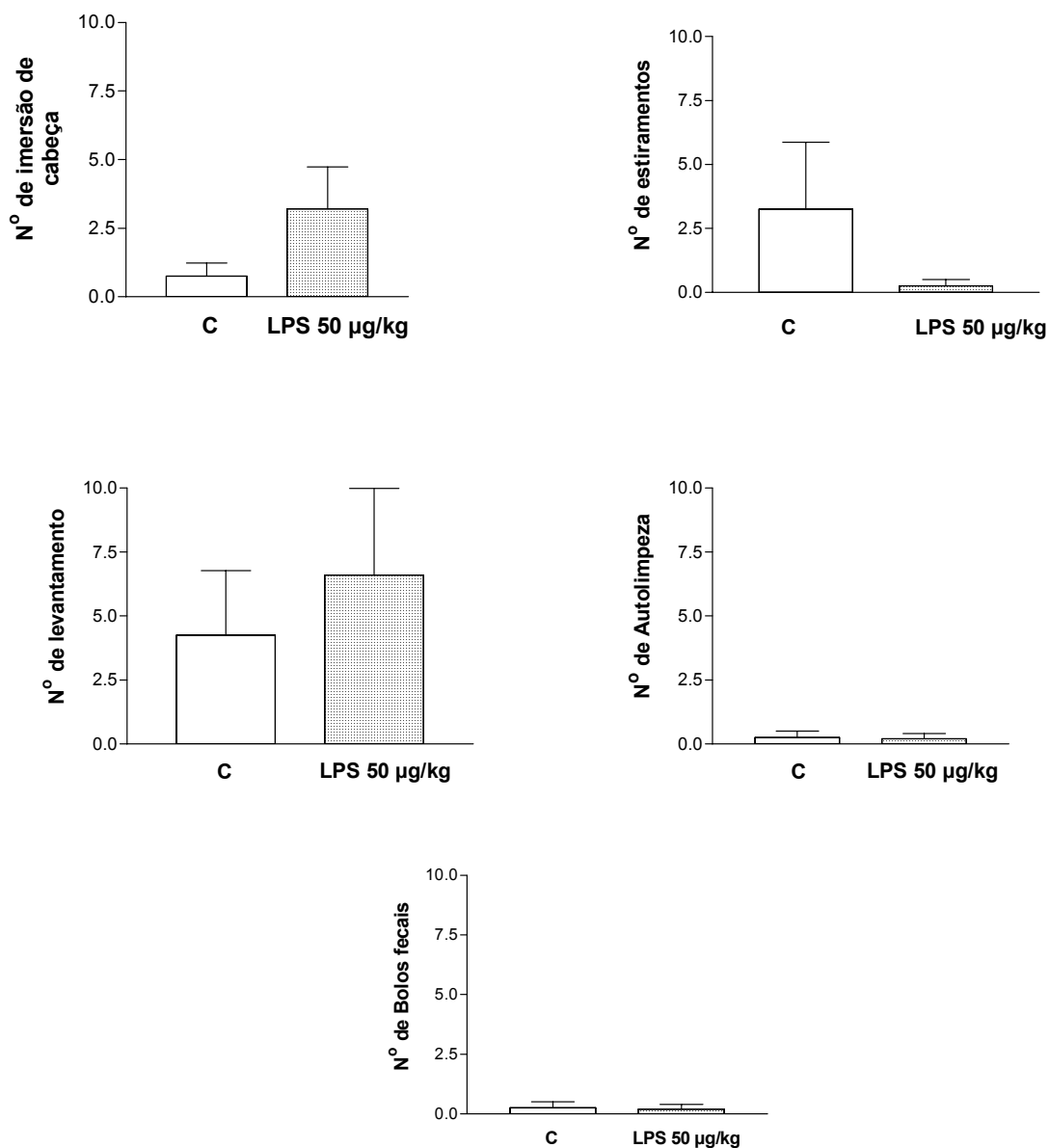


Figura 33 - Influência do LPS (50 µg/kg i.p.) nos parâmetros etológicos avaliados em camundongos no LCE em sessões de 5 min (5 h). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM (Teste *t* de Student não-pareado bicaudal). O n° de animais empregados por tratamento foi de 5.

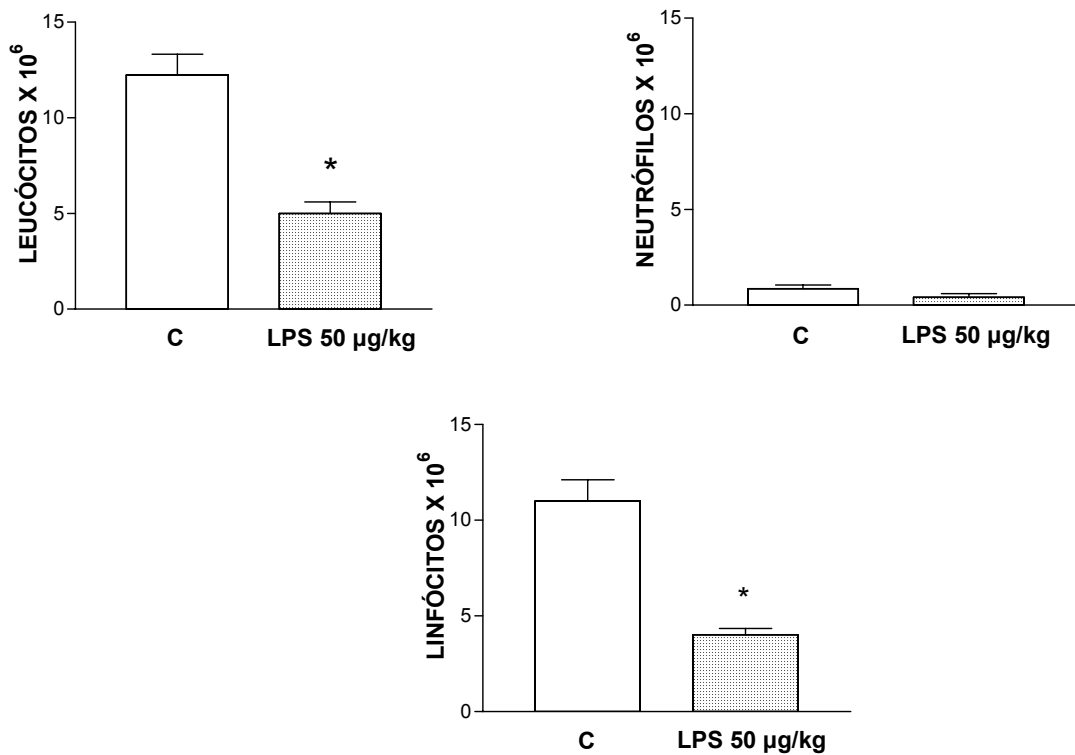


Figura 34 - Efeito do LPS (50 µg/kg i.p.) na distribuição dos leucócitos, 5 h após o desafio imune. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ($P < 0,05$) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (Teste *t* de Student não-pareado bicaudal). O n° de animais empregados por tratamento foi de 10.

4.1.6. Avaliação da influência do pré-tratamento com o antagonista de receptor da citocina, IL-1ra, na resposta comportamental e na distribuição de leucócitos promovidos pelo estresse de natação e ou pela SP.

Objetivos específicos

Investigar se os efeitos do estresse de natação ou da SP envolvem a interleucina IL-1 β e seu receptor.

Resultados

Nos experimentos que se seguem estabelecemos se a dose de seu antagonista IL-1ra era efetiva nos paradigmas experimentais usados (LCE e distribuição da série branca sangüínea), para posteriormente usá-la em animais submetidos ao estresse de natação ou tratados centralmente com a SP.

Na figura 35 observamos o efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor IL-1ra (1,8 μ g i.c.v.) no efeito da citocina IL-1 β (900 pg i.c.v.) avaliado no labirinto em cruz elevado por 5 min, em camundongos. A redução promovida pela IL-1 β na percentagem do tempo despendida nos braços abertos ($F_{(3,36)} = 23,084$;

$P < 0,05$) não foi alterada pelo pré-tratamento com seu antagonista, que, no entanto, inibiu o efeito desta citocina sobre a frequência de entradas nestes braços ($F_{(3,36)} = 12,009$; $P < 0,05$). O número de entradas nos braços fechados não foi significativamente modificado por quaisquer tratamentos ($F_{(3,36)} = 1,024$; $P > 0,05$).

A figura 36 mostra o efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor IL-1ra (1,8 μg i.c.v.) no efeito da citocina IL-1 β (900 pg i.c.v.) avaliado nos parâmetros etológicos do LCE, em camundongos. A redução no número de imersões de cabeça produzida pela citocina ($F_{(3,36)} = 10,869$; $P < 0,05$), assim como o aumento no número de estiramentos ($F_{(3,36)} = 6,850$; $P < 0,05$) e no comportamento de levantamento ($F_{(3,36)} = 8,367$; $P < 0,05$), não foram inibidos pelo tratamento com seu antagonista (que teve efeito *per se*). O comportamento de autolimpeza ($F_{(3,36)} = 2,77$; $P > 0,05$) e o número de bolos fecais ($F_{(3,36)} = 1,961$; $P > 0,05$) não foram significativamente afetados por quaisquer tratamentos.

Na figura 37 temos o efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor IL-1ra (1,8 μg i.c.v.) no efeito da citocina IL-1 β (900 pg i.c.v.) na distribuição de leucócitos 2 h após os tratamentos. O número de leucócitos totais ($F_{(3,36)} = 2,162$; $P > 0,05$), assim como o número de neutrófilos ($F_{(3,35)} = 0,3675$; $P > 0,05$) não foram significativamente diferentes entre os grupos, enquanto a linfopenia promovida pela IL-1 β é revertida pelo pré-tratamento com seu antagonista ($F_{(3,35)} = 3,503$; $P < 0,05$).

Conclusões parciais

A IL-1 β apresentou um perfil do tipo angiogênico no LCE e seu antagonista, o IL-1ra, apresentou um perfil similar. No entanto, quando usamos o IL-1ra antes da IL-1 β há uma reversão do efeito do tipo angiogênico na frequência de entradas nos braços abertos. Na distribuição de leucócitos há uma reversão da linfopenia quando do uso do antagonista IL-1ra.

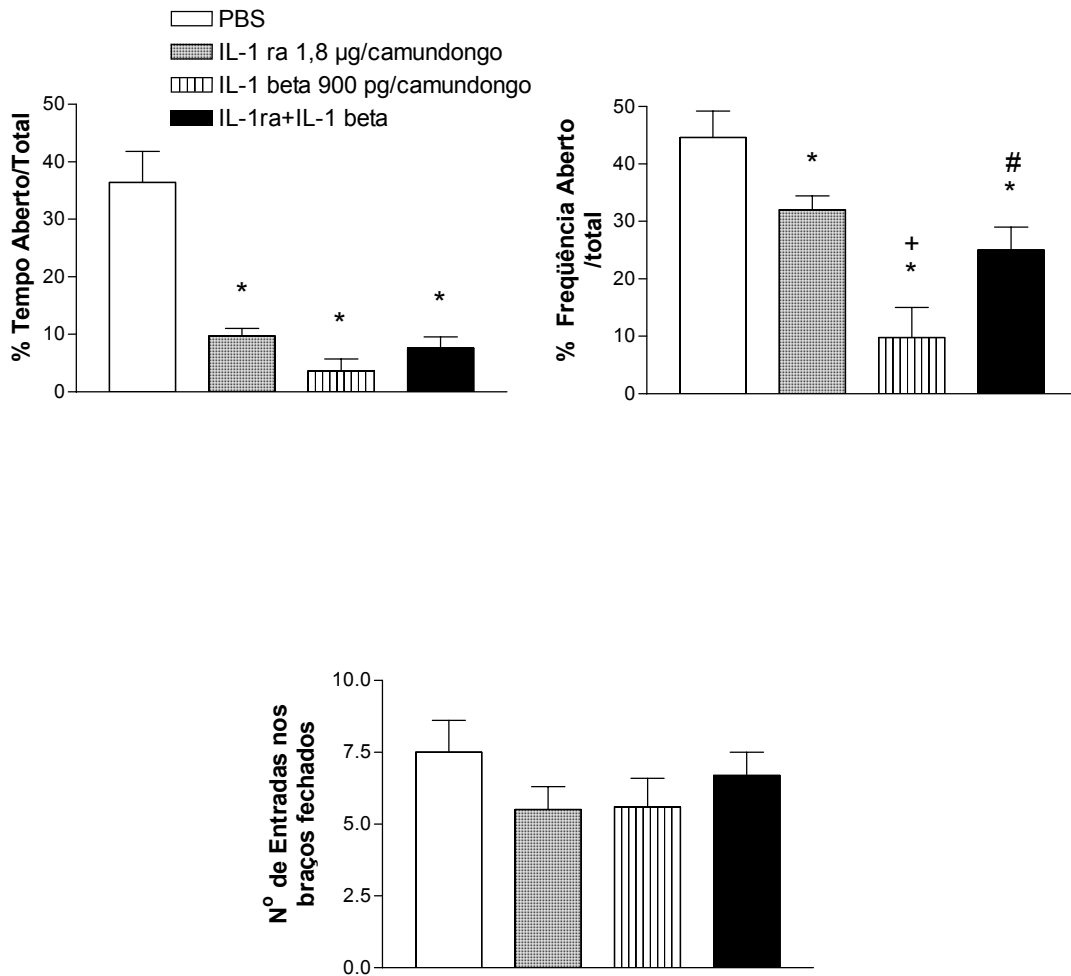


Figura 35 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor da IL-1 β , IL-1 ra (1,8 µg i.c.v.), no efeito da citocina (900 pg i.c.v.) avaliado no labirinto em cruz elevado por 5 min, em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($P < 0,05$), a grade (#), em relação ao IL-1 β , e a cruz (+) em relação ao IL-1ra + IL-1 β (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 a 10 por tratamento.

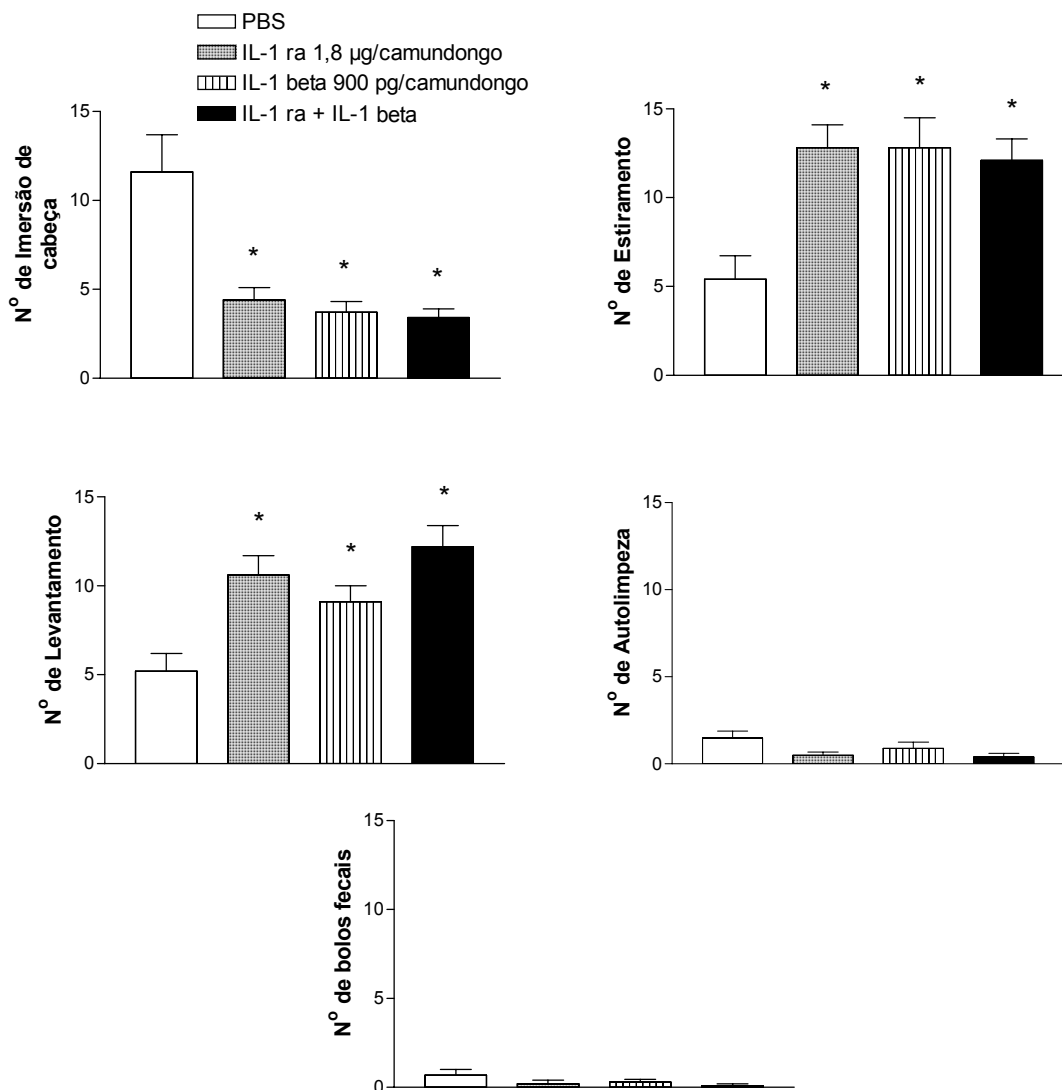


Figura 36 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor da IL-1 β , IL-1 ra (1,8 µg i.c.v.) no seu efeito (900 pg i.c.v.) nos parâmetros etológicos avaliado no labirinto em cruz elevado por 5 min, em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($P < 0,05$; ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 a 10 por tratamento.

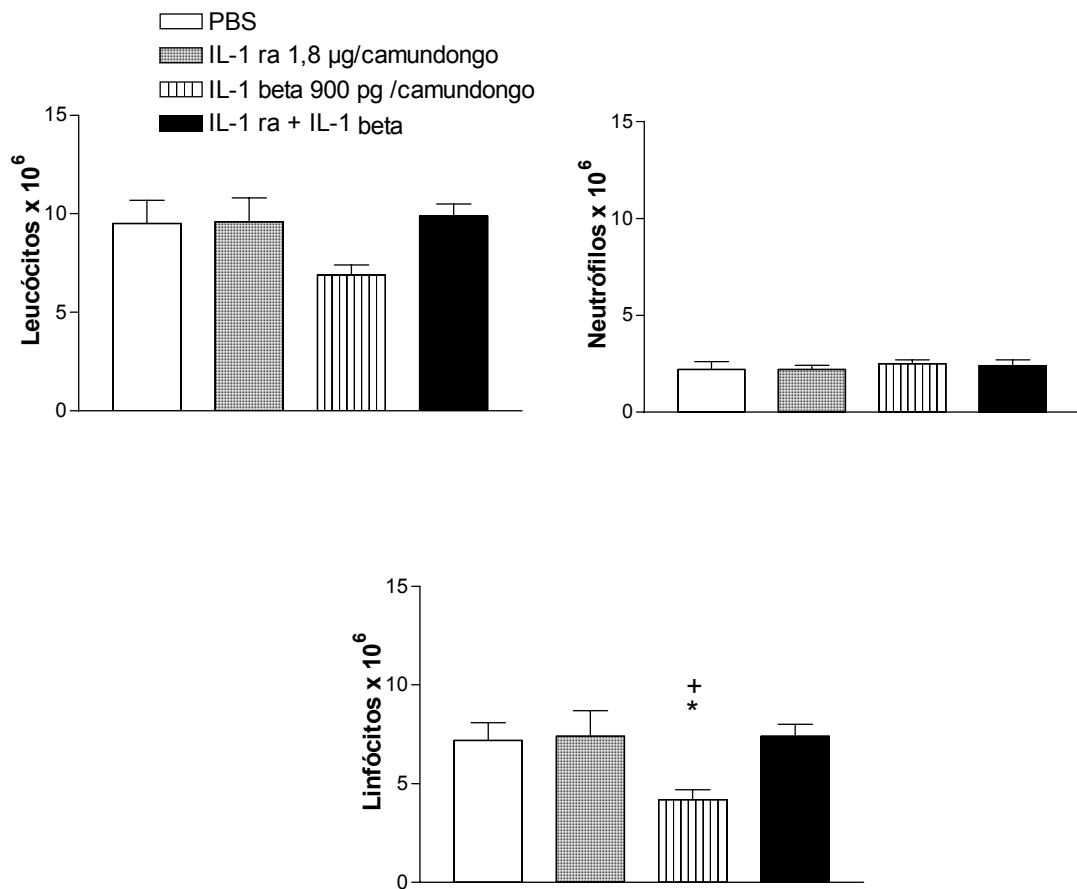


Figura 37 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor da IL-1 β , IL-1ra (1,8 μ g i.c.v.) no seu efeito (900 pg i.c.v.) na distribuição de leucócitos avaliado em camundongos 2 h após o LCE. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($P < 0,05$) e a cruz (+) em relação ao IL-1ra + IL-1 β (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 7 a 10 por tratamento.

Na figura 38 observamos o efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor de citocina, o IL-1ra (1,8 µg i.c.v.), no efeito do estresse de natação (6 min) avaliado no labirinto em cruz elevado (LCE) por 5 min, em camundongos. A redução na percentagem do tempo despendido nos braços abertos não foi alterada pelo pré-tratamento com o IL-1ra ($F_{(3,36)} = 12,735$; $P < 0,05$), embora se observe uma atenuação do efeito do estresse. O mesmo ocorreu no número de entradas nos braços fechados ($F_{(3,38)} = 13,119$; $P < 0,05$). Já a diminuição da frequência de entradas nestes braços pela submissão ao estresse foi inibida pelo pré-tratamento com o antagonista da IL-1β ($F_{(3,38)} = 4,843$; $P < 0,05$).

A figura 39 apresenta o efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor de citocina, o IL-1ra (1,8 µg i.c.v.), no efeito do estresse de natação (6 min) nos parâmetros etológicos do LCE, avaliado em camundongos. O pré-tratamento com o antagonista dos receptores da citocina levou a efeitos opostos ao da submissão ao estresse em alguns parâmetros observados (imersões de cabeça - $F_{(3,38)} = 10,354$, $P < 0,05$; estiramentos - $F_{(3,38)} = 9,788$, $P < 0,05$; comportamento de levantamento - $F_{(3,38)} = 19,538$, $P < 0,05$), diferente na defecação ($F_{(3,38)} = 1,390$; $P > 0,05$), mas só foi capaz de reverter o efeito do estresse no comportamento de autolimpeza ($F_{(3,38)} = 7,547$; $P < 0,05$).

A figura 40 mostra o efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor de citocina, o IL-1ra (1,8 µg i.c.v.), no efeito do estresse de natação (6 min) na distribuição de leucócitos, avaliado 2 h após os tratamentos. A leucopenia ($F_{(3,34)} = 9,483$; $P < 0,05$), assim como a neutrofilia ($F_{(3,33)} = 11,217$; $P < 0,05$) e a

linfopenia ($F_{(3,33)} = 7,018$; $P < 0,05$) produzidas pelo estresse de natação foram significativamente inibidas pelo pré-tratamento com o antagonista IL-1ra.

Na figura 41 observamos o efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor de citocina, o IL-1ra (1,8 μg i.c.v.), no efeito da SP (10 pmol i.c.v.) avaliado no labirinto em cruz elevado, em camundongos. A diminuição na percentagem do tempo despendido nos braços abertos ($F_{(3,38)} = 9,100$, $P < 0,05$) foi significativamente inibida pelo IL-1ra. O mesmo perfil de ação foi observado na frequência de entradas nestes braços ($F_{(3,38)} = 4,300$, $P < 0,05$) e no número de entradas nos braços fechados ($F_{(3,38)} = 1,632$; $P > 0,05$), mas não alcançou diferenças significantes entre os grupos.

A figura 42 mostra o efeito do pré-tratamento com o antagonista IL-1ra (1,8 μg i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol i.c.v.) nos parâmetros etológicos avaliados no LCE por 5 min. Os efeitos da SP nos parâmetros imersões de cabeça ($F_{(3,37)} = 6,634$; $P < 0,05$), número de estiramentos ($F_{(3,38)} = 8,961$; $P < 0,05$), comportamento de levantamento ($F_{(3,38)} = 7,672$; $P < 0,05$), autolimpeza ($F_{(3,38)} = 3,258$; $P < 0,05$) foram revertidos pela administração central da IL-1ra, enquanto os números de bolos fecais não foram significativamente alterados ($F_{(3,38)} = 1,062$; $P > 0,05$) por quaisquer tratamentos, em relação ao grupo controle.

A figura 43 mostra que o pré-tratamento com o antagonista do receptor IL-1ra (1,8 μg i.c.v.) inibiu a neutrofilia ($F_{(3,35)} = 4,928$; $P < 0,05$) produzida pela SP (10 pmol i.c.v.) 2h após os tratamentos. O número de leucócitos ($F_{(3,36)} = 0,353$; $P > 0,05$) e o de linfócitos ($F_{(3,35)} = 0,592$; $P > 0,05$) não foi significativamente modificado por quaisquer tratamentos.

Conclusões parciais

O estresse de natação por 6 min possui um perfil altamente ansiogênico no LCE e isto é revertido parcialmente pelo antagonista da IL-1, o IL-1ra. Na distribuição de leucócitos, a leucopenia, a neutrofilia e a linfopenia ocasionadas pelo estresse de natação também foram revertidas com o uso do antagonista de citocina.

A substância P possui igualmente um perfil do tipo ansiogênico no LCE e isto é também parcialmente revertido pelo uso de IL-1 ra, o mesmo ocorrendo na distribuição de leucócitos, aonde a neutropenia promovida pela SP foi também revertida pelo antagonista da citocina.

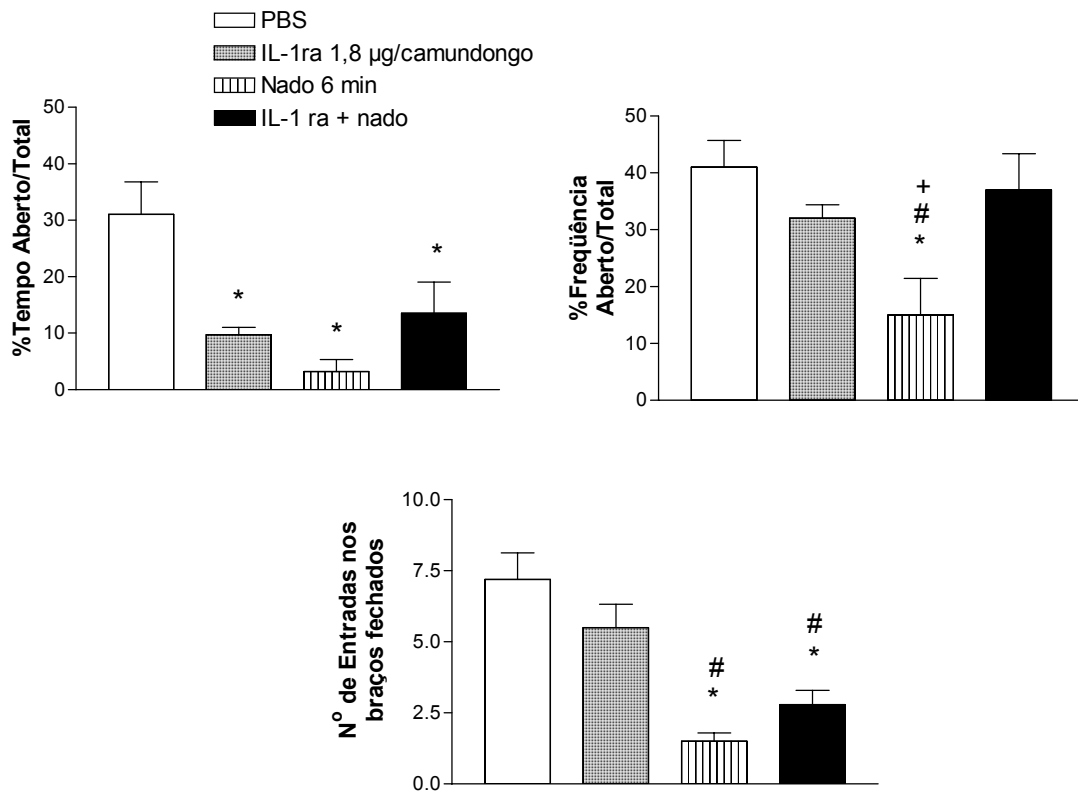


Figura 38 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor da IL-1 β , o IL-1 ra (1,8 µg i.c.v.) no efeito do estresse de natação avaliado no labirinto em cruz elevado por 5 min, em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($P < 0,05$), a grade (#), em relação ao IL-1ra e a cruz (+) em relação ao grupo IL-1ra + estresse (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 9 a 11 por grupo experimental.

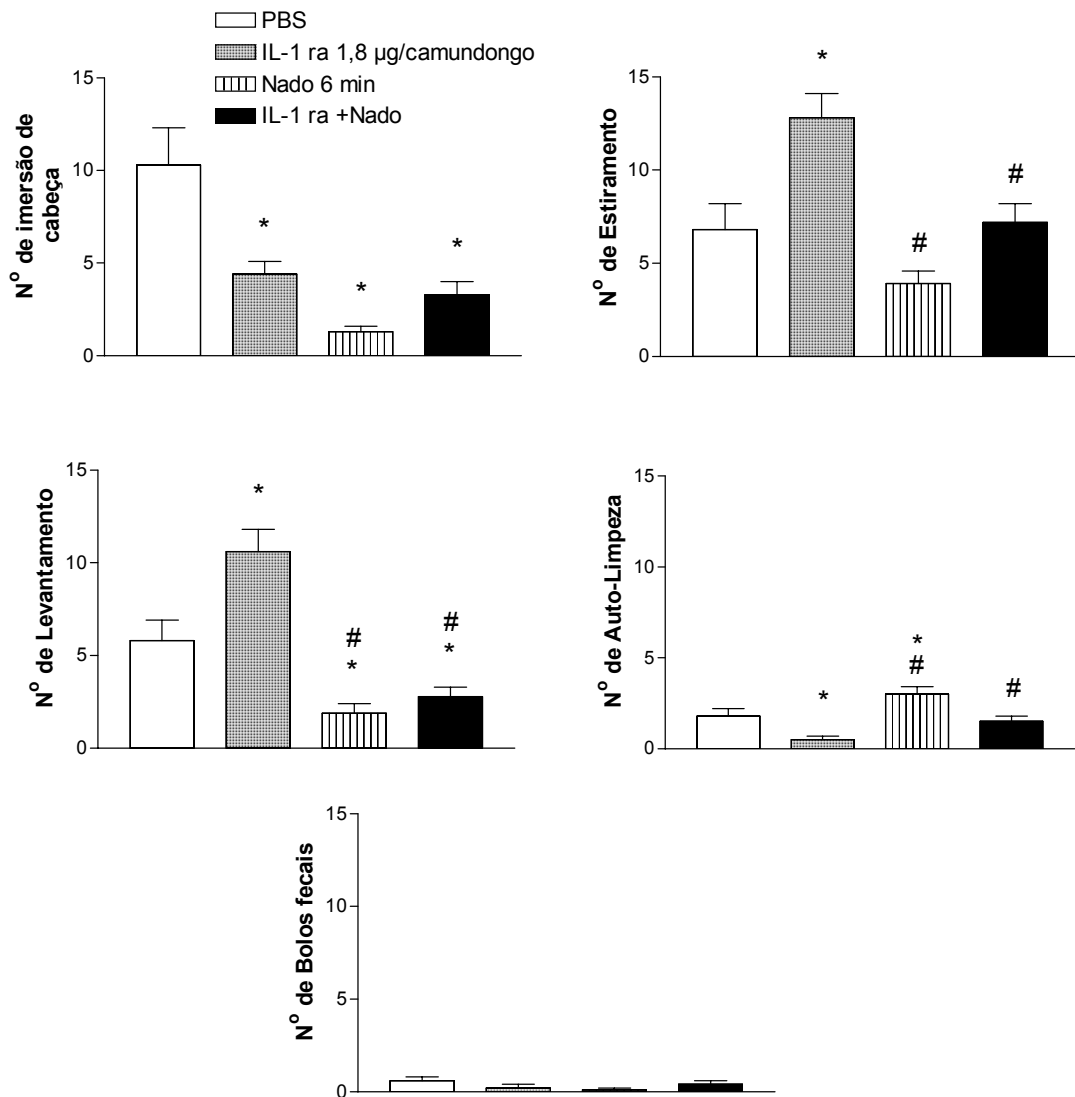


Figura 39 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor da IL-1, o IL-1 ra (1,8 µg i.c.v.) no efeito do estresse de natação nos parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado por 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($P < 0,05$) e a grade (#), em relação ao IL-1ra (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 9 a 11 por grupo experimental.

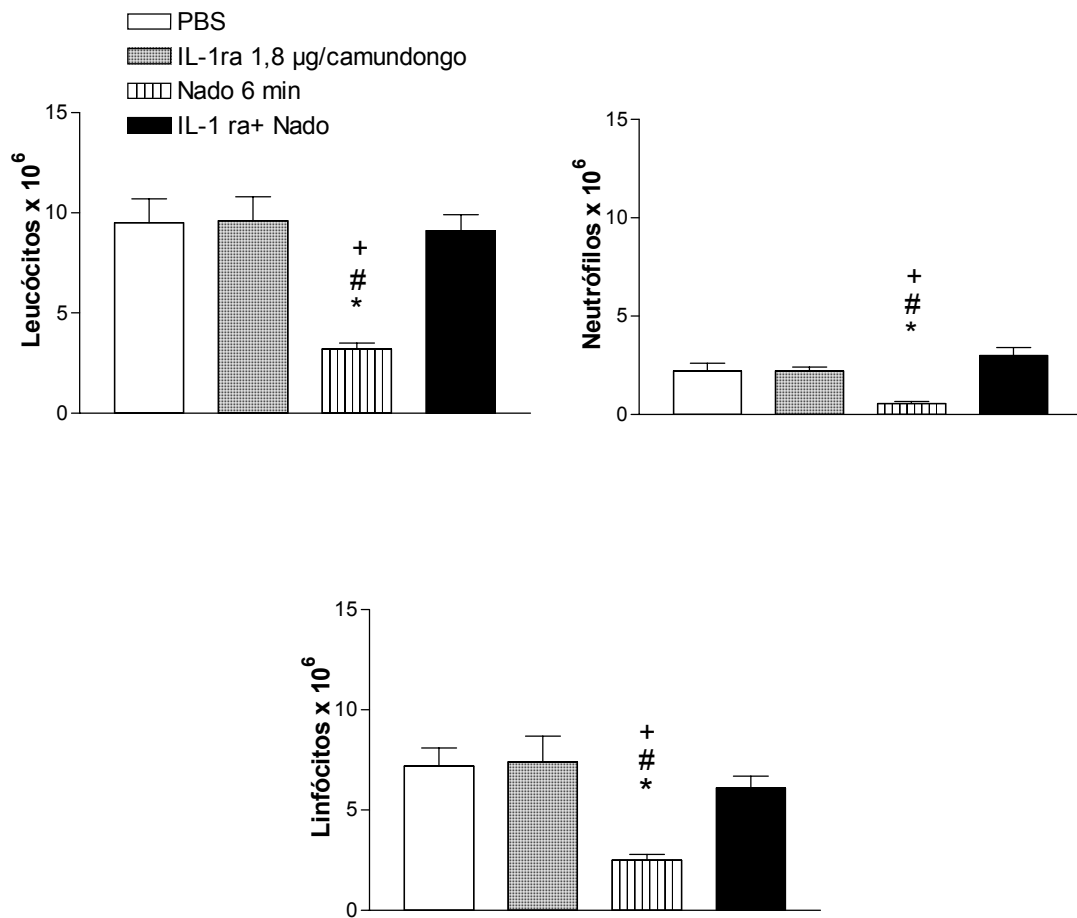


Figura 40 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor da IL-1, o IL-1ra (1,8 µg i.c.v.) no efeito do estresse de natação na distribuição de leucócitos avaliado 2 h após os tratamentos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($P < 0,05$) e a grade (#), em relação ao IL-1ra e a cruz (+) em relação ao IL-1 ra + nado (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 9 a 11 por grupo experimental.

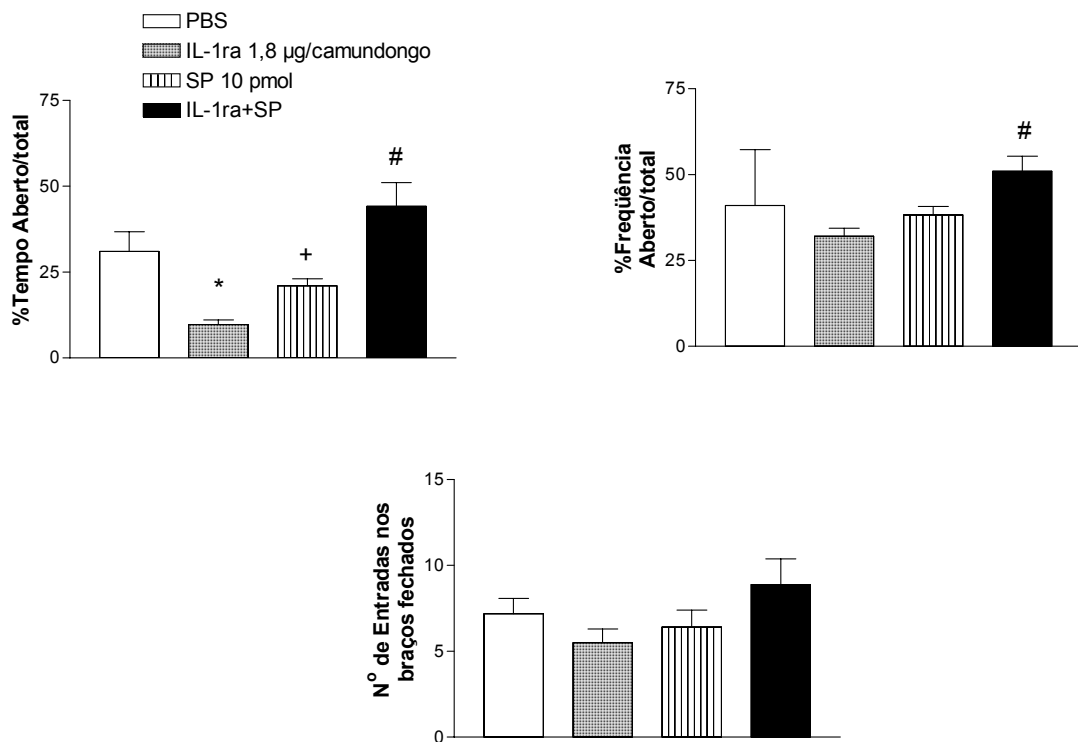


Figura 41 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor da IL-1, o IL-1ra (1,8 µg i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol i.c.v.), avaliado no labirinto em cruz elevado por 5 min, em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($P < 0,05$), a grade (#), em relação ao IL-1ra e a cruz, em relação ao grupo IL-1ra + SP (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 9 a 11 por grupo experimental.

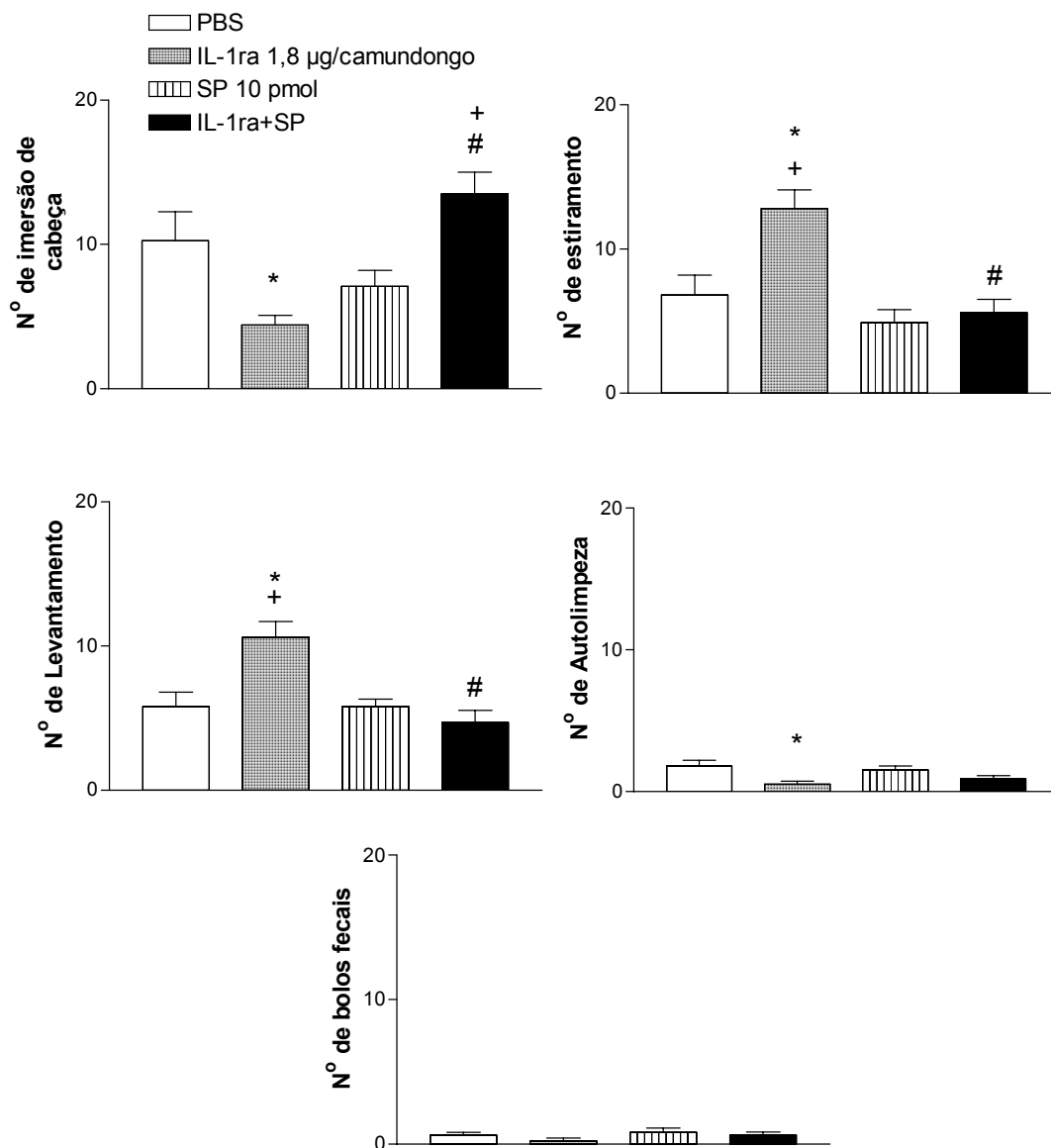


Figura 42 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor da IL-1, o IL-1ra (1,8 µg i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol i.c.v.) sobre os parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado por 5 min, em camundongos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($P < 0,05$), a grade (#), em relação ao IL-1ra e a cruz (+) em relação ao grupo IL-1ra + SP (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 9 a 11 por grupo experimental.

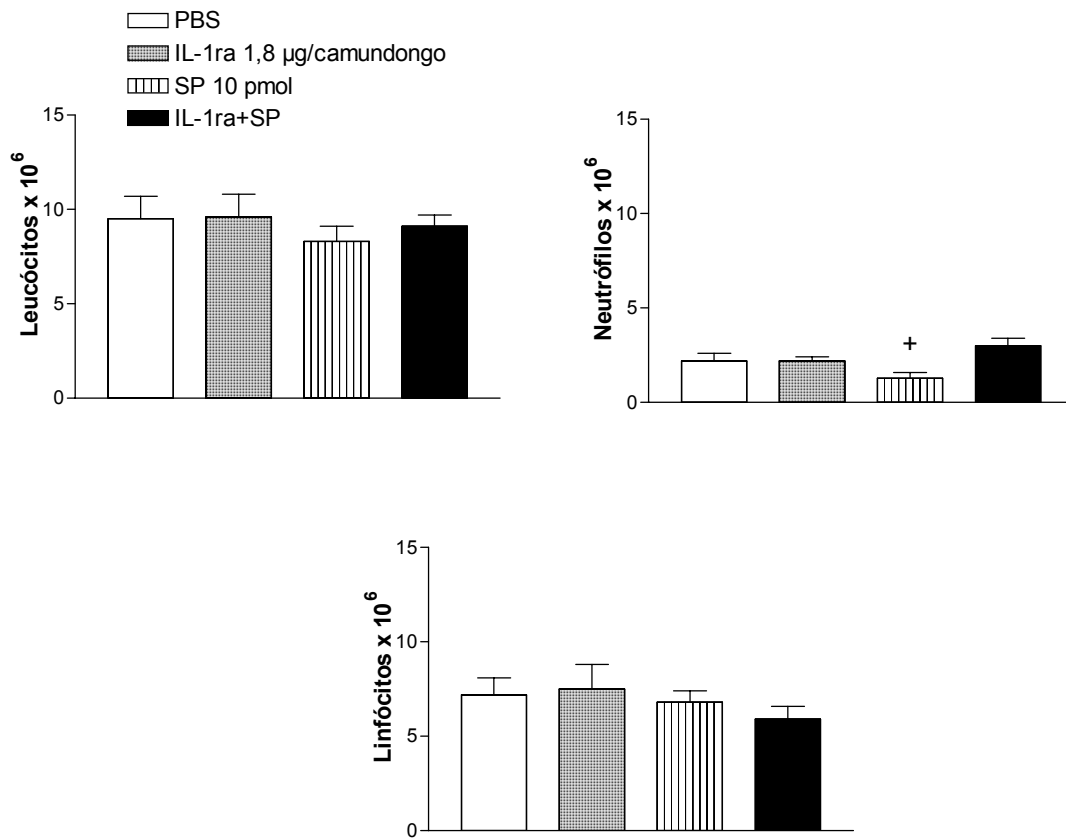


Figura 43 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor da IL-1, o IL-1ra (1,8 µg i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol i.c.v.) na distribuição dos leucócitos avaliados 2 h após os tratamentos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. A cruz (+) denota diferença significativa em relação a SP e IL-1ra + SP ($P < 0,05$; ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 9 a 11 por grupo experimental.

4.1.7. Quantificação da IL-1 β em amostras de soro de camundongos.

Objetivos específicos

Verificar se os modelos do estresse de natação por 6 min ou da administração de substância P 10 pmol (i.c.v.) alteram os níveis de IL-1 β no soro de camundongos.

Resultados e Conclusões parciais

Para a dosagem da IL-1 β optamos coletar o sangue no mesmo tempo que o havíamos feito quando da quantificação dos leucócitos totais e diferenciais, ou seja, uma hora após o estressor ou a SP. Na figura 44 verificamos que há um aumento significativo nos níveis de IL-1 β no soro de camundongos submetidos ao estresse de natação (6 min), e uma redução significativa após a administração de substância P (10 pmol i.c.v.), em relação ao grupo controle e ao grupo estressado ($F_{(2,7)} = 18.500$; $P < 0,001$).

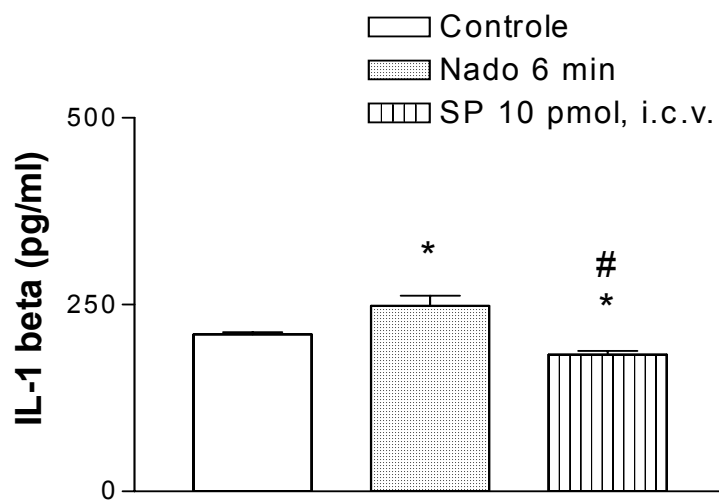


Figura 44- Níveis da citocina IL-1 β no soro de animais 1 h após a submissão ao estresse de natação por 6 min e a injeção central de SP 10 pmol (i.c.v.), o estresse ou substância P. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($P < 0,001$), a grade (#), em relação ao estresse de natação (ANOVA univariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 3-4 por grupo experimental.

4.2. AVALIAÇÃO EX-VIVO E IN VITRO

4.2.1. Dosagem de óxido nítrico

Objetivos

Foi usado um sistema *ex vivo* (macrófagos peritoneais) e *in vitro* (cultura de células C6 de glioma de rato) para verificar o envolvimento do receptor NK₁ nos processos celulares de liberação de citocinas através de uma medida indireta, a produção de óxido nítrico.

Resultados

Na figura 45 podemos observar a produção de nitrito por macrófagos peritoneais ativados com LPS 1 µg/ml + IFN-γ (10%) de camundongos injetados previamente com SP 10 pmol por via i.c.v. A produção de nitrito foi avaliada pelo método de Griess, e verificamos um aumento significativo nos seus níveis após o tratamento com SP ($F_{(3,20)} = 17,012$; $P < 0,05$) em machos ($F_{(1,20)} = 0,99$; $P >$

0,05; interação - $F_{(3.20)} = 1,73$; $P > 0,05$), menor que a observada pela ativação dos macrófagos com LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ + IFN- γ (10%).

Na figura 46 observamos que a incubação (24 h) das células de linhagem de glioma de ratos (C6) com diferentes tratamentos levou a um aumento na produção de NO quando adicionamos LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ + SP 1nM à cultura ($F_{(8-41)} = 2,412$; $P < 0,05$) e este aumento é inibido pela adição de L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS, e/ou pela adição de FK 888, um antagonista de receptores NK₁.

Entretanto, a incubação das células de linhagem de glioma de ratos (C6) com os mesmos tratamentos (Figura 47), 48 h depois promoveu alterações similares na produção de NO, mas não estatisticamente diferentes dos valores controle ($F_{(8-49)} = 2,677$; $P > 0,05$).

Conclusões parciais

No teste *ex-vivo*, a administração central de SP levou a um aumento nos níveis de NO em macrófagos peritoneais apenas em machos. Este efeito da SP foi confirmado em linhagem de células de glioma C6, onde a SP estimulou a liberação de NO, sendo esse efeito inibido pelo antagonista específico de receptor da taquicinina NK₁, FK888, e pelo L-NAME, inibidor reversível da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

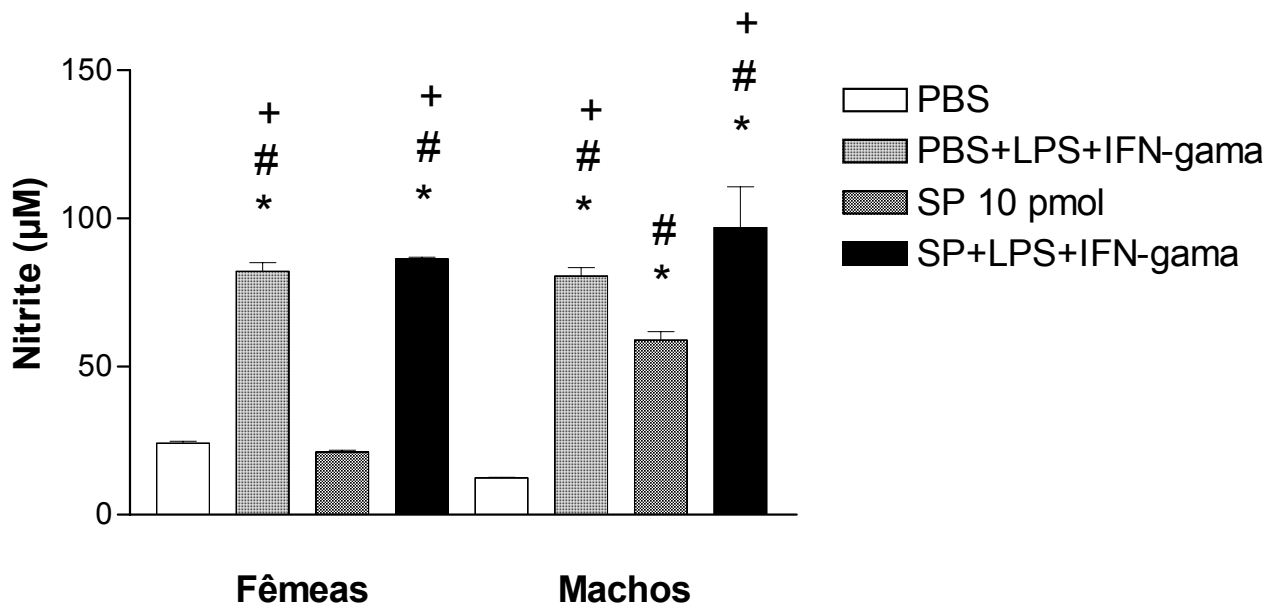


Figura 45- Produção de nitrito por macrófagos ativados com LPS 1 µg/ml + IFN- γ (10%) de camundongos tratados previamente com SP 10 pmol. A produção de nitrito foi avaliada pelo método de Griess. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes em relação aos valores obtidos nos grupos controle das fêmeas ($P < 0,05$), a grade (#) em relação ao controle dos machos e a cruz (+) em relação às fêmeas tratadas com SP (ANOVA bivariada seguida pelo teste de Newman-Keuls). O número de animais usados foi de 3 a 4 por tratamento.

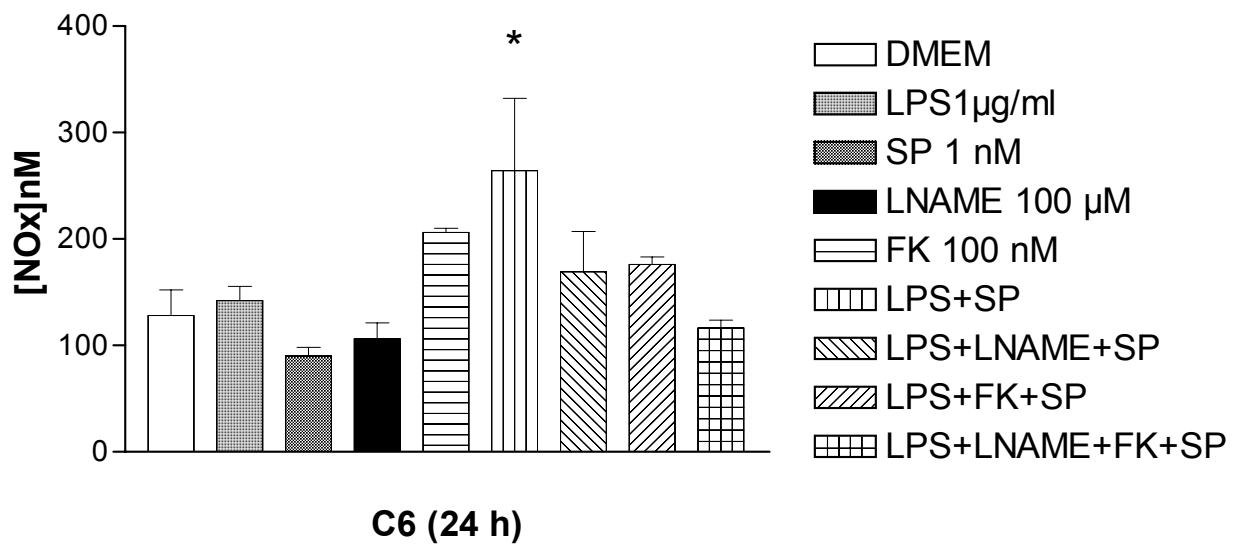


Figura 46 - Efeito do LPS (1µg/ml), da SP (1nM), do L-NAME (100µM) e do FK888 (100 nM) na produção de NO em células de glioma de ratos (C6), após a incubação por 24 h. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de três amostras. O asterisco denota diferença significativa em relação aos valores obtidos no grupo controle DMEM (* $P < 0.05$; ANOVA univariada, seguida do teste de Newman-Keuls).

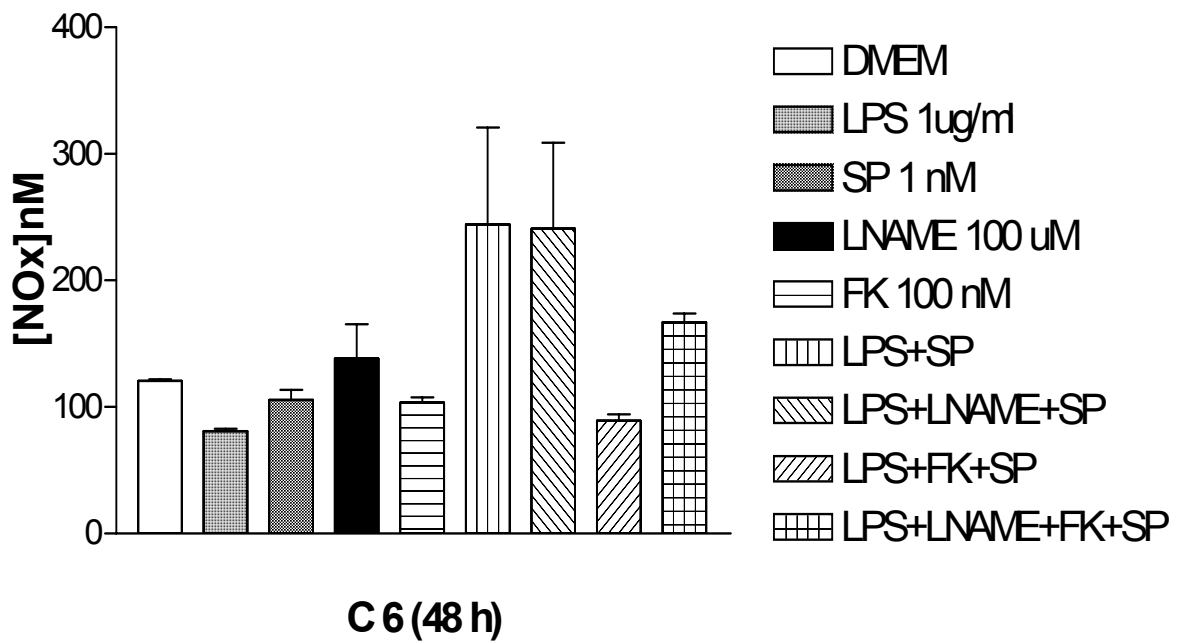


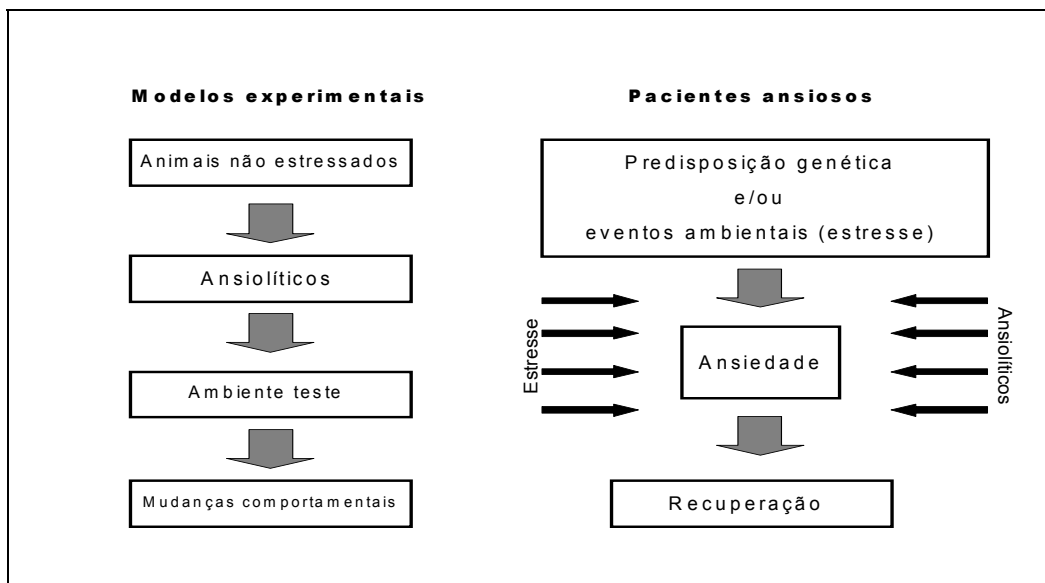
Figura 47 - Efeito do LPS (1 μ g/ml), da SP (1nM), do L-NAME (100 μ M) e do FK888 (100 nM) na produção de NO em células de glioma de ratos (C6), após a incubação por 48 h. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de três amostras.

5. DISCUSSÃO

A ansiedade e a depressão são psicopatologias prevalentes no mundo moderno (KESSLER et al., 1994), sendo que as mulheres apresentam mais freqüentemente estas patologias (DMS-IV, 1994). Na terapia medicamentosa atual prevalecem os benzodiazepínicos e os inibidores seletivos de recaptção de serotonina, respectivamente (VASSOUT et al., 2000). Estes medicamentos, a despeito de sua comprovada eficácia, têm seu uso limitado por diversas razões, entre elas seus efeitos colaterais indesejáveis (RUPNIAK et al., 2000). Assim, na última década, há um enorme esforço no sentido de encontrarmos novas alternativas medicamentosas para estas afecções. Os prováveis candidatos a ansiolíticos, particularmente, têm sido testados em diversos laboratórios em diferentes paradigmas experimentais, precedendo seus estudos clínicos. O sucesso destes estudos pré-clínicos depende principalmente de uma similaridade entre os modelos animais de ansiedade e os distúrbios de ansiedade em humanos. Apesar do sucesso razoável nas abordagens experimentais usadas até o momento, há várias inconsistências entre os dados pré-clínicos e clínicos, que sugerem que abordagem experimental deve ser melhorada.

A principal discrepância entre os modelos animais e os distúrbios humanos diz respeito ao estado fisiológico/psicológico dos indivíduos: enquanto os animais de experimentação são geralmente animais normais não estressados, os pacientes, em geral, têm uma longa história de experiências estressantes e isto é devido a dois fatores, principalmente: 1) os distúrbios de ansiedade são

geralmente provocados por estressores, e 2) os distúrbios são geralmente associados com situações de estresse porque a ansiedade predispõe os indivíduos a uma sensibilidade exagerada aos agentes ou condições estressantes (esquema 5; HALLER, 2001).



Esquema 5 – Diferenças entre o modelo (teste para ansiolíticos em condições laboratoriais) e a situação modelada (pacientes ansiosos). Adaptado de HALLER (2001)

Estas colocações são relevantes, pois a prática corrente de testar prováveis ansiolíticos em animais não estressados pode levar a conclusões inadequadas em alguns casos, isto é, alguns ansiolíticos efetivos na clínica apresentam dados experimentais inconsistentes, como os agentes serotoninérgicos (KENT et al., 2002), enquanto os benzodiazepínicos, extremamente eficazes em modelos animais, são eficazes clinicamente em apenas 60-70 % dos casos clínicos (HALLER, 2001). Evidentemente, inúmeros fatores podem ser responsáveis por tais diferenças, mas certamente a exposição a situações de estresse pode afetar a

eficácia de drogas ou candidatos a ansiolíticos. Isto é de nosso particular interesse, pois temos postulado que antagonistas de receptores taquicinérgicos têm potencial como drogas do tipo ansiolíticas (TEIXEIRA et al., 1996; GAVIOLI et al., 2002), o que tem sido corroborado por outros autores (BOYCE et al., 2001; CHEETA et al., 2001; FILE, 1997, 2000; VASSOUT et al., 2000; NIKOLAUS et al., 1999; KRAMER et al., 1998; CUTLER et al., 1994). Assim, a comparação dos efeitos comportamentais e fisiológicos da SP com situações de estresse, além do entendimento de possíveis mecanismos básicos comuns, poderia nos levar a uma melhor compreensão da modulação da ansiedade pelas NKs e do potencial uso dos antagonistas taquicinérgicos em situações de ansiedade e/ou estresse, o que foi nosso objeto de estudo no presente trabalho.

Por outro lado, é bem conhecido que a ansiedade e o estresse promovem alterações imunes através de mecanismos adreno - medulares - simpáticos e adreno - corticais - hipotalâmicos - hipofisários, assim como por neurotransmissores, como a substância P (SP), que podem ser traduzidas como mudanças fisiológicas e comportamentais. No presente trabalho, procuramos estudar algumas destas alterações no comportamento (avaliado no labirinto em cruz elevado, modelo validado para a ansiedade experimental), além de mudanças fisiológicas (distribuição da série branca sangüínea, como indicador de mudanças no perfil celular sangüíneo) em animais (camundongos) submetidos a condições de estresse físico (natação forçada) e “farmacológico” (administração central de substância P), procurando verificar a inter-relação entre estas condições e a sua modulação (por pré-tratamentos com antagonistas específicos). Além disso, procuramos encontrar um modelo *in vitro* (cultura de células C6 de glioma

de ratos) que pudesse ser usado para tentar entender o mecanismo de ação de um dos neurotransmissores (SP) possivelmente envolvido no processo.

Nossos resultados, que serão discutidos a seguir, mostraram que as fêmeas são mais sensíveis à administração central de SP, apresentando efeitos do tipo ansiogênicos no LCE mais evidentes que os dos machos, além de leucopenia e linfopenia. Entre as diversas condições de estresse comparadas neste estudo, o estresse de natação por 6 min à temperatura ambiente mostrou alterações comportamentais e sangüíneas similares em qualidade e intensidade àquelas produzidas pela SP. A adrenalectomia não impediu estas alterações, embora os pré-tratamentos farmacológicos sugiram uma participação dos glicocorticóides e dos β -adrenoceptores, mas não dos receptores opióides do tipo μ , na modulação dos efeitos estudados, em animais submetidos ao estresse de natação e também naqueles tratados com SP centralmente. Ambos os grupos também têm seus efeitos comportamentais e sangüíneos inibidos pelo pré-tratamento com um antagonista do receptor taquicinérgico NK₁ (FK-888) e do receptor de interleucina 1- β (IL-1 β), indicando que uma via comum provável entre as alterações comportamentais e fisiológicas produzidas pela SP e pelo estresse seria via liberação de citocinas e, talvez, secundariamente, de NO. Para testarmos tal hipótese, inicialmente verificamos que o estresse de natação e a SP promovem alterações nos níveis de citocinas (IL-1- β) e conseqüentemente de NO em estudos *ex-vivo*. A seguir, observamos que a SP é capaz de ativar macrófagos peritoneais em experimentos *ex-vivo* com produção de NO e ao usarmos uma cultura de células gliais (C6) observamos que a formação de NO foi ativada por SP mais

LPS, sendo inibida tanto pelo FK-888 como pelo L-NAME, o que nos sugere a possibilidade do NO, como um modulador das respostas comportamentais e sangüíneas produzidas pelo estresse de natação e pela SP, talvez via citocinas, além de reforçar a idéia de que a SP é um mediador do estresse, que pode estar sendo negligenciado, mas que poderia ser usado como uma abordagem alternativa em psicopatologias envolvendo situações de estresse, como a ansiedade e a depressão.

Em estudos anteriores, nos quais verificamos a modulação da ansiedade pelas neurocininas, trabalhamos exclusivamente com camundongos machos (TEIXEIRA et al., 1996; RIBEIRO et al., 1999) ou fêmeas (BARETTA et al., 2001; RIBEIRO e De LIMA, 2002). Então, neste estudo com o objetivo de verificar o envolvimento da SP em condições de estresse, inicialmente comparamos os efeitos comportamentais e na contagem diferencial da série branca sangüínea (como um indicador de efeitos imunológicos) em animais machos e fêmeas, comparando-os, para depois darmos continuidade às outras avaliações propostas.

Tanto machos como fêmeas mostraram uma redução da exploração dos braços abertos do LCE, assim como uma redução no número de imersões de cabeça e um aumento no número de estiramentos, fortalecendo, assim, os dados indicativos do perfil ansiogênico da SP, já descrito na literatura (BILKEI-GORZO et al., 2002; RIBEIRO e De LIMA, 2002; BARETTA et al., 2001; RUPNIAK et al., 2000; SARIA, 1999; TEIXEIRA et al., 1996, AGUIAR e BRANDÃO, 1996 entre outros). No entanto, todas as mudanças observadas

foram mais evidentes nas fêmeas. O mesmo perfil foi observado na contagem diferencial da série branca sangüínea, isto é, machos e fêmeas mostraram uma tendência a diminuição de leucócitos e linfócitos, além de um aumento de neutrófilos, como esperado em situações de estresse (DHABHAR, 2000; DHABHAR et al., 1995; DHABHAR e MCEWEN, 1996), estes efeitos foram, de novo, mais evidentes em fêmeas.

Em ratos, têm sido observadas diferenças entre sexos em uma ampla variedade de comportamentos não reprodutivos. Por exemplo, as fêmeas têm um alto nível de atividade basal em vários testes e defecam menos, quando comparadas aos machos, ao serem expostas a um ambiente novo (BEATTY, 1979). Isto tem sido interpretado como as fêmeas sendo menos “medrosas” e mais exploradoras do que os machos (GRAY, 1979). Particularmente, está bem documentado que as fêmeas adultas demonstram ter uma maior atividade locomotora (o que não verificamos no presente trabalho pela análise do número de entradas nos braços fechados do LCE) e de comportamentos de levantar, o que só ficou evidente no grupo de fêmeas tratadas com SP i.c.v., além de defecarem menos no campo aberto, o que também foi observado em nossos estudos no LCE, embora não tenhamos observado diferenças significantes entre machos e fêmeas (BLIZARD et al., 1975; MASUR et al., 1980).

De outro lado, a distribuição e a função de peptídeos regulatórios no sistema nervoso central (SNC) têm sido extensivamente estudadas nas últimas décadas, sendo que a maioria dos trabalhos é feita baseada na assertiva de que não existem diferenças entre os sexos. A este respeito, os trabalhos de RUGARN

et al. (1999) demonstram que existem diferenças nos níveis de neuropeptídeo Y (NPY), neurotensina (NT) e galanina (GAL), em especial, no hipocampo, estriado, hipotálamo e pituitária, mas não para o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP) e neurocinina A (NKA), nestas áreas. Desta maneira, os resultados da análise de alguns neuropeptídeos em um sexo não podem ser inteiramente extrapolados para o outro. Particularmente, os níveis de SP não mostraram diferenças entre sexos, o que talvez possa ser aplicado a nosso estudo. Assim, as diferenças comportamentais e sangüíneas aqui observadas não poderiam ser atribuídas diretamente à presença de diferentes níveis de SP endógena, mas talvez a uma maior sensibilidade à SP exógena em fêmeas, razão pela qual as usamos nos experimentos subseqüentes. Esta maior “sensibilidade” poderia ser devido a diversos fatores, entre eles efeitos diretos dos hormônios sexuais sobre outros hormônios / neurotransmissores, que devem ser melhor investigados. Quanto a isto, a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é significativamente diferente entre machos e fêmeas. Esteróides sexuais induzem mudanças na expressão dos receptores dos glicocorticóides no hipotálamo, controlando, portanto, a retro-alimentação negativa da homeostasia dos glicocorticóides; o estrógeno inibe e o andrógeno estimula este “feedback” negativo. Desta maneira, o estrógeno regula para cima o cortisol sérico, enquanto que andrógeno diminui os níveis de cortisol sérico. Assim, fêmeas possuem níveis de glicocorticóides altos, quando comparadas aos machos, tanto em condições basais como quando estimuladas (BIJLSMA et al., 1999), o que talvez tenha alguma relação de causa-efeito com a resposta mais evidente das fêmeas ao efeito ansiogênico da SP, hipótese a ser futuramente investigada.

O dimorfismo de gênero no sistema imune está bem estabelecido, sendo resultado de efeitos diretos dos hormônios sexuais. Os andrógenos exercem uma influência inibitória em respostas imunes mediadas por células e respostas humorais, enquanto que o estrógeno apresenta um duplo papel: suprime a resposta imune mediada por células, mas aumenta a resposta imune humoral. Isto poderia explicar os efeitos mais evidentes da SP na distribuição leucocitária em fêmeas, observados no presente estudo. A este respeito, as doenças auto-imunes são mais freqüentes em mulheres (MARCHETTI et al., 2001, LOCKSHIN, 2001). E a linfopenia observada em fêmeas no presente estudo poderia ser indicativa, novamente, de uma maior “sensibilidade” a mudanças no sistema imune produzidas pela SP nas fêmeas.

Constatamos, pois, que as fêmeas mostram-se mais sensíveis que os machos aos efeitos da SP, tanto no comportamento (parâmetros clássicos e etológicos avaliados no LCE), quanto na distribuição dos leucócitos, onde só as fêmeas apresentaram linfopenia significativa quando submetidas ao tratamento com SP. Assim, ao escolhermos as fêmeas para darmos continuidade aos nossos experimentos com situações de estresse e uma substância do tipo ansiogênica, a SP, pensamos que estes achados iniciais do presente estudo poderiam favorecer nossos estudos posteriores verificando o envolvimento da SP em condições de estresse e ansiedade.

As conseqüências comportamentais e fisiológicas da exposição de animais a estressores têm sido extensivamente estudadas. O estresse induz um desequilíbrio no organismo e envolve o sistema endócrino, nervoso central

e imune (GALINOWSKY, 1993). O estresse agudo leva a mudanças comportamentais e fisiológicas que melhoram a habilidade do organismo em alcançar a homeostasia, aumentando as chances de sobrevivência do indivíduo (DUBROVSKY, 2000).

O estresse é um fenômeno psicofísico que sempre existiu no comportamento humano. Desde os primórdios de nossa vida neste planeta, a natureza nos munuiu de um dispositivo de percepção que coloca nosso corpo em estado de alerta contra possíveis ameaças e perigos, independentemente da vontade externa, de nossa própria vontade e, muitas vezes, até mesmo da razão. Esta, quando requisitada, participa apenas da construção da estratégia de controle e de como melhor lidar com o agente estressor.

Experimentalmente, observamos uma redução dos parâmetros de exploração dos braços abertos do LCE, assim como dos parâmetros etológicos relacionados a essa exploração, dados em acordo com um efeito do tipo ansiogênico, já previamente descrito para a SP (TEIXEIRA et al., 1996). As situações de estresse, em geral, também promovem uma redução na exploração dos braços abertos do LCE, bem como da porcentagem de tempo nestes mesmos braços, como verificamos no presente estudo.

A respeito de situações de estresse e do possível envolvimento da SP, é bem estabelecido que este neuropeptídeo induz reações cardiovasculares de defesa em ratos (UNGER et al., 1988; TSCHÖPE et al., 1992; CULMAN e UNGER, 1995) e apresenta efeitos pró-aversivos quando microinjetado na substância cinzenta periaquedutal (AGUIAR e BRANDÃO, 1996). A SP controla

ainda várias respostas comportamentais, neuroquímicas e cardiovasculares do estresse (para revisão ver RUPNIAK & KRAMER, 1999). Estudos neuroquímicos têm mostrado mudanças na quantidade de SP em distintas regiões do cérebro em resposta a estímulos estressantes e tanto o aumento quanto a diminuição da concentração de SP têm sido relatados. Ratos submetidos à condição de imobilização mostraram um aumento nas fibras imunorreativas à SP na substância cinzenta periaquedutal dorsal (BRODIN et al., 1994) e aumentos na concentração de SP foram encontrados no septo e no hipocampo após os animais terem sido submetidos a uma sessão de choque nas patas (SIEGEL et al., 1984). Entretanto, TAKAMAYA et al. (1986) demonstraram haver uma diminuição na quantidade de SP no septo, hipocampo e corpo estriado de ratos submetidos ao estresse de imobilização. Outros estudos demonstraram que a SP está diretamente envolvida na modulação das reações de estresse e defesa no sistema límbico, em ratos (BRODIN et al., 1994) e gatos (SHAIK et al., 1993). Foi também observada uma influência modulatória das taucinininas na resposta fisiológica ao estresse (OEHME et al., 1980; HALL e STEWART. 1983) e FEHDER et al. (1997) observaram um aumento dos níveis sanguíneos de SP em resposta à ansiedade psicológica em humanos e propuseram que a SP serviria como um mediador nas reações imunológicas produzidas pelo estresse.

Assim, como a SP parece ser um mediador do estresse, a seguir, ainda na primeira parte dos experimentos desenvolvidos no presente trabalho, avaliamos diferentes condições de estresse no comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado (LCE) e no perfil celular sanguíneo, para verificarmos se algumas destas condições replicariam os achados comportamentais e sanguíneos

observados após a administração central de SP. Constatamos que o estressor cujos efeitos foram mais similares aos efeitos da SP no sistema nervoso central e no perfil celular sanguíneo foi o de natação por 6 min, o qual produz mudanças comportamentais, diminuindo de modo significativo a percentagem de tempo despendido nos braços abertos, o número de imersões de cabeça e de estiramentos, o comportamento de levantar e o número de bolos fecais, em relação aos valores controle. Estas alterações comportamentais foram na verdade, observadas após a submissão a diferentes condições de estresse (nado forçado por 3, 6 min e imobilização à frio) mas foi mais evidente após o estresse de natação por 6 min na luz vermelha, mostrando que as condições de estresse aqui estudadas produzem um perfil do tipo ansiogênico nos animais similar àquele observado após a administração central de SP. Este efeito do tipo ansiogênico foi evidenciado quando o LCE era realizado logo após o estresse de natação, mas não quando os animais eram avaliados no LCE 1 h após a submissão ao estresse.

A comparação da mesma condição de estresse (nado forçado por 3 min) sob diferentes luminosidades (luz branca 60 W x vermelha 15 W) mostrou que a presença da luz torna mais evidentes os efeitos do estresse, mas por ser mais um fator estressante que poderia “confundir” nossos resultados, decidimos avaliar comportamentalmente os animais em condições sem estresse, na luz vermelha.

Nos parâmetros sanguíneos, as mudanças fisiológicas, traduzidas pelo aumento de neutrófilos e tendência à diminuição de leucócitos e linfócitos, foram constatadas com mais evidência somente 1 h após a submissão dos animais ao estresse, em contraposição às mudanças comportamentais

constatadas logo em seguida ao estressor. Estes achados foram qualitativamente semelhantes aos observados após a injeção i.c.v. de SP.

Do ponto de vista fisiológico, é de se esperar que cada estímulo em particular possa desencadear um perfil de respostas neuroendócrinas específicas, de forma a manter a homeostasia, desafiada por um estímulo em particular específico (MARTI e ARMÁRIO, 1998) e que alterações celulares necessitem de um tempo maior para se estabelecerem, em comparação a mudanças sutis de comportamento, as quais parecem depender de modificações rápidas nos níveis de neurotransmissores / neurohormônios centrais, como resposta adaptativa a situações potencialmente perigosas ao organismo.

As células imunes ou leucócitos circulam continuamente do sangue para vários órgãos e de volta para o sangue. Esta circulação é essencial para a manutenção de uma resposta imune efetiva (SPRENT e TOUGH, 1994). O número e as proporções de leucócitos no sangue proporcionam uma importante representação do estado de distribuição de leucócitos no corpo e do estado de ativação do sistema imune (DHABHAR, 2002). De fato, as reduções nos números dos leucócitos sangüíneos foram muito usadas como uma medida indireta de aumentos nos níveis plasmáticos de corticosterona, quando outros métodos de avaliação desse hormônio não estavam ainda disponíveis (HOAGLAND et al., 1946). Sabe-se que diversas situações de estresse levam a reduções no número de leucócitos sangüíneos (para revisão ver DHABHAR e McEWEN, 1996) e esse fenômeno está conservado durante a evolução,

indicando, possivelmente, que a redistribuição de leucócitos tem importante papel adaptativo, além de significância funcional. Os aumentos dos níveis de corticosterona plasmática induzidos por estresse são acompanhados por uma redução significativa no número e porcentagem de leucócitos totais (45-60%) e aumento no número e porcentagem de neutrófilos. DHABHAR et al. (1995) mostraram que as alterações induzidas pelo estresse na distribuição de leucócitos sangüíneos estão presentes dentro de 30 min após a exposição ao estressor. Durante os primeiros minutos de estresse, o número de leucócitos aumenta, mas com a continuação do estresse, eles diminuem e permanecem baixos durante o estresse. Entretanto, se o estressor termina, o número de leucócitos começa a subir e retorna aos níveis basais dentro de poucas horas após o término do estresse (DHABHAR, 2002), enquanto o número de granulócitos geralmente aumenta durante o estresse e não retorna ao nível basal tão rapidamente quanto ao número de monócitos ou linfócitos (DHABHAR et al., 1995). Nossos dados estão de acordo com estes dados já que 1 hora após a submissão ao estresse ou a administração central de SP os parâmetros sangüíneos apresentam seu efeito máximo. Durante a resposta ao estresse há geralmente um aumento no número e porcentagem de neutrófilos (que podem mesmo ser elevados o suficiente para refletir um aumento na contagem de células totais da série branca) e uma diminuição na porcentagem e/ou número de linfócitos (DHABHAR et al., 1995). Isto é confirmado por nossos resultados mostrando que o estresse de natação e a administração central de SP promovem uma redução dos leucócitos totais com linfopenia e neutrofilia.

Estas mudanças na série branca sangüínea são mediadas por hormônios liberados pelas glândulas adrenais (DHABHAR et al., 1996; DHABHAR et al., 1995). A magnitude dessas alterações é significativamente reduzida pela adrenalectomia (DHABHAR et al, 1995; DHABHAR et al, 1996), que, teoricamente, elimina a liberação de corticosterona e noradrenalina pelas glândulas adrenais na circulação sistêmica, em resposta a situações de estresse. Com o intuito de verificar a possível participação do eixo HPA, e seus hormônios, na modulação das alterações comportamentais e imunológicas produzidas por condições de estresse, realizamos inicialmente a adrenalectomia dos camundongos e, após sete dias da cirurgia, testamos os animais no LCE e verificamos o comportamento e a distribuição dos leucócitos, após a submissão dos animais ao estresse de natação por 6 min. Em nossos experimentos, não observamos diferenças no comportamento dos camundongos e na distribuição de leucócitos após a adrenalectomia. Verificamos apenas uma reversão da linfopenia dos animais falso-operados, quando comparados aos adrenalectomizados. A linfopenia observada no grupo falso-operado poderia ser atribuída ao estresse da manipulação cirúrgica neste grupo que, quando da retirada das glândulas adrenais, não mais encontraria substrato anátomo-fisiológico para ocorrer. A adrenalectomia previne os efeitos imunossupressivos de alguns tipos de estresse em estudos em animais (DUNN, 1989), mas em muitos outros estudos as mudanças induzidas por estresse persistem em animais adrenalectomizados (DUNN, 1995), como no presente estudo. A adrenalectomia parece ser efetiva em estudos que examinam respostas agudas para estressores breves (para os quais os efeitos

imunossupressivos são rapidamente revertidos), mas pode ser menos efetiva para os efeitos do estresse crônico (DUNN, 1989). A linfopenia induzida por estresse é bloqueada pela adrenalectomia (KELLER et al., 1983), o que não observamos no presente estudo, exceto no grupo falso-operado, mas uma supressão da estimulação de linfócitos independente da adrenal também foi demonstrada (BROWN e ZWILLING, 1994). Assim, as adrenais são importantes na imunossupressão, mas outros fatores também são importantes. A adrenalectomia *per se*, na verdade, não permite uma distinção entre os efeitos dos esteróides, catecolaminas, ou mesmo de neuropeptídeos secretados pela glândula adrenal (DUNN, 1995). O fato da adrenalectomia não ter sido efetiva em bloquear os efeitos comportamentais e sangüíneos do estresse de natação, levou-nos a não utilizá-la no estudo com a SP, e outra abordagem experimental para verificar o envolvimento do eixo HPA, nas duas condições experimentais aqui estudadas, foi escolhida.

Os eventos ambientais, físicos e emocionais, podem produzir reações de estresse que variam enormemente em número e grau. O estresse pode afetar muitos aspectos da fisiologia e os diferentes níveis de estresse (estado emocional) podem influenciar o estado de saúde (ou doenças) dos indivíduos, na dependência de como se lida com ele. Os sistemas moduladores do estresse consistem de elementos cerebrais, do qual o principal componente é o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a noradrenalina (*locus coeruleus*), assim como elementos efetores periféricos, como o eixo pituitária-adrenal e o sistema nervoso autônomo, que coordenam as respostas ao estresse. A ativação dos sistemas

moduladores do estresse resulta em alterações comportamentais e físicas que permitem ao organismo se adaptar à situação enfrentada. Estes sistemas estão intimamente relacionados com outros elementos do SNC envolvidos na regulação do comportamento e das emoções, em adição ao eixo responsável pela reprodução, crescimento e imunidade.

A exposição a condições estressantes promove a secreção de várias substâncias (hormônios do estresse), como corticosterona/cortisol, catecolaminas, prolactina, ocitocina e renina (Holsboer, 2001). Além disso, várias estruturas do sistema límbico cerebral, principalmente o hipocampo, modulam o eixo HPA, promovendo um controle por retroalimentação negativa da corticosterona liberada durante a resposta do estresse fisiológico (BAUER et al., 2003). Assim, a participação e a importância de uma determinada substância pode ser testada pela inibição da ligação com seu receptor usando-se antagonistas específicos (SCHEDLOWSKI e BENSCHOP, 1999). Essa abordagem foi usada, na segunda parte de nossos estudos, para verificar a participação de hormônios do eixo HPA (glicocorticóides, β -adrenoceptores e sistema opióide), receptores taquicinérgicos do tipo NK₁, além da interleucina IL-1 α , nos efeitos do estresse agudo de natação e da SP na função imune e no comportamento de camundongos.

A resposta clássica de estresse consiste na liberação de CRH do hipotálamo, ACTH da hipófise anterior e glicocorticóide do córtex adrenal. O papel do hipotálamo na função imune foi anteriormente investigado e uma série de experimentos mostrou que o CRH reduz a proliferação de linfócitos, a atividade

citotóxica de células NK e a produção de anticorpos (para revisão ver IRWIN, 1993). Como os linfócitos expressam receptores para a maioria desses fatores é bastante provável que uma ou mais substâncias responsáveis pelas alterações no sistema imune o façam por ligação a seus respectivos receptores nos linfócitos.

Em nossos experimentos usando a aminoglutetimida, inibidor do citocromo P-450 dependente das reações de hidroxilações, inibidor da síntese dos glicocorticóides, bem como o propranolol, antagonista de receptores β -adrenérgicos, verificamos a reversão do efeito ansiogênico do estresse de natação por 6 min e da SP. O pré-tratamento com naloxona, antagonista opióide, no entanto, não interfere com o efeito ansiogênico do estresse de natação ou da SP, mas promove *per se* um perfil de ação do tipo ansiogênico nos animais controle. Por outro lado, todos os pré-tratamentos revertem a leucopenia decorrente do estresse de natação, sem, entretanto, alterar significativamente o efeito da SP sobre a série branca sangüínea.

Os glicocorticóides são hormônios esteróides que estão associados com as respostas físicas do estresse. Sob condições estressantes, o hipotálamo produz e libera corticotrofina no sistema sangüíneo. Quando este alcança o lobo anterior da glândula pituitária, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é produzido e liberado na corrente sangüínea e quando este alcança as glândulas adrenais, desencadeia a liberação de glicocorticóides. Os glicocorticóides são mediadores químicos que modulam ou regulam a resposta imune, pois os linfócitos têm receptores para os glicocorticóides. Os efeitos dos glicocorticóides nas células-alvo são mediados via moléculas receptoras específicas (SCHEDLOWSKI e BENSCHOP, 1999). Os

receptores de glicocorticóides são fatores de transcrição nuclear e estão presentes em todas as células do corpo (BERCZI, 2001). Na verdade, todos os tipos de células imunológicas expressam receptores para os glicocorticóides. Em animais e humanos, um tratamento contínuo com glicocorticóides, altera a distribuição dos linfócitos no organismo (BERCZI, 2001) e induz imunossupressão, inibindo as funções imunes celular e humoral. As funções fagocíticas dos polimorfonucleares e mononucleares e a produção de citocinas são reprimidas por níveis elevados dos glicocorticóides (BERCZI, 2001). As ações dos glicocorticóides parecem principalmente refletir uma inibição da produção e liberação de citocinas, as quais levam à supressão da resposta imune (SCHEDLOWSKI e BENSCHOP, 1999). Além disso, estes hormônios esteróides estão também associados com a resposta comportamental ao estresse. Assim, o cérebro e o sistema imune são suficientemente conectados por um e influenciado pelo outro, via glicocorticóides (COHEN e HERBERT, 1996). A este respeito, alguns fatores estressantes tais como choque elétrico, separação maternal, imobilização, imersão em água fria, manuseio, e outros, têm sido associados com a diminuição da resposta imune em estudos animais. No entanto, efeitos agudos do estresse ou administração de glicocorticóides são evidentes dentro de uma amplitude que vai de poucas horas a dias e são geralmente reversíveis ou seletivos para uma tarefa ou situação particular (McEWEN, 2000).

No presente trabalho, o tratamento com aminoglutetimida, que elimina a resposta da corticosterona a situações de estresse, impede as alterações comportamentais e imunológicas produzidas pelo estresse de natação e pela SP, embora a reversão da linfopenia produzida pela SP tenha sido mais atenuada,

pois o perfil foi semelhante ao visto no grupo estressado pelo nado forçado de 6 min, mas não alcançou significância estatística. Estas observações experimentais fortalecem nossa hipótese de que a SP parece estar envolvida na modulação de situações de estresse. Como os hormônios das adrenais agem em dois tipos de receptores do tipo I (mineralocorticóides) e do tipo II (glicocorticóides, de KLOET et al, 1998), os achados de DHABHAR et al. (1996) mostraram que a corticosterona, agindo em receptores do tipo II, é o principal mediador da redução de linfócitos e monócitos sanguíneos induzida por estresse. Esta redução, na verdade, deve-se a uma redistribuição de leucócitos do sangue para outros órgãos (pele, nódulos linfáticos, por exemplo), o que pode aumentar a função imune naqueles compartimentos para os quais os leucócitos migram após o estresse. Vários estudos têm mostrado que estressores agudos podem influenciar a circulação de linfócitos no organismo, revelando, por exemplo, a participação de catecolaminas nesse processo (SCHEDLOWSKI e BENSCHOP, 1999). Assim, algumas ações agudas do estresse e, provavelmente, da SP poderiam envolver outros mecanismos que não os glicocorticóides, incluindo neuropeptídeos, como os opióides endógenos no caso de estressor doloroso do tipo choque nas patas (MCEWEN, 2000), o que poderia explicar nossos achados. A circulação de linfócitos, por exemplo, é também aumentada por serotonina, SP, bombesina, Met-enkefalina, além das catecolaminas isoprenalina e fenilefrina, e reduzida por VIP, neurotensina e carbacol (DHABHAR, 2002). Além disso, substâncias cujas ações são moduladas por prostaglandinas e aumentadas pelo uso de inibidores de prostaglandinas, tendem a aumentar a circulação de linfócitos a partir de nódulos linfáticos enquanto o efeito oposto é produzido por substâncias cujas ações

requerem ou estão associadas com prostaglandinas ou histamina (MOORE et al., 1988). O comportamento de animais submetidos a situações de estresse pode, portanto, ser influenciado pela manipulação dos sistemas opióide, catecolaminas e outros sistemas moduladores, como neuropeptídeos e citocinas.

O sistema imune se comunica com o sistema nervoso por meio da divisão simpática do sistema nervoso periférico e com o sistema endócrino. A complexidade das influências simpáticas na modulação da imunidade foi revista por vários autores (ADER et al., 2001). A inervação dos órgãos linfóides pelo sistema nervoso simpático provê um importante mecanismo mediador entre o SNC e o sistema imune. O sistema autônomo além de controlar a atividade de órgãos como o coração e o estômago, também ativa os órgãos envolvidos na resposta imune, tais como baço, timo, medula óssea e linfonodos. Os órgãos e células imunes têm receptores para catecolaminas, e catecolaminas são liberadas pelos terminais dos nervos no sistema nervoso simpático (COHEN e HERBERT, 1996). Por outro lado, o sistema nervoso pode regular processos imunológicos através das fibras nervosas autonômicas, as quais estão localizadas em órgãos linfóides primários bem como em órgãos linfóides secundários (SCHEDLOWSKI e BENSCHOP, 1999). A medula adrenal é innervada por fibras do sistema nervoso simpático, e libera as catecolaminas adrenalina e noradrenalina durante situações de estresse físico ou fisiológico. Ambas as catecolaminas são fatores regulatórios importantes nas situações de estresse (SCHEDLOWSKI e BENSCHOP, 1999). A produção de adrenalina e sua viabilidade comercial levaram a inúmeras investigações por pesquisadores, os quais testaram os efeitos da adrenalina nas células brancas sangüíneas

(SCHEDLOWSKI e BENSCHOP, 1999). Em 1904, LOEPER e CROUZON foram os primeiros a descrever a pronunciada leucocitose (um aumento de duas ou três vezes) depois da injeção subcutânea de adrenalina (1 mg) em humanos. FREY, em 1914, relatou que a resposta às injeções de adrenalina eram bifásicas em animais e humanos. A primeira fase de leucocitose levava cerca de 30 min e era caracterizada predominantemente por um aumento do número de linfócitos; durante a segunda fase, eram os granulócitos que aumentavam. Estas e outras observações levaram a uma concordância geral de que a resposta à adrenalina compreendia uma linfocitose inicial (resposta máxima após 30 min), seguida por uma leucocitose com relativa linfopenia (com uma resposta máxima depois de 2-4 h; SAMUELS, 1951). *In vivo*, a adrenalina evoca leucocitose e eosinofilia, a qual é seguida por eosinopenia (BERCZI, 2001), sendo estes efeitos das catecolaminas mediados via adrenoceptores, os quais estão presentes em diferentes tipos celulares do organismo. Em particular, os receptores β -adrenérgicos têm sido identificados em várias subpopulações de linfócitos (MILLS e DIMSDALE, 1993). Em geral, a estimulação de adrenoceptores β leva a uma inibição da função imunológica, enquanto a estimulação de receptores α leva a potenciação da função imune. Antagonistas β -adrenérgicos bloqueiam a supressão imunológica induzida por morfina no baço, mas não no sangue (FECHO et al., 1993), enquanto a adrenalectomia bloqueia a imunossupressão induzida por estresse no sangue, mas não no baço (CUNNICK et al., 1990). Em nosso estudo, o pré-tratamento com propranolol, um antagonista de receptores β -adrenérgicos, reverteu as

mudanças na distribuição de leucócitos e as alterações comportamentais promovidas pelo estresse de natação e pela SP, embora, neste caso, a reversão da linfopenia produzida pela SP não tenha sido completa, provavelmente pelos mesmos motivos já citados, isto é, a participação de outros sistemas em sua modulação.

Na verdade, as substâncias produzidas pelo sistema neuroendócrino servem como transmissores e podem ser agrupadas em hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos. Além disso, substâncias transmissoras circulantes do sistema neuroendócrino são capazes de influenciar as células imunocompetentes, via receptores de membranas específicos (SCHEDLOWSKI e BENSCHOP, 1999). Hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos podem afetar diversos processos no sistema imune, tais como diferenciação e desenvolvimento celular, ativação e proliferação de linfócitos, migração celular, produção e liberação de citocinas, e a expressão dos receptores de citocinas (SCHEDLOWSKI e BENSCHOP, 1999).

O pré-tratamento com a naloxona, um antagonista opióide que bloqueia preferencialmente receptores do tipo μ , não alterou os efeitos comportamentais do estresse de natação ou da SP, apesar de *per se* promove mudanças comportamentais no grupo controle condizentes com uma atividade do tipo ansiogênica, como as produzidas pelo estresse de natação e a SP, o que poderia indicar uma modulação tônica do comportamento pelos opióides. Talvez, por isso, não tenhamos observado quaisquer alterações nos efeitos das duas condições experimentais estudadas. A naloxona, que *per se* não produziu qualquer

modificação na série branca sangüínea em nosso estudo, foi, entretanto, capaz de reverter os efeitos imunológicos de ambas as condições experimentais aqui estudadas, o estresse de natação e a administração central de SP. Sabe-se que os peptídeos opióides promovem imunorregulação por ação no sistema nervoso central. A β -endorfina e os opióides são em geral imunossupressores quando interagem com receptores μ e κ (BERCZI, 2001). Os leucócitos e linfócitos expressam receptores para os opióides endógenos, mas somente poucos estudos investigaram os efeitos da β -endorfina nas funções imune humoral e celular *in vivo*. Experimentos *in vitro* relataram efeitos estimulatórios, bem como inibitórios, das β -endorfinas na proliferação de linfócitos (SCHEDLOWSKI e BENSCHOP, 1999). Em ratos, a infusão de β -endorfina por 3 h induziu um aumento dependente da concentração (acima de 37%) na atividade dos linfócitos T no baço. Esta estimulação da atividade da célula T é bloqueada pela naloxona, (KUSNECOV et al. 1983). SHAVIT (1991) reviu estudos de seu grupo examinando o envolvimento do sistema opióide na modulação da função imune e mostrou que a imunossupressão induzida por opióide é centralmente mediada. Na verdade, o papel dos opióides na imunossupressão é complexo. A este respeito, PAGE et al., (1993) e MARTIN et al., (1987) mostraram que os opióides podem envolver diferentes mecanismos na modulação do estresse, da dor e nos seus efeitos farmacológicos. Uma hipótese a ser melhor explorada em nosso caso diz respeito às alterações sangüíneas produzidas pela SP e pelo estresse de natação que parecem ser mediadas, em parte, pelos opióides endógenos. Portanto, corroborando a nossa hipótese dos mecanismos comuns à SP e ao estresse,

observamos o papel dos glicocorticóides, opióides e receptores β -adrenérgicos na modulação dos efeitos comportamentais e imunológicos promovidos pelo estresse de natação e pela SP, pois, situações de estresse ativando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), resultam em alterações comportamentais e imunológicas (YANG e GLASER, 2002), o que ambas as condições experimentais aqui estudadas parecem fazer. No entanto, além dos mediadores clássicos, descritos anteriormente, uma variedade de outros mecanismos neuroquímicos pode estar envolvida nas alterações comportamentais e imunológicas induzidas por situações de estresse, como o sistema serotoninérgico (ADER et al., 2001) e dopaminérgico (NISTICO et al., 1994), e outros neurotransmissores, especialmente neuropeptídeos (DHABHAR, 2002), pois o eixo HPA é, na verdade, regulado por diferentes neurotransmissores, entre os quais as taquicininas (NUSSDORFER e MALENDOWICZ, 1998), que produzem efeitos semelhantes aos da ativação do HPA (TEIXEIRA e De LIMA, 2001).

Existem algumas evidências do envolvimento da substância P (SP) na resposta ao estresse e os receptores NK_1 parecem mediar os efeitos terapêuticos nos distúrbios relacionados ao estresse (PAPP et al., 2000). Assim, foi nosso interesse investigar o papel das taquicininas, em especial dos receptores NK_1 , onde a SP é o agonista endógeno preferencial, nessa modulação, devido à similaridade entre os efeitos comportamentais produzidos pelo estresse de natação e pela substância P. Desta maneira, verificamos o envolvimento do receptor taquicinérgico NK_1 na resposta comportamental e na distribuição de leucócitos produzida pelo estresse de natação, comparando-a com os efeitos da

SP. O uso de um antagonista específico, o FK888, mostrou que os receptores NK₁ estão envolvidos na modulação dos efeitos comportamentais e imunológicos produzidos pela SP, como anteriormente observado para as mudanças comportamentais (TEIXEIRA et al., 1996; GAVIOLI et al., 2002), e também para os efeitos promovidos pelo estresse de natação agudo. Esses resultados vêm ao encontro da nossa hipótese inicial de que o agonista endógeno preferencial desses receptores, a substância P, promove alterações comportamentais e perfil celular sangüíneo similares às produzidas pelo estresse de natação, confirmando ainda o perfil ansiogênico da estimulação exógena desses receptores (TEIXEIRA et al., 1996), e abrindo a possibilidade do uso de antagonistas taquicinérgicos em situações de estresse. A este respeito, a administração intraperitoneal de um antagonista do receptor NK₁ promove uma ação do tipo ansiolítica no teste claro-escuro, em camundongos (ZERNIG et al., 1992) e a administração central do antagonista NK₁ também promove efeito do tipo ansiolítico em camundongos avaliados no LCE (TEIXEIRA et al., 1996). Os antagonistas do receptor taquicinérgico NK₁ apresentam também efeito do tipo ansiolítico no teste de interação social (FILE, 1997) e no LCE em ratos (GAVIOLI et al., 2002).

No presente estudo, o pré-tratamento com o antagonista NK₁, FK888, reverteu não só os efeitos comportamentais do estresse de natação e da SP, avaliados no LCE em camundongos, mas também impediu o aparecimento da leucopenia provocada por ambas condições experimentais. A SP contém fibras nervosas que inervam vários órgãos imunes ou tecidos incluindo o timo, baço e linfonodos (WEIHE et al., 1989) e a liberação da SP dos terminais nervosos sensoriais a coloca numa posição crítica nas respostas imunes mediadas por

células e na hipersensibilidade imediata. Os receptores das taquicininas têm sido identificados nestes tecidos (WIEDERMANN et al., 1986) e caracterizados em células leucocitárias linfocitárias ou mononucleares com técnicas de radioligantes ou imunohistoquímicas (McGILLS et al., 1987). Os timócitos, linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos e astrócitos possuem receptores para a SP (BERCZI, 2001) e a SP tem um efeito direto nos linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, promovendo proliferação de linfócitos, produção de citocinas, e influenciando de modo variável a secreção de imunoglobulinas (BERCZI, 2001). A SP se liga a receptores de superfície de células específicas em linfócitos humanos circulantes (PAYAN et al., 1984), em células T e B no baço de camundongos e placas de Peyers (STANISZ et al., 1987), leucócitos polimorfonucleares de coelho (MARASCO et al., 1981), monócitos humanos (RUFF et al., 1985) e macrófagos de cobaia (HARTUNG et al., 1986). Pelos estudos *in vitro* e *in vivo* de EGLEZOS et al. (1991) e de BERSTEIN (1991), um papel funcional desses receptores ficou evidenciado: as taquicininas estimulam a proliferação de células T, humanas ou de camundongos, aumentando a indução de mitógenos liberando citocinas (incluindo interferon gama, fator de necrose tumoral e interleucinas) de células mononucleares e macrófagos, aumentando a produção e secreção de IgA e IgM e afetando a quimiotaxia e fagocitose celular. A SP é um potente estimulador da proliferação celular e da produção de citocinas (IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral-TNF; DUNN, 1995). Foi também demonstrado *in vivo* que as taquicininas têm um efeito na recirculação de linfócitos em linfonodos de carneiro, na reversão da involução do timo induzido pelo estresse e na produção de imunoglobulinas, em ratos e camundongos (RAFFA, 1998). Esta demonstração da atividade das

neurocininas em células linfóides sugere que a estimulação neurogênica do mecanismo imunológico poderia também desempenhar um papel significativo nas neuropatias autoimunes tais como na esclerose múltipla (RAFFA, 1998). KIMBALL et al. (1988) sugeriram que a SP ou outras neurocininas poderia desempenhar um papel na geração ou manutenção das condições inflamatórias promovendo a produção de IL-1 β .

Para verificarmos esta possibilidade, tentamos, inicialmente, correlacionar os efeitos comportamentais e na distribuição da série branca sangüínea produzida pela SP com uma situação de ativação imune específica. O desafio por antígeno é comumente usado para acessar a função imune *in vivo*. Os estudos *in vivo* trazem muitas vantagens, mas também muitos desafios. A interpretação dos dados é dificultada por vários fatores como o tempo após o estresse, o tempo de exposição ao antígeno e o parâmetro imunológico escolhido. Assim, há um período crítico após o desafio imune quando o estresse afeta os parâmetros imunológicos (KELLER et al., 1991). Após infecções ou danos teciduais, o sistema imune é ativado e muitos fatores imunes são liberados, com intuito de remover o patógeno, levando a um “comportamento doentio” (*sickness behavior*) com características comuns (febre, aumento das ondas lentas do sono, aumento do número de leucócitos circulantes, perda de peso, anorexia, depressão comportamental; PARNET et al., 2002), dependendo de qual patógeno o induziu (ESPINOSA e BERMÚDEZ-RATTONI, 2001). Os mecanismos que estão envolvidos na modulação do *sickness behavior* podem ser estudados por vários modelos, como

por exemplo, a administração de LPS (complexo glicolipídico da membrana externa de todas as bactérias Gram negativas).

Em nossos estudos, fomos verificar se as alterações comportamentais e imunológicas observadas após uma situação de desafio imune, ou seja, injeções de LPS i.p., eram semelhantes àquelas induzidas pela SP e pelo estresse de natação. Não observamos diferenças significativas em relação ao comportamento avaliado no LCE em camundongos, quando injetamos LPS 10, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p., nos diferentes tempos (1 a 6 h, dados não apresentados nesta tese). Optamos por trabalhar com as doses menores de LPS (10 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por ativarem somente o eixo HPA sem atravessar a barreira hemato-encefálica ou causar choque tóxico (ROMEIO et al., 2001). Estas doses, assim como as outras não apresentadas promoveram alterações não significativas no comportamento dos animais, mudanças estas contrárias àquelas vistas nas duas condições experimentais aqui estudadas. Com a dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ estudamos os efeitos do LPS 1, 2, 4 e 6 h após o desafio e com a dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aos 1, 2, 3 e 5 h tentando verificar se não havíamos perdido algum efeito fugaz desta endotoxina.

Quando analisamos a temperatura corporal dos animais tratados com ambas as doses de LPS, verificamos que na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ houve uma tendência à hipertermia apenas 6 h após sua administração, e, na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5 h após o LPS, ocorreu hipotermia, o que estaria de acordo com o descrito por GOUJON et al., (1995) explicando que camundongos, devido a sua alta taxa metabólica, tendem a desenvolver uma resposta hipotérmica a pirógenos, ao invés de febre. Uma explicação para estas diferenças em relação à temperatura é dada

por ELMQUIST et al. (1996) e SCAMMELL et al. (1996) que observaram que baixas doses de LPS i.v. (5 ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) levam ao aumento da temperatura entre 2 h e 6 h depois da injeção e que altas doses de LPS i.v. (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) produzem um ligeiro aumento aos 90 min, seguido pelo retorno aos níveis basais no tempo de 2 a 3 h e, novamente, à uma hipertermia 5 ou 6 h depois da injeção. Além disso, a via de administração do LPS também parece afetar a resposta da temperatura corporal, pois a injeção de LPS 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. levou a um aumento da temperatura corporal, com seu pico ocorrendo 5 h após o tratamento (MATSUMURA et al., 1998).

Nos parâmetros sangüíneos, analisados 5 e 6 h após a administração de LPS (10 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.), observamos uma leucopenia, similar ao estresse de natação e à administração central de SP, que poderia ser explicada pela liberação de IL-1 β , pois, um desafio imune leva o corpo a liberar citocinas, dentre estas a interleucina-1 β (IL-1 β), pelo sistema imune e estas moléculas, por sua vez, iniciam uma série de processos os quais ajudam o corpo a livrar-se do patógeno ou antígeno (MATSUMURA et al., 1998). Ao lado desses efeitos na periferia, a IL-1 β também medeia várias respostas no sistema nervoso central incluindo a indução de febre e sono, supressão do apetite, aumento na produção de neuropeptídeos e alteração da liberação de neurotransmissores (YANG e KRUKOFF, 2000).

Conquanto a produção de IL-1 β ocorra fora do sistema nervoso central, esta citocina se comunica com sítios centrais via órgãos circunventriculares por falhas na barreira hemato-encefálica ou estimulando o nervo vago

subdiafragmático a produzir IL-1 β em resposta ao estresse (HADDAD et al., 2002). A maior parte dos estudos indicam uma mudança na síntese e resposta as citocinas durante o estresse, geralmente uma redução, embora algumas citocinas pró-inflamatórias possam estar aumentadas durante situações estressantes (GLASER et al., 1990). Como parte da resposta ao estresse, a produção central de IL-1 β ativa o eixo HPA estimulando os neurônios no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) a liberarem o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o qual então agirá na glândula pituitária anterior a estimular o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH; YANG e KRUKOFF, 2000). Os neurônios contendo CRH no PVN também se projetam para o tronco cerebral e a coluna espinhal para controlar as funções autônomas (SAWCHENKO e SWANSON, 1982), provendo uma via pela qual a IL-1 β pode afetar as funções autônomas de maneira geral.

Como exposto acima a IL-1 β é um potente estimulador da liberação do hormônio liberador da corticotrofina (CRH). Quando o CRH é administrado centralmente ele induz efeitos do tipo ansiogênico, portanto, é razoável esperar que a IL-1 β possa também produzir ações do tipo ansiogênicas (CONNOR et al., 1998). Portanto as citocinas podem evocar efeitos do tipo estresse, e quando injetamos a IL-1 β centralmente esta provocou uma redução da exploração dos braços abertos do LCE, como descrito por LACOSTA et al. (1996) e CONNOR et al., (1998). MONTKOWSKI et al., (1997), porém, mostraram que a administração de IL-1 β dentro do ventrículo lateral de ratos tem efeitos diferentes na performance comportamental avaliada no LCE e que

esta era dependente da dose e do modelo experimental utilizado. Mas se este efeito reflete uma ação ansiogênica genuína ou um efeito secundário do estado doentio induzido pela citocina, não é possível ser determinado no presente estudo. Além disso, a IL-1 β levou a leucopenia ($P < 0,05$) e a linfopenia ($P < 0,05$) de forma similar ao nado forçado 6 min e a SP.

Com base nos experimentos com o antagonista de IL-1 β , o IL-1ra, KENT et al. (1996) propuseram que mesmo a IL-1 β periférica pode entrar no cérebro, ou que a IL-1 β endógena é produzida e liberada dentro do cérebro em resposta da IL-1 β periférica. Isto nos leva a questão de como a liberação endógena ou a administração exógena de citocinas conseguem acessar o cérebro via circulação. Embora existam evidências de que a IL-1 β circulante seja capaz de atravessar a barreira hematoencefálica via um mecanismo de transporte ativo (BANKS et al., 1989), é geralmente aceito que a IL-1 β também age ao nível dos órgãos circunventriculares (OVLT) induzindo componentes centrais para as reações de fase aguda (KATSURA et al., 1990). A injeção central do antagonista de receptor da IL-1 β , o IL-1ra, inibe a ativação do eixo HPA, as mudanças comportamentais e o sono evocado pela administração sistêmica de endotoxina ou do dipeptídeo muramil, substâncias que liberam citocinas em roedores (ROTHWELL e HOPKINS, 1995). KENT et al., (1996) demonstraram que a administração central do antagonista da IL-1 β , o IL-1ra, bloqueia completamente alguns dos efeitos comportamentais da administração periférica da IL-1 β , o que não ocorreu em nossos estudos em que apenas a frequência de entradas nos braços abertos do LCE e a linfopenia foram, parcial e totalmente,

respectivamente, revertidas pelo antagonista em questão. O IL-1ra compete com a IL-1 β ocupando seus receptores de superfície celular e teoricamente, não possui atividade agonista (BLUTHÉ et al., 1997); além de raramente produzir um bloqueio completo dos efeitos da IL-1 β (ADER et al., 2001). Assim o fato do IL-1 ra produzir efeitos similares a citocina pode estar relacionado com a dose da IL-1 β , pois MONTKOWSKI et al., (1997) mostraram que efeito da IL-1 β na performance comportamental era dependente da dose e do modelo utilizado.

Desta maneira, em função da IL-1 β promover efeito do tipo ansiogênico e linfopenia similar às condições experimentais aqui estudadas e pelo fato do estresse, assim como a SP, promoverem liberação de citocinas, estudamos o efeito do antagonista de receptor da IL-1, o IL-1ra, nos efeitos comportamentais e imunológicos produzidos pelo estresse de natação por 6 min e pela substância P. O pré-tratamento com o IL-1ra reverteu o efeito do tipo ansiogênico do estresse de natação por 6 min e da substância P e impediu parte dos efeitos sangüíneos promovidos por estas condições experimentais, mostrando que as citocinas, em particular a IL-1 β , parecem mediar os efeitos comportamentais e imunológicos do estresse de natação e da SP. Assim, a dosagem desta citocina no soro de animais tratados com SP ou submetidos ao estresse de natação foi o passo subsequente em nossos estudos e observamos, que ambas as condições produziram efeitos opostos nos níveis de IL-1 β *ex-vivo*, isto é, uma redução e um aumento, respectivamente, detectados pelas técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA). A cinética de ação da SP no

que diz respeito a ativação de macrófagos e liberação de IL-1 β pode ser totalmente distinta da cinética de liberação de IL-1 β induzida pelo estresse do nado forçado (NGUYEN et al., 1998, 2000). No entanto, o aumento de IL-1 β promovido pelo estresse de natação e a redução produzida pela administração central de SP, parecem levar a alterações comportamentais e no perfil celular sangüíneo similares e revertidas parcialmente pelo pré-tratamento com seu antagonista, IL-1ra. A explicação para tal fato é complexa e outros experimentos serão necessários para se chegar a uma conclusão plausível para este achado, mas talvez as alterações nos níveis de citocinas aqui observadas sejam independentes das mudanças comportamentais e sangüíneas promovidas pelo nado forçado ou pela SP.

Por outro lado, a liberação de citocinas como a IL-1 β pode levar, por interação com seus receptores, à produção de óxido nítrico (NO) pelas células estimuladas (NELSON et al., 1997). E, em vários sistemas periféricos e centrais, o NO parece mediar alguns efeitos da SP (PALMA et al., 1999), além de regular a liberação de SP em algumas preparações (INOUE et al., 1997). O NO é um radical livre reativo sintetizado sob demanda pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), sendo permeável para a membrana plasmática, não requerendo um receptor biológico para a comunicação intracelular ou a influência de mecanismos de transdução de sinal (CALABRESE et al., 2000), além de ser detectável por diferentes métodos. Assim, buscamos usar modelos *ex vivo* e *in vitro* para verificar esta possibilidade e tentar correlacionar seus resultados com aqueles já descritos nos experimentos *in vivo*. Inicialmente, usamos a ativação

de macrófagos obtidos de animais administrados centralmente com SP e verificamos que, em machos, a SP promoveu um aumento significativo da produção de NO, medida pelos nitritos formados. A partir destes dados mostrando que a SP levava a um aumento de NO *ex-vivo*, usamos *in vitro* a cultura de células C6 de glioma de ratos e, após diferentes tratamentos, dosamos os níveis de NO de seu sobrenadante.

As células gliais são compostas de seis tipos de células incluindo astrócitos, oligodentrócitos, microglia, células de Schwann, células endimais e satélites (GARBER e HEIMAN, 2002). As células gliais, que são 10 vezes mais abundantes que os neurônios no SNC, controlam a liberação de fatores neurotróficos (MONARD et al., 1973) ou sustentam o meio interno em equilíbrio, mantendo, assim, a função neuronal (KIMELBERG, 1981). Uma das principais funções da célula glial é a manutenção do meio ambiente ao redor dos neurônios, portanto, a interação neuronal – glial pode ser considerada a unidade básica para o sistema nervoso (BOHN et al., 2000). Os astrócitos estão entre o grupo de células funcionalmente mais ativas do cérebro: 1) produzem uma variedade de moléculas biologicamente ativas (fatores de crescimento, proteases e antiproteases, neuroesteróides, NO, eicosanóides e componentes da matriz extracelular) que podem afetar as funções dos neurônios vizinhos; 2) promovem a diferenciação e sobrevivência dos neurônios; 3) armazenam glicogênio como reserva de energia no cérebro e fornecem substratos metabólicos aos neurônios; 4) tamponam os níveis iônicos extracelulares, especialmente de K⁺, permitindo aos neurônios manter sua excitabilidade; 5)

desempenham importante papel na recaptação e, possivelmente, na liberação de aminoácidos e catecolaminas; 6) participam da resposta imune no cérebro, pois atuam como uma célula apresentadora de antígeno, produzem citocinas ou expressam o gene da citocina, e 7) regulam a sinaptogênese e a regulação sináptica, assim como a eficácia da transmissão sináptica (PALMA et al., 1995). Várias destas funções são reguladas por neuropeptídeos, incluindo as taquicininas que ativam os astrócitos por estimularem várias vias de transdução de sinal distintas: *turnover* de fosfatidil inositol, aumento nos níveis citoplasmáticos de Ca⁺⁺, translocação da proteína quinase C (PKC), estimulação do metabolismo de ácido aracdônico. Em resposta à SP, os astrócitos se tornam reativos e é induzida a mitogênese e a produção de vários mediadores solúveis como citocinas, prostaglandinas e derivados da tromboxana (PALMA e MAGGI, 2000).

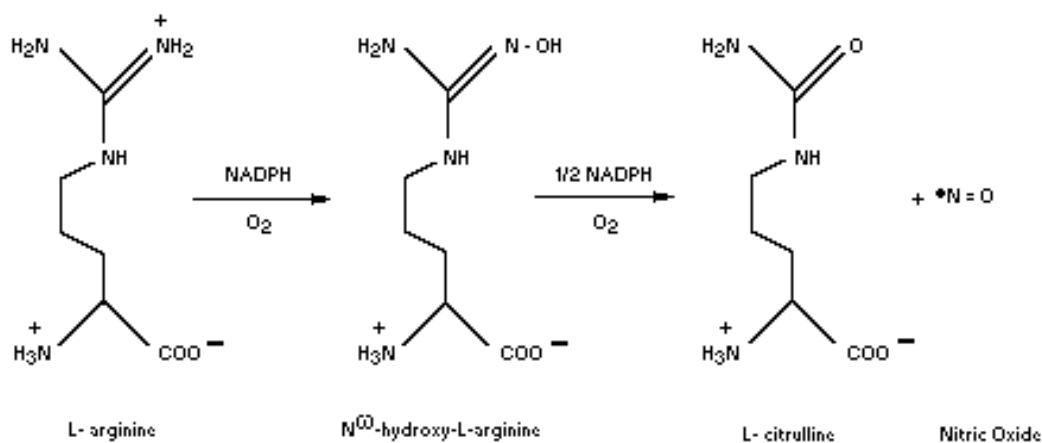
A linhagem celular de glioma C6 tem sido amplamente usada como um modelo *in vitro* para o estudo das propriedades celulares gliais, incluindo a produção de fatores neurotróficos e a liberação de proteínas extracelulares pela astroglia (YU et al., 1999). O animal do qual se retira a C6 é o rato *Rattus norvegicus* e a linhagem C6 foi clonada de um tumor glial de rato induzido pela N-nitrosometiluréia por BENDA et al., (1968). A C6 e outras células gliais expressam diversos receptores para neurotransmissores, tais como receptores H1 (NAKAHATA et al., 1986), colinérgicos muscarínicos (MASTERS et al., 1985) e α -adrenérgicos (AGULLO e GARCIA, 1992). Há ainda evidências que as células C6 expressam receptores funcionais NK₁ (PALMA et al., 1995).

Assim, a estimulação de receptores NK₁ por SP em cultura de células gliais C6 poderia levar à produção de citocinas, como a IL-1 β (PALMA e MAGGI, 2000), que, por sua vez, levaria ao aumento nos níveis de NO, pois é bem conhecido que o estímulo de células gliais com citocinas pró-inflamatórias pode resultar na síntese de NO, o que requer a indução de iNOS (FEINSTEIN et al., 1999).

O NO foi descoberto sendo o fator relaxante derivado do endotélio em 1980 e foi quimicamente identificado em 1987, é uma molécula sinalizadora intracelular e intercelular numa variedade de tecidos (NOMURA, 1998). Na última década ficou bem estabelecido que o NO atua como segundo mensageiro de diferentes neurotransmissores e, ele próprio, é considerado um neurotransmissor no sistema nervoso central (entre os neurônios e a glia), macrófagos, células endoteliais e outros tecidos (DAWSON e SNIDER, 1990). Têm ainda sido demonstrado que o NO desempenha vários papéis no cérebro, dentre eles a mediação da potenciação de longo prazo (ZHOU e HAWKINS, 1995), regulação de transporte de neurotransmissores, bem como neuroproteção e neurotoxicidade (MILLER et. al., 1997).

A produção de NO (esquema 6) é catalizada a partir da oxidação do grupamento guanidina do aminoácido L-arginina (PALMER et al., 1988) por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintase (NOS), que origina a N^w-hidroxi-L-arginina, como um intermediário estável, e depois gera L-citrulina e NO em quantidades equimolares. Várias formas de NOS têm sido identificadas incluindo duas isoformas constitutivas dependentes de Ca⁺⁺ / calmodulina,

NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS), bem como uma isoforma independente de Ca^{++} denominada de NOS induzível (iNOS, NOS tipo II). A enzima iNOS é ativada ao nível de transcrição por compostos imunoestimulantes, tais como lipopolisacarídeos (LPS), e citocinas, tais como IL-1 β e TNF- α (MILLER, et al., 1997). Uma vez ativada, a enzima iNOS produz NO por um período de horas onde este participa das respostas imunes e inflamatórias (MILLER et al., 1997).



Esquema. 6. Biossíntese do óxido nítrico. A produção de NO é catalizada a partir da oxidação do grupamento guanidina do aminoácido L-arginina (PALMER et. al., 1988) por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintase (NOS), que origina a N^ω-hidroxi-L-arginina, como um intermediário estável, e depois gera L-citrulina e NO em quantidades equimolares. (PALMER et al., 1988).

Após qualquer forma de dano cerebral, as citocinas pró – inflamatórias são predominantemente sintetizadas pelas células imunes periféricas, tais como macrófagos, células T e neutrófilos, mas algumas (IL-1, IL-6, e TNF- α) podem também ser produzidas diretamente pelo sistema nervoso (MUNHOZ – FERNANDEZ e FRESNO, 1998). A este respeito, depois de situações de

trauma, isquemia, infecção viral ou desafio imune, os astrócitos e a microglia têm sido identificados como a principal fonte de células que expressam a iNOS (MILITANTE et al., 1997). Os astrócitos expressam ambas as enzimas iNOS e cNOS, enquanto na microglia só a iNOS tem sido encontrada (MURPHY et al., 1993), sendo que alguns estudos têm demonstrado que as culturas de células de glioma de ratos expressam a iNOS (RASO et. al., 1999).

Diversos neuropeptídeos ou neurotransmissores podem regular as funções de astrócitos (MITROVIC et al., 1994). A SP, em particular, tem uma participação importante nestas funções (OTSUKA e YOSHIOKA, 1993). Os astrócitos expressam receptor NK₁ funcional e a SP se liga a tais receptores disparando a ativação de fosfolipase C, seguida de várias respostas funcionais, entre elas, a liberação de citocinas (PALMA e MANZINI, 1998). Além disso, em gliomas humanos, tais como astrocitomas e glioblastomas, há grande expressão de receptores para a SP, bem como a presença da própria SP (PALMA e MANZINI, 1998).

Nossos estudos *in vitro*, mostraram que a SP, quando associada ao LPS, estimulou a liberação de NO em células C6 de glioma de ratos e que este efeito da SP foi bloqueado tanto pelo antagonista específico de receptor da taquicinina NK₁, FK888, quanto pelo L-NAME, inibidor reversível da enzima óxido nítrico sintase. Esses dados indicam o envolvimento dos receptores NK₁ e do NO na modulação dos efeitos da SP *ex-vivo* e *in vitro*, fato que pode ter repercussão para explicar o mecanismo de ação da SP *in vivo*.

11. Conclusões

Os estressores, por outro lado, não são eventos com efeitos idênticos na função imune ou no comportamento. Um estressor pode levar a intensa ativação autônoma, por exemplo, mas ter pouco efeito nas respostas hormonais. O estresse não é dependente somente de fatores psicológicos que podem afetar o sistema imune (esquema 7). Assim, qualquer evento psicológico ou comportamental que é capaz de afetar a atividade do sistema nervoso autônomo ou atividade hormonal poderá também ser capaz de afetar a imunidade. Alguns desses fatores incluem a depressão, a angústia e a ansiedade. O sistema imune, por sua vez, é extremamente complexo, e alguns aspectos de seu funcionamento podem ser afetados por eventos estressantes, enquanto outros não o são, ou respondem de maneira diferente. Por exemplo, um estressor pode alterar a geração de anticorpo, mas não a proliferação celular. A resposta imune envolve uma cascata de eventos químicos por vários dias. A cascata de eventos é regulada por algumas das formas do corpo responder ao estresse. Isto significa que o efeito de um estressor dependerá do tempo, duração e da particular mistura da atividade hormonal e ativação simpática produzida pelo estressor. Tem sido mostrado, por exemplo, que os estressores interferem com a produção de anticorpos somente se o estresse ocorrer dentro de um curto período de tempo relativo à exposição do antígeno. Há também condições nas quais o estressor não afeta a função imune, ou melhora, bem como suprime a imunidade.

O presente estudo teve como objetivo comparar os efeitos comportamentais e imunológicos da substância P e de condições de estresse, no labirinto em cruz elevado e na distribuição de leucócitos sanguíneos, respectivamente, na tentativa de entender o papel da SP e de seu receptor preferencial NK₁ na mediação do estresse experimental e suas conseqüências. A avaliação *in vivo* procurou verificar os principais sistemas que participam na gênese e término dos efeitos comportamentais e na distribuição dos leucócitos. A avaliação *ex-vivo* e *in vitro* buscou verificar o envolvimento do receptor NK₁ nos processos celulares básicos centrais, pela medida da produção de óxido nítrico, na tentativa de obter um modelo mais simples das ações da SP no SNC.

Assim, a respeito da participação da SP na modulação das mudanças comportamentais e no perfil celular sanguíneo produzidas por condições de estresse, nossos experimentos permitem concluir que:

- ✓ As fêmeas mostraram-se mais reativas que os machos aos efeitos comportamentais e imunológicos promovidos pela SP. Essas observações sugerem uma inter-relação entre o SNC e o sistema imune em resposta ao estresse e pode estar relacionada aos seus mediadores, como as citocinas.

- ✓ O estresse de natação promove mudanças comportamentais, avaliadas no LCE, e na distribuição dos leucócitos sanguíneos, semelhantes às produzidas pela SP, sendo estes efeitos mais

evidentes para a natação de 6 min e menos intensos nos animais submetidos ao estresse de imobilização no frio.

- ✓ A adrenalectomia não impediu as alterações no comportamento dos animais no LCE, mas na distribuição dos leucócitos houve reversão da linfopenia observada, sugerindo a participação de outros hormônios e/ou outros sistemas neurosecretórios, que não a corticosterona, na modulação das alterações comportamentais e imunes induzidas pelo estresse de natação.
- ✓ Nossos resultados mostram a influência dos sistemas adrenérgico e dos glicocorticóides na modulação da resposta comportamental à SP e ao estresse de natação, enquanto esses mesmos sistemas, e também o opióide, inibem mais efetivamente o efeito do estresse, do que aquele induzido pela SP, na distribuição de leucócitos.
- ✓ O estresse de natação, e a SP, promove alterações comportamentais e imunológicas que parecem envolver os receptores taquicinérgicos NK₁ em sua modulação, reforçando a similaridade entre estas duas condições experimentais e a participação da SP como mediadora do estresse.

- ✓ A administração sistêmica de LPS 10 e 50 µg/kg promoveu pequenas alterações nos parâmetros etológicos dos animais no LCE e diminuição dos leucócitos e linfócitos, além de produzir hipotermia com a dose de 50 µg/kg. Apenas as alterações sangüíneas foram similares às induzidas pelo estresse de natação. Assim, esta condição experimental (LPS), modelo de comportamento doentio em camundongos, parece ser comportamentalmente diferente do estresse de natação.

- ✓ A IL-1β apresentou um perfil do tipo ansiogênico nos parâmetros do LCE. Quando usamos o IL-1ra, antagonista de seus receptores, antes da IL-1β há uma reversão do efeito do tipo ansiogênico desta citocina, assim como há uma reversão da linfopenia observada.

- ✓ O estresse de natação por 6 min possui um perfil altamente ansiogênico no LCE, assim como a SP i.c.v., o qual foi revertido pelo antagonista da IL-1, o IL-1ra. Na distribuição de leucócitos a leucopenia, a neutrofilia e a linfopenia também é revertida com o uso do antagonista, IL-1ra.

- ✓ O estresse de natação aumentou, enquanto a administração central de SP reduziu, os níveis de IL-1β *ex-vivo*, nos indicando que a cinética de ação da substância P, no que diz respeito a ativação e

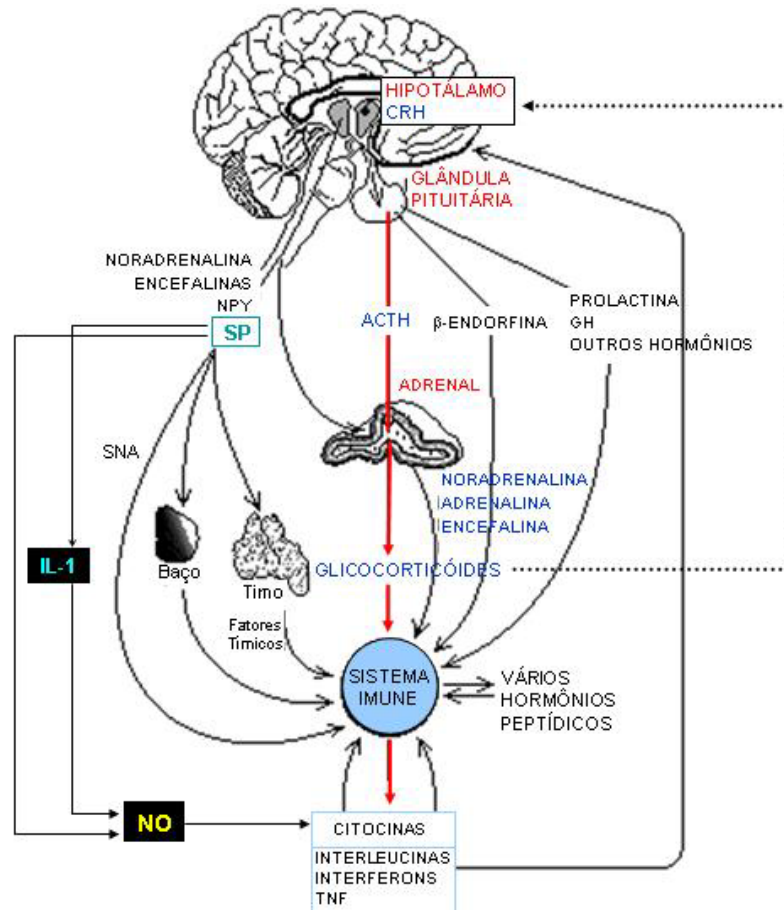
liberação de IL-1 β pode ser totalmente distinta da cinética de liberação IL-1 β induzida pelo estresse do nado forçado.

- ✓ Em vários sistemas periféricos e centrais o NO parece mediar alguns efeitos da SP (Palma *et. al.*, 1999), além de regular a liberação de SP em algumas preparações (INOUE *et. al.*, 1997). *Ex-vivo*, a SP i.c.v. levou a um aumento na produção de NO.
- ✓ Em linhagem de células C6 de glioma de rato, a SP também estimulou a liberação de NO. Este efeito foi bloqueado pelo antagonista específico de receptor da taquicinina NK₁, FK 888, e pelo inibidor da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME.

A SP, presente nas vias cerebrais envolvidas com processos de defesa, parece ser ativada em condições de estresse contribuindo para as alterações comportamentais e imunológicas produzidas. Estes efeitos parecem envolver os receptores taquicinérgicos NK₁, a produção de NO, de citocinas como a IL-1 β além de outros sistemas como o de catecolaminas, glicocorticóides e opióides, mostrando a complexidade das respostas ao estresse/ansiedade.

É importante, entretanto, ter em mente a limitação das generalizações entre as espécies, pois achados em roedores não necessariamente são aplicáveis a humanos, mas podem ser indicativos de processos básicos em algumas

psicopatologias. Uma correlação positiva pode ser indicativa de um fator causal comum responsável por ambos os efeitos, comportamental e imunológico, mas não provam uma relação causa-efeito, podendo apenas servir de base para o desenvolvimento de novas hipóteses.



Esquema 7: Interação bidirecional entre o sistema imune e o sistema nervoso central. Adaptado de DUNN, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A. K., LICHTMAN A. H., POBER J. S. *Cellular and Molecular Immunology*, 3RD Ed W.B.Saunders Company Philadelphia, USA. P: 213-230, 1997.

ADER, R., FELTEN, D., e COHEN, N. *Psychoneuroimmunology*. Third edition. San Diego. California: Academic Press. USA. 2001.

ADDISON, T. *On the Constitutional and local effects of the suprarenal, capsules*. London: Highley, 1855.

AGUIAR, M. S., BRANDÃO, M. L. Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. *Behav. Pharmacol.* 5: 369-373, 1994.

AGUIAR, M. S., BRANDÃO, M. L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. *Physiol. Behav.* 60: 1183-1186, 1996.

AGULLO, L., GARCIA, A. *Biochem. J.* 288:619-624, 1992.

ANSELONI, V. Z., MOTTA, V., LIMA, G., BRANDÃO, M. L. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28 (5): 597-601, 1995.

ASPINALL, R. The immune system. In J. C. Buckingham, Glenda E. Gillies and Anne-Marie Cowell (eds). *Stress, Stress Hormones and the Immune System*. John Wiley & Sons Ltda, pp.71-92, 1997.

AUBERT, A. Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. *Neurosci. Biobehavi Rev.* 23(7): 1029-1036, 1999.

AVITSUR, R. & YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: Gender differences in the suppression of sexual activity during illness. *Pharmacol Biochem Behav.* 64 (4): 787-796, 1999.

BANKS, W. A., KASTIN, A., DURHAM, D. A. Bidirectional transport of interleukin 1 α across the blood brain barrier. *Brain Res. Bull.* 23: 433 – 437, 1989.

BANNON, M. J., LEE, J. M., GIRAUD, P., YOUNG, A., AFFOLTER, H. U., BONNER, T. I. Dopamine antagonist haloperidol decreases substance P, substance K, and preprotachykinin mRNA. *J. Biol. Chem.* 261: 6640-6642, 1986.

BARETTA, I. P., ASSREUY, J., DE LIMA, T. C. M. Nitric oxide involvement in the anxiogenic-like effect of substance P. *Behav. Brain Res.* 121: 199-205, 2001.

BAUER, M. E., PAPADOPOULOS, A., POON, L., PERKS, P. LIGHTMAN, S. L., CHECKLEY, S., SHANKS, N. Altered glucocorticoid immunoregulation in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinol.* 28: 49 – 65, 2003.

BEATTY, W. W. Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: Organizational and activational influences. *Horm. Behav.* 12: 112-163, 1979.

BELSIVI. Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea – pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* 198-219, 1991.

BENDA, P., LIGHTBODY, J., SATO, G., LEVINE, L., e SWEET, W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161: 370, 1968.

BERCZI, I. e NAGY, E. Neurohormonal control of cytokines during injury. In: N.J. Rothwell and F.Berkenbosch (eds). *Brain control of the response to injury.* Cambridge University Press, Cambridge, pp: 96-144, 1994.

BERCZI, I. The stress concept: An Historical perspective of Hans Selye's Contributions. In: J. C. Buckingham, Glenda E. Gillies and Anne-Marie Cowell

(eds). *Stress, Stress Hormones and the Immune System*. John Wiley & Sons Ltda, pp.1-5, 1997.

BERCZI, I. Neuroimmune Biology- An Introduction. *New Foundation of Biology*. 3-45, 2001.

BERNARD, C. Lecons sur les phenomenes de la vie commune aux animaux et aux végétaux (vol.2). Paris: *Bailliere*, 1879.

BERNSTEIN, J. M. The role of the autonomic nervous system and inflammatory mediators in nasal hyperreactivity: a review. *Otolaryngol. Head Neck Surg*. 105: 596-607, 1991.

BERTACCINI, G. Active polypeptides of non-mammalian origin. *Pharmacol. Rev.*, 28: 127-177, 1976.

BESEDOVSKY, H. O. e DEL REY, A. Immuno-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr.Rev*. 64-102, 1996.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. E SORKIN, E. Antigenic competition between horse and sheep red blood cells as hormone-dependent phenomenon. *Clin. Exp. Immunol*. 37: 106-113, 1979.

BESEDOVSKY, H. O, DEL REY, A. E SORKIN, E. e DINARELLO. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*. 233: 652-654, 1986.

BESEDOVSKY, H. O. e SORKIN, E. Network of immunoneuroendocrine interactions. *Clin. Exp. Immunol*. 27:1-12, 1977.

BIJLSMA, J. W. J., CUTOLO, M., MASI, A. T., AND CHIKANZA, I. C. The neuroendocrine immune basis of rheumatic diseases. *Immunol. Today*, 1999.

BILKEI-GORZO, A., RACZ, I., MICHEL, K., ZIMMER, A. Diminished anxiety and depression related behaviors in mice with selective deletion of the *Tac1* gene. *J. Neurosci*. 22 (22): 10046-10052, 2002.

BLALOCK, J. E. Proopiomelanocortin-derived peptides in the immune system. *Clin. Endocrinol.* 22: 823-827, 1985.

BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol. Rev.* 69: 1-32, 1989.

BLALOCK, J. E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today* 15: 504-511, 1994.

BLIZARD, D A, LIPPMAN H R, CHEN, J J. Sex differences in open-field behavior in the rat: The inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiol. Behav.* 14:601-608, 1975.

BLUTHÉ, R-M., DANTZER, R., KELLY, K. W. Central mediation of the effects of interleukin-1 on social exploration and body weight in mice. *Psychoneuroendocrinol.* 22 (1): 1-11, 1997.

BOHN, L. M., BELCHEVA, M. M., COSCIA, C. J. Mitogenic signaling via endogenous κ -opioid receptors in C6 glioma cells: evidence for the involvement of protein kinase C and the mitogen – activated protein kinase signaling cascade. *J. Neuroch.* 74: 564 – 573, 2000.

BOYCE, S., SMITH, D., CARLSON, E., HEWSON, L., RIGBY, M., O'DONNELL, R., HARRISON, RUPNIAK, N.M.J. Intra-amygdala injection of the substance P (NK1 receptor) antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalizations in guinea-pigs. *NeuroPharmacol.* 41: 130-137, 2001.

BRAWMAN-MINTZER, O. E LYDIARD, R. B. Biological basis of generalized anxiety disorder. *J. Clin. Psych.* 51: 16-25, 1997.

BRENT, P. CHAHL, J. LORRIS, A. e CANTARELLA, P. A. Effect of intracerebroventricular injection of substance P on biogenic amine concentrations in guinea-pig brain. *Biogenic. Amines*, 10: 319-327, 1994.

BRODIN, E.; ROSEN, A.; SCHÖTTL, E. E BRODIN, K. Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on

substance P, cholecystokinin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. *Neuropeptides*, 26: 253-260, 1994.

BRODIN, E., OGREN, S. O., THEODORSSON-NORHEIM, E. Effects of suchronic treatment with imipramine, zimelidine and alaproclate on regional tissue levels of substance P and neurokinin A/ neurokinin B like immunoreactivity in the brain and spinal cord of the rat. *Neuropharmacol.* 26: 581-590, 1987.

BROWN, D. H., e ZWILLING, B. S. Activation of the hypothalamic – pituitary – adrenal axis differentially affects the anti – mycobacterial activity of macrophages from BCG – resistant and susceptible mice. *J. Neuroimm.* 53: 181 – 187, 1994.

BRUNELLESCHI, S. Tachykinin actions on alveolar macrophages. *Neuropeptides*, 22: 11-12, 1992.

BUCKINGHAM, J. C. Stress and the neuroendocrine immune axis: the pivotal role of glucocorticoids and lipocortin 1. *Br J. Pharmacol*, 118: 1-19, 1996.

BUCKINGHAM, J. C., SMITH, T. e LOXLEY H. D. The control of ACTH secretion. In V. H. T. James (ed.) *The Adrenal Cortex*, New York, Raven press, pp: 131-58, 1992.

BUCKINGHAM, J. C.; GILLIES. G. E. e COWELL, A. (eds). *Stress, Stress Hormones and the Immune System*. John Wiley & Sons Ltda, 1997.

BULLOCK, K. e LUCITO, R. The effects of cortisone on acetylcholinesterase (AchE) in the neonatal and aged thymus. *Ann. NY Acad. Sci.* 521: 59-71, 1988.

BULLOCK, K. Neuroanatomy of lymphoid tissue: a review, *Neural Modulation of immunity*. 111-141, 1985.

CALABRESE, V., BATES, T. E., STELLA, A. M. G. No synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/ antioxidant balance. *Neuroch. Res.* 25: 1315 – 1341, 2000.

CANNON, W. B. Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage (2nd ed.) New York: Appleton & Co, 1929.

CHANG, M.; LEEMAN, S.; NIALL, M. Amino acid sequence of substance P. *Nature*, 232: 86-87, 1971.

CHEETA, S., TUCCI, S., SANDHU, J., WILLIAMS, A. R., RUPNIAK, N. M., FILE, S. E. Anxiolytic actions of the substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 and 5-HT (1A) agonist 8-OH-DPAT in the social interaction test in gerbils. *Brain Res.* 915: 170-175, 2001.

CHROUSOS, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune mediated inflammation. *New England J. Med.* 332 (20): 1351-1362, 1995.

COHEN, S. & WILLIAMSON, G. M. Stress and infectious disease in humans. *Psychological Bulletin.* 109: 5-24, 1991.

COHEN, S. e HERBERT, T. B. Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. *Annual Review of Pshyc.* 47: 113-142, 1996.

CONNOR, T. J. SONG, C., LEONARD, B. E., MERALI, Z., ANISMAN, H. An assessment of the effects of central interleukin - 1 β , 2, 6, and tumor necrosis factor - α administration on some behavioural, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. *Neuroscience.* 84 (3): 923 – 933, 1998.

CULMAN, J. E UNGER, T. Central tachykinins: mediators of defense and stress reactions. *J. Physiol. Pharmacology*, 73: 885-891, 1995.

CROSSIN. Nitric oxide; a versatile second messenger in brain. *TBS.* 16: 81, 1991

CUNNICK, J. E.; LYSLE, D. T , KUCINSKI, B. J., RABIN, B. Evidence that shock-induced immune suppression is mediated by adrenal hormones and peripheral α -adrenergic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36: 645-651, 1990.

CUNNICK, J. E.; LYSLE, D. T. e ARMFIELD, A. Shock-induced modulation of lymphocyte responsiveness and natural killer activity: Differential mechanisms of induction. *Brain Behav. Immunol.* 2: 102-113, 1988.

CUTLER, M. Potential anxiolytic activity in gerbils from the substance P (SP) receptor antagonist CGP 49823. *J. Psychopharmacol.* A 22, 1994.

DAWSON, T. M. e SNYDER, S. H. *J. Neurosci.* 14: 5147-5159, 1990.

DE LIMA, T. C. M.; BARETTA, I. P. e ASSREUY, J. Nitric oxide involvement in the anxiogenic effect of substance P in mice in the elevated plus-maze. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23: 1859, 1997.

DE LIMA, T. C. M., RAE, G. A. Effects of cold-restraint and Swim stress on convulsions induced by pentylentetrazol and electroshock: Influence of naloxone pretreatment. *Pharmacol. Bioch. & Behav.* 40: 297-300, 1991.

DE KLOET, E. R., VREUGDENHIL, E., OITZL, M. S., JOELS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* 19: 269-301, 1998.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O. e SORKIN, E. Endogenous blood levels of corticosterone control the immunologic cell mass and B cell activity in mice. *J. Immunol.* 133: 572, 575, 1984.

DEMETRIKOPOULOS, M. K., WEISS, J. M., e GOLDFARB, R. H. Environmental factors and disease: Stress and cancer. In B. S. McEwen (Ed.), *Handbook of physiology: Coping with the environment.* Oxford: Oxford University Press, 1998.

DEROCQ, J-M., SÉGUI, M., BLAZY, C., EDMONDS-ALT, X., LE FUR, G., BRÉLIERE, J-C., e CASELLAS, P. Effect of substance P on cytokine production by human astrocytic cells and blood mononuclear cells: characterization of novel tachykinin receptor antagonists. *FEBS Lett* 399: 321-325, 1996.

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

DHABHAR, F. S., MILLER, A. H., STEIN, M., McEWEN, B. S., SPENCER, R. L. Effects of stress on immune cell distribution-dynamics and hormonal mechanisms. *J. Immunol.* 154, 5511-5527, 1995.

DHABHAR, F. S., MILLER, A. H., McEWEN, B. S., SPENCER, R. L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. *J. Immunol.* 157: 1638-1644, 1996.

DHABHAR, F. S., e McEWEN, B. S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:1059-1064, 1999.

DHABHAR, F. S. Stress induced augmentation of immune function. The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behav. Immunity.* 16: 785 – 798, 2002.

DSM-IV- Diagnostic and statistic manual of mental disorders. 4th ed. Washington, D. C.: *American Psychiatric Association*, 1994.

DINARELLO, C. A. Modalities for reducing interleukin 1 activity in disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 155-159, 1993.

DION, S.; ROUSSI, N.; NANTEL, F.; DRAPEAU, G.; REGOLI, D.; NALINE, E.; ADVENIER, C. Receptor for neurokinin in human bronchus a and urinary bladder are of the NK₂ type. *Eur. J. Pharmacol.*, 178: 215-219, 1990.

DOWDELL, K. C., GIENAPP, I. E., STUCKMAN, S., WARDROP, R. M. e WHITACRE, C. C. Neuroendocrine modulation of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis: a critical role for the hypothalamic—pituitary-adrenal-axis. *J. Neuroimmunology* 100:243-251, 1999.

DUBROVSKY, B. The specificity of stress responses to different nocuous stimuli: neurosteroids and depression. *Brain Res. Bull.* 51 (6): 443-455, 2000.

DUNN, A .J. e SWIERGIEL, A .H. Behavioral responses to stress are intact in CRF-deficient mice. *Brain Res* 845:14-20, 1999.

DUNN, A. J. Interactions between the nervous system and the immune system. Implications for psychopharmacology. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*, edited by Floyd E. Bloom and David J. Kupfer. Raven Press 63: 719-731, 1995.

DUNN, A. J. Psychoneuroimmunology for the psychoneuroendocrinologist: a review of animal studies of nervous-immune system interactions *Psychoneuroendocrinol*, 14:251-74, 1989.

EGLEZOS, A.; ANDREWS, P. V.; BOYD, R.L. e HELME, R.D. Review: Modulation of the immune response by tachykinins. *Immunol. Cell Biol.* 69: 285-294, 1991.

ELENKOV, I. J., CHROUSOS, G. P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *TEM* 10 (9):359-368, 1999.

ELLIOT, P. Place aversion induced by the substance P analogue, dimethyl-C7, is not state dependent: implication of substance P in aversion. *Exp. Brain Res.* 381: 354-356, 1988.

ELMQUIST, J. K., SCAMMELL, T. E., JACOBSON, C. D., SAPER, C. B. Distribution of fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide. *J. of Comp. Neur.* 371: 1-19, 1996.

ERSPAMER, V. The tachykinin peptide family. *TINS*, 4: 267-269, 1981.

ESPINOSA, E., BERMÚDEZ-RATTONI, F. Behavior immunity relationship; the role of cytokines. *Rev. Investigat. Clínica.* 53 (3): 240-253, 2001.

EUTAMENE, H.; THEODOROU, V.; FIORTI, J.; BUENO, L. Implication of NK₁ and NK₂ by interleukin 1 β : role of nitric oxide. *Gastroenterology*, 109: 483-489, 1995.

FARRIS, E. J. Increase in lymphocytes in healthy persons under certain emotional states. *American journal of Anatomy*, 63: 297-323, 1938.

FECHO, K., DYKSTRA, L. A. LYSLE, D. T. Evidence for β - adrenergic receptor involvement in the immunomodulatory effects of morphine. *J. Pharmacol. Experimental Therapeutics*. 265: 1079 – 1087, 1993

FEHDER, W. P.; SACHS, J.; UVAYDOVA, M. e DOUGLAS, S. D. Substance P as an immune modulator of anxiety. *Neuroimmunomodulation*, 4: 42-48, 1997.

FEINSTEIN, D. L., REIS, D. J., REGUNATHAN, S. Inhibition of astroglial nitric oxide synthase type 2 expression by idazoxan. *Mol. Pharmacol.* 55: 304 – 308, 1999.

FILE, S. E. Anxiolytic action of a neurokinin 1 receptor antagonist in the social interaction test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58:747-752, 1997.

FILE, S. E. NKP608 and NK1 receptor antagonists, has an anxiolytic action in the social interaction test in rats. *Psychopharmacol.* 152: 106-109, 2000.

FREY, W. Der Einfluß des vegetativen Nervensystems auf das blutbild. *Zeitschrift für die Gesamte Experimentelle Medizin*, 2, 38-49, 1914.

FUJI, T., MURAI, M. MORIMOTO, H., MAEDA, Y., YAMAOKA, M., HAGIWARA, D., MIYAKE, H., IKARI, N. e MATSUO, M. Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK₁ receptor antagonist, FK888. *Br.J. Pharmacol.*, 107: 785-789, 1992.

GALINOWSKI, A Stress et panique aspects immunologiques. *L'Encéphale*, XIX: 147-151, 1993.

GARBER, M. M., HEIMAN, A. S. The in vitro effects of Pb acetate on NO production by C6 glial cells. *Toxicol. In vitro.* 16: 499 – 508, 2002.

GAVIOLI, E.; CANTERAS, N. S.; DE LIMA, T. C. M. Anxiogenic-like effect induced by substance P injected to the lateral septal nucleus. *Neuroreport* 10: 3399-3403, 1999.

GAVIOLI, E.; CANTERAS, N. S.; DE LIMA, T. C. M. The role of lateral septal NK₁ receptors in mediating anxiogenic effects induced by intracerebroventricular injection of substance P. *Behav. Brain Res*, 2002.

GERARD, N. P.; EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; GERARD, C. The human neurokinin A (substance K) receptor. *J. Biol. Chem.*, 265: 20455-20462, 1990.

GERARD, N. P.; GARRAWAY, L. A.; EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; DIJIMA, M.; PAQUET, J. L.; GERARD, C. Human substance P receptor (NK₁): organization of the gene, chromosome localization and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry*, 30: 10640-10646, 1991.

GLASER, R., RABIN, B., CHESNEY, M., COHEN, S., & NATELSON, B. Stress-induced immunomodulation. *JAMA* 281, 1999.

GLASER, R., KENNEDY, S., LAFUSE, W. P., BONNEAU, R. H., SPEICHER, C., HILLHOUSE, J., KIECOLD – GLASER, J. K. Psychological stress induced modulation of interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 production in peripheral blood leukocytes. *Archives of General Psychiatry*. 47: 707 – 712, 1990.

GOUJON, E., PARNET, P., CREMONA, S., DANTZER, R. Endogenous glucocorticoids down regulate central effects of interleukin-1 β on body temperature and behaviour in mice. *Brain Res*.702: 173 – 180, 1995.

GRAHAM, A.; HOPKINS, B.; POWELL, S. J.; DANKS, P.; BRIGGS, I. Isolation and characterization of the human lung NK₂ receptor gene using rapid amplification of cDNA ends. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177: 8-16, 1991.

GRAY. The effects of inhibitors of the L – arginine nitric oxide pathway on endotoxin induced loss of vascular responsiveness in anesthetized rats. *British J. Pharmacol*. 103: 1218, 1991.

GRAY, J. A. Emotionality in male and female rodents: a reply to Archer. *Br. J. Psychol.* 70: 425-440, 1979.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, J. S., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138, 1982.

GUARD, S.; WATSON, .Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochem. Int.*, 2: 149-165, 1991.

HADDAD, J. J., SAADE, N. E., SAFIED – GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro – immune - endocrine interactions: a role for the hypothalamic – pituitary - adrenal revolving axis. *J. Neuroimmunol.* 133: 1 – 19, 2002.

HAGAN, R. M.; MCLEAN, S. Stafford Vineyard peptide Conference bears fruit. *TIPS*, v. 14: 315-318, 1993.

HALEY, T. J., MCCORMICK, W. G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mice. *Br. J. Pharmacol.*, 12:12-15, 1957.

HALL, M. E., GRANTHAM, P., LIMOLI, J., STEWART, J. M. Effects of substance P and neurokinin A (substance K) on motor behaviour: unique effects of substance P attributable to its amino-terminal sequence. *Brain Res.* 420: 82-94, 1987.

HALL, M. E.; STEWART, J. M. Prevention of stress-induced analgesia by substance P. *Behav. Brain Res.*, 10: 375-382, 1983.

HALLER, J. The link between stress and the efficacy of anxiolytics. A new avenue of research. *Psysol. Behav.* 73: 337-342, 2001.

HARBUZ, M. S., JESSOP, D. S. Stress and inflammatory disease: widening roles for serotonin and substance P. *Stress.* 4: 57-70, 2001.

HARRIS, G. W. Neural control of the pituitary gland. *Physiol Rev*, 28:139-79, 1948.

HARRIS, G. W. *Neural Control of the Pituitary*. London, Edward Arnold, 1955.

HARTUNG, H. P.; WOLTERS, K. e TOYKA, K. V. Substance P: binding properties and studies on cellular responses in guinea-pig macrophages. *J. Immunol.* 136: 3856-3863, 1986.

HARKNESS, J. E. e WAGNER, J. E. *The biology and medicine of rabbits and rodents*. Williams & Wilkins. Fourth edition, 1995.

HELKE, C. J.; KRAUSE, J. E.; MANTYH, P. W.; COUTURE, R.; BANNON, M. J. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides receptors and regulatory mechanisms. *FASEB*, 4: 1606-1615, 1990.

HENCH, P. S.; KENDALL, E. C.; SLOCUMB, C. H. e POLLEY, H. F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-corticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Mayo Clinic Proc.* 24: 181-197, 1949.

HERSHEY, A. D. e KRAUSE, J. E. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science*, 247: 958-962, 1990.

HOAGLAND, H., ELMADJIAN, F., PINCUS, G. Stressful psychomotor performance and adrenal cortical function as indicated by the lymphocyte response. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 6 : 301 – 311, 1946.

HÖKFELT, T., BROBERGER, C., XU, Z-Q. D., SERGEYEV, V., U., R., DIEZ, M. Neuropeptides- an overview. *Neuropharmacol.* 39: 1337-1356, 2000.

HOLSBOER, F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J. Affect. Dis.* 62: 77-91, 2001.

HOPKINS, B.; POWELL, S. J.; DONKS, P.; BRIGGS, I.; GRAHAM, A. Isolation and characterization of the human lung NK-1 receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180: 1110-1117, 1991.

INOUE, A., HASHIMOTO, T., HIDE, I., NISHIO, H., NAKATA, Y. 5-Hydroxytryptamine facilitated release of substance P from rat spinal cord slices is mediated by nitric oxide and cyclic GMP. *J. Neuroch.* 68 (1): 128 – 133, 1997.

IRWIN, M., HAUGER, R., e Brown, M. Central corticotrophin-releasing hormone activates the sympathetic nervous system and reduces immune function: Increased responsivity of the aged rat. *Endocrinol.* 131: 1047 – 1053, 1992.

IRWIN, M. brain corticotrophin releasing hormone and interleukin-1 β induced suppression of specific antibody production. *Endocrinol.* 133: 1352 – 1360, 1993.

IVERSEN, L. L., McNIGHT, A. T., FOSTER, A. C., YOUNG, S. C., WILLIAMS, N. J. Pharmacology of the tachykinin system. In; SCHWARTZ, T. M., HILSTED, L. M., REHFELD, J. F. (Eds.) *Neuropeptides and their receptors*. Copenhagen: Munksgaard. P: 363 – 372, 1990.

JAFFE, H. L. The influence of the suprarenal gland on the thymus. III Stimulation of the growth of the thymus gland following double suprarenalectomy in young rats. *J. Exp. Med.* 40: 753-760, 1924.

JANEWAY, C. A. TRAVERS, P., WALPORT, M., CAPRA J. D. *Imunobiologia, o sistema imunológico na saúde e na doença*; trad. Denise Cantarelli Machado et al. 4ed.- Porto Alegre: Artes médicas Sul, 2000.

JESSOP, D. S., DOUTHWAITE, J. A , CONDE, G. L., LIGHTMAN, S. L., DAYAN, C. M. & HARBUZ, M. S. Effects of acute stress or centrally injected interleukin-1 β on neuropeptide expression in the immune system. *Stress* 2: 133-144, 1997.

JEZOVA, D., OCHEDALSKKI, T., GLICKMAN, M. KISS, A e AGUILERA, G. Central corticotropin-releasing hormone receptors modulate hypothalamic-

pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity during stress. *Neuroscience* 94: 797-802, 1999.

JOHNSON, H. M.; SMITH, E. M.; TORRES, B. A. e BLALOCK, J. E. Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4171-4174, 1982.

JOHNSON, H. M.; SMITH, E. M.; TORRES, B. A.; DION, L. D. e BLALOCK, J. E. Regulation of lymphokine (gamma-interferon) production by corticotropin. *J. Immunol.* 132: 246-250, 1984.

JOHNSON, E. O., KAMILARIS, T. C., CHROUSOS, G. P., GOLD, P. W. Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16: 115-130, 1992.

KAGE, R.; MCGREGOR, G. P.; THIM, L.; CONLON, J. M. Neuropeptide γ , a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from γ preprotachykinin mRNA in the female rat brain. *J. Neurochem.*, 50: 1412-1427, 1988.

KANGAWA, K.; MINAMINO, N.; FUKUDA, A.; MATUSO, M. Neuromedin K: A novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114: 533-540, 1983.

KATSURA, G., ARIMURA, A., KOVES, K., GOTTSCHALL, P. E. Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin - 1 β induced ACTH release. *Am. J. Physiol.* 258: E163 – E171, 1990.

KELLER, S. E., WEISS, J. M., SCHLEIFER, S. J., MILLER, N. E., STEIN, M. Stress induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. *Science.* 221: 1301 – 1304, 1983.

KELLER, S. E., SCHLEIFER, S. J. LIOTTA, A. S., BOND, R. N., FARHOODY, N., e STEIN, M. Stress induced alterations of immunity in hypophysectomized rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 85: 9297 – 9301, 1988.

KELLER, S. E., SCHLEIFER, S. J., DEMETRIKOPOULOS, M. K. Stress induced changes in immune function in animals: Hypothalamo – pituitary – adrenal influences. In R. Ader, D. L. Felten, N. Cohen (Eds.), *Psychoneuroimmunology* (2nd ed.). San Diego: Academic Press. p: 771 – 784, 1991.

KELLY, G. S. Nutritional and botanical interventions to assist with the adaptation to stress. *Altern. Med. Rev.* 4 (4):249-265, 1999.

KENT, S., BRET-DIBAT, J. L., KELLY, K. W. e DANTZER, R. Mechanisms of sickness induced decreases in food motivated behavior. *Neurosci. Biobeh. Rev.* 20 (1); 171 – 175, 1996.

KENT, J. M., MATHEW, S. J., GORMAN, J. M. Molecular targets in the treatment of anxiety. *Biol. Psychiatry.* 52: 1008-1030, 2002.

KESSLER, R. C., MCGONAGLE, K. A., ZHAO, S. Lifetime and 12 month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States: reslts from the national comorbidity survey. *Arch. gen. Psychiatry.* 51: 8-9, 1994.

KIMBALL, E. S.; PERSICO, F. J. e VAUGHT, J. L. Neurokinin-induced generation of interleukin-1 in a macrophage cell line. *Advances in neuroimmunology, Annals of the New York Academy of Sciences.* 540: 688-690, 1988.

KIMELBERG, H. K. *Biochim. Biophys. Acta.* 646: 179-184, 1981.

KIMURA, S.; OKADA, M.; SUGITA, Y.; KANAZAWA, I.; MUNEKATA, E. Novel neuropeptides, neurokinin α and β , isolated from porcine spinal cord. *Proc. Jpn. Acad. Series B*, 59: 101-104, 1983.

KRAMER, M. S., CUTLER, N., FEIGNER, F., SHRIVASTAVA, R., CARMAN, J., SRAMEK, J. J., REINES, S. A., LIU, G., SNAVELY, D., WYATT-KNOWELES, E., HALE, J. J., MILLS, S. G., MACCOSS, M., SWAIN, C. J., HARRISON, T., HILL, R. G., HEFTI, F., SCONICK, E. M., CASCIERI, M. A., CHICCHI, G. G., SADOWSKI, S., WILLIAMS, A. R., HEWSON, L., SMITH, D., RUPNIAK, N. M. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science.*281: 1640-1645, 1998.

KRASE, W., KOCK, M., SCHNIZLER, H. U. Substance P is involved in the sensitization of the acoustic startle response by footshock in rats. *Behav. Brain Res.* 63: 81-88, 1994

KRIS, R. M.; SOUTH, V.; SALTZMAN, A.; FELDERS, S.; RICCA, G. A.; JOYE, M.; HUEBNER, K.; KAGAN, J.; GROCE, C. M.; SCHLESINGER, J. Cloning and expression of the human substance K receptor and analysis of its role in mitogenesis. *Cell Growth Differentiation.* 2: 15-22, 1991.

KURTZ, M. M., WANG, R., CLEMENTS, M. K., CASCIERI, M. A., AUSTIN, C. P., CUNNINGHAM, B. R., CHICCHI, G. C., LIU, Q. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P like peptides. *Gene.* 296: 205-212, 2002.

KUSNECOV, A. W., KING, M. G. e HUSBAND, A. J. immunomodulation by behavioral conditioning. *Biol. Psychol.* 28, 25-39, 1983.

KUSNECOV, A. V.; GROTA, L. J.; SCHMIDT, S. C.; BONNEAU, R. H.; SHERIDAN, J.F.; GLASER, R. e MOYNIHAN, J.A. Decreased herpes simplex viral immunity and enhanced pathogenesis following stressor administration in mice. *J. Neuroimmunol.* 38: 129-138, 1992.

KVETNANSKY, R.; FUKUHARA, K.; PACAK.; CIZZA, G.; GOLDSTEIN, D. S. e KOPIN, I. J. Endogenous glucocorticoids restrain catecholamine synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. *Endocrinol.* 133: 1411-1419, 1993.

LACOSTA, S., KULCZYCKI, J., MERALI, Z., ANISMAN, H. Behavioral, endocrine and central neurochemical alterations induced by interleukin – 1. *Soc. Neurosci.Abstr.* 22: 2058, 1996.

LAURSEN, S. E., BELKNAP, J. P. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J. Pharmacol. Met.* 16: 155-157, 1986.

LEW, R.; GURAGHTY, D. P.; DRAPEAU, G.; REGOLI, D.; BURCHER, E. Binding characteristics of [¹²⁵I] Bolton-Hunter [Sar⁹ Met (O₂)¹¹] substance P, a new selective radioligant for the NK₁ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 184: 97-108 1990.

LIPP, M. In: *Pesquisas sobre stress no Brasil. Saúde, ocupações e grupos de risco*. Marilada Lipp (org). 2ª edição. Campinas. Papyrus Editora, 2001.

LISTER, R. G. Ethological- based animal models of anxiety disorders. *Pharmac. Ther.*, 46: 321-340, 1990.

LOCKSHIN, M. D. Invited review: sex ratio and rheumatic disease. *J. Appl. Physiol.* 91 (5):2366-2373, 2001.

LOEPER, M., CROUZON, O. L'action de l'adrenaline sur le sang. *Archives de Medicine Experimentale et d'Anatomie Path*, 16, 83-108, 1904.

MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; EGLEZOS, A.; QUARTARA, L.; GUILIANI, S.; GIACHATTI, A. Tachykinin receptors in guinea pig renal pelvis: activation by exogenous and endogenous tachykinin. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 27-33, 1992.

MAGGIO, J. E.; SANDBERG, B. E. B.; BRADLEY, C. V.; IVERSEN, L. L.; SANTIKAN, S. Substance K: A novel tachykinin in mammalian spinal cord. In: SKRABANEK, P. (Ed.) *Substance P*. Dublin: Boole, p. 20-21, 1983.

MARASCO, W. A.; SHOWELL, H. J. e BECKER, E. L. Substance P binds the formyl-peptide chemotaxis receptor on the rabbit neutrophil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99: 1065-1072, 1981.

MARCHETTI, B., MORALE, M. C., TESTA, N., TIROLO, C., CANIGLIA, S., AMOR, S., DIJKSTRA, C. D., BARDEN, N. Stress, the immune system and vulnerability to degenerative disorders of the central nervous system in transgenic mice expressing glucocorticoid receptor antisense RNA. *Brain Res. Rev.* 37: 259-272, 2001.

MARTI, O.; ARMARIO, A. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int.J. of Develop. Neurosc.* 16 (3-4): 241-260, 1998.

MARTIN, J., PRYSTOWSKI, M. B., ANGELETTI, R. H. Preproenkephalin mRNA in cells, macrophages and mast cells. *J. Neurosc. Res.* 18: 82 – 86, 1987.

MASLINSKI, W. Cholinergic receptors of lymphocytes. *Brain Behav. Immun.* 3:1-14, 1989.

MASON, G. S.; ELLIOT, P. J. Behavioral consequences following infusion of selective neurokinin agonists into the median raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology*, 31: 757, 1992.

MASTERS, B. B., MARTIN, M. W., HARDEN, T. K. BROWN, J. H. *Biochem. J.* 227: 933-937, 1985.

MASU, Y.; NAKAYAMA, K.; TAMAKI, H.; HARADA, Y.; KUNO, M.; NAKANISHI, S. cDNA cloning of bovine substance K receptor through oocyte expression system. *Nature*, 329: 826-838, 1987.

MASUR, J, SCHUTZ, M T, BOERNGEN, R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. *Dev. Psychobiol.* 13(2):107-110, 1980.

MATSUMURA, K., CAO, C., OZAKI, M., MORII, H., NAKADATE, K., WATANABE, Y. Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J. of Neurosc* 18: 6279-6289, 1998.

McEWEN, B. S. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacol.* 22 (2): 108-124, 2000.

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

McGILLIS, J. P.; ORGANIST, M. L. e PAYAN, D. G. Substance P and immunoregulation. *Fed. Proc.* 46: 196-199, 1987.

MELLO FILHO, J. Psicossomática psicanalítica, 1998.

MILITANTE, J. D., FEINSTEIN, D. L., SYAPIN, P. J. Suppression by ethanol of inducible nitric oxide synthase expression in C6 glioma cells. *J. Pharmacol. Experim. Therap.* 281: 558 – 565, 1997.

MILLER, K. J., MARIANO, C. L. e CRUZ, W. R. Serotonin 5HT2A receptor activation inhibits inducible nitric oxide synthase activity in C6 glioma cells. *Life Sciences*, 61(18): 1819-1827, 1997.

MILLS, P. J., e DIMSDALE, J. E. The promise of adrenergic receptors studies in psychophysiologic research II: Applications, limitations, and progress. *Psychosomatic Medicine*, 55, 448-457, 1993.

MITROVIC, B. MARTIN, F. C., CHARLES, A. C., IGNARRO, L. J., ANTON, P. A., SHANAHAN, F., MERRIL, J. E. Neurotransmitters and cytokines in CNS pathology. *Prog. Brain Res.* 103: 319 – 330, 1994.

MONARD, D., SOLOMON, F., RENTSCH, M., GYSIN, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70: 1894-1897, 1973

MONTKOWSKI, A., LANDGRAF, R., YASSOURIDIS, A., HOLSBOER, F., SCHÖBITZ, B. Central administration of IL-1 reduces anxiety and induces sickness behaviour in rats. *Pharmacol. Bioch. Behav.* 58 (2): 329 – 336, 1997.

MOORE, T., SPRUCK, C.H., SAID, S. I. Depression of lymphocyte traffic in sheep by vasoactive intestinal peptide (VIP). *Immunol.* 64: 475 – 478, 1988.

MORA, J. M., AMTMAN, L. E., e HOFFMAN, S. J. Effect of mental and emotional states on the leukocyte count. *J. Am. Med. Ass.* 86: 945 – 946, 1926.

MUNCK A., GUYRE P. AND HOLBROOK N.J. Physiological function of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews*, 5: 25-44, 1984.

MUNHOZ-FERNANDEZ, M. A., FRESNO, M. The role of tumor necrosis factor, interleukin 6, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Progress in Neurobiol.* 56: 307 – 340, 1998.

MURPHY, S., SIMMONS, M. L., AGULLO, L., GARCIA, A., FEINSTEIN, D. L., GALEA, E., REIS, D. J., MINC-GOLOMB, D., SCHWARTZ, J. P. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *TINS*. 16: 323 – 328, 1993.

NAKAHATA, N., MARTIN, M. W., HUGHES, A. R., HEPLER, J. R., HARDEN, T. K. *Mol. Pharmacol.* 29: 188-195, 1986.

NAKAMURA, H.; MOROJI, T.; NOHARA, S.; NAKAMURA, H.; e OKADA, A. Effects of whole-body vibration stress on substance P and neurotensin-like immunoreactivity in the rat brain. *Environ. Res.* 52: 155-163, 1990.

NAKANISHI, S. Mammalian tachykinin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14: 123-136, 1991.

NELSON, R. J., KRIEGSFELD, L. J., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M. Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 18: 463-491, 1997.

NIKOLAUS, S., HUSTON, J. P., HASENÖHRL, R. U. reinforcing effects of neurokinin substance P in the ventral pallidum: mediation by the tachykinin NK₁ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 370: 93-99, 1999.

NGUYEN, K. T., DEAK, T., OWENS, S. M., KOHNO, T., FLESCNER, M., WATKINS, L. R., MAIER, S. Exposure to acute stress induces brain interleukin – 1 β protein in the rat. *J. Neurosci.* 18 (2): 2239 – 2246, 1998.

NGUYEN, K. T., DEAK, T., WILL, M. J., HANSEN, M. K., HUNSAKER, B. N., FLESCNER, M., WATKINS, L. R., MAIER, S. Timecourse and corticosterone sensitivity of the brain, pituitary, and serum interleukin-1 β protein response to acute stress. *Brain Res.* 859: 193 – 201, 2000.

NISTICO, G., CAROLEO, M. C., ARBITRIO, M., PULVIRENTI, L. Evidence for an involvement of dopamine D1 receptors in the limbic system control of immune mechanisms. *Neuroimmunomodulation.* 1: 174 – 180, 1994.

NOMURA, Y. A transient brain ischemia- and bacterial endotoxin-induced glial iNOS expression and NO-induced neuronal apoptosis. *Toxicol. Lett.* 102-103: 65-69, 1998.

NUSSDORFER, G. G. e MALENDOWICZ, L. K. Role of tachykinins in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides* 19(5): 949-968, 1998.

OEHME, P.; HECHT, K.; PRIESCHE, L.; MILSEM, M.E.; POPPEI, M. Substance P as a modulator of physiological processes. In: MORSAN, C.A.; TRACZYK, W.Z. (Eds.) *Neuropeptides and neural transmission*. New York: Raven Press, p. 73-84, 1980.

OTSUKA, M.; YOSHIOKA, L. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.*, 73: 229-308, 1993.

OWENS M.J. e NEMEROFF C.B. Physiology and pharmacology of corticotrophin releasing factor. *Pharmacological Reviews*, 43: 425-73, 1991.

PAGE, G. G., BEN – ELIYAHU, S., YIRMIYA, R., LIEBESKIND, J. C. Morphine attenuated surgery – induced enhancement of metastatic colonization in rats. *Pain*. 54: 21 – 28, 1993

PALMA, C., URBANI, F., MANZINI, S. Interleukin-6 production by U373 MG, a human astrocytoma cell line: different pathways involved in substance P and lipopolysaccharide activation. *J. Neuroimmunol.* 59: 155-163, 1995.

PALMA C., MANZINI, S. Substance P induces secretion of immunomodulatory cytokines by human astrocytoma cells. *J. Neuroimmunol.* 81: 127 – 137, 1998.

PALMA C., NARDELLI, F. MANZINI, S. Correlation between binding characteristics and functional antagonism in human glioma cells by tachykinin NK₁ receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 374: 435 – 443, 1999.

PALMA, C., MAGGI, C. A. the role of tachykinins via receptors in progression of human gliomas. *Life Sci.* 67: 985-1001, 2000.

PALMER, R. M. J., ASHTON, D. S., MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333: 664-666, 1988.

PAYAN, D. G.; BREWSTER, D. R.; MISSIRIAN-BASTIEN, A. e GOETZL, E. J. Substance P recognition of a subset of human T-lymphocytes, *J. Clin. Invest.* 74: 1532-1539, 1984.

PAPP, M.; VASSOUT, A.; GENTSCH, C. The NK₁-receptor antagonist NKP608 has an antidepressant-like effect in the chronic mild stress model of depression in rats. *Behav. Brain Res.* 115: 19-23, 2000.

PARNET, P., KELLEY, K. W., BLUTHÉ, R-M., DANTZER, R. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines induced sickness behavior. *J. Neuroimmunol.* 125: 5-14, 2002.

PATEL, H. H., HSU, A., GROSS, G.J. Attenuation of heat shock-induced cardioprotection by treatment with the opiate receptor antagonist naloxone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282 (6):H2011-7, 2002.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S., BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in rat. *J. Neurosci. Meth*, 14:149-167, 1985.

PERRONE, M. H.; LEPORE, R. D.; SHAIN, W. Identification and characterization of substance P receptors on LRM55 glial cells. *J. Pharmacol. Exper. Ther*, 238: 389-395, 1986.

PETITET, F.; SAFFROY, M.; TORRENS, Y.; LAVIELLE, S.; CHASSAING, G.; LOEUILLET, D.; GIOWINSKI, J.; BEAUJOUAN, J. C. Possible existence of a new tachykinin receptor subtype in the guinea pig ileum. *Peptides*, 13: 383-388, 1992.

PONCELET, M., GUENDET, C.; EMONDSALT, X.; BRELIÈRE, J. C.; LE FUR, G.; SOUBRIE, P. Turning behaviour induced in mice by neurokinin A receptor agonist: stereoselective blockade by SR 48968, a non-peptide receptor antagonist. *Neurosci. Lett.*, 149: 40, 1993.

PORSOLD, R. D., LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-732, 1977.

RADOJCIC, T.; BAIRD, S.; DARKO, D.; SMITH, D. E BULLOCH, K. Changes in β -adrenergic receptor distribution on immunocytes during differentiation: an analysis of T-cells and macrophages. *J. Neurosci. Res.* 30: 328-335, 1991.

RAFFA, R. B. Possible role (s) of neurokinins in CNS development and neurodegenerative or other disorders. *Neurosc. And Biobeh. Rev.*22: 789-813, 1998.

RANG, H. P. e DALE, M. M. *Farmacologia Seção 2 Mediadores Químicos* p. 83. Editora Guanabara-Koogan. Segunda edição, 1993.

RASO, G. M., MELI, R., GUALILLO, O., PACILIO, M., CARLO, R. D. Prolactin induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells. *J. Neuroch.* 73: 2272 – 2277, 1999.

REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHERE, J. C. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacological Reviews*, v. 46, n. 4, p. 551-589, 1994.

REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; COUTURE, R. New selective agonists for neurokinin receptors: pharmacological roots for receptor characterization. *TIPS*, 9: 290-295, 1988.

REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; D'ORLEANS-JUSTE, P. Receptors for substance P and related neurokinins. *Pharmacology*, 38: 1-15, 1989.

RIBEIRO, S. J., TEIXEIRA, R. M., CALIXTO, J. B., DE LIMA, T. C. M. Tachykinin NK₃ receptor involvement in the modulation of experimental anxiety in mice. *Neuropeptides*. 33: 181-188, 1999.

RIBEIRO, S. J., DE LIMA, T. C. M. Naloxone-induced changes in tachykinin NK₃ receptor modulation of experimental anxiety in mice. *Neurosci Lett* 258: 155-158, 1998.

RIBEIRO, R. L., DE LIMA, T. C. M. Participation of GABA_A receptors in the modulation of experimental anxiety by tachykinin agonists and antagonists in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psych.*, 2002.

RIBEIRO DA SILVA, A., HÖKFELT, T. Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons. *Neuropeptides* 34(5) 256-271, 2000.

RODGERS, R. J., CAO, B. J., HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 30: 204-299, 1997.

ROMEO, H. E., TIO, D. L., RAHMAN, S. U., CHIAPPELLI, F., TAYLOR, A. N. The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune to brain communication; relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. *J. Neuroimm.* 115: 91 – 100, 2001.

ROSÉN, A.; BRODIN, K.; ENEROTH, P. E BRODIN, E.; Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystinin in the peri-aqueductal grey and limbic regions of rat brain. *Acta Physiol. Scand.*, 146: 341-348, 1992.

ROTHWELL, N., HOPKINS, S. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *TINS*. 18(3):130 – 136, 1995.

RUFF, M. R.; WAHL, S. M. e PERT, C. B. Substance P mediated chemotaxis of human monocytes. *Peptides*. 6 (2): 107-111, 1985.

RUGARN, O., HAMMAR, M., THEODORSSON, A., THEODORSSON, E., STENFORS, C. Sex differences in neuropeptide distribution in the rat brain. *Peptides* 20: 81-86, 1999.

RUPNIAK, N., CARLSON, E. C., HARRISON, T., OATES, B., SEWARD, E., OWEN, S., DE FELIPE, C., HUNT, S. E WHEELDON, A. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK₁) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacol*, 39: 1413-1421, 2000.

RUPNIAK, N. e Kramer, M. Discovery of the ant-depressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK₁) antagonists. *Tips*, 20:485-490, 1999.

SANDERS, V. M. E STRAUB, R. H. Norepinephrine, the β -adrenergic receptor, and immunity. *Brain, Behav. and Immunity* . doi: 10.1006: 1-43, 2001.

SAKURADA, T.; YAMADA, T. SAKURADA, S.; KISARA, K. e OHBA, M. Substance P analogues containing D-histidine antagonize the behavioral effects of intrathecally co-administered SP in mice. *European J. Pharmacol.*, 174: 153-160, 1989.

SAKURADA, T.; YAMADA, T.; TAN-NO, K.; MANOME, Y.; SAKURADA, S.; KISAA, K.; OHBA, M. Differential effects of substance P analogs in NK₁ receptor agonists in the mouse spinal cord. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 259: 205-210, 1991.

SAMUELS, A., J. primary and secondary leucocyte changes following the intramuscular injection of epinephrine hydrochloride. *Journal of Clinical Investigation*. 30, 941-947. 1951.

SARAFINO, E. P. *Health psychology: Biopsychosocial Interactions* New York (3rd ed).Wiley, p. 70, 1998.

SARIA, A. The tachykinin NK₁ receptor in the brain: pharmacology and putative functions. *European J. Pharmacol.* 375: 51-60, 1999.

SASAI, Y.; NAKANISHI, S. Molecular characterization of rat substance L receptor and its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 695-702, 1989.

SAWCHENKO, P. E. e SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.* 205: 260-272, 1982.

SCAMMELL, T. E., ELMQUIST, J. K., SAPER, C. B. Inibition of nitric oxide synthase produced hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever. *American J. Physiol.* 271, R333-R338, 1996.

SCHEDLOWSKI, M. e BENSCHOP, R. J. Neuroendocrine system and immune functions in *Psychoneuroimmunology an Interdisciplinary Introduction*. Edited by SCHEDLOWSKI, M e Tewes, U. Kluver Academic /Plenum Publishers, New York, N.Y, 1999.

SCHEDLOWSKI, M. JACOBS, R., STRATMANN, G., RICHTER, S., HÄDICKE, A., TEWES, U., WAGNER, T. O. F., e SCHMIDT, R. E. Changes of natural Killer cells during acute psychological stress. *J. Clinical Immunol.* 13: 118-126, 1993.

SCHIMADA, S.; INAGAKI, S.; KUBOTA, Y.; KITO, S.; SHIOTANI, Y.; TOHYAMA, M. Coexistence of substance P- and enkephalin-like peptides in single neurons of the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 425: 256-262, 1987.

SEABROOK, G. R.; BOWERY, B.; HILL, R. G. Pharmacology of tachykinin receptors on neurones in the ventral tegmental area of rat brain slices. *European Journal of Pharmacology.* v. 273, p. 113-119, 1995.

SELYE H. A syndrome produce by diverse nocuous agents. *Nature*, 138:32, 1936.

SELYE H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin Endocrinol*,6: 117-230, 1946.

SELYE, H. Stress and disease. *Science*, 122: 625-31, 1955.

SHAIKH, M. B.; STEIBERG, A.; SIEGEL, A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive rage behavior in the cat. *Brain Res.*, 625: 283-294, 1993.

SHAVIT, Y. Stress induced immune modulation in animals: Opiates and endogenous opioid peptides. In R. Ader, D. L. Felten, N. Cohen (Eds.). *Psychoneuroimmunology* (2nd ed.). San Diego: Academic Press. p: 789 – 806, 1991.

SHI, Y.; DEVADAS, S., GREENELTCH, K. M., YIN, D., MUFSON, R. A. e ZHOU, J. - N. Stressed to death: Implication of lymphocyte apoptosis for psychoneuroimmunology. *Brain Behav. Immunity.* 17:S18-S26, 2003.

SHIGEMOTO, R.; YOKOTA, Y.; TSUCHIDA, K.; NAKANISHI, S. Cloning and expression of a rat neuromedin receptor cDNA. *J. Biol. Chem.*, 265: 623-628, 1990.

SHIRAYAMA, Y., MITSUSHIO, H., TAKASHIMA, M., ICHIKAWA, H., TAKASHI, K. Reduction of substance p after chronic anti-depressant treatments in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat. *Brain Res.* 739: 70-78, 1996.

SIEGEL, R. A., DUCKER, E. M., FUCHS, E., PAHNKE, U. E WUTTKE, W. Responsiveness of mesolimbic, mesocortical, septal and hippocampal cholecystinin and substance P neuronal system to stress in the male rat. *Neurochem. Int.*, 6: 783-789, 1984.

SPRENT, J. e TOUGH, D. F. Lymphocyte life-span and memory. *Science*, 265, 1395-1400, 1994.

STANISZ, A. M.; SCICCHITANO, R.; DAZIN, P.; BIENENSTOCK, J. e PAYAN, D. G. Distribution of substance P receptors murine spleen and Peyer patch T and B cells. *J. Immunol.*, 139; 749-754, 1987.

STRAUB, R. H., WESTERTMANN, J. e FALK, W. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immun. Today.* 19: 409 – 413, 1998.

SUNDELIN, J. B.; PROVEDINI, D. M.; WAHLESTEDT, C.; LAURELL, H.; POHL, J. S.; PETERSON, P. A. Molecular cloning of the murine substance K and substance P receptor genes. *Eur. J. Biochem.*, 203: 625-631, 1992.

TAKAMAYA, H., OTA, Z. E OGAWA, N. Effects of immobilization stress on neuropeptides and their receptors in rat central nervous system. *Regult. Pept.*, 15: 239-248, 1986.

TAKEDA, Y.; CHOU, K. B.; TAKEDA, J.; SACHAIS, B. S.; KRAUSE, J. E. Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179: 1232-1240, 1991.

TATEMOTO, K.; LUNDBERG, J. M.; JORNVALL, M.; MUTT, V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 128: 947-953, 1985.

TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R. S.; RIBEIRO, S. J.; CALIXTO, J. B.; RAE G. A e DE LIMA, T. C. M. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. *Eur J. Pharmacol.*, 311: 7-14, 1996.

TEIXEIRA, R. M., DE LIMA, T. C. M. Gender differences in the behavioral and immunological effects induced by substance P. XVI *Reunião Annual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (Fesbe) Abstract* 01.260:169, 2001.

TSCHÖPE, C.; PICARD, P.; CULMAN, N.J.; PRAT, A.; ITOI, K.; REGOLI, D.; UNGER, T. e COUTURE, R. Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioral effects of tachykinins on NK₁ and NK₂ receptors in the rat. *British J. Pharmacol.*, 107: 750-755, 1992.

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

UNGER, T. H.; CAROLUS, S.; DEMMERT, G.; GATEN, D.; LANG, R. E.; MASERGLUTH, C.; STEINBERG, H. e VEELKEN, R. Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ. Res.*, 63: 812-820, 1988.

VAN DER HART, M. G. C., CZÉH, B., BIURRUN, G., MICHAELIS, T., WATANABE, T., NATT, O., FRAHM, J., FUCHS, E. Substance P receptor antagonist and clomipramine prevent stress induced alterations in cerebral metabolites, cytogenesis in the dentate gyrus and hippocampal volume. *Mol. Psych.* 7: 933-941, 2002.

VASSOUT, A., VEENSTRA, S., HAUSER, K., OFNER, S., BRUGGER, F., SCHILLING, W., GENTSCH, C. NKP608: a selective NK₁ receptor antagonist with anxiolytic-like effects in the social interaction and social exploration test in rats. *Regulatory Pep.* 96: 7-16, 2000.

VON EULER, V.; GADDUM, J. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.*, 72: 74-87, 1931.

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

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

WEIHE, M. S.; FINK, T. e ZENTEL, H. J. Tachykinins, calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y in nerves of the mammalian thymus: interactions with mast cells in autonomic and sensory neuroimmunomodulation? *Neurosci. Letts*, 100: 77-82, 1989.

WIEDERMANN, C. J.; SERTL, K. E PERT, C. B. Substance P receptors in rat spleen: characterization and autoradiographic distribution. *Blood*, 68: 1398-1401, 1986.

WOLOSKI, B. M. R. J.; SMITH, E. M.; MEYER III, W. J.; FULLER, G. M. e BLALOCK, J. E. Corticotropin-releasing activity of monokines. *Science*. 230: 1035-1037, 1985.

WONG, M. L., LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 343-351, 2001.

YANG, W., KRUKOFF, T. L. Nitric oxide regulates body temperature, neuronal activation and interleukin-1 β gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus in response to immune stress. *Neuroph.* 39: 2075-2089, 2000.

YANG, E. V. e GLASER, R. *Int. Immunopharmacol.* Stress-induced immunomodulation and the implications for health. 2 (2-3):315-324, 2002.

YAMADA, K., NABESHIMA, T. Stress induced behavioral responses and multiple opioid systems in the brain. *Behav. Brain Res.* 67: 133-145, 1995.

YOKOTA, Y.; SASAI, Y.; TANAKA, K.; FUJIWARA, T.; TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R.; KAKIZUKA, A.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S. Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J. Biol. Chem.*, 264: 17649-17652, 1989.

YU, W. -J., LIAU, S-S., CHIN, W. – T., CHENG, J. – T. Effect of serum in medium on the expression of inducible nitric oxide synthase and superoxide dismutases in cultured C6 glioma cells. *Neurosci. Lett.* 261: 37-40, 1999.

ZHANG, Y., LU, L., FURLONGER, C., WU, G. E., PAIGE, C. J. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates b lymphopoiesis. *Nat. Immunol.* 1: 329-397, 2000.

ZERNIG, G., DIETRICH, M., MAGGI, C. A., SARIA, A. The substance P (NK₁) receptor antagonists (±) - CP- 96,345 causes sedation and motor impairment of Swiss albino mice in the black-and-white box behavioral paradigm. *Neurosci. Lett.*, 143: 169-172, 1992.

ZHOU, M., e HAWKINS, R. D. Long term depression: A learning related type of synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Reviews in the Neurosciences* 6 (3): 259 - 277. 1995.